

# **Die Expression und Regulation der CYP3A in menschlicher Haut**

**Deren mögliche Beteiligung am Vitamin D-Stoffwechsel als  
Ursache für die positive Selektion des CYP3A-Lokus in Europäern**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Dorothea Baranyai

Mainz, 2014

Tag der mündlichen Prüfung: 27. März 2014





Bibliographische Zusammenfassung .....	i
Abbildungsverzeichnis .....	iii
Tabellenverzeichnis .....	vi
Abkürzungsverzeichnis .....	vii
<b>Abstract .....</b>	<b>1</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>2</b>
<b>Einleitung .....</b>	<b>4</b>
Interindividuelle Variabilität der CYP3A.....	4
Natürliche Selektion des <i>CYP3A</i> -Lokus.....	6
Vitamin D-Metabolismus des Menschen .....	12
Aufbau der menschlichen Haut .....	22
CYP3A-Enzyme in der menschlichen Haut .....	24
Rolle der CYP3A im Vitamin D-Metabolismus .....	28
<b>Hypothese und Ziele der Arbeit.....</b>	<b>31</b>
<b>Material .....</b>	<b>33</b>
Allgemeines .....	33
Menschliches kutanes Probenmaterial.....	36
Studienkollektive mit bekannten Vitamin D- und Knochendichte-Status.....	37
Transgene <i>CYP3A5</i> -Luc-Mäuse .....	38
<b>Methodik .....</b>	<b>39</b>
Zellkultur .....	39
Gewebekultur menschlicher und muriner Haut.....	44
Molekularbiologische Methoden.....	45
Biochemische Methoden .....	57
Histologische Methoden .....	60
Datenanalyse.....	62

<b>Ergebnisse .....</b>	<b>65</b>
Charakterisierung der CYP3A und NR1I in menschlicher Haut.....	65
Regulation von CYP3A durch Vitamin D-Metaboliten .....	78
Expression von CYP3A und NR1I in psoriatischer Haut.....	86
Vitamin D-Metabolismus durch CYP3A-Enzyme .....	88
Einfluss des <i>CYP3A5</i> *3-Allels auf Vitamin D-Status und Knochendichte .....	92
<b>Diskussion.....</b>	<b>96</b>
CYP3A5 als dominantes CYP3A-Isozym in menschlicher Haut.....	96
Regulation der CYP3A-Expression durch Vitamin D-Metaboliten .....	99
Regulation der CYP3A-Aktivität durch Vitamin D-Metaboliten.....	104
Metabolismus der Vitamin D-Vorstufen durch CYP3A-Enzyme .....	105
Interindividuelle Variabilität der CYP3A in menschlicher Haut.....	109
Selektion der <i>CYP3A</i> -Lokus in Europäern .....	112
<b>Fazit .....</b>	<b>115</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>116</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>122</b>

### **Bibliographische Zusammenfassung**

Die praktischen Arbeiten der Dissertation wurden von Dezember 2010 bis Januar 2014 in den Laboren des Pharmakologischen Instituts der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt. Finanzielle Förderung erhielt diese Promotion von Dezember 2010 bis September 2013 durch die Studienstiftung des Deutschen Volkes.

Die schriftliche Arbeit umfasst 115 Seiten und gliedert sich in vier Teile. Einleitend steht eine Einführung in die für diese Arbeit relevante Literatur, die in die Beschreibung der Arbeitshypothese und der Ziele des Projekts überleitet. In den darauffolgenden Abschnitten zu Material und Methode werden eben diese ausführlich, möglichst eindeutig und nachvollziehbar beschrieben sowie spezielle Methoden in Versuchsprinzip und Aufbau kurz erläutert. Es folgt die Darstellung der Ergebnisse in Wort und Bild und gemäß der zu beantwortenden Fragestellungen in einzelne Sinneinheiten gegliedert. Jedes Unterkapitel beschäftigt sich mit einem Teilaspekt, den es zur Bearbeitung der Hypothese bedarf. Der vierte und letzte Abschnitt ordnet die beschriebenen Ergebnisse in den Kontext des bisherigen Wissenstands ein und diskutiert deren Bedeutung für die Hypothese dieser Arbeit sowie für aktuelle und zukünftige Forschung zur Rolle der CYP3A-Enzyme in menschlicher Haut und dem Vitamin D-Metabolismus. Zuletzt folgt das Fazit.

In Zeitraum dieser Arbeit wurden insgesamt folgende Tagungsbeiträge veröffentlicht:

Baranyai D., Gödtel-Armbrust, U., Nestler, S., Wojnowski, L. 2013. The role of CYP3A enzymes in human skin. 2. *Skin Metabolism Meeting*. pp. 21. Valbonne, Frankreich (Posterpräsentation)

Baranyai, D., Muro, E., Gödtel-Armbrust, U., Schirmer, M., Kisanga, E., Diczfalusy, U., Fillekes, Q., Schuurman, R., Burger, D. & Wojnowski, L. 2013. The reduction of nevirapine-driven HIV mutations by carbamazepine is modulated by CYP3A activity. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **386**: S6 (Vortrag bei der 79. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Halle)

Baranyai, D., Nem, D., Qiu, H., Gödtel-Armbrust, U., Nestler, S. & Wojnowski, L. 2012. Pregnane X receptor and yin yang 1 contribute to the differential tissue expression and induction of CYP3A5 and CYP3A4. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **385**: S8 (Vortrag bei der 78. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Dresden)

Zudem wurden Beiträge zu folgenden Publikationen geleistet:

Baranyai, D., Muro, E., Gödtel-Armbrust, U., Schirmer, M., Kisanga, E., Diczfalusy, U., Fillekes, Q., Schuurman, R., Burger, D. & Wojnowski, L. 2013. The reduction of nevirapine-driven HIV mutations by carbamazepine is modulated by CYP3A activity (in Überarbeitung für *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*)

Nem, D., Baranyai, D., Qiu, H., Gödtel-Armbrust, U., Nestler, S. & Wojnowski, L. 2012. Pregnane X receptor and yin yang 1 contribute to the differential tissue expression and induction of CYP3A5 and CYP3A4. *PLoS One* **7**: e30895.

Mathäs, M., Burk, O., Qiu, H., Nussag, C., Gödtel-Armbrust, U., Baranyai, D., Deng, S., Römer, K., Nem, D., Windshügel, B. & Wojnowski, L. 2012. Evolutionary history and functional characterization of the amphibian xenosensor CAR. *Mol Endocrinol* **26**: 14-26.

### Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Weltweite Verteilung der Allelfrequenzen von <i>CYP3A4</i> *1B und <i>CYP3A5</i> *3 .....	5
Abb. 2: Bedeutende genetische Popymorphismen des <i>CYP3A</i> -Lokus und deren Kopplung.....	8
Abb. 3: Selektionsparameter des <i>CYP3A</i> -Lokus bei Europäern .....	9
Abb. 4: Vitamin D-Syntheseweg in Haut, Leber und Niere unter Angabe der möglichen Beteiligung der <i>CYP3A</i> -Enzyme .....	14
Abb. 5: 25-Hydroxyvitamin D-Konzentration bei nicht-humanen Primaten und dem modernen Menschen .....	16
Abb. 6: Messareale zur Knochenmineraldichtemessung des Hüftgelenks und deren Zusammenhang mit T- und Z-Werten.....	18
Abb. 7: Hautfarbe endogener Bevölkerungen weltweit .....	21
Abb. 8: Aufbau der menschlichen Haut (Teil 1).....	23
Abb. 9: Aufbau der menschlichen Haut (Teil 2).....	24
Abb. 10: Schematische Darstellung der Arbeitshypothese .....	32
Abb. 11: Prinzip des 2-Hybrid-Systems.....	44
Abb. 12: Graph zur allelischen Diskriminierung mittels Hybridisierungssonden .....	51
Abb. 13: Prinzip und Spezifizität der Lumineszenz-basierten Methode zur Untersuchung der CYP-Enzymaktivität.....	58
Abb. 14: Expression der <i>CYP3A</i> in unterschiedlichen Hautschichten männlicher Präputien .....	65
Abb. 15: mRNA-Expression der <i>CYP3A</i> in menschlichem Gewebe .....	67
Abb. 16: Anteilige Expression der <i>CYP3A</i> -Isozyme in Haut und Leber .....	68
Abb. 17: Repräsentativer Proteinnachweis der <i>CYP3A</i> in humaner Haut.....	69
Abb. 18: Korrelation der RNA- und Proteinmenge von <i>CYP3A5</i> und <i>CYP3A4/7</i> in humaner Haut .....	69
Abb. 19: Proteinnachweis von <i>CYP3A5</i> in verschiedenen humanen Organen .....	70
Abb. 20: Immunhistologische Lokalisierung von <i>CYP3A4/7</i> und <i>CYP3A5</i> in menschlicher Haut.....	71
Abb. 21: Immunhistologische Lokalisierung von <i>CYP3A4/7</i> und <i>CYP3A5</i> in epidermalen Hautadnexen.....	72
Abb. 22: mRNA- und Proteinmenge in menschlichen Hautproben in Abhängigkeit vom <i>CYP3A5</i> *3-Genotyp.....	73
Abb. 23: <i>in vivo</i> -Biolumineszenz in unbehaarter Haut von <i>CYP3A5</i> -Luc-Mäusen.....	75
Abb. 24: Viabilität und Luziferaseaktivität kultivierter Haut der <i>CYP3A5</i> -Luc-Maus.....	76

Abb. 25: mRNA-Expression der nukleären Rezeptoren der NR1I-Familie - VDR, CAR und PXR - in humanem Gewebe.....	77
Abb. 26: Anteilige Expression der NR1I - VDR, PXR und CAR - in Leber und Haut.....	78
Abb. 27: Induktion der mRNA-Expression endogener CYP3A in HaCaT-Zellen durch Vitamin D-Metaboliten .....	79
Abb. 28: Konzentrationsabhängige Regulation der endogenen CYP3A-Expression durch 25-VD und 1,25-VD in HaCaT .....	80
Abb. 29: Induktion der CYP3A-Expression durch Vitamin D-Metaboliten in primären Keratinozyten.....	81
Abb. 30: Vitamin D-abhängige Aktivität der proximalen CYP3A-Promotoren im Reporter-gen-Assay .....	83
Abb. 31: Vitamin D-abhängige Interaktion des VDR mit RXR $\alpha$ im 2-Hybrid-System. ....	84
Abb. 32: Dosisabhängigkeit der VDR-vermittelten Induktion durch ausgewählte Vitamin D-Metaboliten .....	85
Abb. 33: Viabilität der HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung und Behandlung mit Vitamin D-Metaboliten .....	86
Abb. 34: CYP3A-Expression in psoriatischer und gesunder Haut.....	87
Abb. 35: Expression der NR1I mRNA in psoriatischer und gesunder Haut.....	88
Abb. 36: Regulation der CYP3A4-Aktivität .....	89
Abb. 37: Regulation der Aktivität von CYP3A5 und CYP3A7 .....	90
Abb. 38: Detektion der Vitamin D-Metaboliten mit UV-HPLC .....	91
Abb. 39: Einfluss des CYP3A5*3-Genotyps auf den Vitamin D-Status zweier europäischer Studienpopulationen .....	93
Abb. 40: Einfluss des CYP3A5*3-Genotyps auf die Knochendichte der Wirbelkörper und der Hüfte.....	93
Abb. 41: Saisonale Variabilität des 25-Hydroxyvitamin D-Spiegels der Göttinger Studienpopulation.....	95
Abb. 42: Erkenntnisse zur Metabolisierung von 7-Dehydrocholesterol und Vitamin D <sub>3</sub> durch CYP3A-Enzyme.....	106
Abb. S 1: Substanz-abhängige Aktivität der proximalen CYP3A-Promotoren im Reporter-gen-Assay .....	118
Abb. S 2: Aktivierung nukleärer Rezeptoren der 1I-Familie durch Vitamin D-Metaboliten.....	118
Abb. S 3: CYP3A5-mRNA-Expression in primären Keratinozyten nach CYP3A5*3-Genotyp .....	119

Abb. S 4: Expression von CYP3A4 und CYP3A5 in läsionaler und unbetreffener  
Haut psoriatischer Patienten..... 119

Abb. S 5: UV-Chromatogramme der Inkubation rekombinant exprimierter rCYP3A-  
Isozyme mit 25-Hydroxyvitamin D und 7-Dehydrocholesterol ..... 120

Abb. S 6: UV-Chromatogramme der Inkubation rekombinant exprimierter rCYP3A-  
Isozyme mit Vitamin D..... 121

Abb. S 7: Expression von CYP3A5 und CYP3A7 in 96 humanen Hautbiopsien ..... 121

**Tabellenverzeichnis**

Tab. 1: Isomerisierung von Prä-Vitamin D zu Vitamin D in Anhängigkeit von Temperatur und Zeit (Bognar 1992) .....	13
Tab. 2: Definitionen der Knochengesundheit anhand der T- und Z-Werte aus Messungen der Knochenmineraldichte .....	19
Tab. 3: Zusammenhang von 25-Hydroxyvitamin D-Spiegel mit Breitengrad und Jahreszeit (Ross et al. 2011) .....	20
Tab. 4: Plasmide .....	33
Tab. 5: Vitamin D-Metaboliten .....	35
Tab. 6: Antikörperliste.....	35
Tab. 7: Rekombinante Proteine .....	36
Tab. 8: Menschliche Hautproben.....	37
Tab. 9: Zusammenhang zwischen Filterwirkung und Anzahl der verwendeten Lagen des Filters bei der UVB-Bestrahlung .....	41
Tab. 10: Zusammenhang von Strahlendosis und Bestrahlungsdauer bei konstanter Strahlungsintensität (~0,1 mW/cm <sup>2</sup> ) .....	42
Tab. 11: Primer und Sonden zur Quantifizierung der mRNA-Expression in humanem Probenmaterial.....	47
Tab. 12: Primer zur Genotypisierung transgener <i>CYP3A5</i> -Luc-Mäuse .....	50
Tab. 13: Primer und Hybridisierungssonden zur Bestimmung des humanen <i>CYP3A5</i> *3-Genotyps.....	51
Tab. 14: Übersicht der Genotypdaten humaner Hautspender am SNP rs776746 .....	73
Tab. 15: Individuelle Daten der Induktion der CYP3A durch Vitamin D-Metaboliten in primären Keratinozyten.....	82
Tab. 16: Profil verschiedener Vitamin D-Vorstufen und -Metaboliten in Anwesenheit verschiedener rCYP3A-Enzyme .....	92
Tab. 17: Genotypdaten zweier europäischer Studienpopulation am SNP rs776746.....	93
Tab. 18: Zusammenfassung der ermittelten EC <sub>50</sub> -Werte der Vitamin D-vermittelten Effekte .....	103
Tab. S 1: Verfügbare Parameter zweier europäischer Studienpopulationen.....	116
Tab. S 2: Einbettprogramme histologischer Schnitte .....	117

### Abkürzungsverzeichnis

VD	Vitamin D
25-VD	25-Hydroxyvitamin D, Calcidiol
1,25-VD	1,25-Dihydroxyvitamin D, Calcidiol
7-DHC	7-Dehydrocholesterol
Chol.	Cholesterol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
sec	Sekunde/n
min	Minute/n
h	Stunde/n
RT	Raumtemperatur (nicht in Verbindung mit qRT-PCR)
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> , Einzelbasenaustausch
CYP	Zytochrom P450
VDR	Vitamin D-Rezeptor, NR1I1
PXR	Pregnan X-Rezeptor, NR1I2
CAR	konstitutiver Androstan-Rezeptor, NR1I3
SV	Splicevariante
RXR $\alpha$	Retinoid X-Rezeptor alpha, <i>NR2B1</i>
rpm	<i>rotations per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
g	Normalbeschleunigung mit $g = 9,80665 \text{ m/s}^2$
mind.	mindestens
Vol	Volumen, Volumina
rCYP3A	rekombinantes, heterolog exprimiertes CYP3A
rCYB5	rekombinantes, heterolog exprimiertes Zytochrom b <sub>5</sub>
gDNA	genomische DNA
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i> , Hanks ausgeglichene Salzlösung
DPBS	Dulbeccos Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
RLU	<i>relative light units</i> , relative Lichteinheiten
AK	Antikörper
WB	Western Blot, Immunoblot
DEPC	Diethylpyrocarbonat
bp	Basenpaare
kb	Kilobasenpaare
GITC	Guanidinthiocyalat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
HE	Hämalaun-Eosin, im Zusammenhang histologischer Färbungen
ns	nicht signifikant, $P > 0,05$
na	<i>not available</i> , nicht verfügbar
MAF	<i>minor allele frequency</i> , Allelfrequenz des abgeleiteten Allels relativ zum humanen Referenzgenom hg19
RPKM	<i>reads per kilobase per million mapped reads</i> , Einheit der mRNA-Expressionsdaten mittels RNA-seq
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Detektion durch Massenspektrometrie
DXA	<i>dual-energy x ray absorptiometry</i> , Dual-Röntgen-Absorptiometrie
BMD	<i>bone mineral density</i> , Knochenmineraldichte



## Abstract

In the liver and small intestine CYP3A enzymes metabolize the vast majority of xenobiotics taken up by the human body. However, these enzymes are also expressed in other organs, including skin. Neither the exact isozyme composition nor the physiological role of the cutaneous CYP3A expression are known. Based on limited *in vitro* data, CYP3A could play a role in the cutaneous synthesis of vitamin D. CYP3A could also catalyze the cutaneous drug metabolism of topically or systemically applied drugs. In this capacity, CYP3A could contribute to immunologic and non-immunologic adverse drug reactions, up to 45 % of which manifest in human skin. Besides, a number of genetic approaches locate signatures of positive selection to the *CYP3A* locus, however the driving force remains unclear.

The working hypothesis of this project was that CYP3A regulate the cutaneous synthesis of vitamin D. In this role CYP3A expression underwent purifying selection in European populations to prevent vitamin D deficiency and bone malformations like rickets and osteomalacia.

The expression and regulation of CYP3A was investigated in skin samples, in a skin-derived cell line and in primary skin cells, and in transgenic mice. The metabolic activity of CYP3A towards cutaneous vitamin D precursors was addressed by means of recombinant enzymes. CYP3A5-mRNA was the most abundant CYP3A in human skin biopsies, exceeding CYP3A4-mRNA 3- and CYP3A7 130-fold, and corresponding, respectively, to 1.3 %, 0.01 % and less than 0.01 % of the these genes' hepatic expression levels. The expression of CYP3A43-mRNA was negligible. CYP3A5 was bi-modally expressed both on mRNA and protein level, with carriers of the expresser allele \*1 showing a 3.3-fold higher mRNA, and a 1.8-fold higher protein expression than homozygous carriers of the \*3 allele. CYP3A4/7- and CYP3A5-proteins localized mainly to the keratinocytes of the epidermis as well as to the sebaceous glands, i. e. to areas of vitamin D synthesis. The cutaneous expression of CYP3A5 was also observed in transgenic mice carrying a luciferase reporter gene under the control of a human *CYP3A5* promoter. Compared to the liver, the vitamin D receptor (VDR) expression was 100-fold higher, that of CAR comparable, and that of PXR negligible. Correspondingly, CYP3A expression was increased by 1,25-dihydroxyvitamin D, the active vitamin D, and its precursors except of 7-dehydrocholesterol, but not by rifampicin. As revealed by two-hybrid assays, the response to 1,25-dihydroxyvitamin D and its precursors was mediated via VDR. Its magnitude was cell donor-, cell passage-, and cell type-dependent. All three CYP3A isozymes metabolized vitamin D to (an) unknown metabolite(s) different from 25-hydroxyvitamin D, the immediate precursor of the active vitamin D. Taken together, these data suggest that cutaneous CYP3A, predominantly CYP3A5, may regulate the vitamin D homeostasis via VDR-mediated induction of its metabolism. The assessment of clinical effects of the CYP3A expression status clinical phenotypes such as rickets should follow.

## Zusammenfassung

In Leber und Dünndarm bauen CYP3A-Enzyme eine Vielzahl von Fremdstoffen ab, die in den Körper gelangt sind. Zudem aber sind diese Enzyme auch in anderen Organen, wie der Haut exprimiert. Doch weder die genaue Zusammensetzung der CYP3A-Isozyme noch deren physiologische Rolle in der Haut sind bisher bekannt. Basierend auf begrenzten *in vitro*-Daten ist eine Rolle der CYP3A in der kutanen Vitamin D-Synthese denkbar. Auf der anderen Seite könnten die kutanen CYP3A auch lokal oder systemisch verabreichte Medikamente in der Haut verstoffwechseln und so zur Entstehung immunologischer und nicht-immunologischer unerwünschter Arzneimittelwirkungen beitragen, von denen sich bis zu 45 % in der Haut manifestieren.

Die Arbeitshypothese dieses Projekts war, dass die CYP3A die kutane Synthese von Vitamin D regulieren. In dieser Funktion wurden sie zur Vermeidung von Vitamin D-Mangel-Erkrankungen wie Rachitis oder Osteomalazie in Europäern negativ selektiert.

Die Expression und Regulation der CYP3A wurde in Hautbiopsien, einer Zelllinie epidermalen Ursprungs und primären Hautzellen wie auch in transgenen Mäusen untersucht. Die metabolische Aktivität der CYP3A gegenüber den kutanen Vitamin D-Vorstufen wurde mit Hilfe rekombinant exprimierter Enzyme untersucht. CYP3A5-mRNA war die häufigste der CYP3A in humanen Hautproben und überstieg die von CYP3A4 um das Dreifache, die von CYP3A7 um das 130-Fache. Damit entsprach diese 1,3 %, 0,01 % bzw. 0,01 % der jeweiligen hepatischen Genexpression. Die Expression von CYP3A43 war zu vernachlässigen. CYP3A5 zeigte eine bimodale Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. So zeigten Träger der Wildtyp-Allels \*1 eine 3,3-fach höhere mRNA- und 1,8-fach höhere Proteinmenge als homozygote Träger des Nullallels \*3. CYP3A4/7- und CYP3A5-Protein wurde v. a. in den Keratinozyten der Epidermis und den Talgdrüsen, also den Bereichen der kutanen Vitamin D-Synthese lokalisiert. Die CYP3A5-Expression wurde ferner in der Haut transgener Mäusen gezeigt, die das Reportergen Luziferase unter Kontrolle des humanen *CYP3A5*-Promoters exprimieren. Verglichen mit der Leber war die kutane Expression des Vitamin D-Rezeptors (VDR) 100-fach höher, die der Xenosensoren CAR und PXR vergleichbar bzw. zu vernachlässigen. Dementsprechend erhöhte die Behandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D, dem aktiven Vitamin D-Hormon, und dessen Vorstufen außer 7-Dehydrocholesterol, jedoch nicht der PXR-Ligand Rifampicin, die Expression der CYP3A. Wie in Zwei-Hybrid-Experimenten gezeigt, wurden die Effekte des 1,25-Dihydroxyvitamin D und dessen Vorstufen alleinig durch VDR vermittelt. Die Effektstärke hingegen war abhängig von Zellspender, Zellpassage und Zelltypus. Alle drei CYP3A-Isozyme metabolisieren Vitamin D zu einem oder mehreren unbekanntem Metaboliten, jedoch nicht zu 25-Hydroxyvitamin D, dem direkten Vorläufer des aktiven Vitamin D.

Zusammengefasst legen die Daten nahe, dass die kutanen CYP3A, allen voran CYP3A5, die Vitamin D-Homöostase durch VDR-vermittelte Induktion des Abbaus von Vitamin D-

Vorstufen regulieren. Dies zusammen mit Sequenzdaten liefert starke Indizien für Vitamin D als treibende Kraft der Selektion des *CYP3A*-Lokus in Europäern. Der Einfluss der *CYP3A*-Expression auf selektiv wirksame, klinisch relevante Knochenveränderungen wie Rachitis oder Osteomalazie müssen folgen.

## Einleitung

Zytochrom P450 Monooxygenasen (CYP) bilden das wichtigste enzymatische System des sogenannten Phase I-Stoffwechsels zahlreicher endogener und exogener Substanzen. CYP3A-Enzyme, allen voran CYP3A4 und in kleinerem Umfang CYP3A5 und CYP3A7, besitzen ein breites Substratspektrum und bauen 45 bis 60 % der heute eingesetzten Medikamente ab. Arzneiinteraktionen mit Beteiligung von CYP3A gehören zu den wichtigsten in der heutigen Medizin (Wilkinson 2005).

*In vivo* wurden die Proteine CYP3A4, CYP3A5 und CYP3A7 hauptsächlich in der Leber und im Dünndarm nachgewiesen (Koch et al. 2002, Daly 2006). Darüber hinaus sind diese Enzyme auch in anderen Organen, wie der Haut exprimiert (Baron et al. 2001, Smith et al. 2003, Yengi et al. 2003). Doch weder die genaue Zusammensetzung der CYP3A-Isozyme noch deren interindividuelle Variabilität oder physiologische Rolle in der Haut sind bisher bekannt. Basierend auf begrenzten *in vitro* Daten könnten CYP3A eine Rolle in der kutanen Vitamin D-Synthese spielen. Auf der anderen Seite verstoffwechseln die kutanen CYP3A möglicherweise auch topisch oder systemisch verabreichte Medikamente in der Haut. Dabei führten sie zur Entstehung immunologischer und nicht-immunologischer unerwünschter Arzneimittelwirkungen, von denen sich bis zu 45 % in der Haut manifestieren (Nayak & Acharjya 2008). Meist nehmen diese einen milden Verlauf und heilen spontan ab, doch in 2 % der Fälle kommt es zu massiven Reaktionen mit in den seltensten Fällen tödlichem Ausgang (Nayak & Acharjya 2008). Fast jedes Medikament kann diese Reaktionen verursachen, und so zeigen nicht-steroidale Entzündungshemmer (NSAIDs), Antibiotika und Antiepileptika eine Ausbruchsrate von 1-5 % (Bigby 2001).

Zunächst soll im Folgenden die Datenlage aus der Literatur zur Expression, Regulation und Aktivität der CYP3A der Haut beschrieben werden. Auch eine Beschreibung der Haut selbst sowie deren Beteiligung an der Synthese von Vitamin D (VD) folgt. Abschließend werden Kenntnisse über die Beteiligung der CYP3A-Enzyme am VD-Metabolismus dargestellt.

## Interindividuelle Variabilität der CYP3A

Im menschlichen Genom befinden sich vier *CYP3A*-Gene, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7* und *CYP3A43*, in einem 231 kb Cluster auf Chromosom 7q21-22.1 (Gellner et al. 2001). Ihre Anordnung lässt die Entstehung durch Tandem-Duplikationsereignisse aus einem 40 bis 55 kb großen ancestralen Gen vermuten, was durch eine phylogenetische Analyse von Primaten-*CYP3A* bestätigt wurde (Qiu et al. 2008).

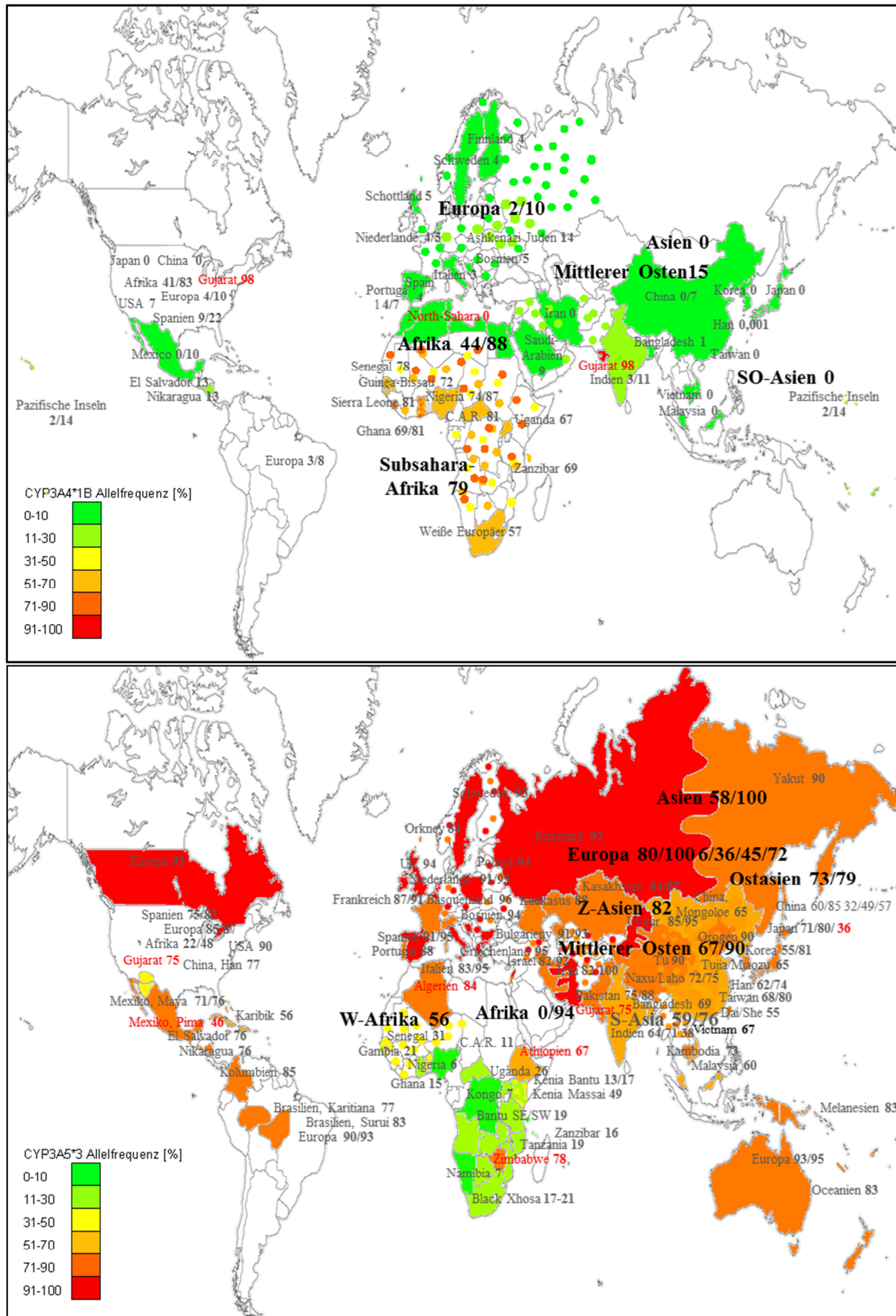


Abb. 1: Weltweite Verteilung der Allelfrequenzen von *CYP3A4\*1B* und *CYP3A5\*3*

Die Allelfrequenzdaten stammen aus Publikationen des Zeitraums 2002 bis 2011. Dies waren > 250 Studien für *CYP3A5\*3* (unten) und > 120 für *CYP3A4\*1B* (oben). Gezeigt sind die Bezeichnung der untersuchten Populationen mit der jeweils beschriebenen Spanne der Allelfrequenzen. Für eine bessere Übersichtlichkeit wurden Regionen gemäß der beschriebenen Allelfrequenzen der in Europa selteneren Variante anhand einer Farbskala eingefärbt.

CYP3A4 wurde in der Leber bei allen bisher untersuchten Individuen allerdings in sehr variablen Mengen detektiert. Das *CYP3A4\*1B*-Allel (rs2740754, Rebbeck et al. 1998) verdoppelt die hepatische CYP3A4-Expression, was jedoch nur einen Teil seiner interindividuellen Expressionsvariabilität erklärt (Schirmer et al. 2006). Nahezu abwesend in der Population weißer Europäer, mit einer Allelfrequenz von maximal 4 %, ist es das Hauptallel mit 66 bis 83 % innerhalb Afrikas (Abb. 1 oben).

CYP3A5 wird polymorph, d. h. nur in manchen Individuen exprimiert, wofür das *CYP3A5\*1*-Allel verantwortlich ist (Hustert et al. 2001a, Kuehl et al. 2001, Burk et al. 2002). Bisher sind drei sogenannte *low expresser* Allele bekannt, die zu einer reduzierten CYP3A5-Expression führen; neben dem häufigsten \*3-Allel (rs776746, Kuehl et al. 2001) sind es in afrikanischen Populationen zudem zwei weitere Allele \*6 (rs10264272, Kuehl et al. 2001) und \*7 (rs4130333, Hustert et al. 2001a). Diese verringern die Zahl der Hochexprimierer in Afrika auf bis zu 40 % (Bains et al. 2013). Die Entstehung des \*3- respektive \*6-Allels wird auf 2388 und 6825 Generationen vor heute, also auf etwa 75.000 bzw. 220.000 Jahre datiert (Bains et al. 2013). Die sehr unterschiedlichen Häufigkeiten des *CYP3A5\*1*-Allels in Europa und Afrika sind fast identisch mit denen des *CYP3A4\*1B*, was auf eine Kopplung zwischen diesen Allelen zurückzuführen ist (Hustert et al. 2001a, Kuehl et al. 2001, Thompson et al. 2004, Semiz et al. 2011). Klinisch relevant ist die CYP3A5-Expression für die Dosierung des Immunsuppressivums Tacrolimus, die bei Trägern des *CYP3A5\*1*-Alleles erhöht werden muss (Wallemacq et al. 2009).

CYP3A7 wird normalerweise nur pränatal exprimiert. Das exklusiv in Europa detektierte *CYP3A7\*1C*-Allel (Kuehl et al. 2001) umfasst sieben Basenaustausche im Promotor und ist verantwortlich für die postnatale Persistenz der CYP3A7-Expression bei 10-20 % der Europäer (Wojnowski & Kamdem 2006). Etwa 1 % der weißen Europäer trägt gleichzeitig sowohl *CYP3A5\*1* als auch *CYP3A7\*1C* und exprimiert beide Proteine. Aufgrund des sehr geringen mRNA-Expressionsniveaus (Koch et al. 2002) sowie des fehlenden Nachweises eines funktionellen Proteins *in vivo* gilt *CYP3A43* als Pseudogen.

### Natürliche Selektion des *CYP3A*-Lokus

Die genetische Variabilität auf Populationsebene ermöglicht schnelle Anpassungen an Änderungen der Umweltbedingungen und spielt dadurch eine entscheidende Rolle im Überleben einer Spezies. Bei geänderten Umweltbedingungen werden vorteilhafte Genotypen überproportional an die Folgegeneration weitergegeben, was als positive bzw. adaptive Selektion bezeichnet wird.

Die ausgeprägten, zunehmend gut dokumentierten Unterschiede in Allelhäufigkeiten zwischen unterschiedlichen Ethnien des Menschen resultieren demzufolge entweder aus adaptiven Selektionsprozessen im Laufe der Besiedlung von geographischen Erdregionen der letzten 60.000 Jahre (Jobling 2004, u. A. S. 283, 289). Dem gegenüber stehen zufällige Prozesse (genetischer Drift), die den Genpool einer Population v. a. in kleinen,

migrierenden Sub-Populationen im Zuge eines sogenannten genetischen Flaschenhalses oder Gründereffekts verändern und somit nicht adaptiv sondern demographisch begründet sind. Eines der anerkanntesten Beispiele positiver Selektion ist die Aufhellung der Hautfarbe (Sturm & Duffy 2012, Liu et al. 2013). Die Hellhäutigkeit entstand mit der Migration des anatomisch modernen Menschen aus Afrika, höchst wahrscheinlich um die verminderte kutane Synthese von Vitamin D<sub>3</sub> (VD<sub>3</sub>) in nördlichen Breitengraden zu kompensieren (Robins 2009, Sturm & Duffy 2012). Genetisch kann die beginnende Selektion depigmentierender Genmutationen auf etwa 30.000 Jahre vor heute und für europa- bzw. asienspezifische Mutationen auf die vergangenen 11.000-19.000 Jahre datiert werden (Beleza et al. 2013). Das Hautpigment Melanin fängt die für die VD<sub>3</sub>-Synthese notwendigen Photonen der UVB-Strahlung ab (Sturm & Duffy 2012), deren Intensität mit der Entfernung vom Äquator abnimmt (Clemens et al. 1982). Als selektierender Phänotyp wird die VD-Mangelerkrankung Rachitis angenommen. Diese Knochenerkrankung führt bereits im Kindesalter unter anderem zur Verkürzung des Beckens entlang der Tiefenachse - eindrucksvoll illustriert durch Vieth (Vieth 2003). Letztlich kann dies u. A. die perinatale Sterblichkeit erhöhen und damit die Weitergabe u. a. von mit Rachitis assoziierten Allelen reduzieren (Aoki 2002, Jobling 2004, S. 409).

Die klinische Relevanz dieser Anpassung wird veranschaulicht durch den VD-Mangel bei dunkelhäutigen Afrikanern, die in nördliche Breitengrade migrieren. So betrug die Serumkonzentration des 25-Hydroxyvitamin D (25-VD), Marker für den VD-Status, bei Schwarzafrikanern im Mittel 29 pg/ml in Zaire und nur noch 9 pg/ml nach der Migration nach Belgien (M'Buyamba-Kabangu et al. 1987). Laut Daten des Robert-Koch-Instituts zur in Deutschland lebenden Bevölkerung zeigten auch Kinder von Migranten häufiger VD-Mangel als deutschstämmige Kinder (Hintzpeter et al. 2008). VD-Mangel führt nachweislich zu rachitischen Knochenveränderungen (Holick 2009), könnte aber auch zur hohen Prävalenz von Prostatakrebs bei Afrikanern beitragen, da diese Krebsform durch VD beeinflusst wird (Schwartz 2005). Diese und ähnliche Beobachtungen bilden den Forschungsschwerpunkt der evolutionären Medizin, die nach krankheitsprädisponierenden Genvarianten in den vorangegangenen adaptiven Prozessen der betreffenden ethnischen Gruppe sucht. Die Bedeutung dieser Forschungsrichtung nimmt im Hinblick auf die zunehmende Globalisierung und Mobilität des Menschen zu.

Bereits vor fast zehn Jahren wurden basierend auf Sequenzanalysen Signaturen positiver Selektion für den *CYP3A*-Lokus beschrieben, die nahelegen, dass die heutig beobachtete interindividuelle Variabilität dieser medikamentenabbauenden Enzymfamilie (Abb. 1) durch evolutionäre Kräfte verursacht wurde (Thompson et al. 2004, Schirmer et al. 2006, Chen et al. 2009). Diese Untersuchungen polymorpher Genotypdaten, sog. SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) zeigen lange Blöcke von SNPs, die gekoppelt vererbt werden und für *selective sweeps*, für selektive Verschiebungen des Genpools einer Population typisch sind. Der größte Grad der Kopplung und die längsten gekoppelten Abschnitte des *CYP3A*-Lokus (Abb. 2) wurden bei Europäern so bereits 2006 identifiziert (Schirmer et al.

2006), was sich auch anhand neuerer Daten in einem deutlich erhöhten XP-EHH am *CYP3A*-Lokus für die europäische Referenz-Population (CEU) bestätigte (Abb. 3). Die XP-EHH (*Cross Population Extended Haplotype Homozogosity*, Sabeti et al. 2007) ist ein vergleichender Messwert der Homozygotie der Haplotypen zweier Populationen (XP-EHH CEU vs. CHB bzw. CEU vs. YRI in Abb. 3) und gibt ein quantitatives Maß für den Grad der positiven Selektion. Dieser Parameter, wie auch andere sind aktuell im Genombrowser UCSC integriert (Pybus et al. 2013) und können sowohl als berechnete Rohdaten wie auch als genomweit normiert Rang-Werte (*rank scores*) dargestellt werden. Auf einer Skala von 0 bis 3,5 gilt für letztere vereinfacht gesprochen: je höher der Rang-Wert, desto stärker bzw. wahrscheinlicher ist die Signatur positiver Selektion des entsprechenden Locus und dies unabhängig vom zugrundeliegenden Parameter.

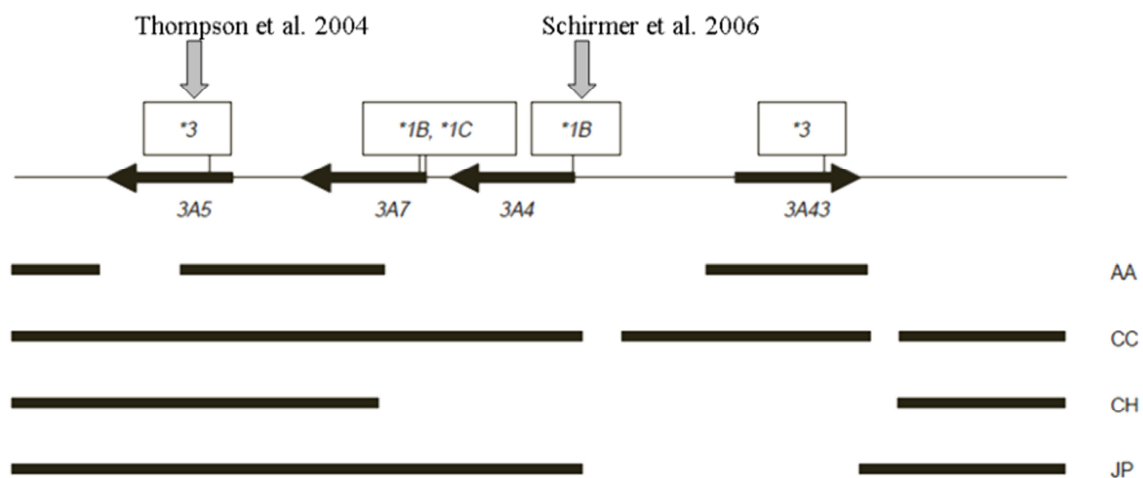


Abb. 2: Bedeutende genetische Polymorphismen des *CYP3A*-Lokus und deren Kopplung  
 Oben ist der *CYP3A*-Lokus des Menschen mit den bisher bedeutendsten Polymorphismen gezeigt. Gekennzeichnet sind die putativ selektierten Polymorphismen nach Thompson et al. (2004) und Schirmer et al. (2006). Horizontale Linien deuten die Lokalisierung der Kopplungsböcke innerhalb des *CYP3A*-Lokus bei Amerikanern afrikanischen Ursprungs (AA), weißen Europäern (CC), Chinesen (CH) und Japanern (JP) an. Der Grad der Kopplung ist bei Europäern am größten, bei denen ein Block CYP3A5, CYP3A7 und CYP3A4 einschließt (Wojnowski & Kamdem 2006).

Neben dem Grad der genetischen Kopplung, wie durch die XP-EHH beschrieben, geben sowohl Allelfrequenzen als auch der Grad der Populationsdifferenzierung Aufschluss über die Selektion eines genetischen Locus. Abb. 3 zeigt folgende statistische Parameter, die nachfolgend genauer beschrieben werden:

- XP-EHH (Sabeti et al. 2007)
- Tajima's D (Tajima 1989)
- Fixationsindex (Weir & Cockerham 1984)
- XP-CLR (Chen et al. 2010).

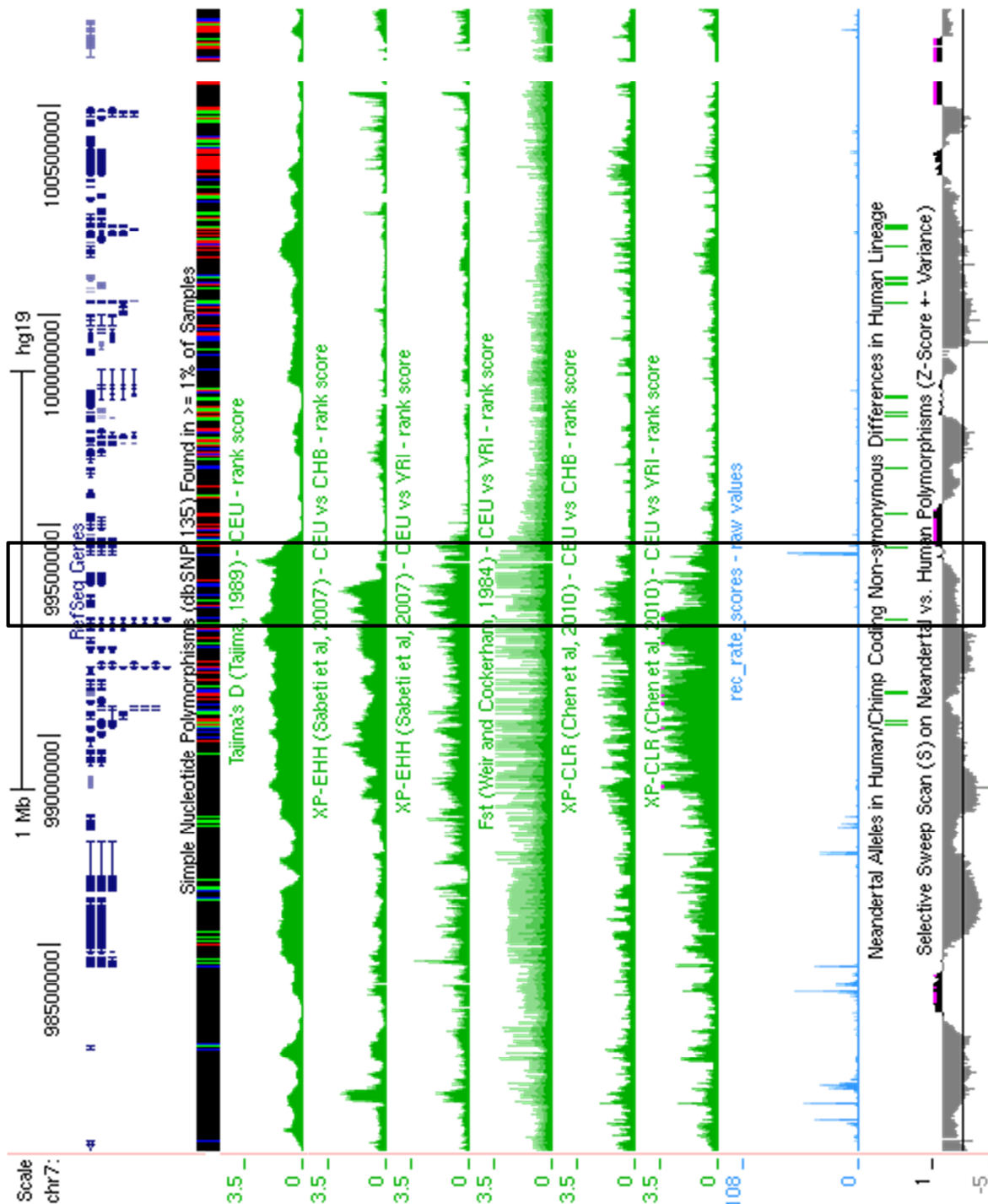


Abb. 3: Selektionsparameter des *CYP3A*-Lokus bei Europäern

Umrandet ist der *CYP3A*-Lokus mit flankierenden Bereichen im 1.000 Genomes Selection Browser des UCSC (Pybus et al. 2013). Zuoberst befindet sich in schwarz eine Skala zur Position des Lokus auf Chromosom 7, darunter in blau die Referenzsequenzen proteinkodierender Gene. Die Zeile darunter zeigt SNPs mit einer Allelfrequenz  $\geq 1\%$ . Dabei werden synonyme (grün), nicht-synonyme bzw. Austausche an Splice-Stellen (rot), nicht-translatierte (blau) oder intronische bzw. Austausche unbekannter Funktion (schwarz) unterschieden. Darunter in grün sind genomweit normierte Selektionsparameter (rank scores) rezenter europäischer Populationen (CEU) aufgeführt, basierend auf dem Spektrum der Allelfrequenzen (Tajima's D), der Struktur des Kopplungsungleichgewichts (XP-EHH) und der Differenzierung der Populationen (FST, XP-CLR). Die unterste Zeile in blau gibt die Rekombinationsrate (rec rate) an. Zuletzt stehen Daten auf Basis des Neanderthaler-Genom. Ersteres zeigt nicht-synonyme Austausche zwischen Mensch und Schimpanse auf der Linie zum modernen Menschen. Anhand der Außengruppe (Orang-Utan) sind abgeleitete (humane) Allele im Genom des Neanderthaler als vertikale Balken in grün dargestellt. Bei der Zeile der *selective sweeps* darunter zeigen Negativwerte an, dass Neanderthaler weniger abgeleitete Allele als aufgrund von Neutralität erwartet aufweisen, was v. a. bei Werten  $> -2$  (horizontale Linie) auf positive Selektion im frühen modernen Menschen schließen lässt.

Tajima's D (Tajima 1989) vergleicht die erwartete und beobachtete genetische Variabilität einer Population. Anhand der Anzahl polymorpher Positionen einer Population und der durchschnittlichen Anzahl von Mutationen zwischen zwei Individuen der Population wird statistisch geprüft, ob die beobachtete Variabilität unter der Annahme neutraler Evolution der erwarteten entspricht oder ob nicht-zufällige Prozesse zu abweichender Variabilität geführt haben. Diese beinhalten gerichtete Selektion und Populationsexpansion ( $D < 0$ ) auf der einen sowie balancierender Selektion und Populationskontraktion ( $D > 0$ ) auf der anderen Seite. Da demographische Veränderungen aller Wahrscheinlichkeit nach das gesamte Genom mehr oder weniger gleich betreffen, natürliche Selektion jedoch nur funktionell relevante Bereiche des Genoms, gibt der Rang-Wert hier eher Aufschluss über selektive als demographische Prozesse. So zeigen auch hier hohe Werte eine positive Selektion des *CYP3A*-Lokus und dies spezifisch für die europäische, nicht aber die ostasiatische (CHB) oder westafrikanische Referenz-Population (YRI). Tajima's D der europäischen Population zeigt v. a. für *CYP3A5* und *CYP3A43* deutlich negative Rohwerte (Daten nicht dargestellt), was auf gerichtete Selektion schließen lässt.

Den Grad der Populationsdifferenzierung untersuchen F-Statistik (Weir & Cockerham 1984) und der XP-CLR-Test (*cross-population composite likelihood ratio test*, Chen et al. 2010) durch den Vergleich der Allelfrequenzen zweier Populationen. Dabei vergleicht der Fixationsindex  $F_{ST}$  die erwartete Heterozygotie der Subpopulation mit der der Gesamtpopulation und gibt an, wieviel Prozent der Variabilität zwischen beiden Populationen durch deren Subdivision begründet sind; für den *CYP3A*-Lokus sind dies Werte bis  $> 90 \%$  (Daten nicht dargestellt). Die XP-CLR ist das Verhältnis zweier Wahrscheinlichkeiten der gleichen Begebenheit unter der Annahme zwei verschiedener Hypothesen. Bei diagnostischen Tests dient dieses Wahrscheinlichkeitsverhältnis, die *likelihood ratio* (LR), zur Umschreibung der Güte eines diagnostischen Tests im Hinblick auf Sensitivität und Spezifität; hier gibt das Verhältnis an, ob sich die Allelfrequenz schneller als durch Drift erwartet verändert hat (Chen et al. 2010). Auch hier weisen besonders *CYP3A5* und *CYP3A4* für Europäer LRs von bis zu 350 respektive 250 (Daten nicht dargestellt), also eine moderat starke Evidenz für Selektion auf (Evelt et al. 2000).

Eine aktuelle genomweite Studie zur Selektion der 57 menschlichen *CYP*-Gene identifizierte Polymorphismen des *CYP3A*-Lokus als positiv selektiert, darunter rs2242480 (*CYP3A4*), rs472660 (*CYP3A43*) sowie rs15524 und rs4646450 (*CYP3A5*) in Populationen europäischer Herkunft (Polimanti et al. 2012). Diese so gezeigte positive Selektion des *CYP3A*-Lokus in nicht-afrikanischen Populationen ist auch für die oben erwähnten Unterschiede in den Häufigkeiten des *CYP3A4*\*1B- und *CYP3A5*\*1-Allels zwischen Afrika und Europa verantwortlich.

Welche Gründe und Konsequenzen diese positive Selektion letztlich hatte und welches der *CYP3A*-Gene bzw. -Allele selektiert wurde, ist dennoch umstritten. Die *CYP3A5*-Expression könnte vorteilhaft für den Wasserhaushalt und die Salzhomöostase in Regionen

mit Wasserknappheit sein (Kuehl et al. 2001). So könnte die Umwandlung von Cortisol zu 6 $\beta$ -Hydroxycortisol durch CYP3A5 in der Niere eine erhöhte Salzresorption und Wasserretention ermöglichen. Die Salzretentionshypothese wird durch die CYP3A5-Expression in der überwiegenden Mehrheit (bis zu > 70 %) der schwarzen Afrikaner unterstützt. Auch die neueste Studie zur CYP3A5-Expression in afrikanischen Populationen bestätigte die Korrelation der Allelfrequenz von *CYP3A5*\*3 mit der geographischen Breite und zeigte zugleich einen geographischen Zusammenhang mit der Aridität im Holozän (vor 10.000 Jahren) und späten Pleistozän (vor 50.000 Jahren), was die Rolle von CYP3A5 in Wasser- und Salzretention früherer afrikanischer Populationen bestärkt (Bains et al. 2013).

Givens und Kollegen fanden 2003 einen Zusammenhang zwischen dem *CYP3A5*\*3-Allel und erhöhtem Blutdruck in einer afroamerikanischen Versuchsgruppe (Givens et al. 2003). Basierend darauf sowie auf eigenen genetischen Daten postulierten Thompson und Kollegen den durch Salzaufnahme bedingten Bluthochdruck als selektierenden Faktor gegen die CYP3A5-Expression in nicht-afrikanischen Populationen (Thompson et al. 2004). Diese Hypothese stimmt zwar mit der genetischen Signatur des Locus überein (Abb. 3), erscheint allerdings wenig plausibel. Um als selektierender Faktor zu wirken, müsste der Bluthochdruck eine starke negative Wirkung auf die evolutionäre Fitness haben. Diese müsste sich auch heute als erhöhte Mortalität in CYP3A5-exprimierenden Menschen im reproduktiven Alter manifestieren, was nicht belegt ist. Auch konnte die Assoziation zwischen Bluthochdruck und *CYP3A5*\*3 in den meisten darauffolgenden Studien nicht reproduziert werden (Ho et al. 2005, Lieb et al. 2006, Langae et al. 2007). Zwar zeigten salzabhängig hypertensive Ratten im Vergleich zu gesunden Ratten eine signifikant veränderte Expression der CYP3A-Homologe CYP3A2 und CYP3A9, doch waren diese Effekte unterschiedlich gerichtet und die Vergleichsgruppe von unterschiedlichem genetischen Hintergrund (Kuang et al. 2013). In genomweiten Assoziationsstudien am Menschen fanden sich ebenfalls keine Zusammenhänge zwischen Bluthochdruck und dem *CYP3A*-Lokus auf Chromosom 7, weder in europäischen Populationen (Levy et al. 2009, Newton-Cheh et al. 2009, Org et al. 2009), noch in asiatischen (Niu et al. 2010, Takeuchi et al. 2010), afrikanischen (Rice et al. 2006, Tayo et al. 2009) oder amerikanischen (Basu et al. 2008).

Schirmer und Kollegen postulierten dagegen, dass die *CYP3A*-Lokusselektion in Europa nicht durch Hypertonus, sondern durch Rachitis verursacht wurde und nicht CYP3A5, sondern CYP3A4 betraf. Hierfür sprechen auch genomweite Daten, die rs2242480, das *CYP3A4*\*1G-Allel als selektierte SNP identifizierten (Polimanti et al. 2012). Dieses Allel zeigte sich in einer chinesischen Studienpopulation als Prädiktor für einen schlechteren VD-Status der Probanden (Robien et al. 2012). Ob es die CYP3A4-Aktivität jedoch hemmt (Zhang et al. 2010) oder steigert (Zuo et al. 2013) ist bislang noch offen. Unstrittig ist jedoch, dass auch das \*1G-Allel mit einer Allelhäufigkeit von 8 % in Europa, 25 % in Asien und 89 % in Nigeria Frequenzunterschiede zwischen einzelnen Populationen

aufweist (Frazer et al. 2007). Daneben wurde auch ein weiterer SNP des *CYP3A5* als selektiert identifiziert, der sich in vollkommener Kopplung zum funktionellen *CYP3A5*\*3-Allel (rs776746) befindet (Polimanti et al. 2012).

Doch gerade diese generell starke Koppelung der einzelnen SNPs des *CYP3A*-Lokus macht es schwer mit solchen Sequenzanalysen genaue Aussagen zu Ursache und Konsequenzen der jedoch letztlich unstrittigen positiven Selektion der *CYP3A*-Lokus in Europäern zu treffen. Es bedarf funktioneller Analysen, um zwischen den einzelnen Isozymen und Polymorphismen zu differenzieren. Zudem ist es hier noch wichtig einen Gedanken zur Betrachtungsebene der positiven Selektion auszuführen. Zeigen Polymorphismen wie am Locus des *CYP3A4*\*1G-Allel oder nahe des *CYP3A5*\*3-Allels Signaturen positiver Selektion in Europa, spricht beides schließlich funktionell für eine Selektion gegen die Expression der *CYP3A* in europäischen Populationen. Ähnliches gilt für das in Europa seltene *CYP3A4*\*1B-Allel. Letzten Endes bedeutet dies, dass die *CYP3A*-Expression in europäischen Populationen von Nachteil war und durch reinigende Selektion vermindert wurde. Da die genannten Allele (noch) nicht vollständig in Europa fixiert sind, spräche dies für einen noch andauernden Selektionsprozess.

## Vitamin D-Metabolismus des Menschen

Cholesterin wird als Stabilisator der zellulären Biomembran ständig erneuert und ist die Ausgangsverbindung für Steroidhormone, Gallensalze und auch Vitamin D (Rezen et al. 2011). Es kann über tierische und pflanzliche Nahrung zugeführt oder *de novo* synthetisiert werden. Die Synthese von Cholesterin findet v. a. in Leber und Dünndarm, aber auch im Muskel, in endokrinen Organen, wie den Nebennieren und Geschlechtsdrüsen sowie der Haut statt (Kostner 2007). Das 7-Dehydrocholesterin (7-DHC) oder auch Pro-VD<sub>3</sub> der Haut selbst entsteht entweder aus Cholesterin (Zouboulis 2000, Bogh et al. 2010, Tremezaygues & Reichrath 2010) oder Lathosterin (Guryev et al. 2003, Glossmann 2010) und höchst wahrscheinlich nicht wie bislang angenommen im Darmepithel oder der Leber, sondern direkt in der Haut durch die enzymatische Aktivität vor allem in den Talgdrüsen (Zouboulis 2000) sowie den Strata spinosum und basale der Haut (Norman 1998, Glossmann 2010). So befinden sich 35 % des kutanen 7-DHCs in der Dermis und 65 % in der Epidermis v. a. in den zuvor genannten Arealen (Holick et al. 1980, Norman 1998, Lehmann & Meurer 2010). Unter UV-Einwirkung werden 1,3 bis 50 % (Knuschke et al. 10/2012, Holick et al. 1981, MacLaughlin et al. 1982, Diffey 1991, Lehmann et al. 2003) des kutanen 7-DHC v. a. im Stratum basale der Epidermis photolytisch in Prä-VD<sub>3</sub> umgewandelt (Holick 1981) und isomerisieren innerhalb weniger Stunden bis mehrerer Tage zu VD<sub>3</sub> (Bognar 1992, Lehmann & Meurer 2010). Der Schwellenwert für die UVB-induzierte VD<sub>3</sub>-Synthese *in vivo* liegt dabei im Bereich um 14-20 mJ/cm<sup>2</sup> (Webb et al. 1988, Matsuoka et al. 1989, Lehmann et al. 2003). Dabei zeigt die produzierte VD<sub>3</sub>-Menge einen positiven, jedoch nicht-linearen Zusammenhang mit der UVB-Dosis (Olds 2010). Die thermische Isomerisierung des instabilen Prä-VD geschieht bis zum Erreichen eines

Gleichgewichtszustandes mit VD und ist identisch für VD<sub>2</sub> und VD<sub>3</sub>. Die Isomerisierungsrate hängt dabei alleinig von der Temperatur (Tab. 1), nicht aber vom Lösungsmittel, der Lichteinstrahlung oder der Katalyse ab (Bognar 1992).

Gebildetes VD<sub>3</sub> gelangt von der Epidermis über die Gefäße der Dermis in die Blutbahn. Nach der Sonnenexposition vergehen ein bis vier Tage bevor ein Anstieg des VD-Status, also des 25-VD, in der Blutbahn sichtbar wird (Haddad et al. 1993, Lehmann & Meurer 2010).

Tab. 1: Isomerisierung von Prä-Vitamin D zu Vitamin D in Anhängigkeit von Temperatur und Zeit (Bognar 1992)

Temperatur [°C]	Anteil bei Gleichgewicht		Dauer bis Erreichen des Gleichgewichts
	Prä-VD	VD	
0	4	96	350 Tage
20	7	93	30 Tage
40	11	89	3 ½ Tage
60	16	84	½ Tag
80	22	78	72 min
100	28	72	30 min
120	35	65	7 min

Neben dem kutan synthetisierten VD<sub>3</sub> werden etwa 10-20 % des zirkulierenden VD, VD<sub>2</sub> und VD<sub>3</sub>, über die Nahrung aufgenommen (Tremezaygues et al. 2011). VD<sub>2</sub>, ein VD<sub>3</sub>-Derivat mit einer zusätzlichen Methylgruppe am C24-Atom, kann über pflanzliche Nahrung zugeführt werden. Dabei wird es nicht wie bisher angenommen in den Pflanzen selbst gebildet, sondern vielmehr durch Pilz- und/oder Hefe-Kontamination der Nahrung mit aufgenommen; Hefe und Pilze synthetisieren VD<sub>2</sub> durch UVB-vermittelte Umwandlung des Pro-VD<sub>2</sub> (Ergosterol) (Japelt & Jakobsen 2013). In tierischen Produkten bildet neben VD<sub>3</sub> auch 25-VD<sub>3</sub> einen Großteil der vorhandenen VD-Metaboliten. 25-VD<sub>3</sub> erreicht dabei typisch Konzentrationen von 0,2-1 µg pro 100 g bovinem Muskelfleisch bzw. Niere sowie 1,0 µg pro 100 g Eidotter (Nollet 2012). In der Nahrung erlangt 25-VD<sub>3</sub> v. a. aufgrund seiner 5-fach höheren Potenz im Vergleich zu VD<sub>3</sub> an Bedeutung und macht z. B. in Milch 75 % der VD-Aktivität gemessen am Kalzium-Transport aus (Nollet 2012).

VD und dessen Metaboliten liegen zu 98 % gebunden v. a. an das VD-bindende Protein im Blutplasma vor (Campbell et al. 2010). In der Leber wird es zu 25-VD bzw. Calcidiol und anschließend in der Niere zu 1,25-Dihydroxyvitamin D (1,25-VD), dem physiologisch aktiven Hormon Calcitriol, hydroxyliert. Als Hormon unterliegt 1,25-VD einer engen Regulation und einem negativem Feedback-Mechanismus (Deeb et al. 2007), die Bildung von 25-VD hingegen kaum. Letztere hängt vielmehr von der Menge an zur Verfügung stehendem VD ab (Japelt & Jakobsen 2013).

Abb. 4 fasst die Synthese von Calcitriol in Haut, Leber und Niere zusammen und gibt, falls bekannt, die katalysierenden Enzyme bzw. die Beteiligung der CYP3A unter Nennung der Literaturquelle an.

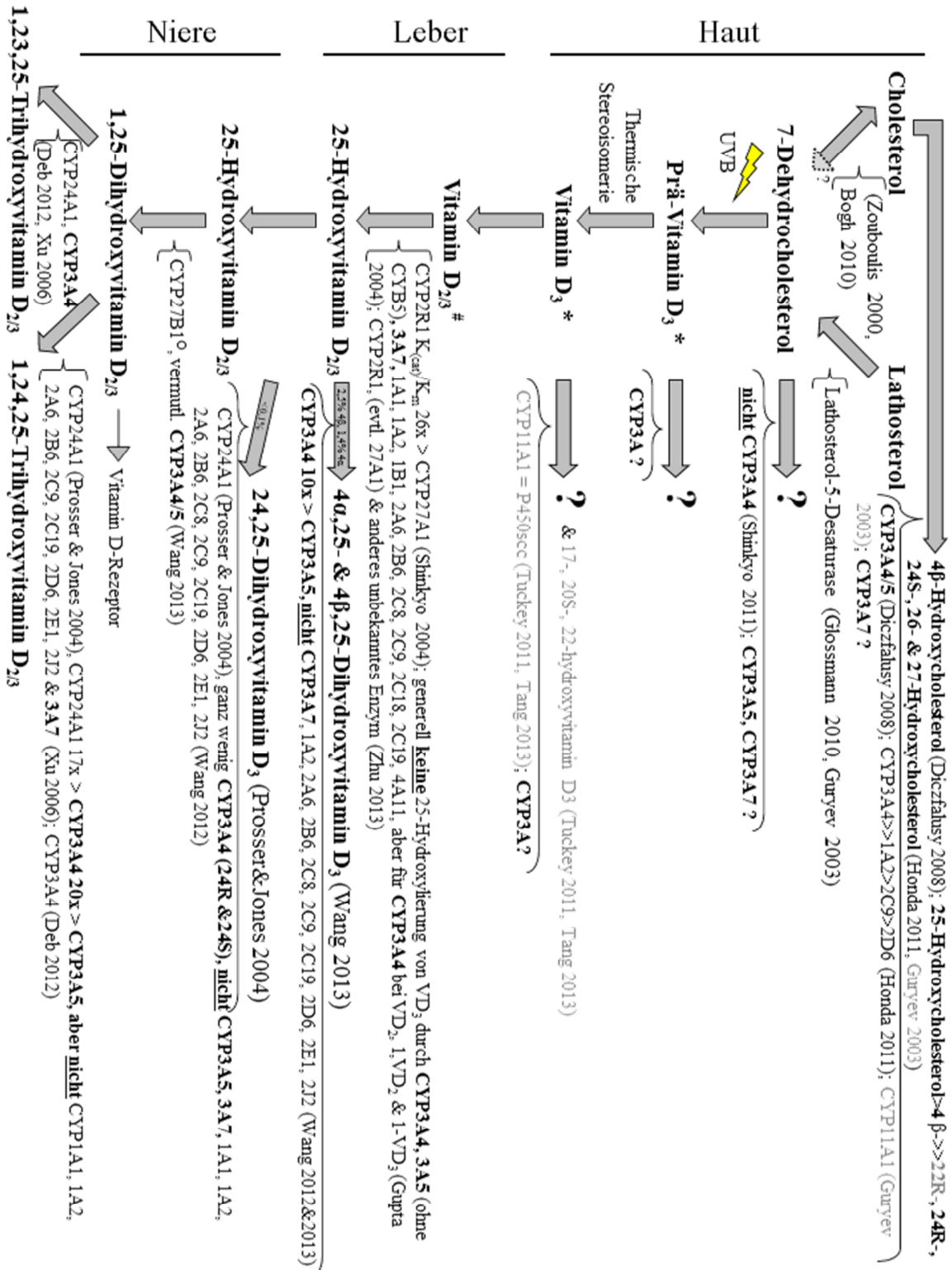


Abb. 4: Vitamin D-Syntheseweg in Haut, Leber und Niere unter Angabe der möglichen Beteiligung der CYP3A-Enzyme. Fehlende Angaben sind mit einem Fragezeichen gekennzeichnet. In grau sind mögliche Metaboliten aufgeführt, die für andere CYP-Enzyme beschrieben wurden. \* Prä-VD<sub>3</sub> und VD<sub>3</sub> können durch Licht außerdem Lumisterol und Tachysterol bzw. 5,6-Trans-VD<sub>3</sub> und Suprasterol I und II photolysiert werden (Holick et al. 1981). # Ab hier spielt auch VD<sub>3</sub> und VD<sub>2</sub> aus der Nahrung eine Rolle (Japelt & Jakobsen 2013). *Cyp2r1*<sup>-/-</sup>-Mäuse haben verringertes 25-VD, aber normales 1,25-VD im Serum. Ein zusätzlicher K.O. von *Cyp27a1* bringt keine weitere Änderung. Dies spricht für CYP2R1 als Hauptenzym bei der 25-Hydroxylierung von VD, für eine geringe Beteiligung von CYP27A1 und eine weitere nicht unwichtige 25-Hydroxylase neben CYP2R1 (Zhu et al. 2013b). ° *Cyp27b1*<sup>-/-</sup>-Mäuse haben kein 1,25-VD (Christakos et al. 2013), niereninsuffiziente/anephrische Patienten (Lambert et al. 1982, Koenig et al. 1992, Yumita et al. 1996, Ishimura et al. 1999) und Patienten mit VDDR Typ I (Scriver et al. 1978, Yan et al. 2011) hingegen noch geringe Restspiegel, was für eine extrarenale Aktivität des CYP27B1 oder evtl. eines anderen Enzyms spricht.

Intrazellulär bindet Calcitriol an den Vitamin D-Rezeptor (VDR), der als aktivierter nukleärer Rezeptor in den Zellkern transloziert, als Heterodimer mit RXR, dem Retinoid X-Rezeptor, an Promotoren bestimmter Zielgene bindet und so deren Expression reguliert. Calcitriol ist physiologisch u. A. der Hauptregulator der Kalzium- und Phosphat-Homöostase im Dünndarm und vermittelt letztlich eine gesunde Mineralisierung des Knochens (Deeb et al. 2007).

Doch dass eine ausreichende Sonnenexposition allein noch kein Garant für einen normalen VD-Spiegel ist (Binkley et al., 2007; Hollis et al., 2007; Jacobs et al., 2008), führen Knuschke und Kollegen auf vier weitere Einflussfaktoren des 25-VD-Spiegels zurück:

- inadäquate kutane Produktion von  $VD_3$
- verstärkter photochemischer Abbau von Prä- $VD_3$  oder  $VD_3$
- Abnormalitäten im Abtransport von  $VD_3$  aus der Haut in die Blutzirkulation
- Verminderung der kutanen  $VD_3$ -Synthese durch verstärkte Melaninbildung (Knuschke et al. 10/2012).

Dies scheint zwar der primäre Weg der Synthese von Calcitriol zu sein, doch sowohl in primären (Bikle et al. 1986a, Bikle et al. 1986b, Matsumoto et al. 1991, Schuessler et al. 2001, Vantieghem et al. 2006b) als auch in immortalisierten Keratinozyten (Lehmann 1997, Lehmann et al. 2000a), Sebozyten (Zouboulis 2004) sowie in Zell-basierten Hautmodellen (Lehmann et al. 2000c, Lehmann et al. 2001) und *in vivo* (Lehmann et al. 2003) konnte gezeigt werden, dass die Haut prinzipiell über alle nötigen Enzymsysteme zur vollständigen UVB-abhängigen Synthese des aktiven 1,25-VD aus 7-DHC verfügt. Dabei muss *in vitro* jedoch 7-DHC extern zugeführt werden, da Fibroblasten und Keratinozyten kein endogenes 7-DHC besitzen (Nemanic et al. 1985). Arbeiten von Lehmann und Kollegen zeigen auch, dass eine Synchronisierung der verwendeten Zellen durch Serum-Entzug die Detektion der VD-metabolisierenden Kapazität isolierter Zellen erleichterte.

Die 25-Hydroxylierung von VD in Keratinozyten schien zwar bis 1998 ausgeschlossen (MacLaughlin et al. 1991), erwies sich jedoch scheinbar als abhängig von serumhaltigen Kulturbedingungen (Lehmann et al. 1998) und konnte später auch in Fibroblasten detektiert werden (Ellfolk et al. 2009). Darüber hinaus zeigte sich die Entstehung von 1,25-VD *in vitro* abhängig von der Menge an vorhandenem 7-DHC, der UVB-Dosis (Optimum  $30 \text{ mJ/cm}^2$ ) und -Wellenlänge (297 bis 307 nm, Optimum 302 nm) (Lehmann & Meurer 2003). Die VD-Syntheserate war dabei maßgeblich für die 1,25-VD-Bildung (Lehmann & Meurer 2003). Auch die 25-Hydroxylierung von 1-VD konnte in HaCaT-Zellen nachgewiesen werden und unterstreicht so, nach Aussage der Autoren, deren Anwendbarkeit zur Studie des VD-Metabolismus *in vitro* (Lehmann et al. 1998). Letztlich gelten v. a. Keratinozyten als besonders geeignet für die Untersuchung des VD-Stoffwechsels *in vitro*. Bei deren Kultur stellten sich einige Parameter, wie die Supplementierung des Mediums mit Serum (Lehmann et al. 1998) als bedeutend heraus. In

serumfreien Kulturbedingungen konnte nach 1, 6, 12, 24 und 48 Stunden keine 25-Hydroxylierung von VD gemessen werden (MacLaughlin et al. 1991). Dermale Fibroblasten sind hingegen allgemein nicht zur 1-Hydroxylierung von 25-VD fähig (Vantieghem et al. 2006a).

Hinsichtlich der Relevanz der kutanen VD-Synthese, konnten Okano und Kollegen in Haut von Ratten endogenes 25-VD und 1,25-VD messen. Ebenfalls konnten sie an Mäusen zeigen, dass i. v. appliziertes 25-VD und 1,25-VD nach 5 h in die Haut, v. a. in die Epidermis gelangte. Für die Autoren zeigt dies, dass v. a. hepatorenal synthetisiertes 25-VD und 1,25-VD auch aufgrund höherer Syntheseraten Hauptquelle aktiver VD-Metaboliten der Haut darstellen und deren endokutane Synthese eine eher untergeordnete und lokale Rolle spielt (Okano et al. 1989). Andererseits konnten Bikle et al. in *ex vivo*-perfundierter Schweinehaut eine Syntheserate bis zu 8 pg 1,25-VD pro Minute messen. Unter der Annahme einer ähnlichen Syntheserate in menschlicher Haut gerechnet auf die gesamte Hautoberfläche, müsste die Haut mit einer Gesamtkapazität von 2,8 ng 1,25-VD bei Niereninsuffizienz zumindest rechnerisch in der Lage sein, die 1 $\alpha$ -Hydroxylierung des 25-VD in physiologisch ausreichendem Maße zu kompensieren (Bikle et al. 1994).

### Vitamin D-Metabolismus in der Tierwelt

Durch den Vergleich des 25-VD-Spiegels nicht-humaner Primaten (Abb. 5) vermutete Vieth, dass auch die Vorfahren des modernen Menschen aufgrund der Nähe zum Äquator, geringerer Luftverschmutzung und einer geringeren Bedeckung der Haut durch Bekleidung 100 nmol/l oder mehr zirkulierendes 25-VD aufwiesen (Vieth 2003).

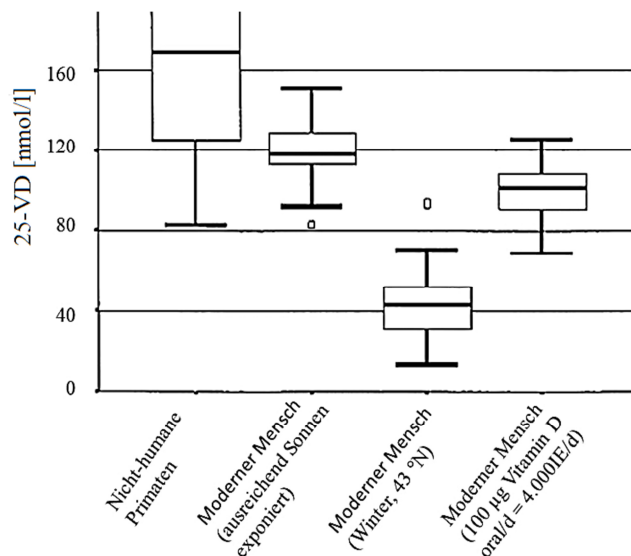


Abb. 5: 25-Hydroxyvitamin D-Konzentration bei nicht-humanen Primaten und dem modernen Menschen. Dargestellt sind Medianwerte (Linie), die 50 % Quartile (Box) und Minimal- sowie Maximalwerte (Vieth 2004).

Eine Bewertung der 25-VD-Spiegel zwischen Mensch und Tier sowie Rückschlüsse auf vergangene menschliche Populationen jedoch fällt schwer. So weisen Neuweltaffen (Platyrrhini) vermutlich aufgrund einer Endorgan-Resistenz einen allgemein 4- bis 10-fach

höheren VD-Bedarf auf (Yamaguchi et al. 1986, Gacad & Adams 1991). Auch Behaarung bzw. Fell verhindert die kutane VD-Synthese nicht generell, kann jedoch je nach Dichte und Farbe eine Rolle bei der kutanen VD-Synthese spielen, sodass geschorene Schafe einen besseren VD-Status als ungeschorene aufweisen (Hidiroglou & Karpinski 1989). Auch Ratten mit dunkler Fellfarbe zeigten trotz UV-Bestrahlung rachitische Veränderungen, weiße Ratten jedoch nicht (Hess et al. 1922). Interessanterweise zeigten auch nicht-bestrahlte Artgenossen weißer Fellfarbe, die im gleichen Käfig gehalten wurden, ebenfalls keine Knochenveränderungen. Man geht davon auf, dass 7-DHC über die Talgdrüsen an das Fell abgegeben, dort durch UV-Bestrahlung zu VD umgewandelt und durch gegenseitige oder auch selbst gerichtete Fellpflege, sogenanntes (*auto*) *grooming*, oral aufgenommen wird (Carpenter & Zhao 1999). Dieses tritt bei VDR<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen vermutlich zur Deckung des erhöhten VD-Bedarfs sogar verstärkt auf (Kalueff et al. 2004). Allgemein geht man davon aus, dass Herbi- und Omnivore ihren Bedarf an VD v. a. über Sonnenexposition und kutane Synthese decken. Bei Katzen, Hunden und Karnivoren im Allgemeinen hingegen spielt die kutane VD-Synthese eine eher untergeordnete Rolle. Karnivoren verfügen nur über ca. 10 % des kutanen 7-DHCs im Vergleich zu Ratten, Hamstern, Schweinen oder Schafen und Katzen sowie zudem über eine gesteigerte 7-DHC-Reduktase-Aktivität und weisen damit einen verstärkten Abbau des wenigen verfügbaren 7-DHCs auf (How et al. 1994, Morris 1999, Morris et al. 1999). Karnivoren decken ihren VD- Bedarf vornehmlich über die Nahrung. Aufgrund der geringen UVB-Strahlungs-dosis in der artifiziellen Tierhaltung von Labornagern, wird jedoch deren VD-Bedarf vermutlich ebenso v. a. über die Nahrung gedeckt.

### **Vitamin D-Status und Knochen**

Die Einteilung des VD-Status erfolgt anhand des Serumspiegels von 25-VD, da es mit einer Halbwertszeit von ca. 15 Tagen relativ stabil ist und weniger stark reguliert ist als Calcitriol (Jones 2008). Nichtsdestotrotz unterliegt es deutlichen jahreszeitlichen Schwankungen (Abb. 5). Werte zwischen 50 und 75 nmol/l gelten für die Mehrheit der Bevölkerung als VD-suffizient und ermöglichen einen ausgeglichenen Knochenumbau, mit positivem Einfluss auf Fraktur- und Sturzrisiko sowie Mortalität (Rizzoli et al. 2013). Bei geringeren Spiegeln spricht man von Insuffizienz (< 50 nmol/l) und Mangel (< 25 nmol/l) mit erhöhtem Knochenabbau, verminderter Knochendichte bzw. vermehrten Mineralisierungsdefekten (Rizzoli et al. 2013).

Als Ursache für VD-Mangel geben Rizzoli und Kollegen folgendes an:

- reduzierte epidermale Synthese, z. B. aufgrund von Gebrauch von Sonnenschutz, hohem Alter, Jahreszeit oder Hautpigmentierung
- verminderte Verfügbarkeit aufgrund von Malabsorption und Übergewicht

- erhöhter Abbau oder Verlust bei der Einnahme von Antikonvulsiva, Herzerkrankungen oder nephrotischem Syndrom
- Schwangerschaft und Stillzeit
- verminderte 25-VD-Bildung bei Leberversagen
- verminderte 1,25-VD-Bildung bei chronischem Nierenversagen, VD-abhängiger Rachitis, X-gekoppelter oder autosomaler Hypophosphatämie oder onkogener Osteomalazie (Rizzoli et al. 2013).

### ***Bewertung der Knochenmineraldichte***

Ein etabliertes Verfahren und zugleich Goldstandard zur Messung der Knochendichte zur Abschätzung des Frakturrisikos ist die Dual-Röntgen-Absorptiometrie (Bartl & Bartl 2004, S. 61). Dabei wird die Knochendichte anhand der gemessenen Absorption zweier schwacher Röntgenstrahlen unterschiedlicher Energie bestimmt; so können die Daten rechnerisch von der Absorption der umgebenden Weichteile bereinigt werden (Bartl & Bartl 2004, S. 61). Die Messwerte sind auf eine definierte Fläche bezogen und geben den Mineralgehalt des Knochens (BMD, *bone mineral density*) in g pro cm<sup>2</sup> als sogenannte Flächendichte an (Bartl & Bartl 2004, S. 62). Empfohlen wird die Messung an mind. zwei verschiedenen Knochenarealen, zumeist an Wirbeln und Hüfte. Die Vermessung der Wirbel umfasst dabei mind. zwei gesunde lumbale Wirbelkörper (L1-L4) inkl. der -bögen und Dornfortsätze, die des Beckens - wie in Abb. 6 (links) gezeigt - bis zu vier Bereiche: Trochanterregion, Intertrochanterregion, Oberschenkelhals und Ward-Dreieck (Bartl & Bartl 2004, S. 62ff).

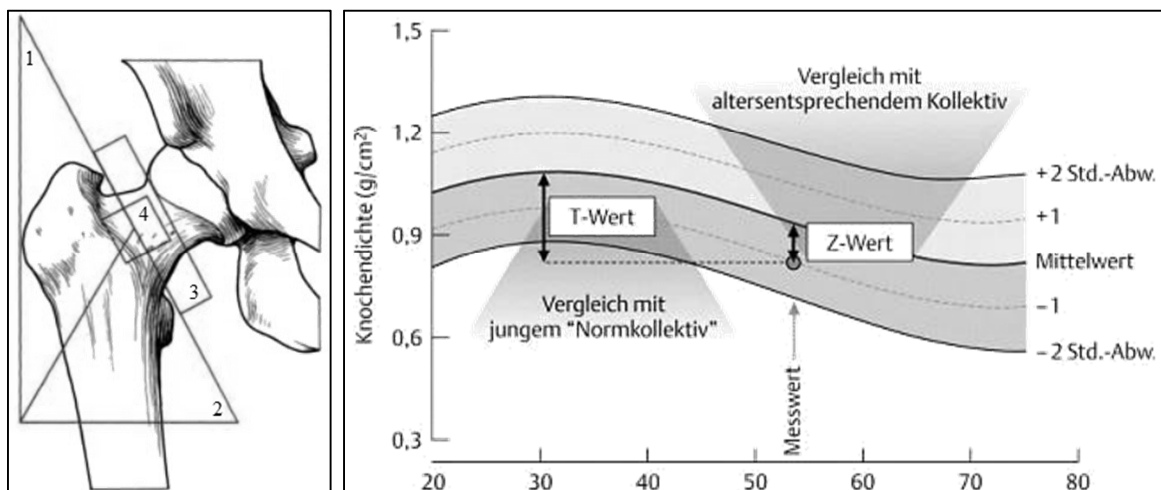


Abb. 6: Messareale zur Knochenmineraldichtemessung des Hüftgelenks und deren Zusammenhang mit T- und Z-Werten  
 Auf der linken Seite dargestellt sind die vier Messbereiche zur Bestimmung der Knochendichte des Beckens mittels Dual-Röntgen-Absorptiometrie. Eingezeichnet sind Trochanterregion (1), Intertrochanterregion (2), Oberschenkelhals (3) und Ward-Dreieck (4) (Bartl & Bartl 2004, S. 63). Die Abbildung auf der rechten Seite verdeutlicht die Aussage der von der Knochendichte eines Kollektivs abgeleiteten T- und Z-Werte (Abbildung: [http://www.orthopaedische-praxis-bielefeld.de/spez\\_osteo.htm](http://www.orthopaedische-praxis-bielefeld.de/spez_osteo.htm), Zugriff 27.11.2013)

Neben der absoluten Knochenmineraldichte werden relativ zu einer Vergleichspopulation der T- und Z-Wert ermittelt. Diese Werte geben an um wie viele Standardabweichungen sich die gemessene Knochendichte von der des Normkollektivs unterscheidet; letzteres

ist entweder die Bevölkerung junger Erwachsener mit maximaler Knochendichte (T-Wert) oder die entsprechende Alterskohorte (Z-Wert) (Richmond 2003). So entspricht in Abb. 6 die Knochendichte des 53-jährigen Patienten von  $0,8 \text{ g/cm}^2$  in etwa einem T-Wert von  $-2,4$  bzw. einem Z-Wert von  $-1$ . Die exakte Umrechnung der Knochendichte in Z- und Z-Wert erfolgt multifaktoriell und berücksichtigt zudem u. A. Geschlecht und Herkunft des Patienten (Richmond 2003).

Laut WHO dient der T-Wert nicht nur zur Klassifikation der Knochengesundheit (Tab. 2), sondern wie auch der Z-Wert der Einschätzung des Frakturrisikos innerhalb der nächsten zehn Jahre: pro Änderung des T- bzw. Z-Wertes um  $\pm 1$ , verdoppelt bzw. halbiert sich das Frakturrisiko (Kanis 1994). 2005 empfahl die Internationale Gesellschaft für klinische Densitometrie (ISCD) die Verwendung der T-Werte gemäß WHO-Standard nur für postmenopausale Frauen und Männer ab einem Alter von 50 Jahren (Sampaio Netto et al. 2007). Für prämenopausale Frauen und jüngerer Männer sei laut ISCD der Z-Wert angemessener und diene laut der Amerikanischen Akademie der orthopädischen Chirurgen (AAOS) als Indikator einer sekundären, also nicht rein altersabhängigen Osteoporose (Tab. 2). Zwar zeigt der T-Wert retrospektiv einen guten Zusammenhang mit tatsächlich aufgetretenen Frakturen, jedoch wird die Bestimmung der Knochendichte aufgrund der schlechten prospektiven Aussagekraft in Deutschland nicht als präventiv diagnostisches Verfahren doch seit der erneuten Lockerung der Bestimmungen im Februar 2013 zudem zur Kontrolle des Behandlungserfolgs durch die Krankenkassen gezahlt (Kassenärztliche Bundesvereinigung Berlin 04/2013, Fortelka 21.02.2013).

Tab. 2: Definitionen der Knochengesundheit anhand der T- und Z-Werte aus Messungen der Knochenmineraldichte  
Die WHO-Definition zur Einschätzung von Osteopenie und Osteoporose richtet sich nach dem T-Wert von Wirbel, Hüfte oder Vorderarm postmenopausaler Frauen europäischer Herkunft (Kanis 1994). Als alternatives Schema für prämenopausale Frauen und Männer unter 50 Jahren schlug die ISCD die altersabhängige Bewertung anhand des Z-Wertes vor (Sampaio Netto et al. 2007), der zudem laut AAOS Indiz einer sekundären Osteoporose sein kann (Richmond 2003, <http://orthoinfo.aaos.org/topic.cfm?topic=a00413>, Zugriff 27.11.13).

<b>Definition des T-Wertes</b>	<b>Terminologie laut WHO</b>
$T \geq -1$	Normal
$-2,5 \geq T \geq -1$	Osteopenie
$T \leq -2,5$	Osteoporose
$T \leq -2,5$ und mind. eine Fraktur	Manifeste Osteoporose
<b>Definition des Z-Wertes</b>	<b>Terminologie laut ISCD</b>
$Z \leq -2,0$	außerhalb der erwarteten Spanne für dieses Alter
$Z > -2,0$	innerhalb der erwarteten Spanne für dieses Alter
<b>Definition des Z-Wertes</b>	<b>Terminologie</b>
$Z > -1$	altersgemäße Knochendichte
$Z < -1,5$	Hinweise auf sekundäre Osteoporose

Der in Abb. 6 gezeigte Patient hätte somit mit einem T-Wert von  $-2,6$  laut WHO Osteoporose, läge jedoch mit einem Z-Wert von  $-1$  laut ISCD im altersentsprechenden Bereich. Da es sich in solch einem Fall also Anzeichen des natürlichen Alterungsprozesses (Seneszenz) handelt und dies nicht als Krankheit angesehen wird, würden in diesem Fall

nicht-medikamentöse, präventive Maßnahmen empfohlen (Dachverband Osteologie e.V. 2009).

### ***Vitamin D-Spiegel und Knochengesundheit***

An 98 Patienten mit Osteomalazie oder Rachitis wurde bestätigt, dass v. a. der 25-VD-Spiegel, eine geringe Kalziumaufnahme und eine geringe Sonnenexposition Hauptrisikofaktoren bei der Entstehung dieser Ossifikationsstörungen sind und genetische Faktoren eine untergeordnete Rolle spielen (Ray et al. 2009). Doch auch genomweite Studien zu Osteoporose weisen das endokrine VD und VDR als vielversprechende Kandidaten im Zusammenhang mit Knochengesundheit aus (Zheng et al. 2011). Doch gibt es durchaus Studien, die keinen Zusammenhang zwischen der Knochendichte und dem 25-VD-Spiegel aufzeigen, so z. B. in 90 postpubertären Frauen zwischen 19 und 22 Jahren, obwohl 59 % dieser Frauen VD-defizient waren (Kremer et al. 2009). 25-VD war geringfügig, aber signifikant erniedrigt in Frauen mit erhöhtem Körpergewicht und -masse und der Menge an subkutanem und viszeralem Fettgewebe (Kremer et al. 2009). Letzteres scheint plausibel, da VD-Metaboliten stark lipophil sind und im Fettgewebe eingelagert bzw. gespeichert werden (22.10.2012). Ebenso bei der retrospektiven Analyse von Daten der endokrinologischen Sprechstunde der Universität Göttingen wurden mehrere Laborparameter als potenzielle Risikofaktoren für Osteoporose untersucht. Es zeigte sich kein Unterschied im 25-VD-Spiegel (10-120 µg/l) zwischen Patienten mit Osteopenie, Osteoporose und gesunden Kontrollen. Lediglich drei Frauen (1,3 %) mit sekundärer Osteoporose wiesen VD-Mangel auf (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. med. Heide Siggelkow, Fachärztin für Innere Medizin, Endokrinologie und Diabetologie, Endokrinologikum Göttingen). Aufgrund der starken saisonalen Variabilität des VD-Status gilt es jedoch den Entnahmezeitpunkt der Proben in den Analysen zu berücksichtigen (Zhang et al. 2011), was hier nicht geschehen war.

Tab. 3: Zusammenhang von 25-Hydroxyvitamin D-Spiegel mit Breitengrad und Jahreszeit (Ross et al. 2011)

Ort (Breitengrad)	Ø 25-VD-Level	
	Winter	Sommer
Toronto, Kanada 43°N	35 nmol/l	50 nmol/l
Tasmanien, Australien 43°S	40 nmol/l	62 nmol/l
Estland, Nord-Europa 59°N	44 nmol/l	59 nmol/l
Salford/Manchester, UK 53°N	46 nmol/l	71 nmol/l
Geelon-Region, Australien 38°S	57 nmol/l	93 nmol/l
Omaha, USA 41°N	68 nmol/l	86 nmol/l

Bei der Untersuchung des 25-VD-Spiegels wurden sowohl saisonale als auch regionale Unterschiede beschrieben (Tab. 3). So konnte in Probanden aus Boston z. B. von Mitte Februar bis Mitte März keine oder nur geringe Synthese von Prä-VD<sub>3</sub> aus 7-DHC in der Haut gemessen werden (Webb et al. 1988). Aufgrund der zuvor beschriebenen Speicherung von VD im Fettgewebe kann einem saisonal bedingten VD-Mangel vorgebeugt werden. Selbst im Falle solchen saisonal bedingten VD-Mangels wären

aufgrund seiner ohnehin begrenzten Dauer keine pathologischen Veränderungen zu erwarten.

### UV-Strahlung und Vitamin D-Synthese

Die Menge an UVB-Strahlung ist für den VD-Haushalt des Menschen entscheidend, da bis zu 90 % des aktiven Calcitriols aus epidermal entstandenen  $VD_3$  gebildet wird. Die ultraviolette (UV-) Strahlung ist elektromagnetische Strahlung, die im kurzwelligen Bereich direkt an das für das menschliche Auge sichtbare Lichtspektrum angrenzt. Die wichtigste natürliche UV-Strahlungsquelle ist die Sonne (Emrich 03.07.2012). Aufgrund physikalischer Eigenschaften und biologischer Wirkweisen wird die UV-Strahlung in drei Bereiche unterschiedlicher Wellenlängen unterteilt. Langwellige UVA-Strahlung (400-315 nm) dringt nahezu ungehindert durch die Atmosphäre auf die Erdoberfläche und in die tieferen Schichten der Dermis der menschlichen Haut (Emrich 03.07.2012). Dort bewirkt sie die akute Dunkelfärbung des Melanins, was jedoch kaum Schutz vor weiterer Bestrahlung bietet. UVA-Strahlung ist die Hauptursache für kanzerogene Erbgutschädigungen aller Hautschichten. Die eigentliche Bräunungsstrahlung ist die mittelwellige UVB-Strahlung (315-280 nm). Etwa 10 % der UVB-Strahlung erreichen die Erdoberfläche und somit die Hautoberfläche des Menschen mit einer durchschnittlichen Dosis von 20-40  $J/m^2$  (Emrich 03.07.2012, Jablonski & Chaplin 2010). Sie dringt bis in epidermale Hautschichten und katalysiert dort die photochemische Umwandlung von 7-DHC zu Prä- $VD_3$ . Zudem verursacht sie die Melanin-Synthese und die Bildung sogenannten Lichtschwielen, d. h. Verdickungen der Hornschicht, als Schutzreaktion der Haut (Emrich 27.06.2012).

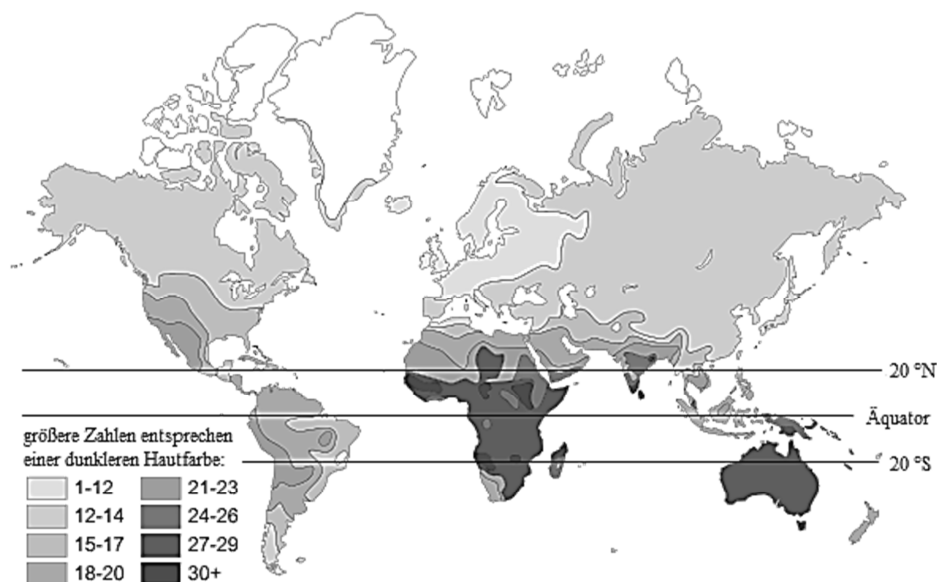


Abb. 7: Hautfarbe endogener Bevölkerungen weltweit  
Zur Orientierung sind je der 20. Breitengrad und der Äquator als Linie angegeben. Modifiziert nach [http://anthro.palomar.edu/adapt/adapt\\_4.htm](http://anthro.palomar.edu/adapt/adapt_4.htm) (Zugriff 24.5.2012).

Die weltweite Unterschiedlichkeit der Hautfarbe endogener Bevölkerungen (Abb. 7) wird zu über 87 % durch die UV-Strahlung verursacht. Bereits Aristoteles bemerkte einen

Zusammenhang von starker Hautpigmentierung und intensiver Sonneneinstrahlung warmer klimatischer Regionen (Jablonski 2011). Die energiereichste UVC-Strahlung (280-100 nm) überwindet die Ozonschicht in der Regel nicht und spielt so eine untergeordnete Rolle (Emrich 03.07.2012). Künstliche UVC-Strahlungsquellen werden aufgrund der keimtötenden Wirkung zur Flächendesinfektion in Laboren eingesetzt. Dass die Intensität der UV-Strahlung auf der Endoberfläche v. a. von der geographischen Breite abhängt, ist bekannt. Zudem spielen Ozonschicht, Bewölkung und Höhe über dem Meeresspiegel eine Rolle (Jablonski 2011).

## **Aufbau der menschlichen Haut**

Die Haut ist das größte Organ des menschlichen Körpers mit einer Fläche von 2 m<sup>2</sup> und einem Gewicht von 3-4 kg (Doll et al. 2010). Man unterscheidet u. A. behaarte Felder- und unbehaarte Leistenhaut (Spornitz 2004, S. 14). Sie besteht stets aus zwei Schichten, Epidermis und Dermis (Abb. 8 und Abb. 9). Dabei enthält die Dermis zahlreiche Adnexe epidermalen Ursprungs, wie die Haarfollikel, Schweiß- und Talgdrüsen aber auch Nerven, Blut- und lymphatische Gefäße (Brohem et al. 2011). Die Epidermis hingegen ist ein gefäßloses, mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel. Keratinozyten bilden mit 90 % den Großteil epidermaler Zellen und differenzieren innerhalb von ca. vier Wochen entlang der einzelnen Strata in Richtung Körperoberfläche, wo sie als tote Hautschuppen abfallen (Christophers & Ständer 2003, S. 3ff). So verliert die Haut ca. 33 Gramm totes Material am Tag (Jewell 1996). Die Haut erfüllt Barrierefunktion und ist gleichzeitig beteiligt an Thermoregulation, Exkretion, Absorption, Metabolismus, Wahrnehmung, Wasserhaushalt, Ästhetik und Kommunikation (Brohem et al. 2011).

Für die Pigmentierung der Haut verantwortlich ist Melanin. Dieses Pigment wird von Melanozyten abhängig von UVB-Einstrahlung in der Basalschicht der Epidermis synthetisiert und diffundiert in die darüber liegenden Keratinozyten (Juzeniene et al. 2009). Genetische Analysen legen nahe, dass die Hautfarbe des Neanderthalers und des Denisovamenschen eher dunkler (Cerqueira et al. 2012), d. h. ähnlich der ursprünglichen Hautfarbe des anatomisch modernen Menschen waren. Diese wurde erst mit der Migration aus Afrika vermutlich als Anpassung für eine ausreichende Photosynthese von VD in der Haut heller (Juzeniene et al. 2009). Eine neuere Studie zeigte hingegen, dass die Pigmentierung selbst keinen Einfluss auf den UVB-vermittelten VD-Metabolismus *in vivo* hat (Bogh et al. 2010). Fraglich bleibt jedoch, ob die angewandte Strahlungs-dosis in dieser Studie im dosisabhängigen Bereich für UVB-abhängige VD-Photosynthese befand oder im gesättigten Bereich. Prinzipiell besagt diese Studie, dass sowohl dunkle als auch helle Haut zur lichtabhängigen VD-Synthese in der Haut fähig ist. Dass es sehr wohl einen Zusammenhang zwischen Hautfarbe und Effizienz der VD-Synthese gibt, zeigen mehrere Studien zur Prävalenz von VD-Mangel v. a. in afrikanischen Frauen (Gallagher et al. 2013) und anderen dunkelhäutigen Personengruppen (siehe Referenzen in (Juzeniene et al. 2009).

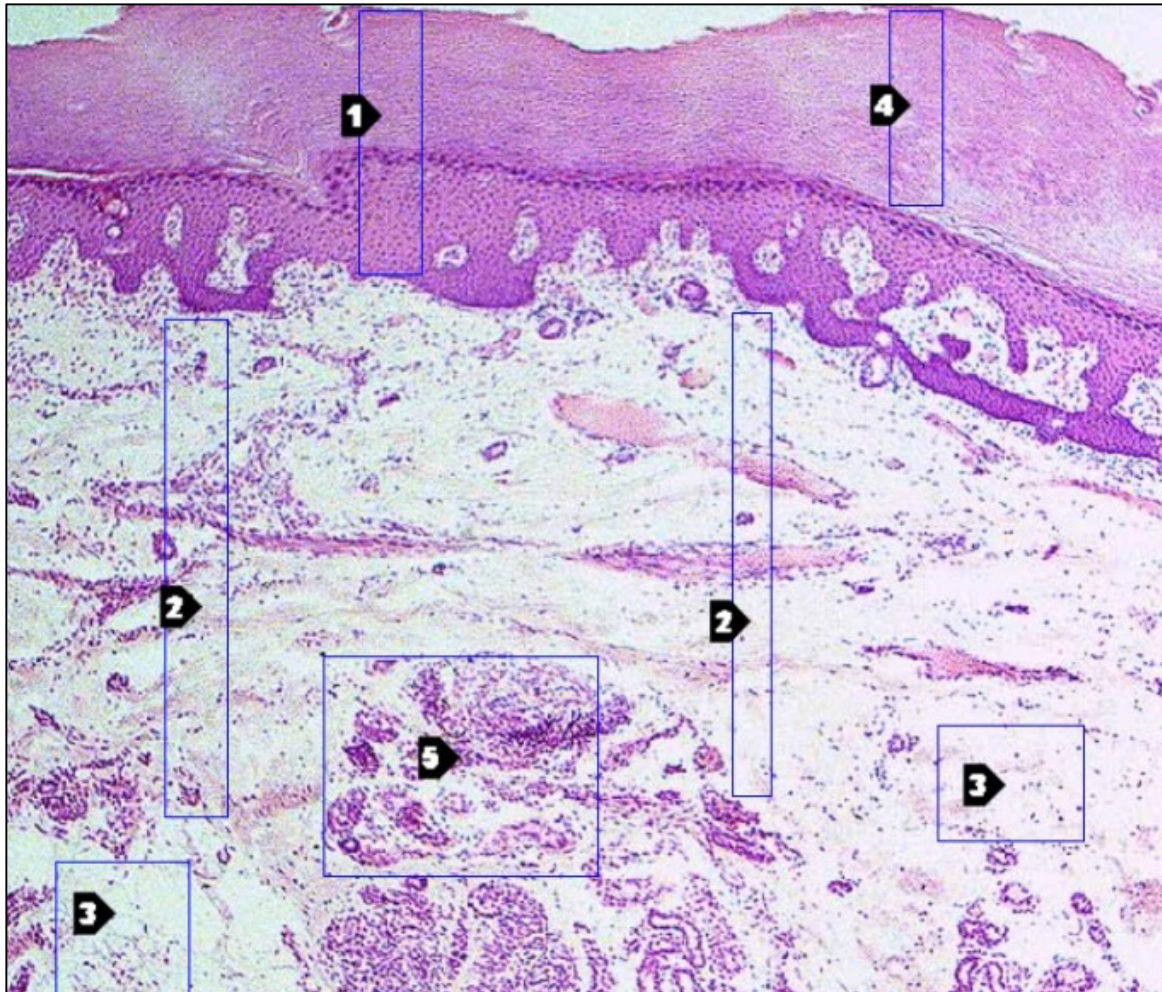


Abb. 8: Aufbau der menschlichen Haut (Teil 1)

Dargestellt ist die lichtmikroskopische Aufnahme eines HE-gefärbten, histologischen Schnitts der Fingerbeere des Menschen in 11-facher Vergrößerung. Zellkerne sind in blau und das Zytoplasma in blassrot angefärbt. Die nummerierten Abschnitte bezeichnen Epidermis (Oberhaut, 1), Corium (Dermis, Lederhaut, 2), Fettgewebsläppchen der Subkutis (Tela subcutanea, 3), Stratum corneum der Epidermis (4), ekkrine Schweißdrüse (5). Entnommen wurde das Bild aus der zweite Version des mikroskopisch-anatomischen Atlas "HistoNet 2000" unter [www.histonet2000.de](http://www.histonet2000.de) (Zugriff 10.09.2013).

Möglicherweise etwas überspitzt jedoch äußerst eindrucksvoll beschrieb Michael Holick die Bedeutung von VD v. a. für Spezies mit UV-abhängiger VD-Synthese wie folgt:

“Nocturnal rodents and other rodent-like species that lived underground needed little, if any, vitamin D to survive. It has been speculated that when the asteroid hit the earth 65 million yr ago, one of the survival characteristics for nocturnal mammals was that they did not require sunlight-mediated vitamin D synthesis to survive, unlike the dinosaurs. Dinosaurs likely depended on the sun to satisfy their vitamin D requirement to utilize dietary calcium efficiently for the maintenance of their massive skeletons. Thus, the lack of sunlight-mediated vitamin D synthesis after the asteroid impact may have been related to the demise of the dinosaurs.” (Holick 2008).

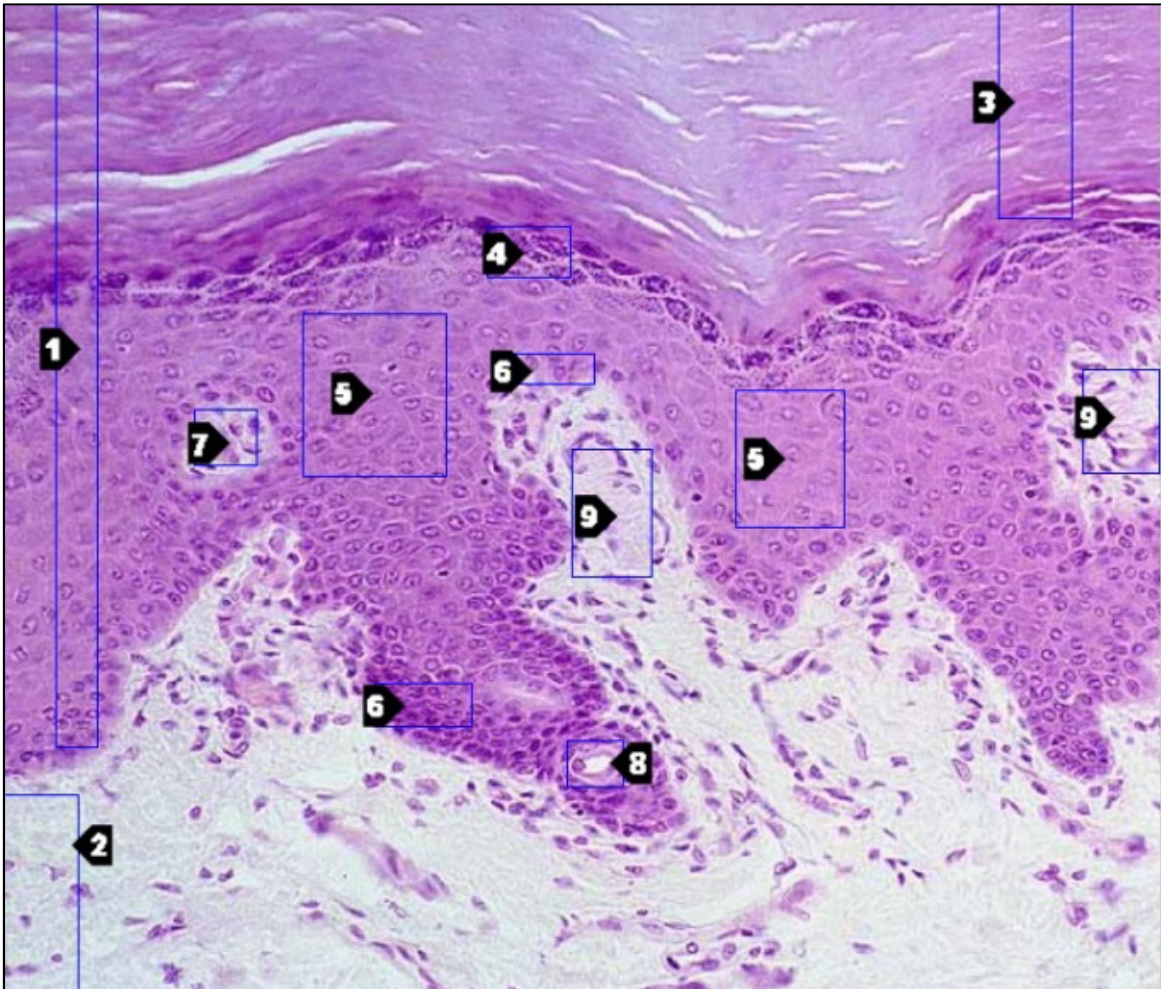


Abb. 9: Aufbau der menschlichen Haut (Teil 2)

Dargestellt ist eine lichtmikroskopische Aufnahme eines HE-gefärbte, histologischen Schnitts der Fingerbeere des Menschen 50-facher Vergrößerung. Zellkerne sind in blau und das Zytoplasma in blassrot angefärbt. Die nummerierten Abschnitte bezeichnen Epidermis (Oberhaut, 1), Corium (Dermis, Lederhaut, 2), Stratum corneum (3), Stratum granulosum (4), Stratum spinosum (5), Stratum basale (6), Bindegewebspapille (quer angeschnitten, 7), Ausführungsgang einer Schweißdrüse (8) und Meißner-Tastkörperchen (9). Entnommen wurde das Bild aus der zweite Version des mikroskopisch-anatomischen Atlas "HistoNet 2000" unter [www.histonet2000.de](http://www.histonet2000.de) (Zugriff 10.09.2013).

## CYP3A-Enzyme in der menschlichen Haut

Einige Studien untersuchten die Expression einzelner (Janmohamed et al. 2001, Lamba et al. 2004b, Jackh et al. 2011) oder mehrerer CYP3A-Isozyme (Li et al. 1994, Vondracek et al. 2001, Smith et al. 2003, Yengi et al. 2003, Smith et al. 2006, Luu-The et al. 2009, Hu et al. 2010) in meist wenigen jedoch auch in bis zu 32 Hautbiopsien. Dabei zeigte sich mit einer Ausnahme (Yengi et al. 2003) CYP3A5 als dominantes Isozym, wobei die beschriebenen Unterschiede zwischen CYP3A4 und CYP3A5 im Bereich zwischen einer 35-fach höheren CYP3A5- (Smith et al. 2003) und 354-fach höheren CYP3A4-Expression (Yengi et al. 2003) lagen. Die CYP3A4-Expression konnte meist nur in einem Teil der untersuchten Hautbiopsien gezeigt werden (Janmohamed et al. 2001, Hu et al. 2010) und variierte 4-fach zwischen den einzelnen Spendern. Dabei erreichte die kutane CYP3A4-mRNA weniger als 1 % bis mehr als 124 % der hepatischen (Janmohamed et al. 2001). Eine weitere Studie zeigte eine CYP3A5-Expression in allen untersuchten Häuten, jedoch

nur in 20-25 % untersuchten Leberproben. Die Autoren folgern daraus, dass die Funktion der CYP3A in der Haut konstitutiv und gewebspezifisch sei (Li et al. 1994).

Darüber hinaus wurde CYP3A4 (Henkler et al. 2011) und CYP3A5 (Li et al. 1994) vereinzelt auf Proteinebene nachgewiesen, jedoch generell meist nur an wenigen Proben, nur auf mRNA-Ebene untersucht oder als Protein nicht detektiert (Yokose et al. 1999, van Eijl et al. 2012). Lokalisiert wurden CYP3A-mRNA und -Protein zellulär v. a. in der Epidermis (Lee et al. 2001, Luu-The et al. 2009, Jackh et al. 2011) und den Talgdrüsen (Lee et al. 2001), genauer den Schweiß sekretierenden Zellen (Janmohamed et al. 2001). Im immunhistochemischen Nachweis befand sich das CYP3A-Protein in den basalen und suprabasalen, nicht-keratinisierten Schichten der Epidermis (Murray et al. 1988, Wolkenstein et al. 1998). Eine Isozym-spezifische Betrachtung fehlt bislang.

Da Hautbiopsien eine begrenzte Ressource darstellen und aufgrund der Notwendigkeit der Reduktion und z. T. mangelnder Übertragbarkeit tierexperimenteller Arbeiten, wurden in den letzten zehn Jahren verstärkt humane Hautmodelle als äquivalenter Ersatz etabliert und hinsichtlich der morphologischen und pharmakokinetischen Gleichwertigkeit untersucht. Dabei werden Epidermis- und Vollhautmodelle unterschieden, wobei entweder primäre Keratinozyten allein oder zusammen mit primären Fibroblasten an der Luft-Medium-Grenze kultiviert werden (Brohem et al. 2011). Die CYP3A-Expression und -Aktivität gilt in den Modellen als mehr oder weniger mit normaler Humanhaut vergleichbar (Neis et al. 2010, Jackh et al. 2011, Götz et al. 2012b).

Bei der Untersuchung an isolierten Hautzellen zeigte sich eine meist geringere Expression und Aktivität der CYP3A als in Hautbiopsien und eine höhere Aktivität in frischen als in gefrorenen Proben (Welch et al. 2013). Primäre Keratinozyten zeigen *in vitro* eine vom Differenzierungsgrad abhängige CYP3A4-Expression, die nach sechs und acht Tagen Kulturdauer ihr Maximum erreicht, doch nichtsdestotrotz 100- bis 1.000-fach unterhalb derer der häufigsten CYP-Isoformen, 4B1, 2W1 und 2C18, bleibt (Du et al. 2006b). Allgemein gelten Keratinozyten als das Hauptreservoir der kutanen CYP-Expression (Baron et al. 2001, Du et al. 2006a) und CYP3A5 als dominantes CYP3A-Isozym (Gonzalez et al. 2001, Saeki et al. 2002, Vyas et al. 2006). Exprimieren Keratinozyten nur CYP3A5 (Gonzalez et al. 2001, Saeki et al. 2002), so konnte CYP3A7 auch in isolierten Langerhans-Zellen und Fibroblasten detektiert werden, wohingegen Melanozyten keine CYP3A-Expression aufwiesen (Saeki et al. 2002). Allgemein konnten nur zwei Studien CYP3A4 in Hautzellen messen, und dies nur in primären (Vyas et al. 2006) oder Dexamethason-behandelten Keratinozyten (Baron et al. 2001). CYP3A-Proteine konnten in 30 µg Keratinozytenlysate (Vyas et al. 2006) bzw. 50 µg Keratinozytenmikrosomen (Baron et al. 2001) nachgewiesen werden.

Der Phase I- und Phase II-Stoffwechsel der Haut beträgt etwa 1/50 dessen der Leber, wobei die Enzyme der Phase II in der Haut deutlich stärker exprimiert sind (Luu-The et al. 2009). Da Phase I-Enzyme in der Regel basal niedrig exprimiert, aber induzierbar sind,

sehen die Autoren den Phase I-Stoffwechsel einschließlich der CYP3A-Enzyme als limitierenden und damit regulierenden Schritt des kutanen (Xenobiotika-) Stoffwechsels an. Zusammen mit der hohen Expression der Phase II-Enzyme beschreiben sie die Haut als wichtiges Organ in der Detoxifikation und Elimination chemischer Substanzen durch die Schweißdrüsen (Luu-The et al. 2009).

Erste Hinweise auf eine messbare CYP3A-Aktivität in der Haut wurden 1987 für die Ratte beschrieben (Mukhtar et al. 1987). Zellulär findet der CYP3A-Metabolismus eher epidermal in den Keratinozyten als in dermalen Fibroblasten statt (Baron et al. 2001, Swanson 2004). In humaner Haut und in Hautmodellen konnte mit den CYP3A-spezifischen Metaboliten 1- und 4-Hydroxymidazolam (Rolsted et al. 2008), 6 $\beta$ -Hydroxytestosteron (Henkler et al. 2011, Götz et al. 2012a) sowie CYP3A-spezifischen Substraten 7-BQ und Luc-BE (Götz et al. 2012b) kutane Aktivität gemessen werden. Allgemein war diese recht gering, nur geringfügig oberhalb der Detektionsgrenze (Kürschner 2007, Götz et al. 2012b) und je nach Untersuchungsmethode 10-, 47- oder 100-fach geringer als in humaner Leber (Rolsted et al. 2008, Götz et al. 2010).

### **Regulation der kutanen CYP3A**

Vitamin D-Rezeptor (VDR, NR1I1), Pregnan X-Rezeptor (PXR, NR1I2) und der konstitutive Androstan-Rezeptor (CAR, NR1I3) bilden die NR1I-Familie nukleärer Rezeptoren und sind ligandenabhängige Regulatoren der *CYP3A*-Genfamilie. Dabei gelten CAR und PXR eher als Xenosensoren, da sie die Expression ihrer Zielgene v. a. in Anwesenheit von Fremdstoffen regulieren; VDR vermittelt v. a. endogene Effekte von Calcitriol. Trotz gewebsspezifischer Expressionsunterschiede zeigt sich eine hohe Korrelation zwischen der PXR- und CAR-Transkription, als auch jeweils zwischen dem Rezeptor und der CYP3A4-Expression (Timsit & Negishi 2007).

CAR konnte bisher mehrfach in der Haut nachgewiesen werden. Dabei reichten Angaben zur Expressionsstärke von sehr gering (Savkur et al. 2003, Lamba et al. 2004a) bis hin zu vergleichbar mit der Leber (Schote et al. 2007). In isolierten Hautfibroblasten wurde kein CAR detektiert (Ellfolk et al. 2009). PXR wurde nicht in Hautbiopsien (Lamba et al. 2004b), jedoch in isolierten dermalen Fibroblasten nachgewiesen (Ellfolk et al. 2009). Eine aktuelle Publikation jedoch beruft sich auf unveröffentlichte Daten, die eine sehr niedrige, jedoch konstitutive Expression sowohl in humaner als auch muriner Haut zeigen (Schmuth et al. 2013). VDR ist nicht nur in epidermalen Keratinozyten exprimiert, sondern ebenfalls in Keratinozyten des äußeren Haarschafts und in der Papille des Haarfollikels (Stumpf et al., 1984; Berger et al., 1988; Reichrath et al., 1994). Die Expression des VDR ist v. a. in der basalen Schicht der Epidermis lokalisiert und nimmt in Richtung des Stratum corneums mit zunehmender Differenzierung der Keratinozyten ab.

### Regulation der CYP3A durch Vitamin D-Metaboliten

Neben den Studien zur basalen CYP3A-Expression in Haut, Hautmodellen und Hautzellen wurde auch deren Regulation untersucht. Hier gibt es jedoch bisher keine eindeutigen Daten. So induzierte Dexamethason die CYP3A4-mRNA bzw. -Aktivität in zwei Studien (Baron et al. 2001, Kürschner 2007), in zwei weiteren Studien jedoch nicht (Du et al. 2006a, Götz et al. 2012b). Gleiches gilt für die Regulation durch UVB-Bestrahlung (Gonzalez et al. 2001, Smith et al. 2003, Kürschner 2007) und Clobetasol (Li et al. 1994, Smith et al. 2006). Smith und Kollegen untersuchten zudem die differentielle mRNA-Expression bei Patienten mit Psoriasis. Dabei zeigte sich CYP3A5 zum einen als dominantes CYP3A-Isozym über CYP3A4, zum anderen eine zweifach verminderte physiologische CYP3A5-Expression in psoriatischer Haut (Smith et al. 2003).

Die Regulation der CYP3A4-Expression durch Calcitriol konnte u. A. in Kolon- (Schmiedlin-Ren et al. 2001), Pankreas- (Schmiedlin-Ren et al. 2001), Prostata- (Maguire et al. 2012), Dünndarmzellen (Schmiedlin-Ren et al. 1997, Harmsen et al. 2008, Pavek et al. 2010, Zheng et al. 2012) und primären Hepatozyten (Schmiedlin-Ren et al. 2001, Drocourt et al. 2002) gezeigt werden. Als eine mechanistische Erklärung gilt u. A. die verstärkte Heterodimerisierung von VDR und RXR in Anwesenheit von 1,25-VD (Jurutka et al. 2005). Schmiedlin-Ren und Kollegen untersuchten ferner die Expression der anderen CYP3A-Isozyme und deren Regulation durch andere Zwischenstufen der VD-Synthesekette. Sowohl CYP3A5 als auch CYP3A7 waren in Caco-2 Zellen durch 1,25-VD induziert, jedoch schwächer als CYP3A4. Letzteres wurde darüber hinaus durch 25-VD, nicht aber VD reguliert (Schmiedlin-Ren et al. 1997). Zur Induktion von CYP3A4 in HepG2-Zellen ist die Datenlage widersprüchlich (Schmiedlin-Ren et al. 2001, Pavek et al. 2010). Die genannten Studien untersuchten die mRNA- sowie Proteinmenge und zeigten meist eine Abhängigkeit von Dosis und Inkubationsdauer. Neben Daten zur Expressionsregulation zeigten Schmiedlin-Ren und andere bereits zuvor eine durch 1,25-VD gesteigerte Aktivität der CYP3A. Calcitriol bewirkte so eine Zunahme der CYP3A-vermittelten 1- und 4-Hydroxylierung von Midazolam in Kolonzellen sowie in Gewebehomogenaten und Mikrosomen von Jejunum und Duodenum (Schmiedlin-Ren et al. 1997, Fisher et al. 1999). Defizitär ist der Erkenntnisstand zur Regulation durch andere VD-Metaboliten neben Calcitriol und der anderen CYP3A neben CYP3A4 in den bereits genannten Organen. Für die Haut fehlen sie völlig. Zudem handelte es sich bei den verwendeten Zelllinien meist um Krebszellen, was die allgemeine Gültigkeit der Ergebnisse zumindest einschränkt. *In vivo* zeigte sich in Dünndarm, Niere und Knochen von Mäusen eine Erhöhung der CYP24A1-Expression 6 h nach subkutaner Injektion von 1,25-VD (Zella et al. 2009, Koszewski et al. 2012). Eine Studie der Verteilung von 1,25-VD nach einer intraperitonealen Injektion in Ratten zeigte 1,25-VD nach 5 h auch in der Haut (Okano et al. 1989). Die hepatische mRNA-Expression der murinen CYP hingegen wurde bisher nur für Dexamethason und Pregnenolon-16 $\alpha$ -Carbonitril (PCN), einem murinen PXR-Liganden untersucht. Interessanterweise war der Plasmaspiegel an 24,25-

VD<sub>3</sub> durch die Behandlung mit PCN nach einer Woche erhöht (2,01-fach), während das zirkulierende 25-VD<sub>3</sub> nicht beeinflusst wurde (Pascussi et al. 2005), was für einen verstärkten Katabolismus des 25-VD<sub>3</sub> durch PXR-regulierte Enzyme, wie z. B. CYP3A spricht. Ferner führte auch in humanen primären Hepatozyten wie in gesunden Probanden die Behandlung mit Rifampicin, einem starken Induktor von CYP3A4, zu einem Anstieg der 4β-Hydroxylierung von 25-VD und zu einer Abnahme des Calcitriolspiegels (Wang et al. 2012) bei gleichzeitiger Induktion der CYP3A4-mRNA (Pascussi et al. 2005). Unstrittig ist außerdem, dass ältere, multimorbide Patienten meist mehrere Medikamente gleichzeitig einnehmen, was nachweislich zu einem schlechteren VD-Status mit geringeren 25-VD-Spiegeln führt (Fabian et al. 2011).

### **Rolle der CYP3A im Vitamin D-Metabolismus**

Auf Sequenzebene zeigte keine der genomweiten Studien zu genetischen und epigenetischen Einflüssen auf die 25-VD- und 1,25-VD-Serumspiegel eine Assoziation mit dem *CYP3A*-Lokus (Ahn et al. 2008, Engelman et al. 2010, Wang et al. 2010, Zhu et al. 2013a). Eine aktuelle, nicht-genomweite Studie identifizierte jedoch *CYP3A4* rs2242480 als Prädiktor für den 25-VD-Spiegel in der chinesischen Studienpopulation (Robien et al. 2012). Eine genomweite Studie zur Wirkung von 1,25-VD hingegen beschrieb *P450 HFLa*, also *CYP3A7*, als Zielgen von 1,25-VD (Wang et al. 2005). Eine andere Studien zur genomweiten Bindung des VDR in lymphoblastoiden Zellen von weißen europäischen Spendern zeigte keine differentielle Expression von *CYP3A*, jedoch von *CYP24A1* (2,13x) und *CYP19A1* (1,35x) (Ramagopalan et al. 2010).

In 76 Patienten wurde eine starke Korrelation ( $r = 0,65$ ) zwischen dem 25-VD-Serumspiegel und dem von 4β-Hydroxycholesterol (4β-OHC), einem endogenen Marker der CYP3A-Aktivität, beschrieben (Honda et al. 2011). Jedoch zweifelten noch im gleichen Jahr Diczfalusy und Björkhem diesen Zusammenhang an und führten hierfür mehrere Gründe an: erstens seien die auf das Gesamtcholesterol normalisierten Werte des 4β-Hydroxycholesterol deutlich höher als bisher beschriebene Werte; zweitens zeige die Studienpopulation eine deutliche Bildung zweier Cluster, von denen nur das mit erhöhten Aktivitätswerten eine Korrelation zwischen 4β-OHC und 25-VD zeigte und drittens wurde durch Honda et al. nicht ausgeschlossen, dass es sich um Autoxidation der Proben handelt, die 25-VD und 4β-OHC gleichermaßen betreffen würde (Diczfalusy & Bjorkhem 2011). Für die Autoxidation wäre ein erhöhtes Verhältnis von 4α- zu 4β-OHC aussagekräftig (Diczfalusy et al. 2008). Letztlich konnten Diczfalusy in zwei eigenen Arbeiten keinen Zusammenhang der CYP3A-Aktivität und dem 25-VD-Spiegel feststellen, selbst unter Berücksichtigung der Einnahme etwaiger CYP3A4-induzierender Medikamenten (Diczfalusy & Bjorkhem 2011, Björkhem-Bergman et al. 2013), nicht jedoch der saisonalen Variabilität. Da das Verhältnis aus 4β-OHC und Cholesterol jedoch nicht nur die CYP3A4-, sondern auch CYP3A5-Aktivität erfasst (Gebeyehu et al. 2011), fehlt hier möglicherweise die Berücksichtigung des *CYP3A5\*3*-Genotyps. Umgekehrt hatte die

Supplementierung mit VD keinen Einfluss auf die CYP3A-Aktivität (Björkhem-Bergman et al. 2013), obwohl 4 $\beta$ -OHC sehr wohl durch CYP3A-Induktoren messbar beeinflusst wird (Kanebratt et al. 2008, Diczfalusy et al. 2009, Diczfalusy et al. 2011). Dennoch gibt es saisonale Unterschiede und damit möglicherweise eine Abhängigkeit von UV-Strahlung in der CYP3A4-Aktivität und -Expression in der Darmschleimhaut (Thirumaran et al. 2012) und der Plasmakonzentration von CYP3A4-Substraten (Lindh et al. 2011).

Abb. 4 auf S. 14 zeigt die Studienlage zum Metabolismus der einzelnen VD-Metaboliten durch CYP3A-Enzyme. Erste Hinweis auf einen Einfluss von VD auf die CYP3A4-Aktivität erbachten Yamazaki und Kollegen, die in Anwesenheit von VD<sub>3</sub> eine um 25 % reduzierte Metabolisierung von Nefedipine zeigten (Yamazaki & Shimada 1999). In einem ähnlichen Versuchsaufbau aktivierte Cholesterol die Aktivität des menschlichen CYP3A4 (110  $\pm$  11 %) und die des CYP3A4 des Schimpansen (105  $\pm$  5,6 %) (Kumar et al. 2009). Unklar bei dieser Methode ist jedoch der genaue Mechanismus einer Aktivierung oder Hemmung. Ob es sich also um kompetitive Hemmung handelt, was für VD<sub>3</sub> als CYP3A4-Substrat spräche, oder um nicht-kompetitive bleibt offen. Durch HPLC-gestützte Analysen zeigten sich sowohl Calcidiol (Wang et al. 2012) als auch Calcitriol (Xu et al. 2006) und Ergocalciferol (VD<sub>2</sub>), nicht aber VD<sub>3</sub> (Gupta et al. 2004) und 7-DHC (Shinkyō et al. 2011) als Substrat einzelner CYP3A-Isozymen.

In HaCaT-Zellen (Lehmann et al. 2000a), im *ex vivo*-Hautmodell (Lehmann et al. 2001) sowie *in vivo* (Lehmann et al. 2003) konnte die Calcitriol-Synthese durch 1 bis 10  $\mu$ M Ketoconazol inhibiert werden. Ketoconazol gilt als selektiver CYP3A-Inhibitor in submikromolaren Konzentrationen (Khojasteh et al. 2011) und hemmt hierbei v. a. die Enzymaktivität auf Proteinebene und in geringerem Maße die Expression (Fuchs et al. 2013). Da es daneben auch CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2B6 und CYP3E1 in Konzentrationen zwischen zwei bis über 50  $\mu$ M inhibiert (Khojasteh et al. 2011), kann jedoch nicht eindeutig auf einen alleinigen Einfluss der CYP3A-Aktivität auf die Calcitriol-Synthese in der Haut geschlossen werden.

### **CYP3A und Veränderungen des Knochenbaus**

Genomweite Studien zu Osteoporose, Knochendichte und Frakturrisiko fanden keine direkte Assoziation mit dem CYP3A-Lokus (Richards et al. 2012). Eine neuere Studie hingegen untersuchte den Zusammenhang zwischen der Knochendichte des Beckens an 5.715 europäischen Probanden mit biologischen Reaktionswegen aus insgesamt 301.019 SNPs verschiedener Gene. Dabei wurde u. A. der Abbauweg von  $\gamma$ -Hexachlorocyclohexan als signifikant verändert identifiziert; zu den involvierten Genen zählen u. A. CYP3A5, CYP3A43 und CYP3A7 (Lee et al. 2012). Bacsı und Kollegen zeigten, dass homozygote Träger der CYP3A7\*1C-Variante eine verringerte Knochendichte der Lendenwirbel bei zugleich verändertem Serumspiegel des Dehydroepiandrosteron-Sulfat (DHEAS) aufwiesen (Bacsı et al. 2007). Beim Vergleich der CYP3A7\*1C-Allelfrequenz

unterschieden sich gesunden postmenopausalen Frauen und Osteoporose-Patientinnen hingegen nicht (Bacsi et al. 2007). Für DHEA, ebenfalls Steroidhormon und Vorläufer des DHEAS, wurde gezeigt, dass verminderte Serumkonzentrationen u. A. mit dem Verlust von Knochensubstanz assoziiert waren (Traish et al. 2011). Der *CYP3A7\*1C*-Polymorphismus verursacht die Persistenz der *CYP3A7*-Expression bei Erwachsenen (Sim et al. 2005) und konnte bei männlichen (Smit et al. 2005) wie auch weiblichen Probanden (Goodarzi et al. 2008) mit erniedrigten DHEAS-Plasmakonzentrationen assoziiert werden. Daneben zeigte ein weiterer Polymorphismus proximal zu *CYP3A43* (rs17277546) diesen Effekt auf die DHEAS-Spiegel (Zhai et al. 2011).

Des Weiteren wurde Pharmaka induzierte Osteomalazie bei Einnahme von Antiepileptika, Glucocorticoiden, Rifampicin und Phenobarbital beschrieben (Holick 2005). Diese Medikamente gelten als *CYP3A*-Induktoren und bereits 1972 wurde Rachitis bei Patienten beobachtet, die mit Phenobarbital behandelt wurden (Hahn et al. 1972a, Hahn et al. 1972b). Neben der Aktivierung der *CYP3A*-Enzyme hemmten 1,5 mM Phenobarbital die 25-Hydroxylierung von  $1\alpha$ -VD in Schweinehepatozyten *in vitro* (Hosseinpour et al. 2007).

## Hypothese und Ziele der Arbeit

Bei Betrachtung der weltweiten Häufigkeitsverteilung des *CYP3A5*\*3-Allels (Abb. 1) aber auch anderer funktioneller Genvarianten fällt eine starke Korrelation mit der Hautfarbe endogener Bevölkerungen (Abb. 7) auf. Daraus abgeleitet stellt sich zunächst die Frage, ob die Deckung der Verteilungsmuster zufällig, d. h. durch genetischen Drift und Migration entstand oder als Anpassung an die Umwelt natürlich selektiert wurden. Festhalten lässt sich, dass *CYP3A*-Genotypdaten eine überzufällige Kopplung einzelner Polymorphismen außerhalb Afrikas aufweisen, die wie anderen Sequenzdaten auf eine positive Selektion im Laufe der Migration des modernen Menschen hindeutet. Zum zweiten stellt sich die Frage nach der Funktion der *CYP3A*-Enzyme, die selektiert wurde. Eine indirekte Argumentation führt hier über die Selektion der Hautfarbe. Rachitis, eine VD-Mangelerkrankung, gilt als der wahrscheinlichste Selektionsfaktor für die weniger starke Pigmentierung der Haut in nicht-afrikanischen Bevölkerungen (Abb. 7). Rachitische Knochenveränderungen v. a. der Beckenknochen führen zu Geburtskomplikationen und verringern nachweislich die Fertilität und damit die evolutionäre Fitness. Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit von  $VD_3$  zu Steroiden ist es nicht überraschend, dass *CYP3A*-Enzymen, insbesondere der Isoform *CYP3A4*, zunehmend eine Schlüsselrolle im  $VD_3$ -Metabolismus zugeschrieben wird. Auch neuere Studien zeigten, dass *CYP3A*-Proteine an mehreren Stellen in den  $VD_3$ -Metabolismus eingreifen (Abb. 4). Allerdings sind bisher keine Daten über den Einfluss des *CYP3A*-Expressionsstatus oder der *CYP3A*-Polymorphismen auf den systemischen oder kutanen  $VD_3$ -Metabolismus oder der Knochengesundheit veröffentlicht worden.

Unstrittig als Anpassung für einen ausreichenden VD-Spiegel und letztlich eine gesunde Knochenentwicklung in nicht-afrikanischen Populationen gilt die Hypopigmentierung der Haut als Anpassung für mehr VD-Synthese. Die Hypothese dieser Arbeit postuliert einen weiteren Mechanismus als Anpassung an eine verminderte Sonneneinstrahlung mit zunehmender Entfernung vom Äquator (Abb. 10). Demnach gilt Rachitis als negativ selektierter Phänotyp und als Auslöser der positiven Selektion des *CYP3A*-Lokus. Die damit einhergehende Abnahme der *CYP3A*-Expression besonders in Europäern diene als Anpassung gegen den Abbau der Vorstufen des aktiven VD-Hormons.

Gemäß der Hypothese wäre zu erwarten, dass *CYP3A* in der Haut (polymorph) exprimiert sind und dass diese kutane Expression durch VD-Metaboliten reguliert ist. Zudem wäre anzunehmen, dass *CYP3A*-Enzyme zum Abbau des aktiven VD und v. a. dessen kutanen Vorstufen, fähig ist. Letztlich wäre systemisch durch den verstärkten Abbau der VD-Vorstufen bei einer hohen *CYP3A*-Expression einen schlechteren VD-Status und eine geringere Knochenmineraldichte zu erwarten. Dies würde sich durch eine höhere Inzidenz z. B. von Osteoporose in Trägern des *CYP3A5*\*3-Allels widerspiegeln.

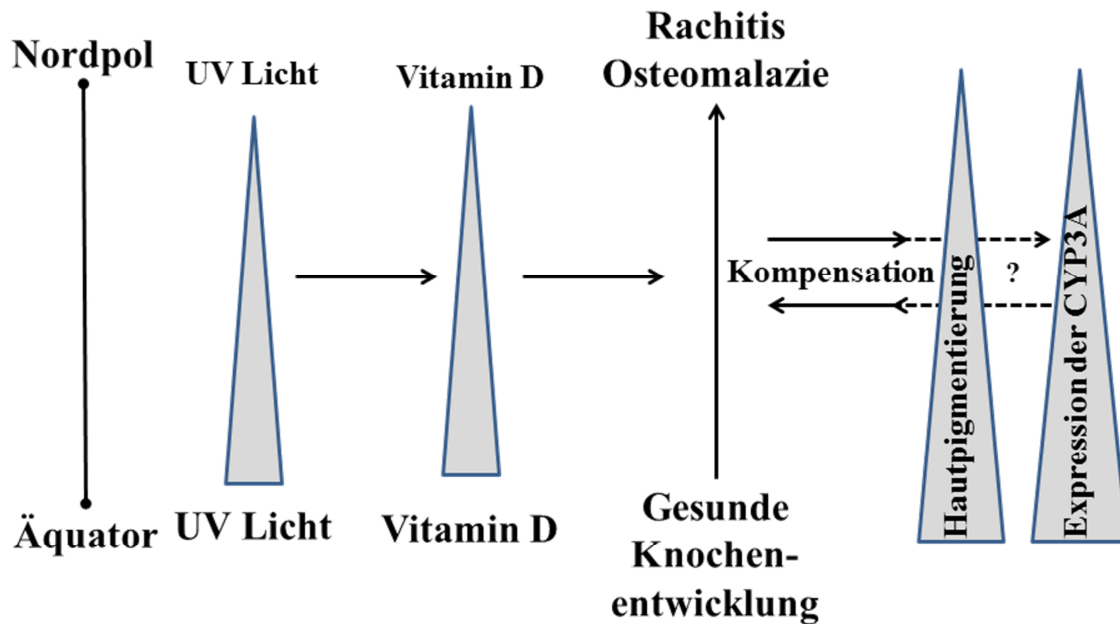


Abb. 10: Schematische Darstellung der Arbeitshypothese

Zur Klärung dieser Fragen erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Quantifizierung der CYP3A-mRNA und der -Proteinmenge sowie deren Lokalisation in humanen Hautbiopsien. Des Weiteren wurde die Regulation der CYP3A-Expression durch VD-Metaboliten in einer Hautzelllinie und primären Hautzellen quantifiziert und mittels Reporter- und 2-Hybrid-Assays mechanistisch untersucht. Daneben erfolgte die Charakterisierung der Aktivität der CYP3A in humaner Haut mittels fraktionierten Hautproteinen. Die Bestimmung der katabolen Kompetenz der einzelnen CYP3A-Isozyme gegenüber den kutanen Vorstufen des aktiven VD-Hormons, 7-DHC und VD, erfolgte mit rekombinant exprimierten Enzymen. Die entstandenen Metaboliten wurden anschließend chromatographisch aufgetrennt und mit UV bzw. Massenspektrometrie detektiert. Zuletzt wurde an zwei europäischen Studienkollektiven der klinische Einfluss des CYP3A-Expressionsstatus, abgeleitet anhand des *CYP3A5*\*3-Genotyps, auf den systemischen VD-Status und die Knochenmineraldichte untersucht.

Durch die Charakterisierung der CYP3A-Enzyme in der Haut als größtes Organ des Menschen soll deren Bedeutung im Stoffwechsel sowohl von Fremdstoffen, als auch von körpereigenen Substanzen untersucht und therapeutische Möglichkeiten bei Gabe über die Haut überprüft werden. In letzter Konsequenz soll dies eine Aussage ermöglichen, ob Rachitis als treibende Kraft in der positiven Selektion des *CYP3A*-Lokus bei Europäern wahrscheinlich ist und so zur heutigen interindividuellen und populationsabhängigen Variabilität des Medikamentenstoffwechsels geführt haben könnte.

## Material

### Allgemeines

Verwendete Plastikware entsprach handelsüblicher Qualität und Reinheitsgrad (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen oder Eppendorf, Hamburg). Alle Chemikalien wurden im höchsten verfügbaren Reinheitsgrad verwendet. Die Prozentigkeit selbst hergestellter Puffer, Lösungen und Reagenzien versteht sich, wenn nicht gesondert angegeben, als Volumen-Prozent (v/v). Das verwendete Wasser war einfach (dH<sub>2</sub>O) oder zweifach entionisiert (ddH<sub>2</sub>O). Letzteres wurde einer Reinwasser-Filteranlage entnommen (Milli-Q Plus oder Synergy UV Ultrapure Typ 1, Millipore Waters, Eschborn). Alle selbst hergestellten Puffer wurden mit ddH<sub>2</sub>O angesetzt und - wenn nicht gesondert angegeben - in einfacher Konzentration verwendet. Für die sterilen Arbeiten der Zellkultur oder für den Umgang mit DNA wurde das ddH<sub>2</sub>O zusätzlich autoklaviert oder für RNA-basierte Versuche zur Inaktivierung von RNasen mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC, Carl Roth, Karlsruhe) behandelt. Hierfür wurde DEPC 1:1.000 in ddH<sub>2</sub>O gelöst, über Nacht gerührt und 20 min durch Autoklavieren inaktiviert. Alle Arbeitsschritte wurden, wenn nicht gesondert erwähnt, bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt.

Die Arbeiten der Zell- und Gewebekultur wurden steril unter dem Laminar Flow Labgard Klasse II (NuAire Modell NU-437, IBS Integra Biosciences, Fernwald) durchgeführt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % bzw. 8 % CO<sub>2</sub> in einem CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank (NuAire Modell NU-550E, IBS Integra Biosciences, Fernwald).

Folgende Tabellen fassen weitere wichtige versuchsübergreifende Materialien, wie verwendete Plasmide (Tab. 4), VD-Metaboliten (Tab. 5), Antikörper (

Tab. 6) und rekombinant exprimierte Proteine (

Tab. 7) sowie das menschliche Probenmaterial (Tab. 8) zusammen. Versuchsspezifische Reagenzien hingegen werden an entsprechender Stelle der jeweiligen Methodenbeschreibung angeführt. Luziferase meint - wenn nicht gesondert erwähnt - die Firefly-Luziferase des Glühwürmchens (*Photinus pyralis*, LINNAEUS, 1767) im Gegensatz zur Renilla-Luziferase der Seefeder (*Renilla reniformis*, PALLAS, 1766).

Tab. 4: Plasmide

Aufstellung der verwendeten Plasmide unter Nennung der Plasmidbezeichnung, der Beschreibung des Konstrukts bzgl. Insert und Vektor (in Klammern) sowie des Verwendungszwecks und der Herkunft. RGA steht für Reporteragen-Assay, 2HA für 2-Hybrid-Assay, TG für die Generierung der transgenen *CYP3A5*-Luc-Mäuse und qRT-PCR für die Verwendung als Plasmidstandardreihe während der quantitativen PCR.

Name	Beschreibung	Assay	Herkunft
p6,2kb-Luc	6,2 kb des menschlichen <i>CYP3A5</i> -Promotors vor dem Luziferase-ORF (pGL3-basic)	RGA, TG	(Nem et al. 2012)
p3A4-pER6	430 bp des proximalen Promotor des humanen <i>CYP3A4</i> vor der <i>Luziferase</i> (pGL3-basic)	RGA	(Qiu et al. 2010),
p3A5-370	370 bp des humanen <i>CYP3A5</i> -Promotors vor dem Luziferase-ORF ( pGL3-basic)		(Nem et al. 2012)

p3A5(-688/mER6)	688 bp des menschlichen <i>CYP3A5</i> -Promotor mit mutiertem proximalen ER6-Motiv		(Burk et al. 2004)
pcDhuPXR	Expressionsplasmid des humanen PXR (pcDNA3.1)		(Geick et al. 2001)
pcDhuVDR	Humanes VDR-Expressionsplasmid (pcDNA3.1)		(Burk et al. 2005)
pcDhu-CAR1	Expressionsplasmid des menschlichen CAR-Splicevariante 1 (SV1, Wildtyp) (pcDNA3.1)		(Burk et al. 2002)
pcDhuCAR-SV2	Expressionsplasmid der humanen CAR-Splicevariante 2 (SV2) (pcDNA3.1)		(Arnold et al. 2004)
pRL-EF1 $\alpha$ 1	Expressionsplasmid der Renilla-Luziferase zur Normalisierung der Transfektionseffizienz	RGA,	(Bros et al. 2003).
pUC18	Vektor zum Auffüllen der Gesamtmenge transfizierter DNA	2HA	
pVP16-AD	Plasmid zur Herstellung eines Fusionsplamids mit der Aktivierungsdomäne des VP16 (aa 446-490)		Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
pVP16-huVDR(90-427)	Plasmid zur Expression eines Fusionsproteins aus der VP16-AD und der VDR-Ligandenbindedomäne (aa 90-427) (pVP16-AD)		Oliver Burk, IKP Stuttgart
pVP16-huCAR1(105-348)	Plasmid zur Expression eines Fusionsproteins aus der VP16-AD und der Ligandenbindedomäne der CAR-SV1, dem Wildtyp-CAR (aa 105-348) (pVP16-AD)		(Arnold et al. 2004)
pVP16-huCAR2(105-348)	Plasmid zur Expression eines Fusionsproteins aus der VP16-AD und der Ligandenbindedomäne der CAR-SV2 (aa 105-348) (pVP16-AD)	2HA	(Arnold et al. 2004)
pVP16-huPXR(108-434)	Plasmid zur Expression eines Fusionsproteins aus der VP16-AD und der PXR-Ligandenbindedomäne (aa 108-434, pVP16-AD)		(Burk et al. 2005)
pGL3-G5	Reportergen-Konstrukt mit einer pentameren GAL4-Bindedomäne (UAS) vor Luziferase (pGL3-basic)		(Arnold et al. 2004)
pM-RXR $\alpha$ (226-462)	Plasmid zur Expression des Fusionsprotein aus RXR $\alpha$ -Ligandenbindedomäne (aa 226-462) und GAL4-DNA-Bindedomäne (pM)		(Arnold et al. 2004)
p105(3A4)	Synonym: p3A4WTpCI, Expressionsplasmid des humanen CYP3A4 (pCI)		(Koch et al. 2002)
p3A5	Synonym: p3A5pUC zur Expression des humanen CYP3A5 (pUC19)	qRT-PCR	(Koch et al. 2002)
p3A7	Synonym: p3A7cdNA zur Expression des humanen CYP3A7 (pBluescript SK-)		(Koch et al. 2002)

Die Bezeichnung der VD-Metaboliten ohne Index meint bei der Beschreibung physiologischer Zusammenhänge sowohl das VD<sub>2</sub>- als auch das zugehörige VD<sub>3</sub>-Derivat. In den hier dargestellten Versuchen wurde, wenn nicht gesondert erwähnt VD<sub>3</sub> bzw. dessen hydroxylierte Formen verwendet. Allgemein orientieren sich die verwendeten Konzentrationen der VD-Metaboliten an bisherigen Veröffentlichungen mit ähnlichem Versuchsaufbau, sowie an den physiologischen Serumkonzentrationen. Diese liegen für VD, 25-VD und 1,25-VD bei 0,5-25 ng/ml (1,5-65 nM), 20-60 ng/ml (50-150 nM) respektive 20-60 pg/ml (50-150 pM) (Blaney et al. 2009).

Tab. 5: Vitamin D-Metaboliten

Alle Substanzen wurden im Reinheitsgrad > 98 % HPLC bzw. Chol. und 1,25-VD in > 99 % HPLC von Sigma (Schnelldorf) bezogen. Gelöst wurden die Substanzen in DMSO, Chol. allgemein und 7-DHC für Induktionsversuche im Reporter-Gen-Assay und 1,25-VD im Inhibitionsassay z. T. in Ethanol (100 %). Die verwendeten Endkonzentrationen der Substanzen betragen 5 und 25 µM im Inhibitionsassay bzw. bei Untersuchungen der VD-Metaboliten und 0,5, 1 oder 10 µM bei Versuchen an Zellen. VD<sub>2</sub> wurde zur Etablierung der UV-HPLC vor der Extraktion der lipophilen Substanzen als Standard in einer Konzentration von 2,5 µM hinzugegeben.

Substanz	Synonyme	Katalognummer	Endkonzentration	
			Zellkultur	Metabolismus
Chol.	Cholesterol	C8667	10 µM	-
7-DHC	7-Dehydrocholesterol, Pro-Vitamin D <sub>3</sub>	30800	10 µM	5/25 µM
VD	Vitamin D <sub>3</sub> , 7-Dehydrocholesterol (aktiviert), Cholecalciferol	C9756	1/10 µM	5/25 µM
VD <sub>2</sub>	Ergocalciferol, ≥ 98.0 % (sum of enantiomers, HPLC)	95220	2,5 µM	2,5 µM
25-VD	25-Hydrocholecalciferol, 25-Hydroxy-Vitamin D <sub>3</sub>	H4014	10 µM	5/25 µM
1,25-VD	Calcitriol, 1,25-Dihydroxycholecalciferol	D1530	500 nM	5/25 µM

Tab. 6: Antikörperliste

Zu jedem Antikörper sind die Zielstruktur, der Wirtsorganismus, die Katalognummer, der Hersteller und die Verwendungsart angegeben. Dabei steht AK für Antikörper, WB für Western Blot und IHC für Immunhistochemie. Beide sekundären Antikörper für WB sind zur Reduktion der Kreuzreaktivität mit humanem Serum gesättigt.

Zielstruktur, Wirt	Katalognummer	Hersteller	Anwendung
Humanes CYP3A4 (HL3), Maus	sc-53850	Santa Cruz, Dallas, USA	WB: 1:100 bzw. 1:250 in 5 % Milchpulver IHC: 1:50 in AK-Puffer
Humanes CYP3A5, Hase	458235	BD Bioscience, Woburn, USA	WB: 1:2.000 in 5 % Milchpulver IHC: 1:500 in Antikörper-Puffer
Humanes CYP3A5 (F18 P3 B6), Maus	C4743	Sigma, Schnelldorf	WB: 1:100 - 1:2.000 in 5 % Milchpulver
Humanes, murines Calnexin (H-70), Hase	Sc-11397	Santa Cruz, Dallas, USA	WB: 1:200 in 5 % Milchpulver

Humane GAPDH (6C5), Maus	sc-32233	Santa Cruz, Dallas, USA	WB: 1:10.000 in 5 % Milchpulver
anti-Maus IgG, Ziege	A6782	Sigma, Schnelldorf	WB: 1:10.000 in 5 % Milchpulver
anti-Hase IgG, Ziege	A0545	Sigma, Schnelldorf	WB: 1:5.000 in 5 % Milchpulver
anti-Hase IgG, Ziege	E0432	Dako, Hamburg	IHC: 1:300 in AK-Puffer
anti-Maus IgG, Pferd	BA-2000	Vector, Burlingame, USA	IHC: 1:200 in AK-Puffer

Tab. 7: Rekombinante Proteine

Diese wurden zum einen für die Untersuchung der Aktivität der CYP3A im VD-Metabolismus (Inhibitionsassay, UV-HPLC) und zum anderen als Positivkontrolle im Immunoblotting (\*) eingesetzt.

Protein	Beschreibung	Katalognummer	Hersteller
rCYP3A4	Humanes CYP3A4 + P450 Reduktase + Zytochrom b <sub>5</sub> SUPERSOMES mit Baculovirus-Expressionssystem in infizierten Insektenzellen (BTI-TN-5B1-4) koexprimiert	456202	BD Bioscience Woburn, USA
rCYP3A5	Humanes CYP3A5 + P450 Reduktase + Zytochrom b <sub>5</sub> SUPERSOMES mit Baculovirus-Expressionssystem in infizierten Insektenzellen (BTI-TN-5B1-4) koexprimiert	456256	BD Bioscience Woburn, USA
rCYP3A7	Humanes CYP3A7 + P450 Reduktase + Zytochrom b <sub>5</sub> SUPERSOMES mit Baculovirus-Expressionssystem in infizierten Insektenzellen (Sf9) koexprimiert	456237	BD Bioscience Woburn, USA
rCYB5	rekombinantes humanes Zytochrom b <sub>5</sub> mit Histidin-Markierung in E. coli exprimiert	P2252	Life Technologies, Carlsbad, USA
rCYP3A4 *	Humanes CYP3A4 + P450 Reduktase SUPERSOMES mit Baculovirus-Expressionssystem in infizierten Insektenzellen (BTI-TN-5B1-4) koexprimiert	456207	BD Bioscience Woburn, USA
rCYP3A5 *	Humanes CYP3A5 + P450 Reduktase SUPERSOMES mit Baculovirus-Expressionssystem in infizierten Insektenzellen (Sf9) koexprimiert	456235	BD Bioscience Woburn, USA

### Menschliches kutanes Probenmaterial

Menschliches peri-operatives kutanes Überschussmaterial wurde von Dres.. Sebastian Nestler (94 Proben, Urologie, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz) und Ralf Mayer (2 Proben, III. Medizinische Klinik und Poliklinik, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz) bereitgestellt. Hierfür wurden die Proben steril entnommen und in 1x HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, PAA, Pasching) kurze Zeit bei RT und post-operativ bei 4 °C gelagert. Von der Entnahme

bis zur Vorbereitung der Proben für die Lagerung bei -80 °C oder die Fixierung für histologische Untersuchungen vergingen meist weniger als 30 min, maximal vereinzelt bis zu 24 h. Tab. 8 fasst einige Daten der gesammelten Hautproben zusammen.

Zum Vergleich der Expression zwischen verschiedenen Geweben wurden bei -80 °C gelagerte Organstücke von Niere (Thelen et al. 1999), Herz (Kassner et al. 2008) und Leber (Jürgen Brochmöller, Klinische Pharmakologie, Georg-August-Universität Göttingen) sowie Leber-Mikrosomen (Koch et al. 2002) anderer Studien verwendet.

Tab. 8: Menschliche Hautproben

Spender	Anzahl	Areal	Altersverteilung	
			Median	Minimum, IQR 1-3, Maximum
gesamt	96		10	1,2 Monate, 2-45,4 Jahre, 92,5 Jahre
♂	93	Vorhaut	9	1,2 Monate, 2-38 Jahre, 92,5 Jahre
♀	3	Brust/Abdomen	55	46, 58 und 62 Jahre

### Studienkollektive mit bekannten Vitamin D- und Knochendichte-Status

Genomische DNA zweier Studienkollektive europäischer Probanden wurden von Prof. Péter Lakatos (Bacsi et al. 2007) und Heide Siggelkow zur Verfügung gestellt. Die 250 respektive 438 Proben wurden in Budapest im März/April 2008 bzw. in Göttingen in einem Zeitraum von Dezember 1998 bis November 2005 gesammelt. Weitere Charakteristika der Probanden wurden bereits vor Beginn dieser Arbeit erhoben und für statistische Analysen im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Eine Übersicht über die Parameter und die Anzahl der jeweils untersuchten Probanden befindet sich in Tab. S 1 im Anhang, darunter VD-Status (Serumkonzentration 25-VitD) und Knochenmineraldichte. Letztere wurde in beiden Studienpopulationen mittels DXA an 3 bzw. 4 kaudalen lumbalen Wirbeln und Messpunkten des Hüftgelenks bestimmt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Proben am Locus des *CYP3A5*\*3-Allels genotypisiert und der Einfluss der daraus abgeleiteten *CYP3A5*-Expression auf VD- und Knochendichte-Status untersucht. Aufgrund der saisonalen Schwankung des 25-VitD-Spiegels wurde hierbei der Entnahmezeitpunkt der untersuchten Proben gesondert berücksichtigt (Zhang et al. 2011).

Für die ungarische Studienpopulation konnte bereits ein Zusammenhang der lumbalen Knochenmineraldichte (T-Werte) mit dem *CYP3A7*\*1C-Allel gezeigt werden (Bacsi et al. 2007). Dabei wiesen homo- bzw. heterozygote Träger des \*1C-Allels, mit anderen Worten Probanden mit einer ins Erwachsenenalter persistierender *CYP3A7*-Expression, um 1,92 respektive 1,55 Standardabweichungen geringere T-Werte auf im Vergleich zu Trägern des *CYP3A7* Wildtyp-Allels auf. Für die Göttinger Probanden wurden bisher keine Daten veröffentlicht.

## **Transgene *CYP3A5*-Luc-Mäuse**

Transgene *CYP3A5*-Luziferase(*CYP3A5*-Luc)-Mäuse (Nem et al. 2012) exprimieren das Reportergen Luziferase unter Kontrolle der proximalen 6,2 kb des menschlichen *CYP3A5*-Promotors (Nem et al. 2012). Die stärkste messbare Luziferaseaktivität zeigten diese in Homogenaten von Dünndarm und Vormagen, keine jedoch in Leber und Niere (Nem et al. 2012). Von den zunächst etablierten Linien transgener Mäuse zweier Gründertiere A und C wurde die Linie C weitergeführt und für alle hier beschriebenen Experimente verwendet. Die Tierhaltung erfolgte in den Räumen der ZVTE der Universität Mainz unter artgerechten Bedingungen mit unbegrenztem Zugang zu Futter und Trinkwasser. Die Zucht erfolgt mit 2-3 Zuchtpaaren aus je einem heterozygoten *CYP3A5*-Luc-Männchen und zwei weiblichen C75BL6/J-Tieren pro Zuchtpaar bei Bedarf, jedoch mind. in einem Intervall von sechs Monaten. Beim Absetzen der Jungtiere im Alter von 18-21 Tagen erfolgte die käfigweise individualisierende Markierung durch Ohrstanzen und die Biopsie der Schwanzspitze zur Gewinnung genomischer DNA zur Genotypisierung. Die *in vivo*-Messungen wurden durch das Landesuntersuchungsamt Koblenz (Nummer: 23 177-07/G 10-1-045) genehmigt.

## Methodik

### Zellkultur

Die humane Adenokarzinomzelllinie LS174T (Tom et al. 1976) sowie die Nierenzelllinie der afrikanischen Grünen Meerkatze COS-7 (Gluzman 1981) wurde von der American Type Culture Collection (Manassas, VA) bezogen. Anders als bei Hautzellen von Nagetieren, die durchaus häufig spontan immortalisieren, sind bei Zellen menschlichen Ursprungs nur bisher drei Fälle einer Spontanimmortalisierung beschrieben (Baden et al. 1987, Boukamp et al. 1988, Rice et al. 1993). Eine solche menschliche, epitheliale Zelllinie, genannt HaCaT (*human adult low calcium high temperature*, Boukamp et al. 1988), wurde freundlicherweise von AG Closs (Pharmakologisches Institut, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz) zur Verfügung gestellt. Diese selbst hatten die Zellen von Dr. S. Frank (pharmazentrum frankfurt, Universitätsklinikum Frankfurt/Main) erhalten.

Die Zellen wurden wie beschrieben kultiviert (Hustert et al. 2001b), mit Ausnahme der fehlenden Supplementierung der COS-7- bzw. HaCaT-Medien mit 1 % essentiellen Aminosäuren. Verwendet wurde stets Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium (mit Phenolrot und L-Glutamin, ohne Pyruvat) oder für Induktionsversuche ohne Phenolrot. Die Supplementierung erfolgte mit 5 % fötalem Kälberserum (FCS), das zuvor Hitze inaktiviert oder bei Induktionsversuchen mit Aktivkohle behandelt wurde. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C bei 8 % CO<sub>2</sub>.

Primäre Keratinozyten und Fibroblasten wurden von Prof. Jens Malte Baron (Dermatologie, Universitätsklinikum Aachen) und Monika Schäfer-Korting (Pharmakologie und Toxikologie, FU Berlin) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in Keratinozytenwachstumsmedium (KGM-BulletKit, Lonza, Basel, Schweiz) in Kulturgefäßen mit CellBind-Oberfläche (Corning, Corning, USA) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Medium wurde vor Verwendung stets auf 37 °C vorgewärmt und zur Reduktion mehrfacher Kalt-Warm-Zyklen zu je 100 ml abgefüllt. Zum Auftauen wurden die Zellen in KGM resuspendiert (Gesamtvolumen 10 ml) und bei 250g für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen erneut in 12,5 ml KGM resuspendiert und auf eine 6 well-Platte zu 2 ml/well ausgesät. Zuvor wurden 20 µl zum Auszählen der Zelldichte in einer Neubauer-Zählkammer (Roth, Karlsruhe) abgenommen. Die Dichte der Zellen betrug zwischen 0,5 und 7,5 x 10<sup>4</sup> Zellen/ml. Bei 80-90 % Konfluenz wurde passagiert bzw. die Behandlung der Zellen begonnen. Bis dahin wurde an jedem dritten Tag das Medium erneuert. Für die Passage wurden die Zellen eines wells 2x mit DPBS gewaschen und mit 500 µl Trypsin/EDTA (Lonza, Basel, Schweiz) 7 min bei 37 °C proteolytisch von der Kulturschale gelöst. Zum Neutralisieren des Trypsins wurden 500 µl Trypsin-Neutralisierungslösung (TNS, Lonza, Basel, Schweiz) hinzugegeben. Die Kulturschale wurde mit 9 ml KGM ausgewaschen und die Zellen bei 250g für 5 min

pelletiert. Das Pellet wurde in 12,5 ml KGM resuspendiert und auf eine 6 well-Platte zu je 2 ml/well überführt.

### **Behandlung menschlichen Hautzellen mit Vitamin D-Metaboliten**

Die Regulation der Expression der endogenen CYP3A durch VD-Metaboliten wurde sowohl in HaCaT als auch an primären Keratinozyten untersucht.

Primäre Keratinozyten wurden bis zu einer 80-90%igen Konfluenz kultiviert. Für Induktionsversuche wurden die Zellen der Passage 1-7 verwendet. Zunächst wurden die Zellen 2x mit DPBS gewaschen. Die Substanzen bzw. das Lösungsmittel wurden in KGM 1:1.000 verdünnt und auf die Zellen gegeben. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und die Zellen 1x mit DPBS gewaschen. Zur späteren RNA- und Protein-Isolation wurde 1 ml peqGOLD TriFast (PEQLAB, Erlangen) pro well hinzugegeben. Die Zellen wurden entweder direkt weiterverarbeitet oder bis zur RNA- und Protein-Isolation bei -80 °C gelagert.

Analog wurden HaCaT-Zellen mit VD-Metaboliten inkubiert. Aufgrund der ausreichenden Verfügbarkeit des biologischen Materials wurden die Zellen mit einer Dichte von  $10^6$  Zellen pro well im 6 well-Format ausgesät und nach 24 h für weitere 24 h in Anwesenheit der VD-Metaboliten inkubiert.

### **Bestrahlung menschlicher Hautzellen**

Zur Untersuchung des für den VD-Metabolismus relevanten Bereichs sollte mittelwellige UVB-Strahlung in natürlich vorherrschenden Intensitäten angewandt werden. Da neben der Dosis auch die Intensität für die eindeutige Beschreibung der Strahlung notwendig sind, wurden möglichst eindeutig beschriebene UVB-Behandlungen der Literatur entnommen. So wurden UVB-Intensitäten von  $0,276 \text{ mW/cm}^2$  in Waterloo im Juni 1999 (Youn et al. 2011),  $0,060 \text{ mW/cm}^2$  im Winter bis zu  $0,243 \text{ mW/cm}^2$  im Sommer (Godar 2005) und  $0,069$  bis  $0,119 \text{ mW/cm}^2$  in Halle an zwei sonnigen Sommertagen im Juni und Juli des Jahres 2002 (Kürschner 2007) beschrieben. Der Schwellenwert für UVB-induzierte VD-Synthese *in vivo* liegt bei  $20 \text{ mJ/cm}^2$  (Webb et al. 1988), was etwa 5 min Bestrahlung an einem sonnigen Tag (Kürschner 2007) bzw. einer minimal erythemalen Dosis (MED) entspricht. Für die Untersuchung des VD-Metabolismus *in vitro* wurden bisher Dosen von  $20$ - $40 \text{ mJ/cm}^2$  (Lehmann et al. 2000b, Lehmann et al. 2001) eingesetzt.

$$\text{Bestrahlungszeit}[s] = \frac{\text{Bestrahlungsdosis} \left[ \frac{\text{J}}{\text{cm}^2} \right] \times 1000}{\text{Intensität} \left[ \frac{\text{mW}}{\text{cm}^2} \right]}$$

Formel 1: Formel zur Berechnung der Bestrahlungsdauer in Sekunden [s] unter Berücksichtigung der Strahlungsdosis in  $\text{J/cm}^2$  und -intensität in  $\text{mW/cm}^2$

Formel 1 dient der quantitativen Beschreibung des Zusammenhangs zwischen Bestrahlungsdauer, -dosis und -intensität. Die Intensität der Strahlung wird in  $\text{mW}/\text{cm}^2$  abgegeben. Die Strahlungseinwirkung pro Zeiteinheit ergibt die Strahlungsdosis in  $\text{J}/\text{cm}^2$ .

Die Bestrahlung erfolgte mit der UV-Bestrahlungskammer BS-02 (Dr. Gröbel UV-Elektronik, Ettlingen) mit ungerader Lampenposition der UVA- und gerader der UVB-Strahlungsquellen. Aufgrund der hohen Strahlungsintensität wurde ein Filter gefertigt und zwischen UV-Quelle und biologischer Probe installiert. Für die korrekte Erfassung der tatsächlich abgegebenen Strahlendosis wurde auch der Sensor mit einem entsprechenden Filter bedeckt. Aus Vorversuchen (Tab. 9) zeigten fünf Lagen Fliegenschutzgitter (Farbe anthrazit, LIDL Stiftung, Neckarsulm) die gewünschte Abschwächung der Strahlungsquelle.

Tab. 9: Zusammenhang zwischen Filterwirkung und Anzahl der verwendeten Lagen des Filters bei der UVB-Bestrahlung

Anzahl der Lagen des Fliegenschutzgitters	Bestrahlungsdauer bis zum Erreichen einer Dosis von $40 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ [sec]	Strahlungsintensität [ $\text{mW}/\text{cm}^2$ ]
0	40	1
1	66	0,606
2	96	0,417
4	246	0,163
5	441	0,091

Für die Bestrahlung wurden HaCaT-Zellen 24 h vor der Behandlung ausgesät (8.000 bzw. 200.000 Zellen/well bei 6 bzw. 96 well-Format). Vor der Bestrahlung wurden die Zellen 1x mit DPBS gewaschen. Zum Verhindern der Austrocknung der Zellen zum einen und zwecks Minderung der Lichtbrechung bzw. Absorption durch den Flüssigkeitsüberstand wurden die Zellen trockengesaugt und mit einem dünnen Film DPBS benetzt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen mit frischem Medium bedeckt und weitere 24 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden die Zellen entweder für die RNA-Isolation mit peqGOLD TriFast abgestoppt oder für die Messung der Zellviabilität mit MTT-Reagenz inkubiert.

### MTT-Assay an Zellen

MTT-Reagenz | 0,5 mg/ml 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid  
(MTT) in supplementiertem Zellkulturmedium (ohne Phenolrot)

Die Durchführung an HaCaT-Zellen erfolgte im 96 well-Format an je 8 wells parallel. Die Bestrahlung erfolgte kumulativ durch Abdecken der nicht zu bestrahlenden Zellen. Somit wurden alle Zellen gleichzeitig mit DPBS gewaschen und in die Bestrahlungskammer verbracht. Insgesamt waren die Zellen für eine Gesamtdauer von ca. 5-6 min nur leicht mit DPBS benetzt und wurden je nach Dosierung unterschiedlich lange bestrahlt (Tab. 10). 24 h nach der UV-Bestrahlung wurden die Zellen 1x mit DPBS gewaschen und mit  $200 \mu\text{l}$  MTT-Reagenz 4 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Dabei wird das gelbe, wasserlösliche MTT in

lebenden Zellen im endoplasmatischen Retikulum in das blau-violette, wasserunlösliche Formazan umgesetzt. Letzteres bestimmt die Absorption bei einer Wellenlänge von 570 nm (Mosmann 1983). Die Extraktion erfolgte nach Entfernung des Überstands mit 200 µl Isopropanol (100 %) für 10 min bei 250 rpm. Für die Messung wurden die Proben durch Auf- und Abziehen mit der Pipette gemischt. Die Emissionsmessung erfolgte bei 570 nm mit dem Tecan SUNRISE (Tecan, Crailsheim) mit Hilfe des Programms Magellan v6.4 (Tecan, Crailsheim).

Tab. 10: Zusammenhang von Strahlendosis und Bestrahlungsdauer bei konstanter Strahlungsintensität (~0,1 mW/cm<sup>2</sup>)

Strahlendosis [mJ/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungsdauer [sec]
0	0
5	41
10	82
20	162
30	243
40	330

### Reportergen-Assay

Substratpuffer Firefly	30 mM Tricine, 15 mM MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O, 10 mM DTT, 0,1 mM EDTA, pH 7,8 (NaOH)  Vor Gebrauch: 4,7 mM D-Luziferin, 0,27 µM Coenzym A, 0,53 µM ATP
Substratpuffer Renilla	0,1 M NaCl, 25 mM Tris pH7,5, 1mM CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O  Vor Gebrauch: 1 µM Coelenterazin h

Reportergen-Assays wurden gemäß Gödtel-Armbrust et al. (Gödtel-Armbrust et al. 2007) mit geringfügigen Anpassungen durchgeführt. Für Induktionsexperimente wurden LS174T-Zellen 24 h vor der Transfektion zu  $2,0 \times 10^4$  Zellen/well im 96 well-Format ausgesät. Transfiziert wurde mit 0,4 µl GeneJuice Reagenz (Novagen, Darmstadt) und einer DNA-Gesamtmenge von 66,7 ng pro Ansatz. Eingesetzt wurden entweder (1) 50 ng des CYP3A4 Reportergen-Konstrukts p3A4-pER6 (Qiu et al. 2010), (2) 50 ng des proximalen CYP3A5-Reportergen-Konstrukts p3A5-370 (Nem et al. 2012), oder (3) 50 ng des 6,2 kb CYP3A5 Reportergen-Konstrukts p6,2kb-Luc (Nem et al. 2012). Kotransfiziert wurden entweder (4) 3 ng des menschlichen PXR Expressionsplasmids pcDhuPXR (Geick et al. 2001), (5) 3 ng des Expressionsplasmids der menschlichen CAR-Splicevariante 1, dem Wildtyp, pcDhu-CAR1 (Burk et al. 2002), (6) 3 ng des Expressionsplasmids der menschlichen CAR-Splicevariante 2 pcDhuCAR-SV2 (Arnold et al. 2004) oder (7) 3 ng des menschlichen VDR Expressionplasmids pcDhuVDR (Burk et al. 2005). Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz wurden stets (8) 13 ng des Expressionsplasmids der Renilla-Luziferase pRL-EF1α1 eingesetzt (Bros et al. 2003). Die verwendeten Kombinationen der kotransfizierten Plasmide sind an entsprechender Stelle angegeben.

## Zwei-Hybrid-System

Das Zwei-Hybrid-System (mammalian 2-hybrid assay, kurz 2-Hybrid-Assay) dient der Analyse der Transaktivierung nukleärer Rezeptoren, in diesem Falle der ligandenabhängigen Wechselwirkung des humanen RXR $\alpha$  mit CAR-SV1, CAR-SV2, PXR bzw. VDR. Nukleäre Rezeptoren bestehen aus einer DNA-Bindedomäne (DBD), die an bestimmte Promotorregionen binden kann und einer Ligandenbindedomäne (LBD), die sowohl Substanzen/Liganden (L) als auch mit anderen nukleären Rezeptoren und Kofaktoren interagieren kann. Verbunden sind LBD und DBD durch eine flexible Scharnierregion, die durch die zuvor beschriebenen Interaktionen ihre Konformation ändert. Anders als im Reporter-Gen-Assay findet hier die Regulation des Reportergens unabhängig vom Promotor über die DBD des Transkriptionsfaktors Galaktose 4 (GAL4) der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*, MEYEN ex E.C. HANSEN) und das entsprechende UAS-DNA-Bindemotiv im Promotor des Reportergens statt. Letzteres liegt zur Signalverstärkung in fünffacher Tandemwiederholung vor und ermöglicht die Bindung mehrerer GAL4-Moleküle gleichzeitig. Zudem enthalten die Vektoren Kernlokalisierungssequenzen, die eine ligandenunabhängige Translokation der Plasmide in den Zellkern bewirken. Mit dem 2-Hybrid-Assay untersucht man zum einen die Aktivierung, die ligandenunabhängig ist und von den untersuchten nukleären Rezeptoren selbst abhängt. Eine basale Interaktion mit in diesem Falle RXR $\alpha$  bewirkt dabei eine Steigerung der gemessenen Luziferaseaktivität im Vergleich zum Leervektor pVP16-AD ohne Ligandenbindedomäne eines zweiten nukleären Rezeptors. Zum anderen gibt dieser Versuchsaufbau Aufschluss über die Induktion in Anwesenheit eines Liganden (L), der an die Ligandenbindedomäne des nukleären Rezeptors bindet und zu einer gesteigerten Luziferaseaktivität gegenüber Lösungsmittel-behandelten Zellen führt/führen kann. Abb. 11 fasst das Versuchsprinzip zusammen.

Für den Versuch wurden COS-7 Zellen im 96 well-Format zu  $16,5 \times 10^4$  Zellen/well ausgesät und nach 24 h mit (1) 36,7 ng des Reporterplasmids pGL3-G5, 26,7 ng des VP16-Fusionsprotein exprimierenden Plasmids (pVP16-NR\*), (2) 3,3 ng des GAL4/RXR $\alpha$ -Fusionsproteins (pM-RXR $\alpha$ ) und (3) 7,7 ng pRL-EF1 $\alpha$ 1 mit 0,4  $\mu$ l des GeneJuice Reagenz (Novagen, Darmstadt) transfiziert. 6 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit VD-Metaboliten behandelt. Verwendete Verdünnungen zur Bestimmung der EC<sub>50</sub>-Dosis für VD, 25-VD und 1,25-VD sind an entsprechenden Stellen im Ergebnisteil angegeben. 40 h nach Beginn der Behandlung wurde der Versuch abgestoppt.

Zur Messung der Luziferaseaktivität wurden die Zellen stets in 60  $\mu$ l Puffer zur passiven Lyse (Promega, Madison, UK) aufgebrochen. HaCaT-Zellen wurden zusätzlich mind. 3 h bei -80 °C eingefroren. Je 20  $\mu$ l des Lysats wurden für die Messung der Firefly- und Renilla-Luziferaseaktivität verwendet. Dabei wurden je well 100  $\mu$ l Substratpuffer injiziert. Die Messung der relativen Lichteinheiten (RLU) erfolgte nach 3 sec Verzögerung

für 10 sec mit dem Luminometer Centro LB 960 (Berthold Technologies, Bad Wildbad) und der zugehörigen Software Mikrowin 2000 (Mikrotek Laborsysteme, Overath).

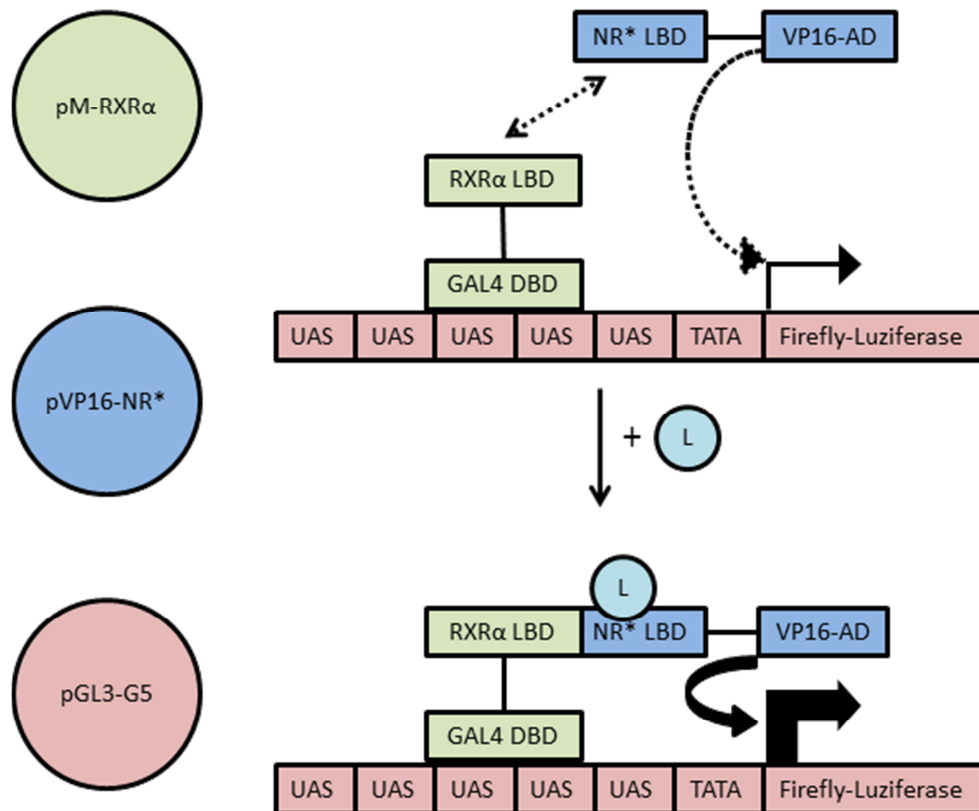


Abb. 11: Prinzip des 2-Hybrid-Systems

Dargestellt sind die drei spezifischen kotransfizierten Plasmide. Dabei exprimiert der Vektor pM-RXR $\alpha$  ein Fusionsprotein aus Ligandenbindedomäne (LBD) des humanen RXR $\alpha$  und der DNA-Bindedomäne (DBD) des unspezifischen und schwach aktivierenden Transkriptionsfaktors Galaktose 4 (GAL4) der Hefe. Der Vektor pVP16-NR $\alpha$  exprimiert ein Fusionsprotein aus der Aktivierungsdomäne (AD) des Herpes simplex Virus (VP16) sowie der Ligandenbindedomäne (LBD) des entsprechenden nukleären Rezeptors (NR). Das Plasmid pGL3-G5 exprimiert das Repotergen Firefly-Luziferase, das durch Bindung des GAL4-Fusionsproteins an das UAS-Motiv des Promotors schwach exprimiert wird. Zur Signalverstärkung liegt dieses Motiv pentamer repetitiv vor, kann also mehrere Fusionsproteine gleichzeitig binden. Die Expression des Reportergens hängt nun v. a. von der physischen Nähe der aktivierenden VP16-Domäne (VP16-AD) zum Promotor ab und diese wiederum von der Stärke der Interaktion der Heterodimerisierungspartner RXR $\alpha$  und NR. \* NR steht in diesem Falle für VDR, PXR, CAR1 bzw. CAR2.

## Gewebekultur menschlicher und muriner Haut

GK-Medium | vgl. Zellkulturmedium für HaCaT bzw. COS-7 mit FCS, Antibiotikum und HEPES-Zusatz, Grundmedium ohne Phenolrot

Für die Aufnahme in die Gewebekultur wurde menschliche oder murine Haut direkt nach der Entnahme vom Unterhautgewebe befreit und mit der Schere in ca. 1 cm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten. Mäuse wurden vorab durch zervikale Dislokation getötet und mit Enthaarungscreme (ElcaMed von ASID BONZ, Herrenberg) für 10-15 min behandelt und enthaart. Für die Entkeimung wurde die Haut in HBSS in die sterile Werkbank überführt und 2x für 20 sec in Hautdesinfektionsmittel Desderman N (Schülke & Mayr, Norderstedt) gespült und final darin für 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Haut 2x in HBSS und 1x in GK-Medium für 20 sec gespült. Die Hautproben wurden auf

Zellkultureinsätzen (ThinCert™ Cell Culture Inserts, 6 well, transluzent, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) über 2 ml Medium bei 5 % CO<sub>2</sub> bei 37 °C inkubiert. Für die Messung der Luziferaseaktivität in murinen Hautproben wurden die Proben nach unterschiedlicher Dauer der Kultur in fN2 schockgefroren, bei -80 °C gelagert oder hinsichtlich der Viabilität mit MTT-Assay untersucht. Im Falle einer Behandlung wurden die Proben vorab für 24 h akklimatisiert. Die Behandlung erfolgte über 40 h auf behandeltem Medium. Die Proben wurden zum einen für Isolation von RNA und zum anderen für die Messung der Luziferaseaktivität verwendet.

### MTT-Assay and Gewebeproben

MTT-Reagenz	0,5 mg/ml 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in supplementiertem Zellkulturmedium (ohne Phenolrot)
MTT-Extraktionspuffer	0,04 M Salzsäure in Isopropanol = 107 ml Salzsäure (10 %) + 7,89 ml Isopropanol (100 %)

Gewebe wurden im ThinCert oder in einem 15 ml Reaktionsgefäß für 4 h bei RT oder 37 °C in 4 ml MTT-Reagenz inkubiert. Die Extraktion erfolgte anschließend mind. 3 Tage bei 4 °C in 2 ml Extraktionspuffer in einem abgedichteten 15 ml Reaktionsgefäß (Kang-Sickel et al. 2011). Die Messung erfolgte an 200 µl des Überstands bei 570 nm mit dem Tecan SUNRISE (Tecan, Crailsheim) mit Hilfe des Programms Magellan v6.4 (Tecan, Crailsheim).

## Molekularbiologische Methoden

### RNA-Isolation

GITC-Puffer	5,1 M Guanidinthiocyanat, 50 mM Natriumcitrat, 50 mM EDTA, pH 8,0 in DEPC-H <sub>2</sub> O, sterilfiltriert
N-Laurylsarcosin	10 % (w/v) in DEPC-H <sub>2</sub> O, sterilfiltriert
RNA-Isolationskit	RNeasy fibrous tissue Kit oder RNeasy Mini Kit (beide Qiagen, Hilden)

RNase-freie Puffer wurden mit DEPC-Wasser oder durch nachträgliche Zugabe von 0,1 % DEPC angesetzt und anschließend autoklaviert. Die Isolation der Gesamt-RNA aus Geweben erfolgte nach vorangegangenem mechanischem Aufschluss mit dem Tissue Lyzer II oder Tissue Lyzer LT (beide Qiagen, Hilden) gemäß eines publizierten Protokolls (Berglund et al. 2007). Die Proben wurden in 1 ml GITC-Puffer und 3-6 Kugeln aus rostfreiem Stahl (ø 5mm) für 3x 4 min bei 20-50 Hz im auf 4 °C vorgekühlten Adapter homogenisiert.

Der Überstand samt Gewebe wurde zum Entfernen der Beads in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 10 min bei 4 °C und 10.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut überführt, auf RT äquilibriert und für weitere 5 min zur Dissoziation der Protein-Nukleinsäurekomplexe bei RT inkubiert. Pro eingesetzten ml GITC-Puffer wurden 50 µl N-Laurylsarcosin hinzugefügt und gemischt. Nach Zugabe von 833 µl Phenol (pH 4,7, wassergesättigt) und 267 µl Chloroform wurden die Proben gut gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte bei 12.000g und 2 °C für 10 min. Die obere wässrige Phase wurde erneut mit 833 µl Phenol und 167 µl Chloroform gemischt und wie zuvor zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde anschließend mit 1 ml Isopropanol und 200 µl Natriumacetat (3 M) mind. 1 h bis zu 16 h bei -20 °C gefällt.

Die Proben wurden bei 12.000g und 2 °C für 20 min für die Aufreinigung mit dem RNeasy fibrous tissue Kit (Qiagen, Hilden) abzentrifugiert. Pro Probe wurden 350 µl RLT-Puffer mit 3,5 µl β-Mercaptoethanol (100:1) angesetzt. Das RNA-Pellet wurde in 100 µl DEPC-Wasser gelöst, mit 354 µl komplettierten RLT-Puffer und 250 µl Ethanol (100 %) mit der Pipette gemischt und 2x über die Säule gereinigt (14.000g, 1 min, 2 °C). Die Säule wurde nun mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen. Der DNA-Verdau erfolgte mit 10 µl DNase (NEB, Frankfurt/M, 2 U/µl), 10 µl 10x DNase-Puffer und 80 µl DEPC-Wasser pro Probe und 30 min Inkubation bei RT auf der Säule. Danach wurde die Säule erneut mit 350 µl RW1-Puffer und im Anschluss 2x mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Die Säule wurde 1 min trocken zentrifugiert und die RNA separat 2x mit 30-50 µl DEPC-Wasser eluiert.

Auch bei der RNA-Präparation nach mechanisch manueller Zerkleinerung der Proben mit peqGOLD TriFast (PEQLAB, Erlangen) nach Herstellerprotokoll oder wie zuvor beschrieben ohne Aufreinigung über die Säule konnte photometrisch reine RNA isoliert werden. Bei der Quantifizierung der 18S rRNA zeigten sich jedoch eine ungewöhnlich späte Amplifikation (etwa acht Zyklen später) und stark schwankende CT-Werte von 3-4 Zyklen zwischen den einzelnen Proben. Auch die Quantifizierung der Zielgene gestaltete sich als schwierig und ließ aufgrund hoher Standardabweichungen der Messtriplikate und sehr hohen CT-Werten keine zuverlässige Aussage über das Expressionsniveau zu. Daher wurde für Extraktion aus Geweben an der Säulen-basierten Methode festgehalten.

Ohne die zuvor beschriebenen Probleme erfolgte die RNA-Isolation aus Zellen mit peqGOLD TriFast (PEQLAB, Erlangen) nach Herstellerprotokoll. Hierfür wurde 1 ml Trifast pro 9,6 cm<sup>2</sup> eingesetzt. Die Proben wurden bei RT 5 min inkubiert. Nach der Zugabe von 200 µl Chloroform pro ml Trifast wurden die Proben gemischt und weitere 10 min bei RT inkubiert. Zur Phasentrennung wurde bei 13.000g bei 4 °C für 15 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und mit 1 ml Isopropanol ü. N. oder mind. 1 h bei -20 °C gefällt. Die RNA wurde bei 13.000g und 4 °C für 20 min pelletiert. Das Pellet wurde 2x mit je 1 ml Ethanol (75 %) gewaschen und bei 4 °C und 13.000g für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde gründlich entfernt, das gereinigte Pellet 10-20 min an der Luft getrocknet und in 30-50 µl DEPC-Wasser gelöst.

Ab der Elution bzw. dem Lösen der RNA erfolgte das Handling von RNA auf Eis zur Verhinderung von RNase-Aktivität bei etwaiger Kontamination. Die RNA-Konzentration wurde mit dem NanoDrop 1.000 Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) photometrisch bestimmt. Ein Teil der RNA wurde zur cDNA-Synthese mit DEPC-Wasser auf ca. 200 ng/ $\mu$ l verdünnt und in Aliquots bei -80 °C gelagert.

### cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) gemäß Herstellerangaben. 1  $\mu$ g RNA wurde pro 20  $\mu$ l Reaktionsansatz eingesetzt. Für größere Ansätze wurden die Reagenzien und die RNA-Menge proportional zum Volumen vervielfacht. Die Lagerung erfolgte für wenige Stunde bei 4 °C oder für längere Zeit bei -20 °C.

### Quantitative PCR

dNTP-Mix (20 mM)	20 mM dATP, 20 mM dTTP, 20 mM dCTP, 20 mM dGTP in Aqua ad injectabilia (Braun, Melsung)
Taq-Puffer	20 mM Tris, 10 mM Ammoniumsulfat (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 4 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM KCl
Taq-Polymerase	Selbst exprimierte Taq-Polymerase (AG Kleinert, Pharmakologie Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz)

Die Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgte Fluoreszenz-basiert mittels Echtzeit-PCR mit dem StepOnePlus Real-Time Amplification System (Applied Biosystems, Darmstadt) unter Verwendung der Herstellersoftware StepOnePlus v2.1 und v2.3. Zwei prinzipiell verschiedene Techniken kamen zum Einsatz. Bei der Detektion mit SYBR Green interkaliert der Farbstoff in doppelsträngige DNA, das heißt v. a. in die entstehenden PCR-Produkte, und fluoresziert. Bei der Verwendung von Hydrolyse- bzw. TaqMan-Sonden hybridisiert die Fluoreszenz-markierte DNA-Sonde analog zu den Amplifikationsprimer an einzelsträngige DNA. Während der Amplifikation wird die Sonde abgebaut und Fluoreszenz wird frei.

Die Amplifikation erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 20  $\mu$ l. Unter Annahme einer 50%igen Effizienz der reversen Transkription wurden 50 ng bzw. im Falle der 18S rRNA 50 pg cDNA pro Reaktion eingesetzt. Dies entspricht 2  $\mu$ l der unverdünnten respektive 1.000-fach in sterilem Wasser verdünnten cDNA. Jede Probe wurde dreifach gemessen.

Tab. 11: Primer und Sonden zur Quantifizierung der mRNA-Expression in humanem Probenmaterial  
Die PCR-Effizienz aller Primerpaare lag zwischen 90 und 105 %.

Primer	Sequenz (5' → 3')	Zielgen (Referenz)
18SF1	gct gct ggc acc aga ctt	Humane und murine 18S rRNA (Dr. Huan Qiu, ehemals AG Wojnowski)
18SR1	cgg cta cca cat cca agg	

CYP3A4-A tqm FW	tca gcc tgg tgc tcc tct atc tat	Humane CYP3A, Sonden mit FAM-Fluoreszenz und <i>black hole quencher 1</i> (Koch et al. 2002)
CYP3A4-A tqm RV	aag ccc tta tgg tag gac aaa ata ttt	
CYP3A4-FAM	FAM-tcc agg gcc cac acc tct gcc t-BHQ1	
CYP3A5 tqm FW	ttg ttg gga aat gtt ttg tcc tat c	
CYP3A5 tqm RV	aca ggg agt tga cct tca tac gtt	
CYP3A5-FAM	FAM-tca ggg tct ctg gaa att tga cac aga gtg cta-BHQ1	
CYP3A7 tqm FW	aag ggc tat tgg acg ttt gac a	
CYP3A7 tqm RV	act cca ctg gcc cga aag	
CYP3A7-FAM	FAM-tat tta tga ctg tca aca gcc tat gct ggc tat ca-BHQ1	
CYP3A43 tqm FW	ctc tat att tat ggg acc cat tca cat a	
CYP3A43 tqm RV	tta cat tct ctg tca aaa ttc caa aga c	
CYP3A43-FAM	FAM-cct ggg cca acc cct ctg cc-BHQ1	
huPXR qRT fw	gca gga gca att cgc cat t	
huPXR qRT rv	tgc gtg agc ata gcc atg atc	
huPXR TaqMan	FAM-cca gcc tgc tca tag gtt ctt gtt cct gaa-BHQ1	
huVDR qRT fw	atc tgc atc gtc tcc cca gat	Humaner VDR, Sonde mit FAM-Fluoreszenz und <i>black hole quencher 1</i> (Ogunkolade et al. 2002)
huVDR qRT rv	agc gga tgt acg tct gca gtg	
huVDR TaqMan	tga ttg agg cca tcc agg acc gc	
huCAR tqm Fw	cat ggg cac cat gtt tga ac	Humaner CAR, Sonde mit FAM-Fluoreszenz und <i>black hole quencher 1</i> (Nishimura et al. 2004)
huCAR tqm Rv	agg gct ggt gat gga tga a	
huCAR-FAM	FAM-tgt gca gtt tag gcc tcc agc tca tc-BHQ1	
huKRT10 fw	cga tga cct taa aaa tca gat tct c	Menschliches Keratin 10
huKRT10 rv	tgt cag cct cca cgc tc	
huKRT14 fw	cct aaa ccg ccg acc tc	Menschliches Keratin 14
huKRT14 rv	gac ctc ccg ctc ctg c	
huIVL fw	gcc tct gcc tca gcc tta c	Humanes Involucrin
huIVL rv	ctc ctg atg ggt att gac tgg	

Die Sonden-basierte PCR erfolgte in 1x Taq-Puffer mit je 1  $\mu\text{M}$  Primer, 0,5  $\mu\text{M}$  Sonde, 0,5 mM dNTPs und 0,5  $\mu\text{l}$  Taq-Polymerase. Die initiale Denaturierung erfolgte bei 95 °C für 5 min. In 45 PCR-Zyklen wurden 10 sec bei 94 °C denaturiert und 60 sec bei 60 °C. Die Detektion mit SYBR Green erfolgte mit 1x konzentriertem PerfeCTa SYBR Green *FastMix*, ROX (Quanta, Gaithersburg, USA) laut Herstellerangaben. Je 200 nM Primer wurden eingesetzt. Der Amplifikation für 2 min bei 95 °C und 45 Zyklen bei 95 °C für 15 sec und 60 sec mit 60 °C wurde eine Schmelzkurvenanalyse zur Detektion unspezifischer Amplifikationsprodukte angeschlossen: 15 sec bei 95 °C, 60 °C für 1 min und Detektion der frei werdenden Fluoreszenz bei jedem Anstieg der Temperatur um 0,3 °C alle 15 sec und final beim Erreichen von 95 °C.

Die 18S rRNA wurde entweder mit SYBR Green und entsprechenden Primern (Tab. 11) oder im Falle humaner Hautproben alternativ mittels TaqMan-Assay (ID Hs03928985\_g1,

Applied Biosystems, Darmstadt) in 0,5x Konzentration in 1x Reaktionspuffer (ABsolute QPCR Mix no ROX, Thermo Fisher Scientific, Dreieich) gemäß Angaben des Herstellers amplifiziert. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte stets während der Annealing- und Elongationsphase. Nach Begutachtung der automatisch erstellten Amplifikationskurven wurden für die spätere Auswertung ggf. Grundlinie der Fluoreszenz und Zyklusschwellenwert (*cycle threshold*, CT) manuell angepasst. Die Auswertung erfolgte nach der  $\Delta$ CT-Methode normalisiert auf die Expression der 18S rRNA. Dargestellt wurde die normalisierte mRNA-Expression als  $2^{-\Delta CT}$ -Werte. Für die absolute Quantifizierung der Expression der CYP3A und NR1I in menschlichen Hautproben wurde entweder eine Plasmidstandardreihe (siehe Tab. 4) mit sechs Verdünnungen zwischen zehn und 1 Mio. Kopien mitgeführt oder drei Verdünnungen einer Leberprobe mit bereits absolut quantifizierter Anzahl Transkripte pro ng 18S rRNA (Koch et al. 2002). Dabei wurden der CT der unterschiedlichen Amplifikationsläufe den mitgeführten Referenzproben angepasst. Die Quantifizierung der Expression unterschiedlich behandelter Zellen erfolgte relativ zur Lösungsmittelkontrolle nach der  $\Delta\Delta$ CT-Methode. Die PCR-Effizienz aller verwendeten Primerpaare (Tab. 11) und TaqMan-Assays lag zwischen 90 und 105 %.

### DNA-Isolation

STE-Puffer	50 mM Tris pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 % SDS, 1 mM EDTA, steril
Proteinase K	20 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O (Carl Roth, Karlsruhe)

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte zum einen aus Schwanzspitzen der CYP3A5-Luc-Mäuse zum Nachweis des Transgens Luziferase und zum anderen aus ca. 100 mg menschlichem Gewebe, meist subkutanem Bindegewebe oder dessen Gefäße, zur Bestimmung des CYP3A5\*3-Genotyps. Die Proben wurden in 500  $\mu$ l bzw. 1 ml STE-Puffer mit 1 mg/ml Proteinase K bei 55 °C über Nacht verdaut. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation mit 16.000g bei RT befand sich die visköse DNA nahe der pelletierten Debris. Der DNA-haltige Überstand wurde nahezu vollständig abgenommen. Im Falle der menschlichen Proben wurde statt des Überstands das stark visköse Pellet aus ungelöstem Bindegewebe abgesaugt. Die DNA wurde anschließend durch Zugabe von 1 ml kaltem Ethanol (100 %) durch Invertieren gefällt und bei 16.000g und 4 °C über 20 min pelletiert. Das Überstand wurde verworfen. Mit 1 ml kaltem Ethanol (70 %) wurde die DNA gewaschen und erneut wie zuvor zentrifugiert. Der Überstand wurde gründlich abgenommen und das Pellet für 15 min getrocknet, in 20-50  $\mu$ l 10 mM Tris pH 8,0 aufgenommen und über Nacht bei 4 °C gelöst. Etwaige feste Bestandteile wurden durch Zentrifugation pelletiert und der klare Überstand überführt. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch mit dem NanoDrop 1000 Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) bestimmt. Die Isolation genomischer DNA aus HaCaT-Zellen erfolgte an  $4 \times 10^6$  Zellen mit dem peqGOLD Tissue DNA mini Kit (PEQLAB Biotechnologie, Erlangen) laut Hersteller-Protokoll. Die DNA-Extraktion aus behandelten, primären Keratinozyten

unklaren *CYP3A5\*3*-Genotyps erfolgte im Anschluss an die RNA-Isolation mit peqGOLD TriFast (PEQLAB, Erlangen). Hierfür wurde die DNA-haltige Phenolphase mit 300 µl Ethanol (100 %) durch mehrmaliges Invertieren gemischt und die DNA bei 4 °C und 10.000g für 10 min pelletiert. Die pelletierte DNA eines Keratinozytenspenders wurde in 400 µl Lysepuffer des peqGOLD Tissue DNA mini Kit (PEQLAB Biotechnologie, Erlangen) gelöst und laut Herstellerprotokoll weiter aufgereinigt. Hierfür wurde die DNA 1 h bei 50 °C mit Proteinase und RNase verdaut, gewaschen und in 50-100 µl Elutionspuffer aufgenommen.

### Genotypisierung

Taq-Puffer	20 mM Tris, 10 mM Ammoniumsulfat (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 4 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM KCl
Taq-Polymerase	Selbst exprimierte Taq-Polymerase (AG Kleinert, Pharmakologie Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz)

### *CYP3A5-Luc-Mäuse*

Die Genotypisierung der *CYP3A5-Luc*-Mäuse erfolgte über den Nachweis des Transgens Luziferase mittels PCR. Der 25 µl Reaktionsansatz enthielt 200 µM dNTPs, 0,5 µl Taq-Polymerase und je 200 nM Primer (Tab. 12) in 1x konzentriertem Taq-Puffer. Nach 3-minütiger Denaturierung bei 94 °C folgten 35 Zyklen bei 94 °C für 45 sec, 58 °C für 30 sec und 72 °C für 1 min. Nach einer finalen Elongation bei 72 °C für 10 min wurde das PCR-Produkt mit standardmäßiger Agarose-Gelelektrophorese visualisiert. Transgene Tiere zeigten ein ca. 500 bp PCR-Fragment. Bei jeder Reaktion wurden eine transgene Positiv-, eine nicht-transgene Negativ- sowie eine Wasserkontrolle mitgeführt.

Tab. 12: Primer zur Genotypisierung transgener *CYP3A5-Luc*-Mäuse

Primer	Sequenz (5' → 3')	Bemerkung
Prom1 fw	gcc acc cct agt tag cac c	Zur Amplifikation eines 500 bp Fragments des Transgens Firefly-Luziferase in <i>CYP3A5-Luc</i> -Mäusen
Prom2 rv	ctc gaa ctc ctg acc tca gg	

### *Humaner CYP3A5\*3-Genotyp*

Die Bestimmung des *CYP3A5\*3*-Genotypus (rs776746) erfolgte an genomischer DNA aus humanen Leber- und Hautproben, humanen Hautzellen sowie Blutproben mittels quantitativer Echtzeit-PCR mit Allel spezifischen, Fluoreszenz-markierten Sonden (Tab. 13).

Der 20 µl Reaktionsmix enthielt 400 µM dNTPs, je 900 nM Primer, je 200 nM Sonde, 0,5 µl Taq-Polymerase in 1x Taq-Puffer. Die Amplifikation erfolgte mit dem StepOnePlus Real-Time Amplification System (Applied Biosystems, Darmstadt) unter Verwendung der Herstellersoftware StepOnePlus v2.1 bzw. v2.3. Nach 30 sec bei 60 °C wurde die Grundfluoreszenz bestimmt. Die Amplifikation erfolgte nach 5 min bei 95 °C über

50 Zyklen bei 94 °C für 15 sec und 60 °C für 1 min. Nach jedem Zyklus wurde die Zunahme der Fluoreszenz beider Farbstoffe in Echtzeit gemessen. Die Endpunktbestimmung erfolgte analog zu Beginn nach 30 sec bei 60 °C.

Tab. 13: Primer und Hybridisierungssonden zur Bestimmung des humanen *CYP3A5\*3*-Genotyps

Primer	Sequenz (5' → 3')	Bemerkung
TM_3A5_I3F	gct cta ctg tca ttt cta acc ata atc tct tta	Primer zur Amplifikation eines Bereichs in Intron 3, den <i>CYP3A5*3</i> -SNP markierend
TM_3A5_I3R	gct tca tat gat gaa ggg taa tgt ggt	
CYP3A5_I3_G	VIC-tgt ctt tca gta tct ctt-MGB-DQ	TaqMan-Sonde für das G-Allel (VIC-Farbstoff) und A-Allel (FAM-Farbstoff) des <i>CYP3A5*3</i> -SNP mit <i>minor groove binder dark quencher</i>
CYP3A5_I3_A	FAM-tgt ctt tca ata tct ctt c-MGB-DQ	

Die Zuordnung der Genotypen erfolgte automatisch, Software-gestützt und konnte anhand eines Graphen zur allelischen Diskriminierung, wie in Abb. 12 dargestellt, nachvollzogen werden. Dieser Graph trägt die Zunahme der Fluoreszenz des VIC-Farbstoffs auf der x-Achse und den des FAM-Farbstoffs auf der y-Achse ab. Dabei werden i. d. R. drei Cluster entsprechend der drei möglichen Genotypen kenntlich. Als Kontrolle werden je Genotyp mind. drei Proben bekannten Genotyps mitgeführt. Eine Kontrolle ohne gDNA (siehe X-Markierung in Abb. 12) dient dem Ausschluss einer Kontamination mit genetischem Material.

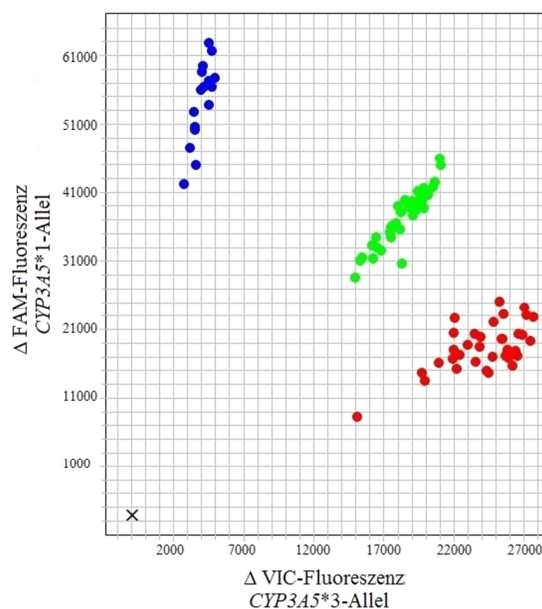


Abb. 12: Graph zur allelischen Diskriminierung mittels Hybridisierungssonden

Dargestellt sind die Fluoreszenz-Zunahmen beider Farbstoffe am Ende der quantitativen PCR. Bei der Bestimmung des *CYP3A5\*3*-Genotyps ist die Sonde zum Nachweis des A-Allels FAM-markiert und auf der y-Achse abgetragen. Das G-Allel wird mit VIC-markierter Sonde detektiert und auf der x-Achse dargestellt. Das X markiert die Leerkontrolle ohne gDNA. Die drei Cluster entsprechen Proben gleichen Genotyps. In blau sind homozygote Träger des *CYP3A5\*1*-Allels mit dem Genotyp AA, in rot homozygote Proben mit zwei G-Allelen. Auf einer Diagonalen zwischen blauem und rotem Cluster befinden sich in grün heterozygote Proben mit beiden Allelen und dem Genotyp AG. Diese zeigen eine Zunahme beider Fluoreszenz-Farbstoffe.

### Proteinlysate

Ripa-Puffer	50 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 % IGEPAL, 0,5 % Natriumdeoxycholat (C <sub>24</sub> H <sub>39</sub> NaO <sub>4</sub> ), 0,1 % SDS
Zusätze	Halt Proteinase Inhibitor single-use Cocktail (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) oder Complete Ultra Tablets Mini (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben, 1:100  5 mM EDTA pH 8,0, 1:100
Waschpuffer	0,3 M Guanidinhydrochlorid in 95 % Ethanol

### Gewebehomogenate

Die Herstellung von Proteinhomogenaten erfolgte mit gekühlten Reagenzien und Probenmaterial. Das Gewebe wurde hierfür in 2 ml verschlussicheren Reaktionsgefäße überführt und gewogen. Die Lyse erfolgte in 0,5-1 ml supplementiertem Ripa-Puffer durch mechanischen Aufschluss mit dem Tissue Lyzer II oder Tissue Lyzer LT (Qiagen, Hilden). Die Proben wurden mit drei Kugeln aus rostfreiem Stahl (ø 5mm) für 2-4x 4 min bei 30-50 Hz im vorgekühlten Adapter homogenisiert. Das Lysat wurde für 30 sec mit dem Microtip Sonicator ultrasonic processor XL bei 20 % Leistung mit Ultraschall behandelt. Die Lagerung der Lysate erfolgte bei -80 °C.

### Zellysate

Zellysate behandelter Keratinozyten wurden zum einen analog in 100 µl supplementiertem Ripa-Puffer aufgenommen und zum Aufschluss der Zellen bei -80 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Lysate zudem für 30 sec mit dem Microtip Sonicator ultrasonic processor XL (Misonix, Farmindale, USA) bei 20 % Leistung mit Ultraschall behandelt.

Aufgrund des begrenzten Materials bei der Kultur primärer Keratinozyten wurden zum anderen Proteine nach vorheriger RNA-Extraktion mit peqGOLD TriFast (PEQLAB, Erlangen) isoliert. Hierfür wurden die Phenol- und Interphase der initialen Phasentrennung gemäß Herstellerprotokoll Option 1 verwendet. Pro 1 ml TriFast wurden 300 µl Ethanol (100 %) hinzugefügt, für 3 min bei RT inkubiert und 15 min bei 2.000g und 4 °C die präzipitierte DNA pelletiert. Der Phenol-Ethanol-Überstand diente der folgenden Protein-Fällung durch Zusatz von 1,2 ml Isopropanol. Nach der Inkubation für 10 min bei RT wurden die Proteine bei 12.000g für 10 min bei 4 °C pelletiert. Zum Waschen wurden die Proteine 3x mit je 2 ml Waschpuffer 20 min bei RT inkubiert und 5 min bei 7.500g und 4 °C abzentrifugiert. Danach wurde das Pellet mit 2 ml Ethanol (100 %) erneut 20 min bei RT inkubiert und wie zuvor, bei unzureichender Sedimentation ggf. 10 min bei 13.000g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Pellet für 5-10 min an der Luft getrocknet. Das Lösen des Proteins erfolgte nach Option 1 in ca. 30 Vol

1 % SDS durch Auf- und Abziehen mit der Pipette und Inkubation für 30 min bei RT. Zum vollständigen Lösen wurden die Lysate für 3x 30 sec im Wasserbad Transsonic T570 (Elma, Siegen) bei 35 kHz sonifiziert. Etwaige Membranreste und extrazelluläres Material wurden bei 10.000g und 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Gelagert wurde der Proteinüberstand bei -20 °C.

### **Murine Gewebehomogenate zur Messung der Luziferasaktivität**

Zellyse-Puffer	5x Cell Lysis Buffer (Promega, Madison, UK) mit 100 mM Tris pH 7,4 auf 1x Konzentration verdünnt
----------------	---

Die Lyse erfolgte an ca. 100-200 mg Gewebe in 1 ml Zellyse-Puffer. Der mechanische Aufschluss erfolgte wie zuvor für menschliches Gewebe beschrieben mit dem Tissue Lyzer Lyzer II (Qiagen, Hilden). Die Homogenate wurden anschließend je 3x in fN<sub>2</sub> schockgefroren und im 37 °C Wasserbad aufgetaut. Die Stahlkugeln wurden entfernt und die Proben bei 4 °C und 10.000g für 10 min zentrifugiert. Der Proteinüberstand wurde abgenommen und ein Aliquot für die Bestimmung der Proteinkonzentration entnommen. Das restliche Lysat wurde bei -80 °C gelagert. Die Messung der Luziferaseaktivität erfolgte an 20 µl Gewebelysat wie für Zellysate beschrieben.

### **Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Proteinbestimmung erfolgte photometrisch basierend auf einem Farbumschlag zum einen des Triphenylmethanfarbstoffs Coomassie-Brillant-Blau (Bradford 1976) und zum anderen der Kupferkomplex-bildenden Bicinchoninsäure (BCA-Assay, Smith et al. 1985). Die Messung der Absorption bei 595 bzw. 562 nm erfolgte mit dem Photometer Tecan SUNRISE (Tecan, Crailsheim) mit Hilfe des Programms Magellan v6.4 (Tecan, Crailsheim).

Die Proteinkonzentrationen wurden anhand einer BSA-Standardreihe (Albumin Fraktion V, AppliChem, Darmstadt) bestimmt. Alle humanen Gewebehomogenate sowie die Zellysate wurden mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) gemäß Herstellerangaben quantifiziert. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration muriner Gewebehomogenate wurden diese 1:50 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Die Messung erfolgte an 5 µl (Leber, Niere, Darm) oder 10 µl (restl. Lysate) der Proteinverdünnung mit dem Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, München) nach Herstellerangaben. Unverdünnte humane Zellfraktionen wurden analog untersucht.

## Proteinfällung

2x Probenpuffer	125 mM Tris, pH 6,8, 2 mM EDTA, 40 mM DTT, 4 % (w/v) SDS, 20 % (w/v) Glycerin, 0,02 % (w/v) Bromphenolblau, sterilfiltriert, portionierte Lagerung bei -20 °C für max. 1 Jahr Vor Gebrauch: 1:2 mit ddH <sub>2</sub> O
-----------------	---

Für die denaturierende Proteinfällung mit Methanol-Chloroform wurden max. 100 µg Protein in 100 µl mit 400 µl Methanol, 100 µl Chloroform und 300 µl H<sub>2</sub>O gut vermischt und zur Phasentrennung 5 min bei 16.000g zentrifugiert. Die Proteine sammeln sich in der Interphase, weshalb die obere Phase abgesaugt wurde. Zur Fällung der Proteine wurden 300 µl Methanol zugegeben, erneut gut gemischt und wie zuvor zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet 5-20 min an der Luft getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 20 µl 1x Probenpuffer aufgenommen, 5 min bei 95 °C denaturiert, anschließend kurz auf Eis gelagert und entweder direkt auf das Gel aufgetragen oder bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert. Vor Gebrauch wurden die gefällten Proben dann erneut denaturiert.

## Western Blot

1x Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS in ddH <sub>2</sub> O, pH 8,3 (durch genaue Einwaage)
Blotting-Puffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10 % Methanol in ddH <sub>2</sub> O
1x TBS-T	10 mM Tris-HCl, 186 mM NaCl, 0,05 % (w/v) Treen20 in ddH <sub>2</sub> O, pH 7,4
Blockierung	5 % (w/v) mageres Milchpulver in 1x TBS-T
Ponceau S	0,25 % (w/v) Ponceau S, 40 % Methanol, 15 % Eisessig in ddH <sub>2</sub> O
10%iges Trenngel	10 % Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 %), 381 mM Tris/HCl pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,07 % TEMED, 0,07 % APS
4%iges Sammelgel	4 % Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 %), 124 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,1 % SDS, 0,13 % TEMED, 0,07 % APS
Membran	hydrophobe PVDF-Membran, 0,45 µm Porengröße, Membrandicke 125 ± 25 µm (Carl Roth, Karlsruhe)
Blotting-Papier	MN827B, Dicke 0,7 mm, Dichte 270 g/m <sup>2</sup> (Macherey-Nagel, Düren)
Gelkammer	Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad, München)
Blot-Kammer	Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, München)

Der Proteinnachweis erfolgte mittels Immunoblot. Hierfür wurde das frisch aufgekochte Proteinlysate der Größe nach mit denaturierender 10 % SDS-PAGE aufgetrennt. Zum

Einlaufen der Proben in das Sammelgel lag bis zum Ausbilden einer geraden Lauffront der Proben ca. 15 min eine Spannung von 100 V an, die eigentliche Separation im Trenngel erfolgte ca. 70 min bei konstant 150 V. Die Proteine wurden dann mit dem Tankblot-Verfahren auf Eis gekühlt und bei 4 °C für 2 h bei konstanter Stromstärke von 200 mA in Blotting-Puffer auf eine PVDF-Membran (Carl Roth, Karlsruhe) übertragen. Hierfür wurde das Gel zuvor 20 min in Blotting-Puffer äquilibriert und die Membran zunächst 10 sec in Methanol aktiviert, 5 min in dH<sub>2</sub>O gespült und ebenfalls 15 min in Blotting-Puffer äquilibriert. Zum Blotten wurden Gel und Membran beidseits von 1 Schwamm und 2 Whatman-Papieren, ebenfalls mit Blotting-Puffer getränkt, umschlossen. Nach dem Blotten wurde das Gel 30 min bei RT in PageBlue Protein Staining Solution (Fermentas, St. Leon-Rot) inkubiert, danach mit dH<sub>2</sub>O gespült und darin über Nacht bei RT entfärbt. Die Membran wurde 5 min mit Ponceau S gefärbt und ca. 5 min in dH<sub>2</sub>O entfärbt. Beide Färbungen dienten der Beurteilung der Blotting-Effizienz und Vergleichbarkeit der aufgetragenen Proteinmengen. Membranareale mit Proteinbanden gewünschter Größe wurden ausgeschnitten, in dH<sub>2</sub>O entfärbt, 5 min in TBS-T gewaschen und darauffolgend 1 h bei RT in 5 % Milchpulver zur Reduktion von unspezifischer Hintergrundbindung der Antikörper blockiert. Der Primär- und später auch der Sekundärantikörper wurden ebenfalls in 5 % Milchpulver verdünnt. Die Inkubation mit dem Primär-Antikörper bei 4 °C erfolgte über Nacht. Die Membran wurde anschließend 3x 10 min mit TBS-T gewaschen und 1 h bei RT mit dem Zweitantikörper inkubiert. Nach erneutem 3x Waschen mit TBS-T für je 10 min wurde die Membran zur Entwicklung der Chemilumineszenz 5 min bei RT mit ECL-Reagenz Femtomax-110 (Rockland, Gilbertsville, USA) inkubiert. Die Messung der Chemilumineszenz erfolgte mit dem ChemiDoc XRS System (Bio-Rad, München). Visualisierung und Auswertung erfolgte mit den herstellereigenen Programmen Quantity One v4.6.9 und Image Lab v4.1. Quantifiziert wurde relativ zu einer stets mitgeführten Referenzprobe oder der Lösungsmittel-behandelten Kontrolle.

Der Nachweis von CYP3A5 und CYP3A4 in humanen Geweben erfolgte meist durch Ute Gödtel-Armbrust (MTA, AG Wojnowski). Als Positivkontrolle wurden stets je 50-100 fmol des entsprechenden rekombinant exprimierten CYP3A (rCYP3A,

Tab. 7) mitgeführt. Für die Abschätzung der Expressionsunterschiede zwischen Haut, Leber, Niere und Herz sowie der Auswirkung des *CYP3A5*\*3-Genotyps auf die Proteinmenge in diesen Organen, wurde eine Nierenprobe mit *CYP3A5*\*3/\*3- bzw. *CYP3A5*\*1/\*3-Genotyp und zwei Lebern des \*3/\*3-Genotyps aufbereitet und mit Hautproben verglichen. Die Effektstärke des hepatischen *CYP3A5*\*3-Genotypeffekts wurde an Lebermikrosomen untersucht.

Bei der Auswahl der Erstantikörper standen die Abgrenzung von CYP3A5 von CYP3A4/7 und die Signalstärke im Vordergrund. Dabei zeigte der letztlich verwendete CYP3A5-Antikörper (WB-3A5, BD Bioscience, Woburn, USA) deutlich stärkere Signale bei gleichen Reaktionsbedingungen als ein alternativ getesteter, ebenfalls CYP3A5-

spezifischer Antikörper (Klon F18 P3 B6, C4743, Sigma, Schnelldorf, Kumarakulasingham et al. 2005). Für die Unterscheidung von CYP3A4 und CYP3A7 konnte bis dato kein spezifischer CYP3A4-Antikörper getestet werden. Ein von Herstellerseite hinsichtlich seiner Spezifität überzeugend dargestellter CYP3A7-Antikörper (Klon F19 P2 H2, sc-53617, Santa Cruz, Dallas, USA) wurde gesichtet. Aufgrund der jedoch der sehr geringen mRNA-Expression von CYP3A7 v. a. im Vergleich zu CYP3A4 wurde auf Proteinebene auf den isozymspezifischen Nachweis verzichtet. Die Kreuzreaktivität der verwendeten Antikörper wurde vorab durch Immunoblot rekombinanter CYP3A getestet.

Bei der Wahl des Sekundäntikörpers erwies es sich aufgrund der Detektion in humanen Geweben als notwendig, auf mit menschlichem Serum gesättigte Antikörper zurückzugreifen. Beide bis dato in der AG verwendeten Antikörper gegen murine bzw. Hasen-Antigene (A6154 bzw. A9044, beide Sigma, Schnelldorf) zeigten eine deutliche Bindung ohne vorherige Erstantikörper-Inkubation.

#### ***in vivo*-Messung der Luziferaseaktivität transgener CYP3A5-Luc-Mäuse**

D-Luziferin (12 µg/µl)	D-Luziferin Kaliumsalt (Caliper Life Science, Hopkinton, USA) in ddH <sub>2</sub> O zu 12µg/µl (lichtgeschützt)
D-Luziferin (10 µg/µl)	Vor Gebrauch: 500 µl D-Luziferin Stammlösung + 60 µl 10x DPBS + 40 µl ddH <sub>2</sub> O final zu 10 µg/µl in 1x DPBS

Die *in vivo*-Messung der Luziferaseaktivität erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Mustafa Diken, Leiter des Immunotherapy Development Center (TRON Translational Oncology, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz) durch Dr. Dieudonné Nem, ehemaliger Mitarbeiter der AG Wojnowski. Die Arbeiten wurden zuvor durch das Landesuntersuchungsamt Koblenz (Nummer: 23 177-07/G 10-1-045) genehmigt. Die *in vivo*-Bildgebung ist eine nicht-invasive Methode zur Messung der Luziferaseaktivität am lebenden Tier. Für die Messung wurden transgene und nicht-transgene Tiere mit einem elektrischen Rasierer am Bauch enthaart. 5 min vor Beginn der Messung wurden jeder Maus 600 µl der wässrigen D-Luziferin-Lösung (10µg/µl) i. p. appliziert. Die Tiere wurden für die Messung mit 2-2,5 % Isofluran und 40 % O<sub>2</sub> kontinuierlich narkotisiert. Die Messung erfolgte für 5 min mit dem IVIS System (Xenogen, Alameda, USA). Die Auswertung und Quantifizierung der Biolumineszenz erfolgte durch Dr. Diken mit dem Programm LivingImage (Xenogen, Alameda, USA).

#### **Präparation menschlicher Hautmikrosomen**

Die Präparation der Mikrosomenfraktion humaner Häute erfolgte nach drei unterschiedlichen Methoden (Lang et al. 2001, Hill 2004, Götz et al. 2012b). Dabei wurden die angegebenen Puffermengen an kleine Probenmengen von ca. 300 mg angepasst und gleichzeitig humane Leberproben mitgeführt. Diese sollten aufgrund der zu erwartenden

messbaren CYP3A-Aktivität unter der Annahme vergleichbarer Eigenschaften als Kontrolle der Präparation aktiver Mikrosomen dienen. Die mechanische Zerkleinerung der Hautproben erfolgte zunächst mit dem Tissue Lyzer II (Qiagen, Hilgen) wie bisher beschrieben. Die Homogenate wurden anschließend 3x 30 sec im Wasserbad Transsonic T570 (Elma, Siegen) bei 35 kHz sonifiziert. Für die Aufreinigung nach Götz et al. wurden die Proben auf Empfehlung von Veronika Blatz (Doktorandin, Umwelttoxikologie, BASF, Ludwigshafen) zunächst mit der Schere zerkleinert und im Glaspotter durch 20-40 Stöße zerkleinert. Das Homogenat wurde anschließend 10x für 5 sec bei hoher Intensität mit Ultraschall behandelt (Bioruptor Plus UCD-300 TM und Bioruptor Water Cooler, Diagenode, Seraing, Belgien).

Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration wurde zur Kontrolle der Fraktionierung mit Immunoblot GAPDH als Zytosol- und Calnexin als mikrosomaler Marker detektiert. Zugleich wurde die CYP3A5-Proteinmenge als auch die CYP3A-Aktivität bestimmt.

## Biochemische Methoden

### Inhibitionsassay

NAPDH Regeneration System	V9510 (Promega, Madison, UK)
P450-Glo CYP3A4 Assay	Luziferin-PFBE, V8901 (Promega, Madison, UK)

Der verwendete P450-Glo Assay (Promega, Madison, UK) ist ein Lumineszenz-basiertes Nachweisverfahren der Enzymaktivität einzelner Zytochrom P450. Der allgemeine Reaktionsablauf ist in Abb. 13 auf der linken Seite dargestellt. Ein Proluziferin (A) wird durch P450-Enzyme in Anwesenheit von NAPDH in Luziferin (B) metabolisiert. Dabei bestimmen die chemischen Gruppen R1 und R2 welche P450-Enzyme deren Abspaltung katabolisieren können. Das entstandene Luziferin dient daraufhin als Substrat für die im Luziferin-Detektionsreagenz enthaltene Luziferase. Bei der Umsetzung des Luziferins wird Licht frei, das mit einem Luminometer quantifiziert werden kann. Das hier verwendete Proluziferin (Luziferin-PFBE) ist ein spezifisches Substrat für CYP3A4, CYP3A5 und CYP3A7 (Abb. 13, rechts). Als additive chemische Gruppen trägt es ein Wasserstoffatom (R2) und ein O-Benzyl (R1), von denen letzteres durch die CYP3A-Enzyme abgespalten wird (A → B).

Die Versuchsdurchführung zur Untersuchung der Effekte einzelner VD-Metaboliten auf die Aktivität der CYP3A erfolgte mit dem P450-Glo CYP3A4 Assay (Luziferin-PFBE, Promega, Madison, UK) und dem NAPDH Regeneration System (Promega, Madison, UK) an rekombinantem humanem CYP3A (rCYP3A,

Tab. 7) nach Herstellerangaben. Alle Inkubationen des Luziferins wurden lichtgeschützt durchgeführt. Zur Qualitätssicherung der rCYP3A und des Assays wurde vorab das

Verhältnis der Reaktion mit und ohne aktives rCYP3A bestimmt. Das erzielte Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis lag stets  $\geq 140$ .

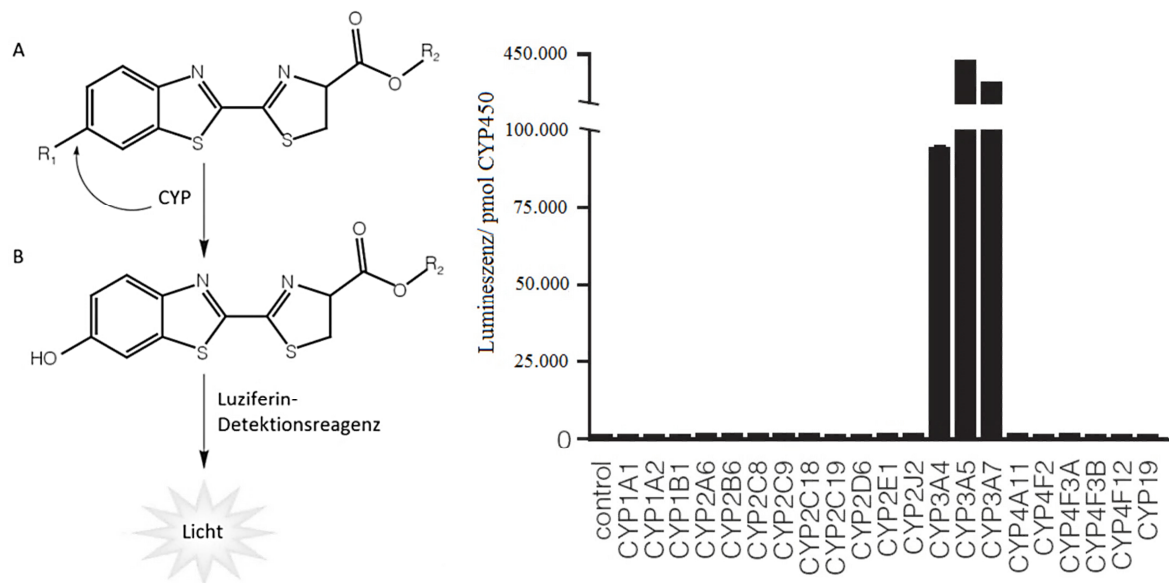


Abb. 13: Prinzip und Spezifität der Lumineszenz-basierten Methode zur Untersuchung der CYP-Enzymaktivität. Bei der Reaktion wird ein Proluziferin (A) durch CYP enzymatisch in Luziferin (B) metabolisiert. Die chemischen Gruppen R1 und R2 bestimmen die Spezifität der Reaktion und so das Enzym, welches diese Reaktion katalysieren kann. Durch die Zugabe des Luziferin-Detektionsreagenz kann die darin enthaltene Luziferase das entstandene Luziferin umsetzen. Dabei wird Licht als Biolumineszenz frei, die mit einem Luminometer quantifiziert werden kann (Cali et al. 2005). Rechts ist die spezifische Umsetzung des Luziferin-PFBE durch je 1 pmol der unterschiedlichen CYP-Isozyme anhand der gemessenen Lumineszenz pro pmol Enzym gezeigt (Promega Corporation 2012).

Im 96 well-Format wurde 1 pmol rCYP3A mit 100  $\mu\text{M}$  Luziferin-PFBE in Anwesenheit von 10 oder 50  $\mu\text{M}$  7-DHC, VD, 25-VD oder 1,25-VD in einem Volumen von 25  $\mu\text{l}$  über 10 min bei 37  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Ein weiterer Reaktionsansatz ohne intaktes CYP diente zur Messung der Hintergrundlumineszenz. Da DMSO selbst als Inhibitor von CYP3A gilt (Easterbrook et al. 2001), betrug dessen Konzentration stets unter 0,1 % und entsprach damit der vom Hersteller empfohlenen Maximalkonzentration (Promega Corporation 2012). Zudem wurden Kontrollen mit der entsprechenden Konzentration des Lösungsmittels zur Ermittlung der Grundaktivität mitgeführt. Durch die Zugabe von 25  $\mu\text{l}$  des 2x NADPH-Regenerationsansatzes mit 400 mM  $\text{KPO}_4$  wurde die Reaktion gestartet und weitere 10 min bei 37  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Finale Konzentrationen betragen 200 mM  $\text{KPO}_4$ , 5 oder 25  $\mu\text{M}$  des VD-Metaboliten und 50  $\mu\text{M}$  Luziferin-PFBE und maximal 0,05 % DMSO. Für die Aktivitätsbestimmung der Hautmikrosomen wurden 20 bis 50  $\mu\text{g}$  Protein eingesetzt. Das Protein wurde in 25  $\mu\text{l}$  Volumen mit 50-320  $\mu\text{M}$  Luziferin-PFBE für 30 min bei 37  $^{\circ}\text{C}$  präinkubiert. Durch Zugabe von 25  $\mu\text{l}$  NADPH-Regenerationsansatz wurde die Reaktion gestartet und 30-90 min bei 37  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

Nach der Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  des Luziferin-Detektionsreagenz erfolgte bei RT für mind. 20 min die Stabilisierung der Lumineszenz-Reaktion. Die gemessenen relativen Lichteinheiten zeigten danach selbst nach 6 h keine Veränderung. Gemessen wurde 10 sec mit dem Luminometer Centro LB 960 (Berthold Technologies, Bad Wildbad) und der zugehörigen Software Mikrowin 2000 (Mikrotek Laborsysteme, Overath).

Für die Auswertung wurde von allen Messwerten die Hintergrundlumineszenz, gemessen ohne aktives rCYP3A, subtrahiert. Für die Berechnung der Substanz-abhängigen Effekte auf die Enzymaktivität wurden die Messwerte durch die entsprechende Lösungsmittelkontrolle dividiert. Entsprechend der Empfehlung des Herstellers wurde eine Standardreihe mit fünf Messpunkten von 0 bis 2  $\mu\text{M}$  D-Luziferin Kaliumsalz (Caliper Life Science, Hopkinton, USA) hergestellt und mitgeführt.

### **Inkubation und Extraktion für die Auftrennung entstandener Metaboliten mit HPLC**

Die VD-metabolisierende Kompetenz der CYP3A wurde zunächst an rekombinantem Enzym durch Auftrennung und Detektion der VD-Metaboliten mittels UV-HPLC durchgeführt.

Hierfür wurden rCYP3A wie zuvor beschrieben inkubiert. 20 pmol rCYP3A wurde mit 10  $\mu\text{M}$  VD-Metabolit inkubiert. 7-DHC wurde zudem in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  eingesetzt. In einem Volumen von 25  $\mu\text{l}$  wurden zunächst Substanz und rCYP3A in ddH<sub>2</sub>O 10 min bei 37 °C und 500 rpm im Heizblock und nach der Zugabe von 25  $\mu\text{l}$  2x NADPH-Puffer weitere 90 min bei 37 °C und 500 rpm inkubiert. Bei der Etablierung der Methode diente VD<sub>2</sub> als interner Standard und wurde in einer Endkonzentration von 2,5  $\mu\text{M}$  vor der Extraktion zugegeben.

Die Extraktion lipophiler Substanzen erfolgte mit Methanol/Chloroform im Verhältnis 1:1. Zunächst wurden die rCYP3A-Ansätze mit 3,75 Vol Methanol/Chloroform (2:1) gut gemischt. Nach der Zugabe von weiteren 0,26 Vol Chloroform wurden die Proben vermischt und zur Phasentrennung bei RT für 5 min bei 3.000g zentrifugiert. Bei ausbleibender Phasenbildung einzelner Proben wurden 0,21 Vol Wasser zugegeben und erneut zentrifugiert. Die untere Chloroform-Phase wurde abgenommen und für 30-90 min in einer Vakuumzentrifuge (SpeedVac Sc110 und VaporTrap RVT100, beides Savant, Holbrook, USA) eingedampft. Die Lagerung bis zur HPLC erfolgte bei -20 °C lichtgeschützt.

### **UV-HPLC**

Die praktische Durchführung der HPLC erfolgte durch Alice Habermeier (AG Closs, Pharmakologisches Institut, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz). Die Extrakte wurden in 100  $\mu\text{l}$  Acetonitril/0,1 % Tetrahydrofluran entsprechend der mobilen Phase der HPLC aufgenommen. 10-20  $\mu\text{l}$  wurden injiziert und bei einem Durchfluss von 1 ml/min bei 30 °C und 4,6 MPa Druck mit einer XBridge BEH Shield RP18 Säule (130Å, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 mm X 150 mm, Waters, Milford, USA) aufgetrennt. Neben der Säule wurden Geräte von Bischoff (Leonberg) verwendet. Die Detektion erfolgte parallel bei drei Wellenlängen, 265, 285 und 305 nm. Die Retentionszeiten der gemessenen Peaks der Proben wurden stets mit einem Standard aus 7-DHC, VD, 25-VD und 1,25-VD abgeglichen. Zur genauen Zuordnung einzelner Peaks wurden die Proben mit einem

Gemisch der vier Metaboliten versetzt und injiziert. Die Auswertung erfolgte mit dem McDAcq Control Center (Bischoff, Leonberg).

### LC-MS

Die Inkubation der rekombinanten Enzyme mit VD-Metaboliten erfolgte wie zuvor beschrieben. Die getrockneten Extrakte wurden bei -80 °C auf Trockeneis gelagert und verschickt. Die Analytik erfolgte in den Laboren von Prof. Burkhard Kleuser (Institut für Ernährungswissenschaft, Nuthetal bei Potsdam)

## Histologische Methoden

### Fixierung und Einbetten der Proben

Zur Fixierung wurden die Gewebeproben über Nacht bei RT in mind. 20 Volumen 4%iger Phosphat-gepufferter Formaldehydlösung (säurefrei, pH 7,0, Carl Roth, Karlsruhe) inkubiert. Eingebettet wurden die Proben automatisiert mit Hilfe von Herrn Ralf Luderschmidt (Neuropathologie, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz) oder den Frauen Marita Wörsdorfer und Ursula Klein (Staatliche Lehranstalt für medizinisch-technische Laboratoriumsassistenten, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz) mit dem baugleichen Einbettautomaten Sakura Tissue Tek VIP E150/300 (Sakura Finetek, Tokyo, Japan). Verwendete Lösungen und Inkubationsbedingungen sind Tab. S 2 im Anhang zu entnehmen. Ausgeblockt wurden die Gewebe in 60 °C warmem Paraffin mit dem Tissue TeK TEC (Sakura Finetek, Tokyo, Japan).

### Anfertigung histologischer Schnitte

Histologische Schnitte wurden von je drei Häuten eines jeden *CYP3A5*\*3-Genotypus angefertigt. Die Paraffinblöcke wurden dafür auf -20 °C über Nacht vorgekühlt und bei Bedarf während der Schnitthanfertigung erneut gekühlt. Die 3 µm dicken Schnitte wurden in Serie am Rotationsmikrotom CUT 5062 (Slee, Mainz) erstellt, auf geschliffene Objektträger (SuperFrost Plus, Menzel-Gläser, Thermo Fisher Scientific, Dreieich) verbracht und über Nacht bei 37 °C getrocknet. Die Lagerung der gefärbten sowie der Rohschnitte erfolgte lichtgeschützt bei RT.

### Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Eosin	1 g Eosin in dH <sub>2</sub> O, 1 Tropfen Eisessig/100 ml
Mayers Hämalaun	1 g Hämatoxylin, 0,2 g Natriumjodat NaJO <sub>3</sub> , 50 g Kaliumaluminiumsulfat KAl(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , 50 g Chloralhydrat und 1 g Zitronensäure, steril filtriert

Für die HE-Färbung wurden die Schnitte zunächst 15 min bei 70 °C im Brutschrank entparaffiniert und anschließend 3x 3 min in Xylol, und je 2 min in absteigenden Isopropanol-Lösungen (100 %, 96 % und 70 %) inkubiert. Nach 2 min Waschen in dH<sub>2</sub>O wurden die Schnitte für 5 min in Hämalaun überführt und 7 min in Leitungswasser gebläut. Die Eosin-Färbung erfolgte für 3 min mit anschließendem Waschen in ddH<sub>2</sub>O. Für das Entwässern in einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Proben kurz in 70 % und danach in 96 % Ethanol getaucht, 2x 2 min in 100 % Ethanol und 3x 3 min in Xylol inkubiert. Die Schnitte wurden mit Deckgläsern der Dicke 0,13-0,16 mm und permanentem Medium (VectaMount Permanent Mounting Medium, Vector, Burlingame, USA) eingedeckt.

### Immunohistochemie

Citrat-Puffer	10 mM Zitronensäuremonohydrat in ddH <sub>2</sub> O, pH 6,0
TBS	10 mM Tris 150 mM NaCl, pH 7,4
Serum-Blockierung	2 % Serum, 1 % (w/v) BSA, 0,1 % Triton X-100, 0,05 % Tween 20 in TBS
Peroxidase-Blockierung	3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in TBS
AK-Puffer	1 % (w/v) BSA, 0,1 % Triton X-100, 0,05 % Tween 20 in TBS

Der immunhistologische Nachweis von CYP3A4/7 und CYP3A5 in menschlicher Haut erfolgte mit der indirekten ABC-Methode über die Meerrettichperoxidase-vermittelten Umsetzung des Chromogens Diaminobenzidin (DAB).

Hierfür wurden die Schnitte 15 min bei 60 °C entparaffiniert und 2x 5 min in Xylol inkubiert. Nach der absteigenden Alkoholreihe mit 2x 3 min in Ethanol (100 %) und je 2x 1 min in Ethanol (96 % und 70 %) wurden die Schnitte 1 min in dH<sub>2</sub>O und 5 min in TBS gespült. Die Antigendemaskierung erfolgte durch Aufkochen in Citrat-Puffer für 20 min im Braun FS20 Multiquick Dampfgarer Typ 3216 (Braun, Kronberg). Die Schnitte wurden 15 min unter fließendem dH<sub>2</sub>O abgekühlt. Alle weiteren Inkubationen fanden bei RT (20-24 °C) statt. Waschschritte erfolgten, wenn nicht gesondert erwähnt, 2x 5 min mit TBS zwischen allen einzelnen Inkubationen. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Proben 5 min mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert. Aufgrund der Detektion mit biotinyliertem Sekundärantikörper folgte die Blockierung des endogenen Avidins und Biotins mit dem Biotin Blocking System (Dako, Hamburg) laut Herstellerangaben. Entsprechend der verwendeten Sekundärantikörper wurde zum CYP3A4/7- bzw. CYP3A5-Nachweis mit Ziegen- respektive Pferdenormalserum (Dako, Hamburg) für 30 min blockiert. Nach diesem Schritt wurde nicht mit TBS gewaschen, sondern nach Ablauen des Serums direkt mit dem Erstantikörper für 1 h und weitere 30 min mit den biotinylierten Zweitantikörpern inkubiert. Verwendete Antikörper und Verdünnungen mit AK-Puffer sind

Tab. 6 zu entnehmen. Anschließend wurde 3x 5 min mit TBS gewaschen. Die 60 min präformierte Lösung aus Streptavidin und Meerrettichperoxidase (K0377, Dako, Hamburg) verblieb 30 min auf den Schnitten. Überschüssige Lösung wurde 3x 5 min mit TBS entfernt und die Schnitte 5 min in dH<sub>2</sub>O gespült. Die Entwicklung der Farbreaktion erfolgte mit dem ImmPACT DAB Peroxidase Substrat (Vector, Burlingame, USA) für 3 min und wurde in dH<sub>2</sub>O abgestoppt. Für die Gegenfärbung des Gewebes wurden die Schnitte 5 min in Meyers Hämalaun getaucht und 5 min unter fließendem dH<sub>2</sub>O gebläut. Entwässert wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe für 2 min in 96 % Ethanol, 2x 3 min in 100 % Ethanol und 2x 3 min in Xylol. Das Eindecken erfolgte analog zur HE-Färbung.

Eine vorangegangene Gegenfärbung mit Weigerts Hämatoxylinlösung (Carl Roth, Karlsruhe) gemäß Herstellerprotokoll brachte keine klare Färbung der histologischen Strukturen. Doch da die Pigmentierung der Haut durch Melanin in den Schnitten als bräunlich granularer Niederschlag in der basalen Epidermis erschien, wurde zudem zur besseren Abtrennung der Melanozyten und der rötlich braunen DAB-Färbung eine weitere Gegenfärbung unternommen. Die Schnitte wurden dabei 15 min mit Azur B (Santa Cruz, Dallas, USA) nach Kamino und Tam (Kamino & Tam 1991) gefärbt. Dies ergab jedoch keine erkennbare Verbesserung. Aufgrund der deutlichen Unterschiede zu den Negativkontrollen ohne Erstantikörper-Inkubation und der bereits deutlichen zytologischen Übersicht durch die Färbung mit Meyers Hämalaun wurde die Etablierung des immunhistochemischen Nachweises der CYP3A in menschlichen Hautschnitten als abgeschlossen betrachtet. Jeder Schnitt und Bereich wurde zwischen den einzelnen Färbungen relativ zueinander betrachtet und dargestellt.

## **Mikroskopie**

Die Durchlicht-Mikroskopie der gefärbten Schnitte erfolgte mit dem Leitz DM RB Fluoreszenz-Mikroskop (Leica, Solms) unter Einsatz der Filter N4, N16 und CB12. Mit der Digitalkamera DXM1200 und dem zugehörigen Programm NIS-Elements F v5.03 (beides Nikon, Düsseldorf) wurden die Bilder mit automatischem Weißabgleich und automatischer Belichtung in 1280x1024 Fine (SW)-Auflösung aufgenommen und als \*.tif-Datei abgespeichert.

## **Datenanalyse**

### **Statistische Auswertung der Versuchsdaten**

Die statistische Auswertung aller Experimente erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism v5.01 (GraphPad Prism Software, La Jolla). Alle Daten wurden per Augenmaß hinsichtlich der Verteilung überprüft. Im Falle der nicht-normalen Verteilung in mind. einer Gruppe wurde im Weiteren entsprechend nicht-parametrisch getestet und graphisch entsprechend die Medianwerte und Spannen der Interquartile dargestellt. Bei

normalverteilten Daten sind arithmetischer Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. Im Zweifelsfall wurde die Abweichung von der Gauss'schen Verteilung angenommen. Wenn nicht gesondert erwähnt wurden alle Tests zweiseitig durchgeführt. Beim Vergleich der absoluten Messwerte zwischen mehr als zwei Gruppen erfolgte ein one-way ANOVA mit gezieltem Vergleich der jeweiligen Behandlung- mit den Kontrollbedingungen und entsprechender post-hoc Korrektur für diese multiple Testung. Für den Vergleich zweier Gruppen erfolgte ein t-Test. Bei Reporter-gen-Versuchen *in vitro* wurde aufgrund des Versuchsaufbaus Normalverteilung angenommen und die normalisierten Luziferaseaktivität in RLU parametrisch getestet. Manche Versuche konnten z. B. aufgrund versuchsinhärenter Schwankungen der absoluten Messwerte nur als relative Daten, d. h. als Vielfaches der Kontrolle ausgewertet werden und wurden stets mit one-sample t-Test gegen den hypothetischen Wert 1 (= keine Veränderung) abgeglichen und nach Bonferroni manuell korrigiert. Dies galt z. B. für die Testung der Effekte einer Behandlung von Zellen mit VD-Metaboliten und UVB-Bestrahlung auf die Induktion der CYP3A-Expression und Viabilität der Zellen. Die Effekte der VD-Behandlung auf die enzymatische CYP3A-Aktivität wurden die Behandlungsgruppen mit den Lösungsmittelkontrollen mit one-way ANOVA getestet. Aufgrund von Schwankungen der absolut gemessenen RLU-Werte zwischen einzelnen Experimenten wurden die Messwerte eines Versuchs zusammengehörig nach Friedman getestet und nach Dunn post-hoc gegen multiples Testen korrigiert. Die bereits bekannten Inhibitoren und Aktivatoren der CYP3A-Aktivität dienten beim Inhibitionsassay lediglich zur Kontrolle der Versuchsbedingungen. Da sie zur Ressourcenschonung z. T. nur einmalig angewendet wurden, sind sie allgemein bei der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt.

Der Intergruppenvergleich zwischen *CYP3A5*\*1-Allelträgern und Trägern des \*3/\*3-Genotypus erfolgte für mRNA und Protein nicht-parametrisch mit dem einseitigen Mann-Whitney-Test, für Knochendichte, T- und Z-Werte wie auch im Falle der Proben aus Budapest für die 25-VD-Spiegel als parametrischer t-Test.

Die Korrelationen der kutanen Expression zwischen Außen- und Innenhaut, sowie der einzelnen mRNA-Spezies und der mRNA- und Proteinmenge von CYP3A4/7 und CYP3A5 wurden nicht-parametrisch gemäß Spearman ermittelt.

Für *P*-Werte gilt stets \* für  $P < 0,05$ , \*\* für  $P < 0,01$ , \*\*\* für  $P < 0,001$ , ebenso für post-hoc Korrektur bei multipler Testung. Zur besseren Übersichtlichkeit der Daten sind in manchen Fällen zufällige Unterschiede mit ns für nicht signifikant ab einem *P*-Wert  $> 0,05$  zusätzlich gekennzeichnet. Alle spezifischen Angaben sind zudem in den entsprechenden Bildunterschriften im Ergebnissteil enthalten.

### **Analyse von RNA-seq und Microarray-Daten**

RNA-seq-Daten der menschlichen und murinen Leber bzw. Haut (je  $n = 1$ ) wurden als RPKM-Werte von Dr. Martin Löwer (TRON Translational Oncology, Universitätsmedizin

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz) bereitgestellt. Vergleichbar ausgewertete RNA-seq-Daten weiterer 83 Hautproben gesunder Probanden und 92 läsionale Hautproben psoriatischer Patienten wurden als RPKM-Werte von Dr. Lam Tsoi (Tsoi et al. 2011, Li et al. 2014) zur Verfügung gestellt. Von drei weiteren Patienten waren RNA-seq Rohdaten je von läsionaler und nicht-läsionaler Haut verfügbar (Jabbari et al. 2012). Diese und weitere Daten menschlicher und murine Leber- und Hautproben (Brawand et al. 2011) wurden unter Anleitung von oder durch Dr. Shiwei Deng (AG Wojnowski) gemäß Standardprotokoll analysiert (Trapnell et al. 2012).

### **Populationsgenetische Analyse des *CYP3A* Lokus**

Die *CYP3A*-spezifische Analyse der Signaturen natürlicher Selektion sollten mittels aktueller Daten der HapMap-Datenbank (Frazer et al. 2007) sowie des 1.000 Genomes Project (Genomes Project et al. 2012) erfolgen. 2012 beschrieben Polimanti und Kollegen solch eine genomweite Analyse aller *CYP*-Loci (Polimanti et al. 2012). Zudem wurden berechnete Selektionsparameter kürzlich im Genombrowser UCSC verfügbar (Pybus et al. 2013). Aufgrund der Aktualität dieser Auswertungen und der verwendeten Daten sowie aufgrund der starken Kopplung des *CYP3A*-Lokus in europäischen Populationen - ersichtlich u. A. als Rekombinationsrate in Abb. 3 - wurde auch in Rücksprache mit Dr. Markus Schirmer (Klinische Pharmakologie, Universitätsmedizin Göttingen) von einer erneuten Analyse abgesehen.

## Ergebnisse

### Charakterisierung der CYP3A und NR1I in menschlicher Haut

#### Vergleichbarkeit der zwei entfernten Schichten humaner Vorhäute männlicher Spender

Bei der in Deutschland verbreitetsten Art der Zirkumzision werden zwei der drei Hautschichten männlicher Präputien entfernt (Miernik et al. 2011). Die Lamina interna, das Innenblatt, ist meist haarlos und ein mehrschichtiges Plattenepithel reich an Schweiß- und Talgdrüsen, ähnlich einer Schleimhaut (Liebich 2009). Das äußere Vorhautblatt, die Lamina externa, entspricht im Aufbau der allgemeinen Körperhaut (Liebich 2009). Zu Beginn der Studie wurden beide Hautschichten gesammelt und von neun Spendern hinsichtlich der mRNA-Expression der CYP3A untersucht.

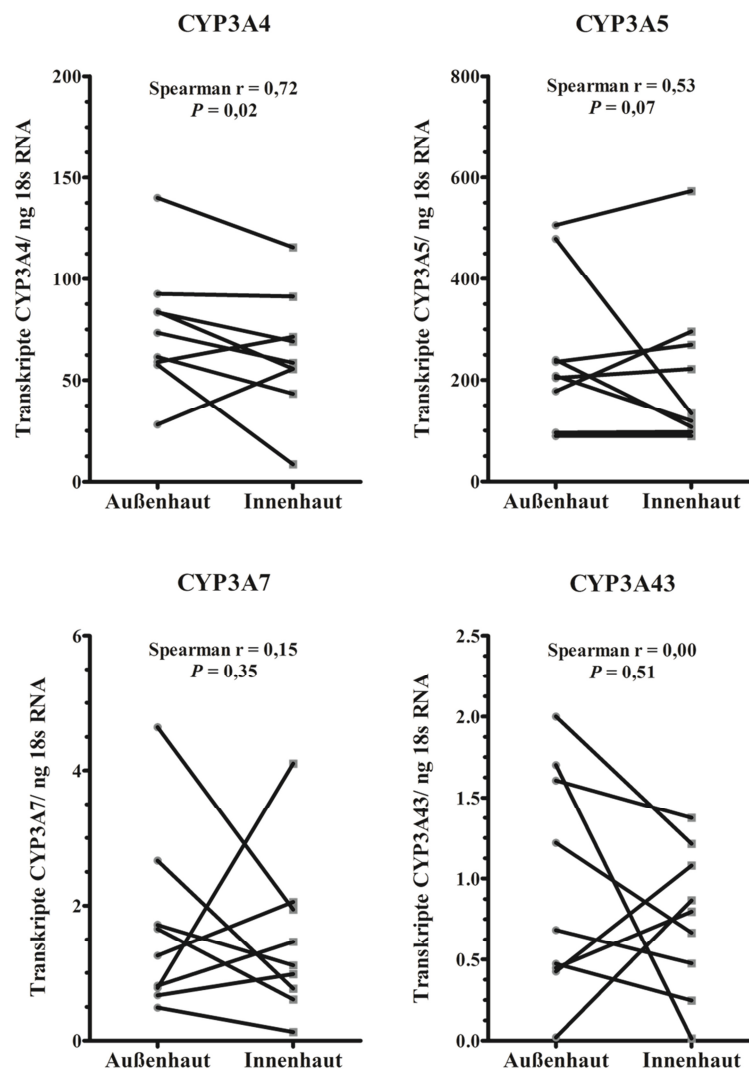


Abb. 14: Expression der CYP3A in unterschiedlichen Hautschichten männlicher Präputien  
Dargestellt sind normalisierte mRNA-Expression von CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 und CYP3A43 in der Lamina externa (Außenhaut, äußeres Hautblatt) und Lamina interna (Innenhaut bzw. Innen-/Parietalblatt) von neun männlichen Hautspendern. Die Korrelation der Expression wurde nach Spearman berechnet. Angegeben sind der Korrelationskoeffizient  $r$  und der entsprechende  $P$ -Wert.

Ein Vergleich der Expressionsdaten beider Hautschichten (Abb. 14) ergab eine überzufällig starke Übereinstimmung der CYP3A4-mRNA ( $r = 0,72$ ). Für die restlichen CYP3A blieb der Vergleich - wenn wie für CYP3A5 auch recht knapp - über dem 5 %-Signifikanzniveau. Für CYP3A5 kann ein nicht-signifikanter Trend für eine starke Korrelation mit  $r = 0,53$  beobachtet werden. Aufgrund dieser geringen Korrelation der Expression beider Hautschichten, aufgrund der anatomisch-histologischen und vermutlich darüber hinaus funktionellen Übereinstimmung zur restlichen Körperhaut wurde für alle weiteren Versuche Vorhautgewebe der Lamina externa verwendet.

### **Quantifizierung der CYP3A in menschlicher (Vor-)Haut**

Die Quantifizierung der CYP3A in menschlichen Hautproben erfolgte zum einen auf Ebene der mRNA und zum anderen auf Protein-Ebene. Hierfür wurde Vollhaut, also sowohl dermale als auch epidermale Schichten der gesammelten Hautproben, vornehmlich Vorhäute, verwendet. Zunächst wurde die mRNA mit qRT-PCR relativ zu Plasmidstandardkurven bzw. Leberproben bekannter absoluter CYP3A-Mengen quantifiziert. Die Normalisierung erfolgte anhand der 18S rRNA-Expression. Daneben standen Expressionsdaten Transkriptom weiter Studien anderer Arbeitsgruppen zur Auswertung zur Verfügung. Bei der Beschreibung der Daten bezieht sich die erst genannte Zahl stets auf die qRT-PCR-Daten (als Transkripte pro ng 18S rRNA) mit entsprechenden RNA-seq-Daten (in RPKM, *reads per kilobase per million mapped reads*) in Klammern.

Abb. 15 zeigt die Expression der vier mRNA-Spezies von CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 und CYP3A43 sowie eine Gegenüberstellung der CYP3A4- und CYP3A5-Expression der einzelnen Proben. Anhand mehrerer Datensätze konnte gezeigt werden, dass CYP3A5 mit mittleren 107 Transkripten pro ng 18S rRNA (4,3 RPKM) das dominante Isozym in menschlicher Haut ist. Dies entspricht dem 2,6 (5)-Fachen der CYP3A4 und dem 130 (20)-Fachen der CYP3A7-Expression. Wie für andere Organe bereits beschrieben lag die Menge der CYP3A43-mRNA meist unter der Nachweisgrenze von einem Transkript pro ng 18S rRNA.

Die CYP3A4-, CYP3A5- und CYP3A7-mRNA variierte interindividuell um das bis zu 170 (30)-, 240 (14)- bzw. 660 (46)-Fache. Allgemein zeigte sich eine überzufällige mittlere positive Korrelation der CYP3A4- und CYP3A5-Expression mit  $r = 0,39$  ( $r = 0,45$ ). Betrachtet man nicht nur diese beiden Isozyme, sondern die Gesamtexpression der CYP3A so zeigt sich ein bimodaler Trend zur allgemein hohen bzw. allgemein niedrigeren CYP3A-Expression.

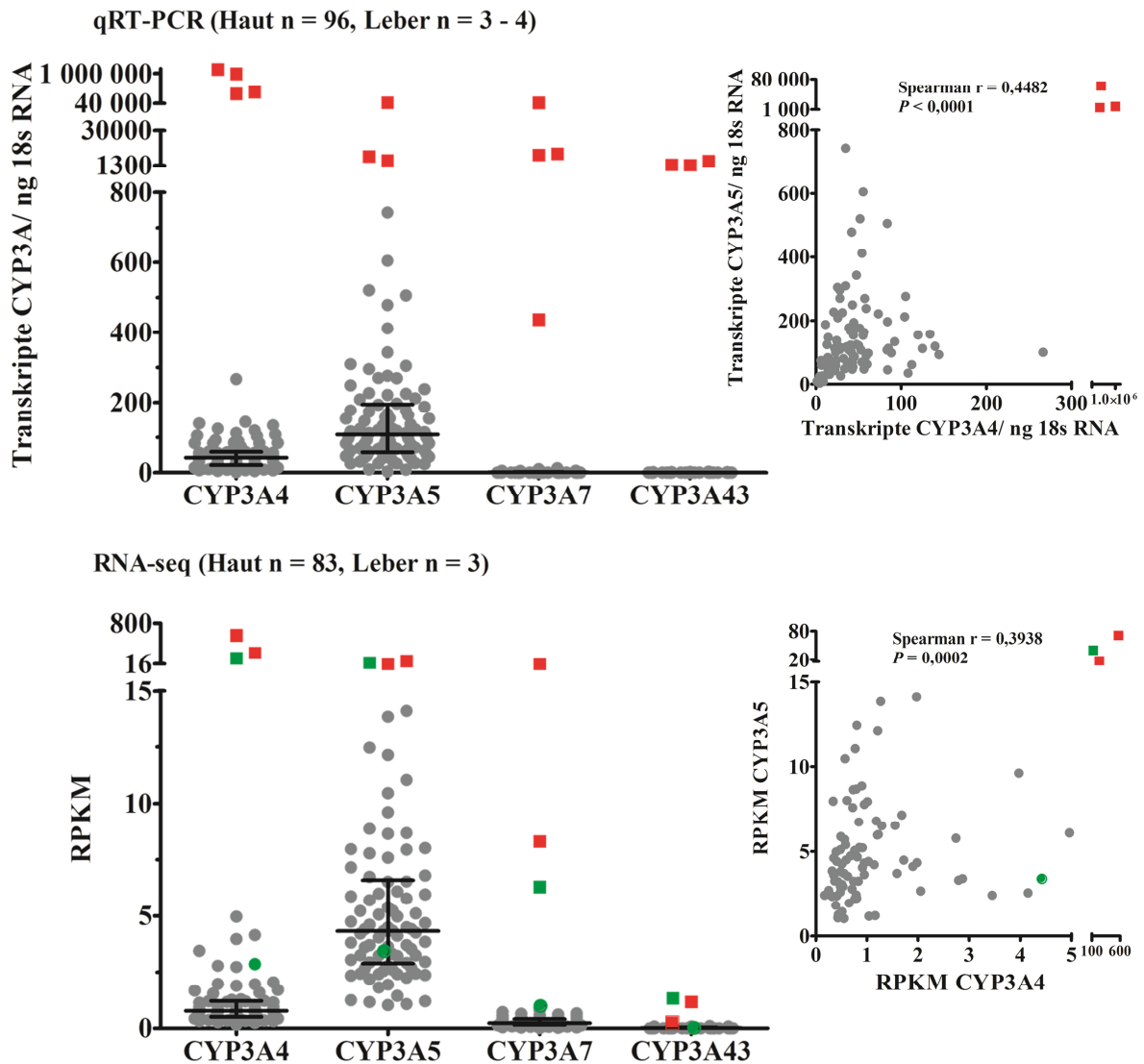


Abb. 15: mRNA-Expression der CYP3A in menschlichem Gewebe

Die Detektion erfolgte mittels qRT-PCR (oben) und RNA-seq (unten) an menschlicher Haut (Kreise) und Leber (Quadrate). Jeweils auf der linken Seite dargestellt sind die Expressionwerte der vier CYP3A-Isozyme in den einzelnen Proben als Transkripte normalisiert pro ng 18S rRNA unter Verwendung mehrerer absolut quantifizierter Referenzproben bzw. im Falle der RNA-seq-Daten als RPKM (reads per kilobase per million mapped reads)-Werte. Dargestellt sind zudem Median-Werte und die Spanne der Interquartile aller Proben. Die jeweils rechten Abbildungen zeigen die Korrelation der CYP3A4- und CYP3A5-Expression nach Spearman unter Angabe des Korrelationskoeffizienten  $r$  sowie des entsprechenden P-Wertes. Unterschiedliche Datensätze sind farblich markiert. Grau dargestellt sind die Daten der qRT-PCR an eigens gesammelten Hautproben bzw. RNA-seq-Daten menschlicher Haut (Tsoi et al. 2011, Li et al. 2014). Daten menschlicher Leberproben sind zum einen in rot dargestellt (qRT-PCR: IKP148 Studie, RNA-seq (Brawand et al. 2011)). Grüne Farbe zeigt RNA-seq-Daten gleicher Aufarbeitung einer Haut (Kreis)- und einer Leberprobe (Quadrat) von Dr. Löwer des Mainzer TRON, Translationale Onkologie an der Universitätsmedizin Mainz.

Die Expression der CYP3A in humaner Leber war zwischen den untersuchten Proben vergleichbar und CYP3A4 zeigte sich als meist exprimiertes Isozym mit mittleren 700.000 Transkripten pro ng 18S rRNA (231 RPKM). Die CYP3A4-mRNA-Spezies überstiegen damit CYP3A5 und CYP3A7 um das 88 (6)-Fache bzw. das 67 (28)-Fache. Wie in Haut war CYP3A43 auch in der Leber das am schwächsten exprimierte Isozym und entsprach weniger als 0,5 % der CYP3A4-Expression. Der Anteil der einzelnen Isozyme an der gesamten CYP3A-Expression in Leber und Haut ist in Abb. 16 veranschaulicht.

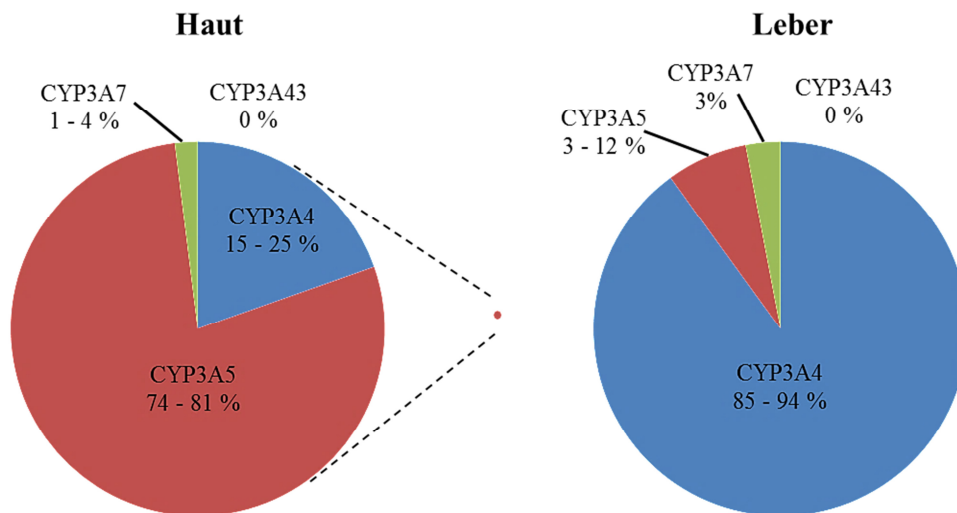


Abb. 16: Anteilige Expression der CYP3A-Isozyme in Haut und Leber

Dargestellt sind prozentuale Anteile der mRNA-Expression von CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 und CYP3A43 in Leber und Haut. Das Größenverhältnis der Kreise entspricht der relativen Gesamtexpression der CYP3A beider Organe. So erreichte die Gesamt-CYP3A-Expression der Haut etwa 1-2 % der hepatischen. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde die anteilige Expression der kutanen CYP3A zudem vergrößert links dargestellt. Gemessen wurde die mRNA-Menge mit qRT-PCR und RNA-seq an insgesamt 179 Haut- und sieben Leberproben. Der Anteil wurde auf Basis der arithmetischen Mittelwerte berechnet.

Der Vergleich der hepatischen und kutanen Expression in beiden Datensätzen ergab eine deutlich höhere CYP3A-Expression in der Leber, wobei diese Unterschiede in qRT-PCR-Daten etwa eine bis drei Größenordnungen größer als in RNA-seq-Daten waren. Die CYP3A4-Expression zeigte den größten Unterschied zwischen beiden Organen und war in der Leber im Mittel 17.000 (304)-fach höher als in der Haut. Deutlich geringere Unterschiede zeigte CYP3A5, dessen kutane Expression zwischen 1 und bis zu 10 % der hepatischen Expression entsprach. CYP3A7 und CYP3A43 erreichten in der Haut bis zu 2,7 % bzw. 0,8 % der hepatischen Expression.

Die Quantifizierung der Proteinmenge von CYP3A4/7 bzw. CYP3A5 erfolgte an Vollhauthomogenaten mittels Immunoblot normalisiert auf die Proteinmenge von GAPDH relativ zu einer stets mitgeführten Hautprobe. Abb. 17 zeigt repräsentative Blots humaner Hautproben unter Angabe des *CYP3A5*\*3-Genotyps. Die Proteine CYP3A4 und CYP3A7 wurde dabei zusammen als Einzelbande von 50 kDa detektiert, CYP3A5 hingegen abhängig von der Bandenstärke als Einzel- oder Doppelbande im Größenbereich von 50-52 kDa. Zwei Banden vergleichbarer Intensität zeigten sich v. a. bei Proben von Trägern des *CYP3A5*\*1-Allels. Zudem korrelierten die CYP3A5-mRNA- und -Proteinmengen ( $r = 0,51$ ,  $P = 0,04$ , Abb. 18 links), die von CYP3A4/7 jedoch nicht ( $r = 0,20$ ,  $P = 0,22$ , Abb. 18 rechts). Auf Protein-Ebene gab es im Gegensatz zu mRNA-Daten keinen Zusammenhang zwischen der CYP3A4- und CYP3A5-Expression ( $r = 0,01$ ,  $P = 0,49$ , Daten nicht dargestellt). Die CYP3A4/7-Proteinmenge variierte zwischen den einzelnen Proben um Faktor 1.350, die von CYP3A5 um das 4-Fache.

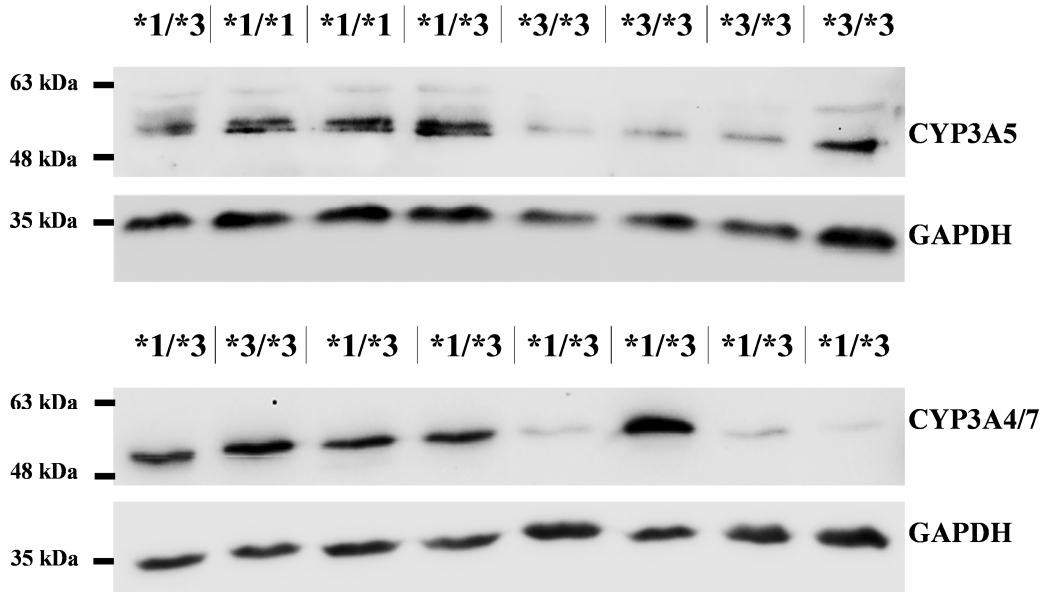


Abb. 17: Repräsentativer Proteinnachweis der CYP3A in humaner Haut

100 µg Protein menschlichen Hauthomogenats verschiedenen *CYP3A5*\*3-Genotypus wurden für die Detektion der CYP3A5- (oben), CYP3A4/7- (unten) und GAPDH-Proteinmenge eingesetzt. Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte durch Chemilumineszenz-basierten Immunoblot und anschließende Detektion mit dem ChemiDoc XRS System (Bio-Rad, München). Visualisierung und Auswertung erfolgte mit den herstellereigenen Programmen Quantity One v4.6.9 und Image Lab v4.1. Quantifiziert wurde relativ zu einer stets mitgeführten Referenzprobe. Angegeben ist der *CYP3A5*\*3-Genotyp, die entsprechenden Bandengröße des Proteinmarkers, sowie der verwendete Primärantikörper.

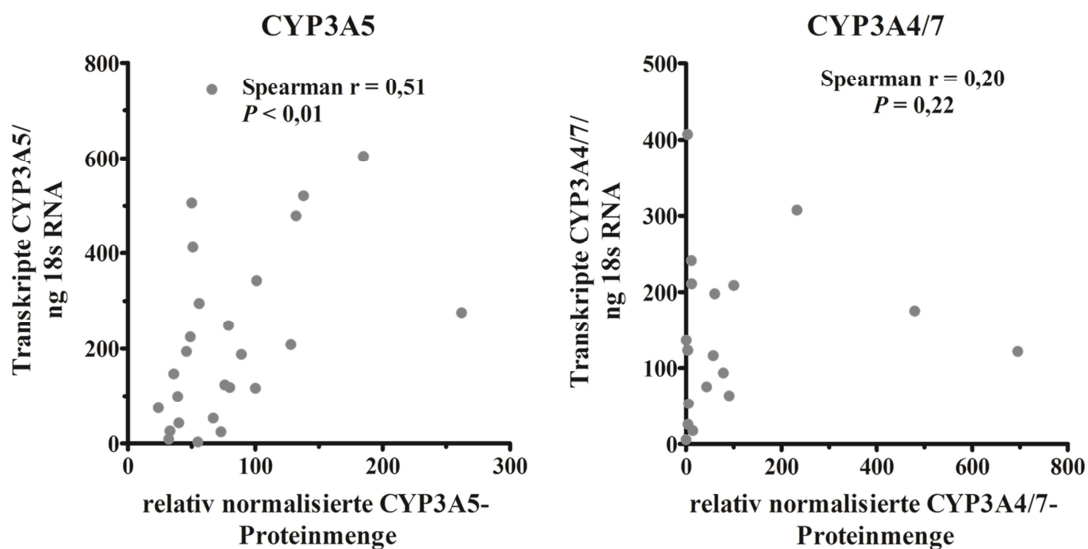


Abb. 18: Korrelation der RNA- und Proteinmenge von CYP3A5 und CYP3A4/7 in humaner Haut

Gezeigt ist die Korrelation der Protein- und RNA-Menge von CYP3A5 (links) und CYP3A4/7 (links). Die RNA-Bestimmung erfolgte mittels qRT-PCR, die des Proteins mit Immunoblot. Da der verwendete Antikörper CYP3A4 und CYP3A7 detektiert, wurden die Expressionsdaten beider Isozyme für die Berechnung zusammengefasst. Die Korrelation wurde nach Spearman berechnet.

Die Proteinmenge der Haut wurde zudem mit Leber-, Nieren- und Herzproben verglichen (Abb. 19). Dabei zeigte sich zum einen wie erwartet (Bolbrinker et al. 2012) auch die renale CYP3A5-Proteinmenge durch den *CYP3A5*\*3-Genotypus beeinflusst und wies in der Niere eines *low expressers* (Genotyp \*3/\*3) eine weniger als halb so große CYP3A5-Proteinmenge auf wie in der Niere eines \*1-Allel-Trägers. Zum anderen zeigte sich bei

Organen des *low expresser*-Genotyps folgende relative Proteinmenge: Leber < Niere < Haut < Herz. Dabei lag die Expression der Leber 2-, 6- und 9,5-fach über der der Niere, Haut respektive dem Herzen. Bei \*1-Allelträgern alleine reduzierte sich dieser Unterschied zwischen den untersuchten Organen. So zeigte die Niere eine vergleichbare und die Haut eine etwa 3,4-fach geringere Proteinmenge als die Leber.

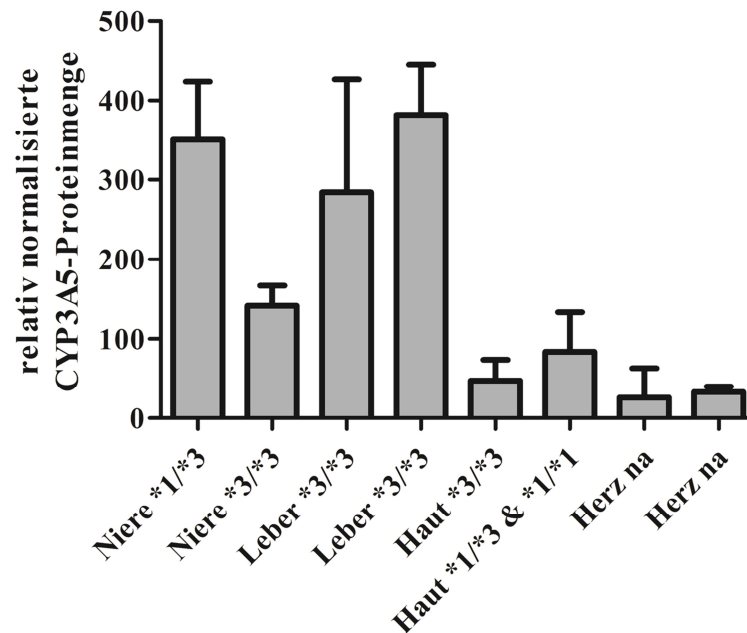


Abb. 19: Proteinnachweis von CYP3A5 in verschiedenen humanen Organen

Detektiert wurden CYP3A5 und GAPDH in 100 µg Protein von Vollgewebshomogenaten menschlicher Leber, Niere, Haut und des Herzens. Die Abbildung zeigt die mittlere Proteinmenge der mehrfach gemessenen Homogenate unter Angabe des *CYP3A5*\*3-Genotypus (\*1/\*1 & \*1/\*3 high expresser, \*3/\*3 low expresser, na kein Genotyp verfügbar).

### Lokalisation von CYP3A4/7 und CYP3A5

Die Lokalisierung der CYP3A erfolgte auf Proteinebene immunhistochemisch an histologischen Schnitten menschlicher Hautproben. CYP3A4/7 und CYP3A5 zeigten ein überlappendes Expressionsspektrum in menschlicher Haut. Dabei waren sie v. a. in den Keratinozyten der Epidermis (Abb. 20) und dort in allen epidermalen Schichten mehr oder weniger gleichmäßig nachweisbar. Für CYP3A5 zeigte sich auch histologisch ein Trend zu einer Abhängigkeit der Proteinmenge vom *CYP3A5*\*3-Genotyp. Daneben wurden CYP3A5 und weniger CYP3A4/7 in den epidermalen Hautadnexen, wie den holokrinen Talgdrüsen (Abb. 21, A + B) und hier v. a. in den Basal- bzw. Ersatzzellen detektiert. In den Basalzellen der Endothelien der dermalen Blutgefäße zeigten sich v. a. das CYP3A4/7- und weniger das CYP3A5-Protein (Abb. 21, C + D). Damit konnten nicht nur die wenigen Daten andere Studien zur Lokalisation der CYP3A reproduziert (Baron et al. 2001, Janmohamed et al. 2001, Lee et al. 2001) sondern zusätzlich isozymspezifisch für CYP3A4/7 und CYP3A5 aufgezeigt werden.

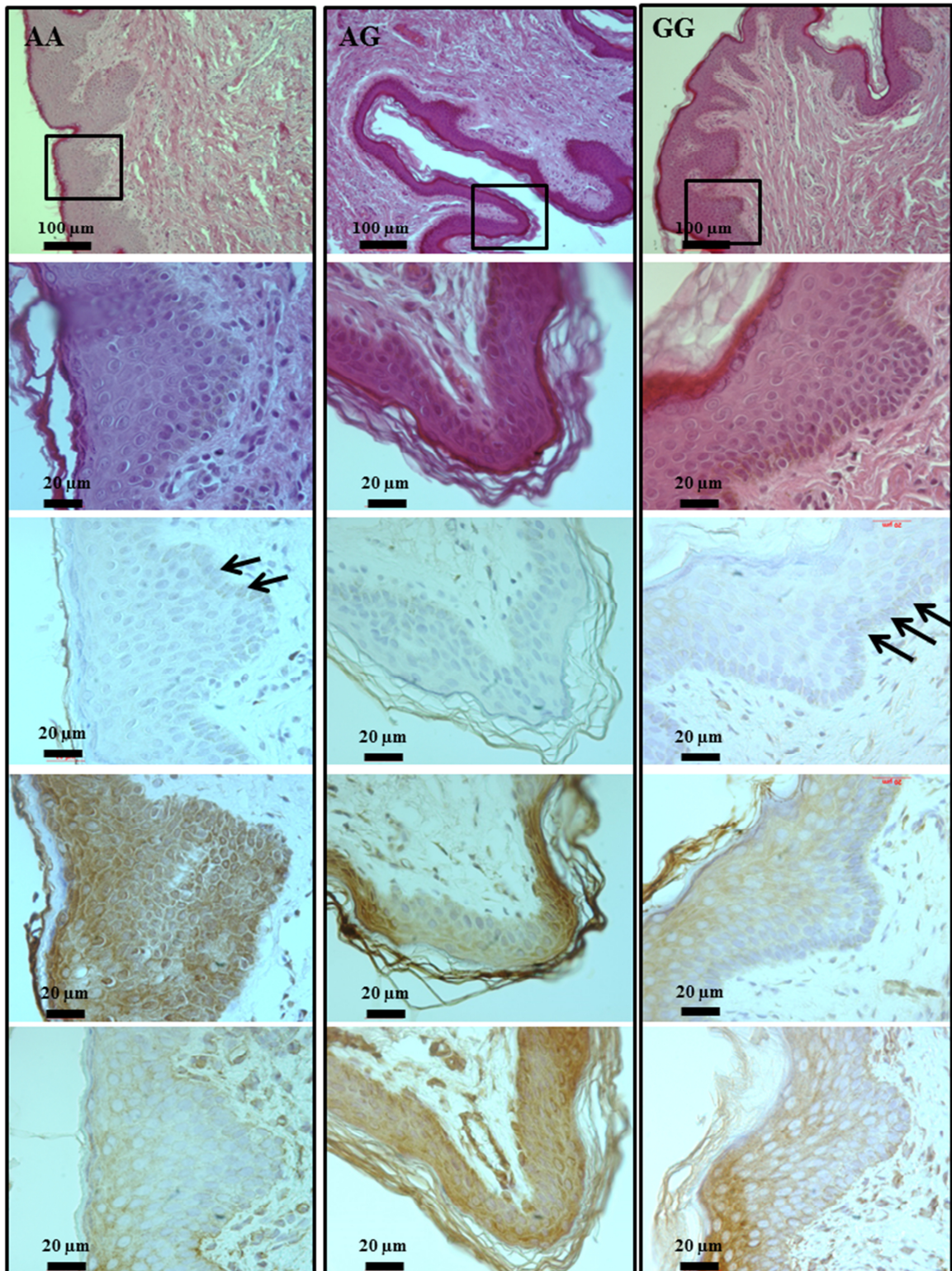


Abb. 20: Immunhistologische Lokalisierung von CYP3A4/7 und CYP3A5 in menschlicher Haut  
 Spaltenweise dargestellt sind repräsentative Schnitte dreier Spenderhäute unterschiedlichen *CYP3A5*-Genotypus (AA, AG und GG). Die Aufnahmen erfolgten bei 10- bzw. 40-facher Vergrößerung (Maßstab 100 bzw. 20  $\mu$ M). Die Rechtecke markieren den Bereich, der stärker vergrößert betrachtet wurde. Pfeile zeigen Melanin-pigmentierte Bereiche der basalen Epidermis, die es vom spezifischen DAB-Signal abzugrenzen galt. Serienschritte der Dicke 3  $\mu$ m wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt (Zeile 1 und 2) und immunohistochemisch ohne Primärantikörper-Inkubation (Zeile 3) oder unter Verwendung eines Antikörpers gegen CYP3A5 (Zeile 4) oder CYP3A4/7 (Zeile 5) gefärbt.

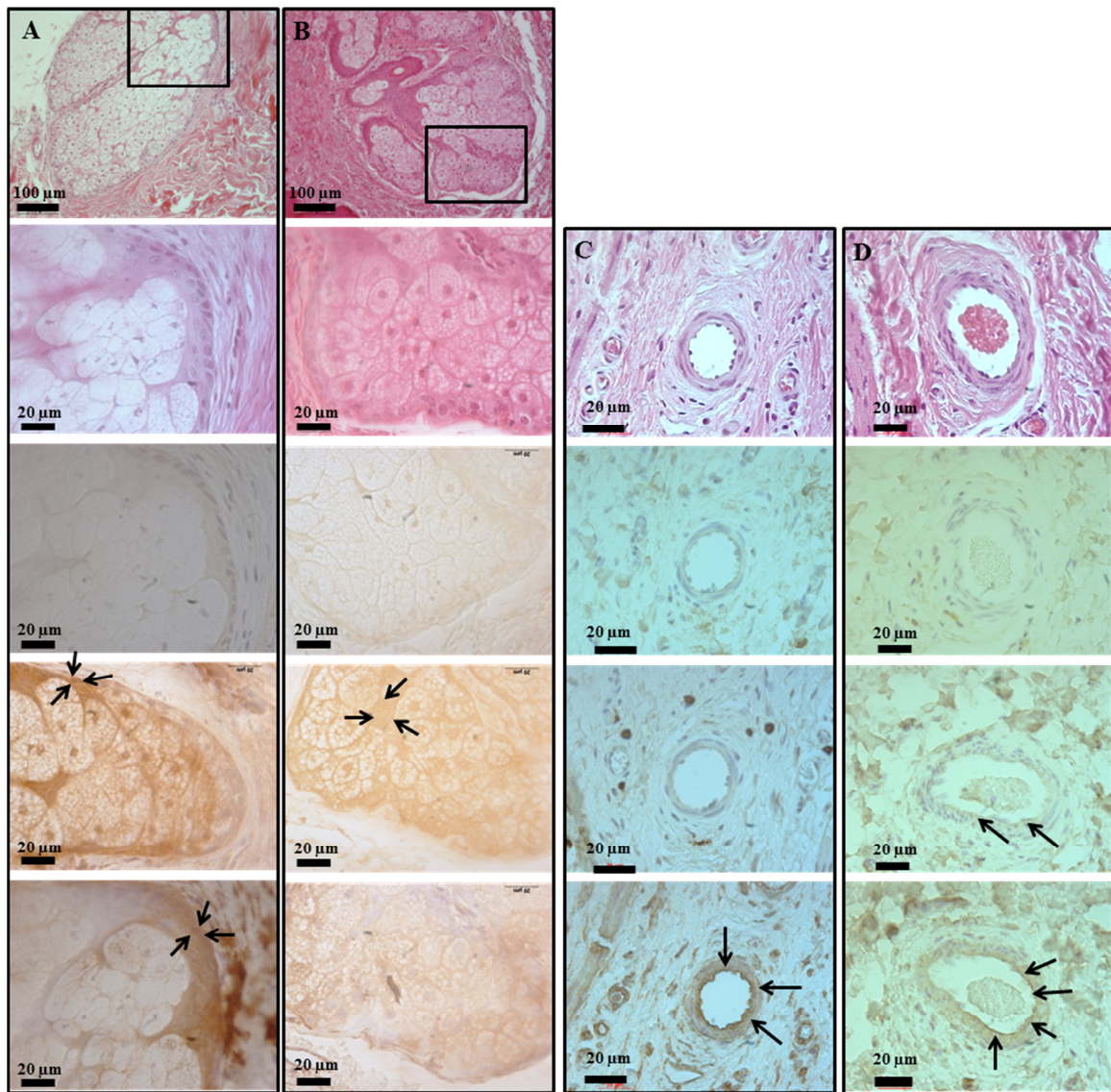


Abb. 21: Immunhistologische Lokalisierung von CYP3A4/7 und CYP3A5 in epidermalen Hautadnexen  
 Spaltenweise dargestellt sind die Bereiche der epidermalen Adnexe wie die Talgdrüsen (A + B) und Endothelien (C + D) von vier verschiedenen Häuten in 10- oder 40-facher Vergrößerung. Die Rechtecke markieren den vergrößerten Bildausschnitt. Pfeile zeigen auf periphere Basal- bzw. Ersatzzellen der holokrinen Talgdrüse (A + B) und basale Endothelzellen dermalen Blutgefäße (C + D). Serienschnitte der Dicke 3 μm wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt (Zeile 1 und 2) und immunhistochemisch ohne Primärantikörper-Inkubation (Zeile 3) oder unter Verwendung eines Antikörpers gegen CYP3A5 (Zeile 4) oder CYP3A4/7 (Zeile 5) gefärbt.

### Relevanz des *CYP3A5*\*3-Allels in humaner Haut

Die Spender menschlicher Hautproben wurden an peri-operativem Überschussmaterial hinsichtlich des *CYP3A5*\*3-Alleles (rs776746) genotypisiert. Dieses Allel ist in nicht-afrikanischen Populationen alleiniger Prädiktor für die bimodal verteilte *CYP3A5*-Expression (Kuehl et al. 2001). Dabei gelten Träger des *CYP3A5*\*1-Allels als *high* (homozygot) und *medium expressers* (heterozygot) und Träger zweier *CYP3A5*\*3-Allele als *low expresser*. Tab. 14 fasst die Genotyp- und Allelfrequenzen der 96 untersuchten Hautproben zusammen. Diese entsprachen den erwarteten Häufigkeiten gemäß den Annahmen des Hardy-Weinberg-Theorems ( $P = 0,0174$ ). Zudem fiel die Allelfrequenz in die Spanne bisher beschriebener europäischer Studienpopulationen.

Da sich die CYP3A5-Expression von *high* und *medium expressers* deutlich weniger unterscheidet als zwischen *medium* und *low expressers* (Koch et al. 2002), wurden erstere in darauffolgenden Analysen als Hochexpressierer zusammengefasst betrachtet.

Tab. 14: Übersicht der Genotypdaten humaner Hautspender am SNP rs776746  
 Angegeben sind die Anzahl der Individuen nach Genotyp und die daraus abgeleitete Genotyp- sowie Allelfrequenz. Die Angabe der Frequenz des ancestralen \*1-Allel als *minor allele frequency* (MAF) richtet sich dabei nach dem menschlichen Referenzgenom hg19. Als Referenzwert (<sup>1</sup>) wurden Daten veröffentlichter Studienpopulationen europäischer Herkunft (Zeitraum 2002-2011, Abb. 1) und der HapMap-Populationen (CEU und TSI, Frazer et al. 2007) herangezogen.

Genotyp (Allel)	Genotyp (Basen)	Anzahl der Individuen	Genotypfrequenz
*1/*1	AA	3	0,03
*1/*3	AG	13	0,14
*3/*3	GG	80	0,83
<b>Allel</b>	<b>Base</b>	<b>MAF</b>	<b>Referenz-MAF<sup>1</sup></b>
*1	A	0,10	0,00-0,18
*3	G		

Basierend auf dem CYP3A5\*3-Genotyp wurden 16 *high expressers* und 80 *low expressers* identifiziert. Wie bereits für Leber (Kuehl et al. 2001), Niere (Bolbrinker et al. 2012) und Dünndarm (Burk et al. 2004) beschrieben führte das CYP3A5\*3-Allel auch in der Haut nachweislich zu einer überzufällig geringeren CYP3A5-Expression. Dabei hatten Träger des \*1-Allels eine 3,3-fach höhere mRNA- und eine 1,8-fach erhöhte Proteinmenge von CYP3A5 als Individuen des \*3/\*3-Genotyps (Abb. 22).

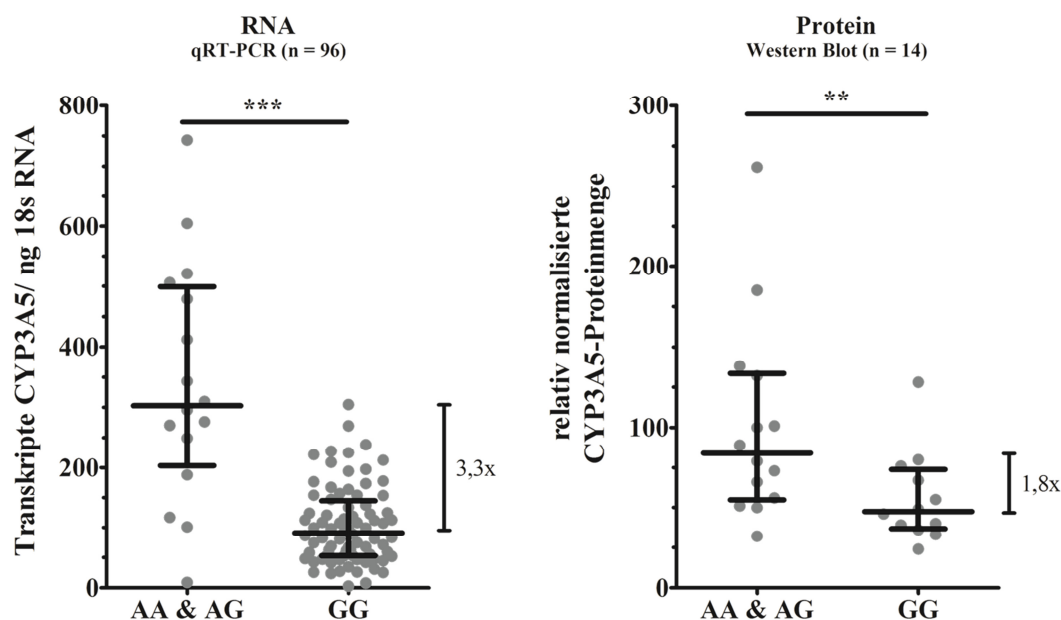


Abb. 22: mRNA- und Proteinmenge in menschlichen Hautproben in Abhängigkeit vom CYP3A5\*3-Genotyp  
 Links dargestellt sind die Transkripte von CYP3A5, normalisiert auf die 18S rRNA-Expression der 96 Hautproben, sowie Median und Interquartilsrange der Gruppen, rechts die CYP3A5-Proteinmenge normalisiert auf GAPDH von je 14 repräsentativen Hautproben pro Gruppe. Die Testung der Expressionsunterschiede zwischen Trägern unterschiedlichen Genotyps erfolgte für zwei Gruppen einseitig und nicht-parametrisch nach Mann-Whitney. Gemäß der Definitionen des verwendeten Programms GraphPad Prism v5.01 gilt \*\*  $P < 0,01$  und \*\*\*  $P < 0,001$ .

Auf funktioneller Ebene konnte dieser Unterschied aufgrund der nicht-erfolgreichen Präparation von Hautmikrosomen und CYP3A-Aktivität unterhalb der Nachweisgrenze nicht bestimmt werden.

### **CYP3A-Aktivität in menschlicher Haut**

Für die Messung der CYP3A-Aktivität wurden mikrosomale Fraktionen hergestellt. Wie erwartet konnte GAPDH als zytosolischer Marker nur in Vollgewebshomogenat, nicht jedoch in mikrosomalen Überständen detektiert werden. Calnexin zeigte in hepatischen Mikrosomen eine konstante 1,7-fache Anreicherung gegenüber Vollgewebshomogenaten. In Hautmikrosomen betrug der Anreicherungsfaktor zwischen 4,7 und 9,7 bis 10,9 bei der Präparation nach Lang (Lang et al. 2001). Die CYP3A5-Proteinmenge war nur in Lebermikrosomen 2- bis 6-fach im Vergleich zu Vollgewebshomogenaten angereichert, in Hautmikrosomen jedoch nicht.

Für keine der Präparationen konnte eine CYP3A-Aktivität oberhalb der LOD (ca. 1.000 RLU) gemessen werden. In Anlehnung an die beschriebenen CYP3A-Aktivitäten in Hautmikrosomen von 0,03-0,05 pmol D-Luziferin/min/mg Mikrosomen (Götz et al. 2012b) wären hier RLUs um 5.650 zu erwarten. Lediglich bei der Inkubation der analog präparierten Leberprobe konnte ein Anstieg der Luziferaseaktivität auf ca. 5.000 RLU gemessen, dagegen nicht anhand des D-Luziferin-Standards quantifiziert werden. Damit lagen die Aktivität der selbst hergestellten Lebermikrosomen 10-fach unterhalb der analog vermessenen Lebermikrosomen (> 40.000 RLU, Koch et al. 2002) mit der Umsetzung der Proluziferins in 20 bis 27 pmol D-Luziferin/min/mg Mikrosomen.

### **Luziferaseaktivität in CYP3A5-Luc-Mäusen**

Vor der Untersuchung der Induktion durch VD-Metaboliten *ex vivo* wurde die basale CYP3A5-Aktivität an Gewebshomogenaten und *in vivo* in Haut transgener CYP3A5-Luc-Mäuse untersucht. Zudem wurde Haut in Gewebekultur aufgenommen und deren Luziferaseaktivität und Viabilität nach den einzelnen Präparationsschritten und nach unterschiedlicher Kulturdauer gemessen. Ziel war hierbei die Untersuchung des Einflusses der Kultivierung auf Luziferaseaktivität und Viabilität.

Murine Haut zeigte sowohl *in vivo* (Abb. 23) als auch in Organhomogenaten (Abb. 24, rechts) eine Aktivität des Transgens Luziferase. An Homogenaten zeigte Haut die höchste gemessene Luziferaseaktivität, gefolgt von Dünndarm (Abb. 24, rechts). In Niere und Leber konnte reproduzierbar keine und in Haut und Dünndarm die höchste Luziferaseaktivität gemessen werden (Nem et al. 2012).

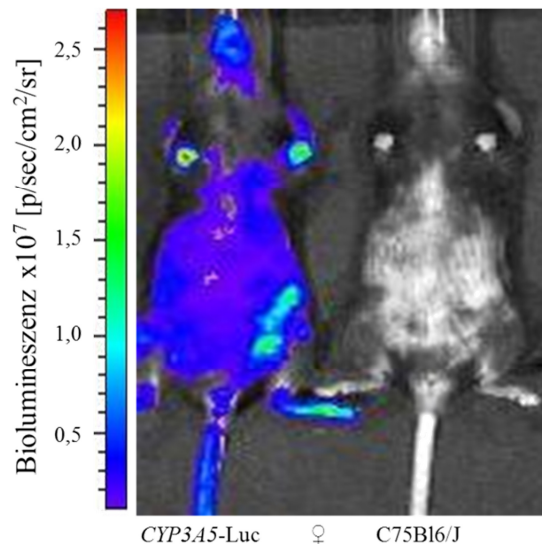


Abb. 23: *in vivo*-Biolumineszenz in unbehaarter Haut von *CYP3A5*-Luc-Mäusen

Dargestellt sind Biolumineszenz einer repräsentativen Messung zweier weiblicher Mäuse mit *C75B16/J*-Hintergrund: einer transgenen *CYP3A5*-Luc-Maus der Linie A (links) und einem nicht-transgenen Wurfgeschwister (rechts). Bei der *in vivo*-Bildgebung wird die Aktivität des Transgens Luziferase am lebenden, narkotisierten Tier anhand der entstehenden Biolumineszenz gemessen. Hierfür wurde die Maus bauchseitig rasiert. Das Substrat D-Luziferin wurde 5 min vor der Messung i. p. appliziert und das entstehende Licht für 5 min integriert. Die Messung wurde von Dr. Mustafa Diken und Dr. Dieudonné Nem am IVIS System (Xenogen, Alameda, USA) durchgeführt. Die rechtsseitige Skala gibt die gemessene Biolumineszenz in Photonen pro Zeit und Fläche an.

Für die Kultivierung wurde Rückenhaut von Mäusen ( $n = 3$ ) entnommen, kultiviert und nach unterschiedlicher Kulturdauer untersucht. Zum Vergleich wurden Leber, Niere und Dünndarm entnommen und analog ohne Kultivierung untersucht.

Durch die Aufnahme der Haut in Gewebekultur konnte allein durch die Desinfektion eine Abnahme der kutanen Viabilität um 10-70 % beobachtet werden (Abb. 24, links). Mit zunehmender Kulturdauer ließ sich eine weitere Abnahme beobachten, die ab ca. 12 h Kulturdauer konstant um 40 % der Ausgangsviabilität lag. Bei der Luziferaseaktivität zeigte sich eine Abnahme bei der Aufnahme in Kultur. Bereits nach 1 h Kulturdauer ging die messbare Luziferaseaktivität um 70 % zurück, verblieb jedoch bis zu 72 h Kultivierung vergleichbar mit der in nicht-kultiviertem Dünndarm messbaren Aktivität. Allgemein zeigte sich kein Zusammenhang zwischen Viabilität und Luziferaseaktivität. Die Halbwertszeit des Luziferaseproteins von drei Stunden (Leclerc et al. 2000) hingegen passt zur geringeren Luziferaseaktivität nach kurzer Kulturdauer und der beeinträchtigten Viabilität.

Aufgrund der geringen Viabilität von max. 50 % der kultivierten Haut und der stark verminderten Luziferaseaktivität wurde auf die Untersuchung der *ex vivo*-Induktion durch VD-Metaboliten verzichtet.

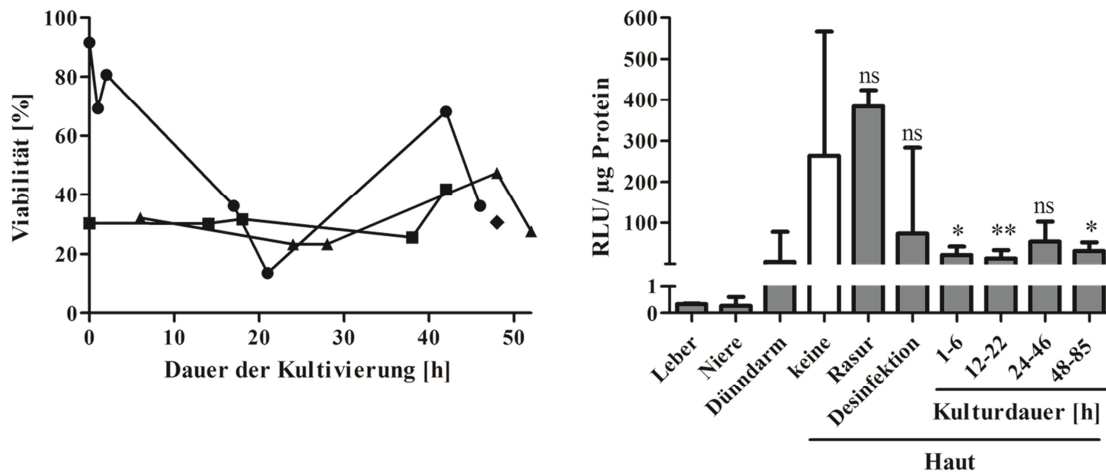
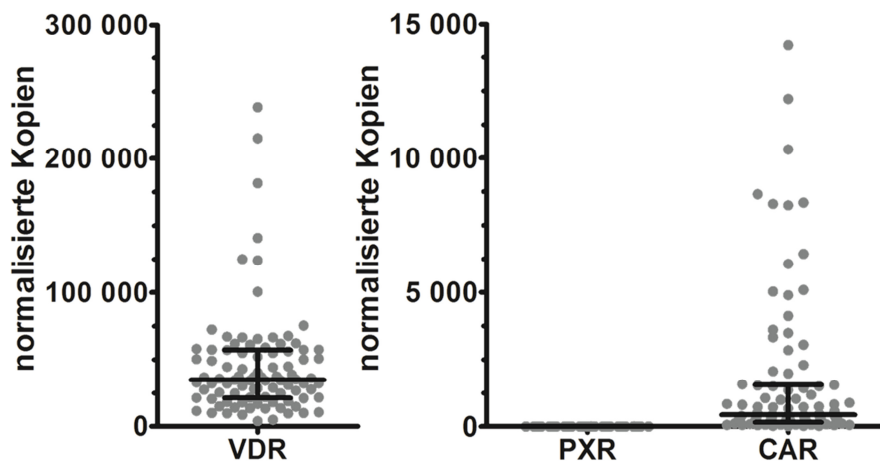


Abb. 24: Viabilität und Luziferaseaktivität kultivierter Haut der *CYP3A5*-Luc-Maus  
 Dargestellt ist die Viabilität (links) und Luziferaseaktivität (rechts) in *ex vivo*-kultivierter Haut von vier *CYP3A5*-Luc-Mäusen als Messwerte der Proben der einzelnen Tiere (Kreise, Quadrate, Dreiecke, Rauten) und Zeitpunkte als miteinander verbundenen Symbole (links) oder Median  $\pm$  Interquartilsrange der einzelnen Behandlungsgruppen (rechts). Hierfür wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und Organe entnommen. Rasierte und desinfizierte Haut wurde in Gewebekultur für unterschiedliche Dauer kultiviert und zum einen die Viabilität (MTT-Assay) und zum anderen die Luziferaseaktivität in Gewebehomogenaten gemessen. Als Referenz diente einerseits nicht-kultivierte Haut, für die eine Viabilität von 100% angenommen wurde, und andererseits unbehandelte Haut („keine“, ohne Rasur und Desinfektion), rasierte Haut („Rasur“, ohne Desinfektion), rasierte und desinfizierte Haut („Desinfektion), sowie Leber, Niere und Dünndarm. Der Effekt der Behandlung und Kultivierung der Haut auf die Luziferaseaktivität wurde zu nicht-kultivierter Haut („keine“) mit Kruskal-Wallis und Dunn’s post-hoc test verglichen.  
 Für *P*-Werte gilt \* *P* < 0,05, \*\* *P* < 0,01, ns *P* > 0,05.

### Expression der NR1I in menschlicher Haut

Die nukleären Rezeptoren der NR1I-Familie - VDR, CAR und PXR - gelten als Hauptregulatoren der Expression der CYP3A. Um deren Relevanz für Prozesse innerhalb menschlicher Haut zu beurteilen, wurde zunächst deren mRNA-Expression methodisch analog zu den CYP3A-mRNA-Spezies quantifiziert. In den zwei Datensätzen menschlicher Haut war VDR mit 40.000 normalisierten Transkripten (16,5 RPKM) am stärksten exprimiert, 80 (9)-mal häufiger als CAR. Die Expression von PXR lag in allen Untersuchungen mit qRT-PCR unterhalb der Detektionsgrenze, mit RNA-seq nahezu bei Null und entsprach damit 0,1 % bzw. 1,1 % derer von VDR respektive CAR. Zwar unterschied sich die relative Expression der NR1I untereinander in der Haut deutlich von der der Leber (rechts in Abb. 25), dennoch ist besonders hervorzuheben, dass die absoluten Expressionswerte des jeweils höchst exprimierten NR1I zwischen beiden Organen vergleichbar waren. So betrug die VDR-Expression der Haut 16,5 RPKM, die CAR-Expression der Leber 7,8 RPKM. Beim Vergleich beider Organe zeigten VDR und CAR eine 110-fach höhere bzw. 4,3-fach niedrigere kutane Expression.

## qRT-PCR (Haut n = 96)



## RNA-seq (Haut n = 83, Leber n = 3)

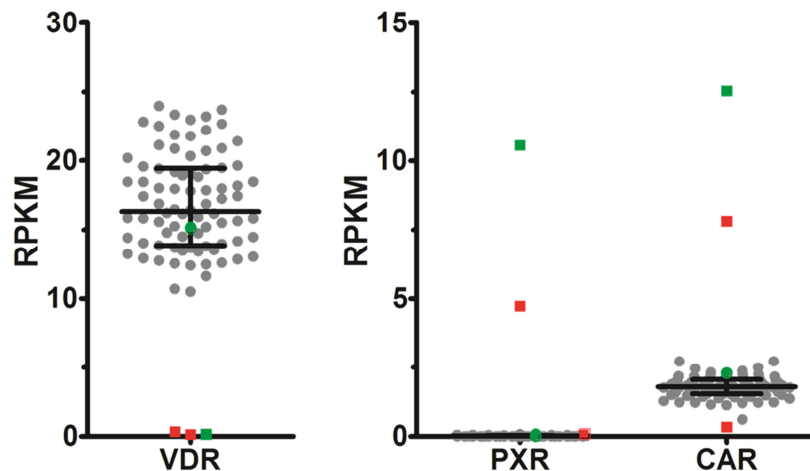


Abb. 25: mRNA-Expression der nukleären Rezeptoren der NR1I-Familie - VDR, CAR und PXR - in humanem Gewebe. Gezeigt ist die mRNA-Expression der einzelnen NR1I in 83 Haut- und drei Leberproben gemessen mit qRT-PCR (oben) und RNA-seq (unten). Aufgrund der um eine Größenordnung höheren Expression von VDR in den Hautproben sind die Daten dazu linksseits separat dargestellt. Neben den Messwerten einzelner Proben sind Median  $\pm$  Interquartilsbreite der Gruppen gezeigt. Unterschiedliche Datensätze sind farblich markiert. Grau dargestellt sind die Daten der qRT-PCR an eigens gesammelten Hautproben bzw. RNA-seq-Daten der Haut (Tsoi et al. 2011, Li et al. 2014). Daten menschlicher Leberproben sind in rot dargestellt (Brawand et al. 2011). Grün zeigt RNA-seq-Daten vergleichbarer Aufarbeitung einer Haut- und einer Leberprobe von Dr. Löwer, TRON.

Für die Haut ergab sich ähnlich wie in der Leber (Westlind-Johnsson et al. 2003, Wolbold et al. 2003) ein überzufälliger Zusammenhang von CYP3A5- bzw. 3A7- und PXR-Expressionsstärken, jedoch nur in Daten aus RNA-seq. Bei der Betrachtung der Expressionsstärken der anderen NR1I und CYP3A erreichte nur eine Korrelation das 5 %-Signifikanzniveau in beiden Datensätzen, nämlich CAR und CYP3A5 ( $r = 0,29$  bzw.  $r = 0,40$ ). In qRT-PCR-Daten zeigte sich zudem ein negativer Zusammenhang zwischen der VDR- und CYP3A5- bzw. CYP3A43-Expression mit  $r = -0,24$  bzw.  $r = -0,54$ .

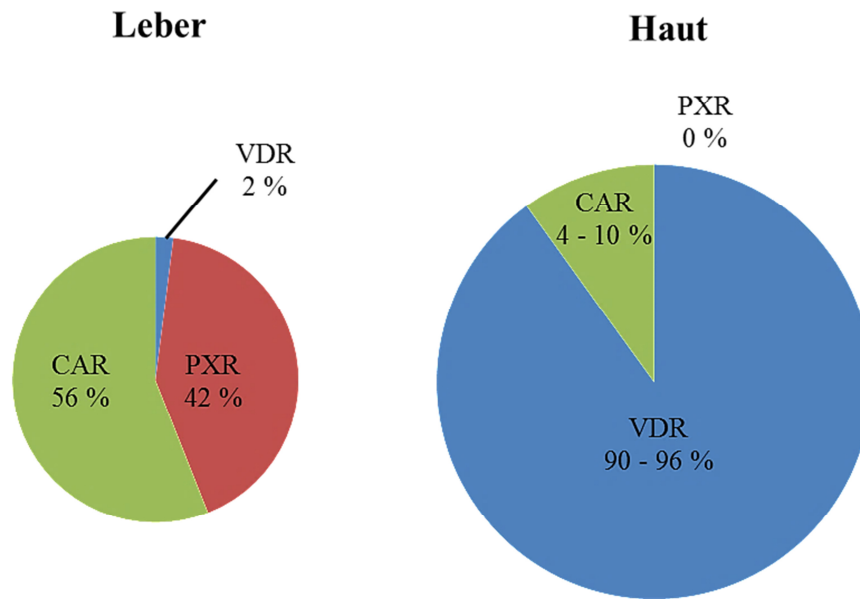


Abb. 26: Anteilige Expression der NR1I - VDR, PXR und CAR - in Leber und Haut  
Gezeigt ist die anteilige Expression der einzelnen NR1I in Leber und Haut dargestellt. Dieser Anteil wurde auf Basis der arithmetischen Mittelwerte berechnet. Die Größe des Kreisdiagramms entspricht der relativen Gesamt-NR1I-Expression in Leber und Haut. Die kutane NR1I mRNA übersteigt die hepatische um das 1,5-Fache.

## Regulation von CYP3A durch Vitamin D-Metaboliten

Die Regulation der *CYP3A*-Promotoraktivität und mRNA-Expression durch VD-Metaboliten wurde in dieser Arbeit in mehreren Modellsystemen unterschiedlicher Komplexität und damit unterschiedlicher Distanz zur Situation *in vivo* untersucht. In Reporter- und 2-Hybrid-Assay wie auch bei der Messung der endogenen Expression der *CYP3A*-mRNA in immortalisierten sowie primären Keratinozyten wurde mit VD-Metaboliten behandelt. Als Positivkontrolle im Reporter-Gen-Assay wurden Dünndarmzellen analog zu HaCaT-Zellen transfiziert und inkubiert.

## Induzierbarkeit von CYP3A4 und CYP3A5 durch Vitamin D-Metaboliten

Die Regulation der endogenen Expression der *CYP3A* durch VD-Metaboliten wurde in immortalisierten und primären Keratinozyten untersucht. Die verwendeten Zellen wurden hinsichtlich ihres *CYP3A5*\*3-Allelstatus genotypisiert. Dabei trugen die verwendeten HaCaT-Zellen den \*3/\*3-Genotyp; elf Zellspender der primären Keratinozyten waren ebenfalls Niedrigexprimierer. Zwei Zelllinien stammten von Hochexprimierern von *CYP3A5*. Für die Induktionsversuche wurden Zellen für 24 h mit den entsprechenden Metaboliten behandelt und die *CYP3A*-mRNA-Spezies mittels qRT-PCR bestimmt.

Dabei zeigte sich *CYP3A4* als responsivstes *CYP3A* mit einer mittleren Expressionsänderung um Faktor 8 bzw. 23 in Anwesenheit von Calcidiol bzw. Calcitriol. Die *CYP3A5*- sowie *CYP3A7*-mRNA-Spezies wurden weniger stark und sehr heterogen beeinflusst: 5- und 8-fach bzw. 3- und 6-fach durch Calcidiol respektive Calcitriol.

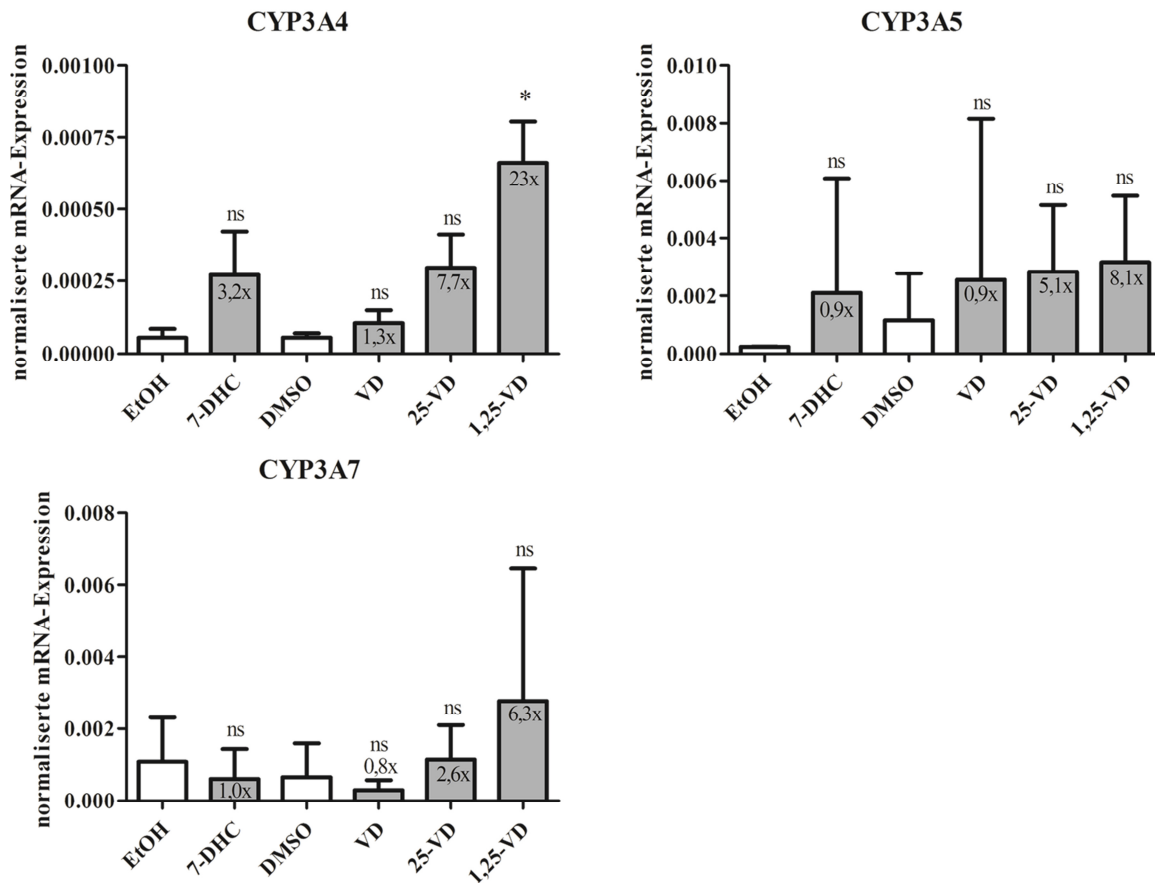


Abb. 27: Induktion der mRNA-Expression endogener CYP3A in HaCaT-Zellen durch Vitamin D-Metaboliten. Die Inkubationen wurden an acht verschiedenen Zellpassagen und Tagen durchgeführt (n = 8). Die mRNA-Expression wurde mit qRT-PCR als Dreifach-Werte bestimmt. Die 18S rRNA-Expression diente als interner Standard zur Normalisierung nach der  $\Delta\text{CT}$ -Methode. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler der mRNA-Menge gemäß  $\Delta\text{CT}$  als  $2^{-\Delta\text{CT}}$ -Werte. Die mittleren Expressionsänderungen gegenüber Lösungsmittel-behandelten Zellen sind den entsprechenden Balken zugeordnet. Der Vergleich der Versuchs- mit der Kontrollgruppe erfolgte mit one-way ANOVA nach Kruskal-Wallis und Dunns post-hoc Korrektur für den Vergleich zwischen fünf Gruppen. Die Daten für Cholesterol sind hier aufgrund fehlender Effekte wie auch zur Einheitlichkeit der dargestellten Werte entfernt, wurden statistisch jedoch berücksichtigt. Für den P-Wert gilt \* für  $P < 0,05$ .

Für die Ermittlung der mittleren effektiven Konzentration der beobachteten Effekte wurden HaCaT-Zellen mit fünf unterschiedlichen Konzentrationen 25-VD (0,3 bis 100  $\mu\text{M}$ ) oder 1,25-VD (0,1 bis 500 nM) behandelt (Abb. 28). Zwar wurden mehrere Konzentrationen getestet, doch die eingesetzte höchste Konzentration wurde aufgrund von Vorversuchen als maximal induzierend angenommen und lag 10-fach über der üblicherweise in Zellkulturversuchen verwendeten Konzentration. Daher dienen die ermittelten  $\text{EC}_{50}$ -Werte eher der Orientierung als der genauen quantitativen Auswertung.

Mit einer  $\text{EC}_{50}$  von 8,96  $\mu\text{M}$  bei der Behandlung mit 25-VD zeigte sich CYP3A4 siebenfach responsiver als CYP3A5, was sich mit seiner zuvor beschriebenen höheren Induzierbarkeit deckt. Aufgrund der geringen Effekte auf die CYP3A7 RNA-Expression konnte hier keine  $\text{EC}_{50}$  bestimmt werden. Bei der Behandlung mit 1,25-VD zeigte sich die allgemein stärkere Potenz der Substanz, da die  $\text{EC}_{50}$  von CYP3A4, CYP3A5 und CYP3A7 jeweils im nanomolaren Bereich lagen. Hier zeigte sich folgende Abfolge der  $\text{EC}_{50}$ : CYP3A4 < CYP3A5 < CYP3A7. Für die halbmaximale Induktion der CYP3A5-

Expression wurden 141 % der bei CYP3A4 nötigen 25-VD-Konzentration eingesetzt. Die  $EC_{50}$  bei CYP3A7 lag 296 % über derjenigen von CYP3A4.

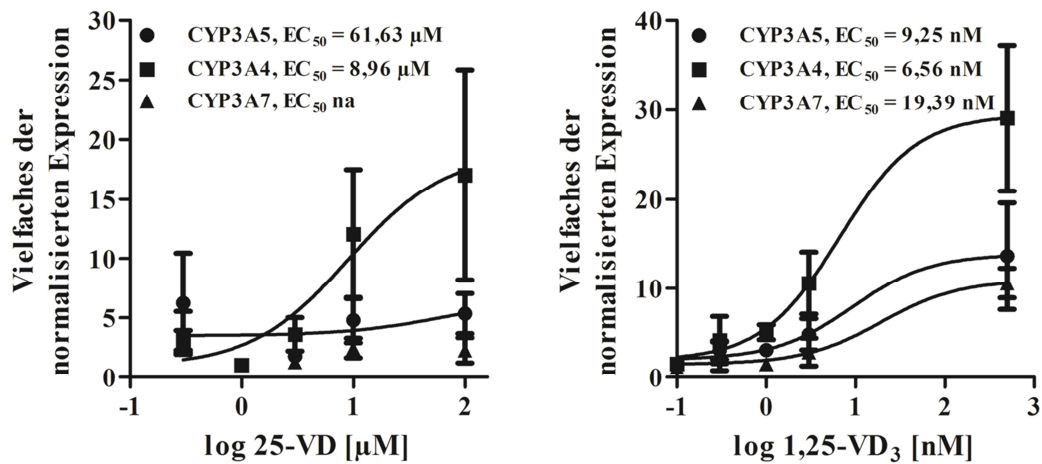


Abb. 28: Konzentrationsabhängige Regulation der endogenen CYP3A-Expression durch 25-VD und 1,25-VD in HaCaT. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der vielfachen Expressionsänderung in Anwesenheit von 25-VD (links) und 1,25-VD (rechts). HaCaT-Zellen wurden für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von 25-VD oder 1,25-VD behandelt. Der Versuch wurde an drei unterschiedlichen Tagen und Zellpassagen durchgeführt (n = 3). Die eingesetzten Konzentrationen wurden log-transformiert und die mittlere effektive Konzentration ( $EC_{50}$ ) mit nicht-linearer Regression gemäß der Methode der kleinsten Quadrate berechnet.

Auch die Regulation der Expression der NR1I wurde untersucht. Hier zeigten sich vernachlässigbare Effekte der Behandlung mit VD-Metaboliten, zum einen aufgrund der kaum/nicht detektierbaren Basalexpression von PXR, zum zweiten aufgrund rein zufälliger Effekte der Behandlung auf die CAR-Expression und zum dritten aufgrund der geringen Effektstärke von Faktor 1,3 bei der überzufälligen Expressionsveränderung des VDR durch 7-DHC.

Für die mRNA-Spezies primärer Keratinozyten ergaben sich abhängig von v. a. Spender und Zellportion deutliche Unterschiede im Ausmaß der relativen Expressionsänderung bei der Behandlung mit verschiedenen VD-Metaboliten (Abb. 29 und Tab. 15). Die Ergebnisse über mehrere Zellpassagen des gleichen Spenders und der gleichen Zellportion zeigten geringere Varianz. Ähnlich zu HaCaT-Zellen zeigten sich auch hier stärkste Effekte bei der Behandlung mit Calcitriol und Calcidiol und kein Einfluss von 7-DHC. Abb. 29 zeigt die mittleren Induktionswerte. Bei CYP3A4 lagen diese wie bei HaCaT-Zellen für Calcidiol und Calcitriol oberhalb derer von CYP3A5 und CYP3A7 mit einer Expressionssteigerung um Faktor 1374 (Median: 32x) und 780 (Median: 8,6x) durch Calcidiol respektive Calcitriol. CYP3A7 zeigte vergleichbare Effekte. Die Expression stieg um das 4930-Fache (Median: 2,1x) in Anwesenheit von Calcidiol und um das 54-Fache (Median: 2,5x) durch Calcitriol-Behandlung. Die CYP3A5-mRNA-Expression wurde überzufällig durch Calcidiol (516-fach, Median: 3,7x) und stark variabel durch Calcitriol (181-fach, Median: 3,7x) induziert. Die Behandlung mit VD beeinflusste die Anzahl der mRNA-Moleküle sowohl von CYP3A4 als auch CYP3A5 und CYP3A7, mit einer 22767-, 31- respektive 22-fachen Induktion der mRNA-Spezies (Median: 6,6x, 2,5x, 1,1x).

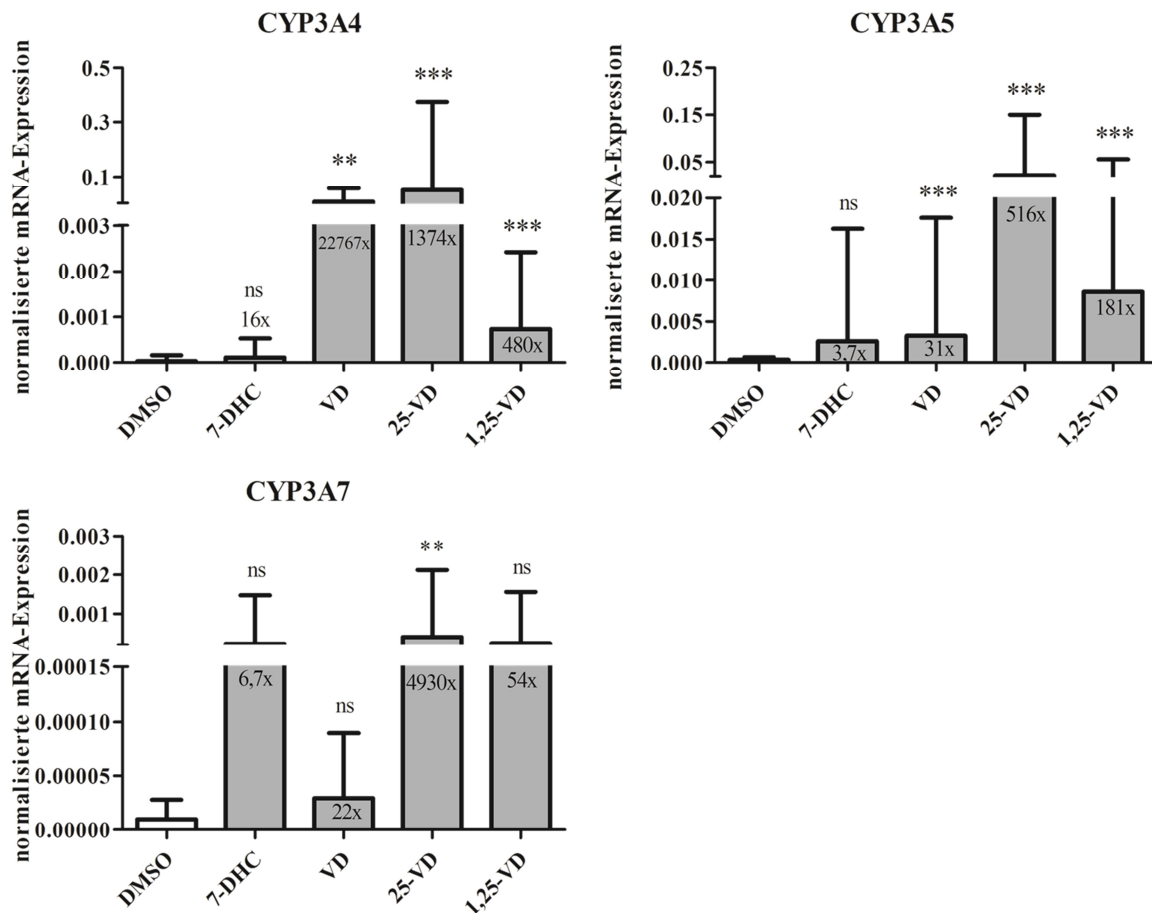


Abb. 29: Induktion der CYP3A-Expression durch Vitamin D-Metaboliten in primären Keratinozyten  
 Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte aller Versuche mit Standardfehler der relativ quantifizierten CYP3A-Expression, normalisiert auf die Expression der 18S rRNA nach der  $\Delta\text{CT}$ -Methode ( $2^{-\Delta\text{CT}}$ -Werte). Die Werte der einzelnen Balken geben die mittlere Expressionsänderung als Vielfaches der Lösungsmittelkontrolle an. Der Vergleich der behandelten Zellen mit der Lösungsmittel-behandelten Kontrolle erfolgte mit one-way ANOVA nach Kruskal-Wallis und Dunns post-hoc Korrektur für vier Intergruppenvergleiche. Dabei gilt für \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  und \*\*\*  $P < 0,001$ . ns steht für nicht signifikant ( $P > 0,05$ ).

Die CYP3A-Expression wurde parallel in primären Fibroblasten (2 Passagen, 1 Spender) untersucht. Dabei war CYP3A5 nicht, CYP3A4 nur sporadisch in einer Passage und CYP3A7 im Mittel 2- bis 20-fach stärker als in Keratinozyten exprimiert, jedoch nicht durch VD-Metaboliten induziert (Daten nicht dargestellt).

Zur Untersuchung der promotorabhängigen Regulation der CYP3A-Expression durch VD-Metaboliten wurden humane Darmkrebszellen und immortalisierte Keratinozyten mit Luziferasekonstrukten transient transfiziert. Die Behandlung erfolgte mit VD-Metaboliten für 40 h. Bei der Promotoranalyse mit Reportergen-Assay (Abb. 30) war keiner der untersuchten Promotoren weder in Dünndarm- noch in Hautzellen durch 7-DHC reguliert. In Dünndarmzellen wurden der CYP3A5- und der CYP3A4-Promotor v. a. durch 1,25-VD, aber auch in geringerem Maße durch VD und 25-VD aktiviert. Dabei zeigte sich CYP3A4 am responsivsten mit einer 3-, 6- und 17-fachen mittleren Induktion durch VD, 25-VD bzw. 1,25-VD. Bei CYP3A5 betrug die VD-, 25-VD- und 1,25-VD-vermittelte Induktion das 2-, 4- und 8-Fache.

Tab. 15: Individuelle Daten der Induktion der CYP3A durch Vitamin D-Metaboliten in primären Keratinozyten  
 Das Vielfache der mRNA-Expression ist tabellarisch erfasst und gemäß der Farbskala rechts entsprechend der Effektstärke farblich hinterlegt. Die Inkubation der Zellen erfolgte in Anwesenheit von je 10 µM der Substanz. Aufgrund der bis hierhin beobachteten starken Effekte durch 1,25-VD wurden hier stets 500 nM eingesetzt. Pro Spender wurden eine bis zwei Zellportionen und bis zu vier Zellpassagen untersucht. In der qRT-PCR wurden Dreifach-Werte bestimmt und gegen die 18S rRNA-Expression als internen Standard nach der ΔCT-Methode normalisiert. Nicht für jede Passage eines jeden Spenders wurden alle Behandlungen gemessen, zum einen aufgrund mangelnden Probenmaterials (Zellzahl oder RNA-Ausbeute), zum anderen aufgrund stark abweichender CT-Werte der 18S rRNA-Expression und damit letztlich mangelnder RNA-Integrität (Fleige & Pfaffl 2007). Fehlende Messwerte sind durch na gekennzeichnet.

Vielfaches der mRNA		CYP3A4				CYP3A5				CYP3A7				Skala		
rs776746	Spender	7-DHC	VD	25-VD	1,25-VD	7-DHC	VD	25-VD	1,25-VD	7-DHC	VD	25-VD	1,25-VD			
GG	K217	p1	0,6	2,0	4,1	6,3	0,8	3,0	4,5	3,8	0,8	1,2	2,1	2,5	< 0,8	
		p2	3,6	7,9	27,2	12,0	2,5	31,5	39,0	32,2	1,7	0,9	2,7	2,7		
		p3	na	1,0	61,2	na	na	1,8	3,5	na	na	0,0	1,6	na		0,8 bis 2,0
		p4	0,1	na	41,5	46,2	1,4	na	8,2	7,9	0,0	na	3,1	6,0		2,1 bis 5,0
GG	K236	p6	2,3	3,1	6,8	4,9	0,8	1,2	2,5	1,5	1,1	0,5	1,2	0,7	5,1 bis 10,0	
AG	K239	p1	1,4	7,0	21,2	11,0	0,3	7,4	12,4	7,0	na	na	na	na	10,1 bis 50,0	
		p2	1,1	na	36,9	176,4	1,1	na	7,3	22,1	na	na	> 200453,4	> 81,1	> 50,1	
GG	K245	p3	na	0,7	na	4869,4	na	0,5	na	2,7	na	0,2	na	1,7		
GG	K323	p6	na	na	na	130,7	na	na	na	23,1	na	na	na	2,4		
		p7	1,3	na	77,8	130,5	1,3	na	19,4	38,5	1,4	na	3,0	5,2		
GG	K403.1	p2	0,6	2,6	7,1	3,8	0,8	1,3	2,8	2,5	0,9	1,4	16,9	5,3		
		p3	1,4	2,8	2,2	1,6	1,7	3,3	2,4	1,8	1,9	3,1	3,2	2,5		
	K403.2	p2	0,5	17,6	17,7	5,4	1,3	3,3	3,0	0,9	1,4	0,8	1,7	0,5		
		p3	8,6	595,0	446,3	91,0	8,7	33,4	26,8	4,0	9,2	16,8	11,1	2,5		
	K403.3	p4	0,2	29,2	990,9	276,1	0,3	10,5	87,8	17,4	0,2	4,8	24,6	3,8		
		p2	8,2	10,0	0,0	0,0	11,4	12,0	0,4	2,6	16,7	13,4	1,0	7,6		
		p3	na	> 49,5	> 176,8	> 76,6	0,1	0,7	1,4	0,8	0,3	26,9	33,7	25,7		
		p4	0,3	0,1	3,4	4,9	0,3	0,1	3,4	4,9	0,1	0,0	0,7	0,7		
GG	K1404	p2	11,9	39,6	3,7	3,8	1,5	17,6	26,6	6,5	3,8	12,2	30,4	10,4		
		p3	na	> 0,9	> 747,7	na	0,6	2,5	1,7	1,0	0,6	2,8	2,5	2,6		
GG	K1801	p1	11,5	16,6	0,0	35,9	9,2	72,2	2,9	7309,2	5,2	55,9	0,9	1786,4		
		p2	26,7	0,7	1141,8	450,0	2,6	3,6	10,4	6,5	1,0	12,0	22,3	39,5		
GG	K1802.1	p2	29,3	2,4	2,9	1,9	0,6	0,4	7,1	0,2	na	na	> 152,3	> 61,4		
		p3	1,2	8,5	17,6	6,3	0,3	1,4	1,3	1,2	> 95,5	> 295,8	> 24,4	> 62,6		
		p4	0,4	2,6	3,3	3,3	0,3	1,8	1,7	1,1	0,5	0,1	0,0	na		
		p5	na	212,1	na	27979,4	na	1,2	na	21,7	na	1,3	na	5,6		
	K1802.2	p2	438,6	58259,9	2410,9	na	64,9	1,0	1,5	na	70,9	0,1	0,4	na		
		p3	0,3	1932,0	644,1	1039,2	0,8	6,6	2,2	3,3	1,0	2,6	1,1	1,1		
		p4	1,5	11,9	274,3	441,6	0,7	0,8	3,6	3,6	1,2	0,4	2,6	2,9		
		p5	9,5	3,9	1186,6	323,1	8,0	13,0	181,8	24,7	5,8	0,9	37,6	4,8		
GG	K1803.1	p2	0,9	5,3	4,1	2,3	1,1	1,4	1,2	0,9	0,2	0,3	0,2	0,0		
	K1803.2	p2	na	> 110,1	> 12319,7	na	0,8	1,0	10,9	1,8	1,0	0,2	3,4	1,1		
		p3	5,4	0,5	61,8	26,6	1,1	2,5	3,8	4,1	0,8	0,9	1,4	0,7		
		p4	0,9	na	na	0,2	1,5	0,2	0,4	0,9	1,6	0,5	0,5	0,4		
		p5	0,3	12,0	55,8	97,3	0,3	9,2	11,6	10,4	0,4	3,9	1,8	2,1		
GG	K2804	p2	42,6	4,9	76,3	48,2	8,1	7,0	27,3	11,0	9,5	1,1	7,7	7,7		
		p3	na	> 29,6	> 115,3	> 2,5	na	2,2	6,3	0,6	na	0,8	1,7	0,4		
AG	K3003	p2	2,0	6,6	19,4	5,6	2,2	6,5	7,7	3,2	2,6	5,0	2,2	1,5		
		p3	0,9	5,2	50,4	16,2	1,5	2,3	8,1	3,7	0,9	1,9	1,7	1,4		
GG	K3009	p2	1,1	3,4	3,5	1,8	1,4	1,9	2,4	2,3	1,2	0,9	1,1	1,3		
		p3	0,7	3,3	7,0	0,8	0,8	2,4	3,4	3,7	1,1	1,4	1,7	3,0		
		p4	13,2	7,1	0,0	0,1	0,7	0,3	3,5	4,6	2,2	0,3	0,9	0,7		

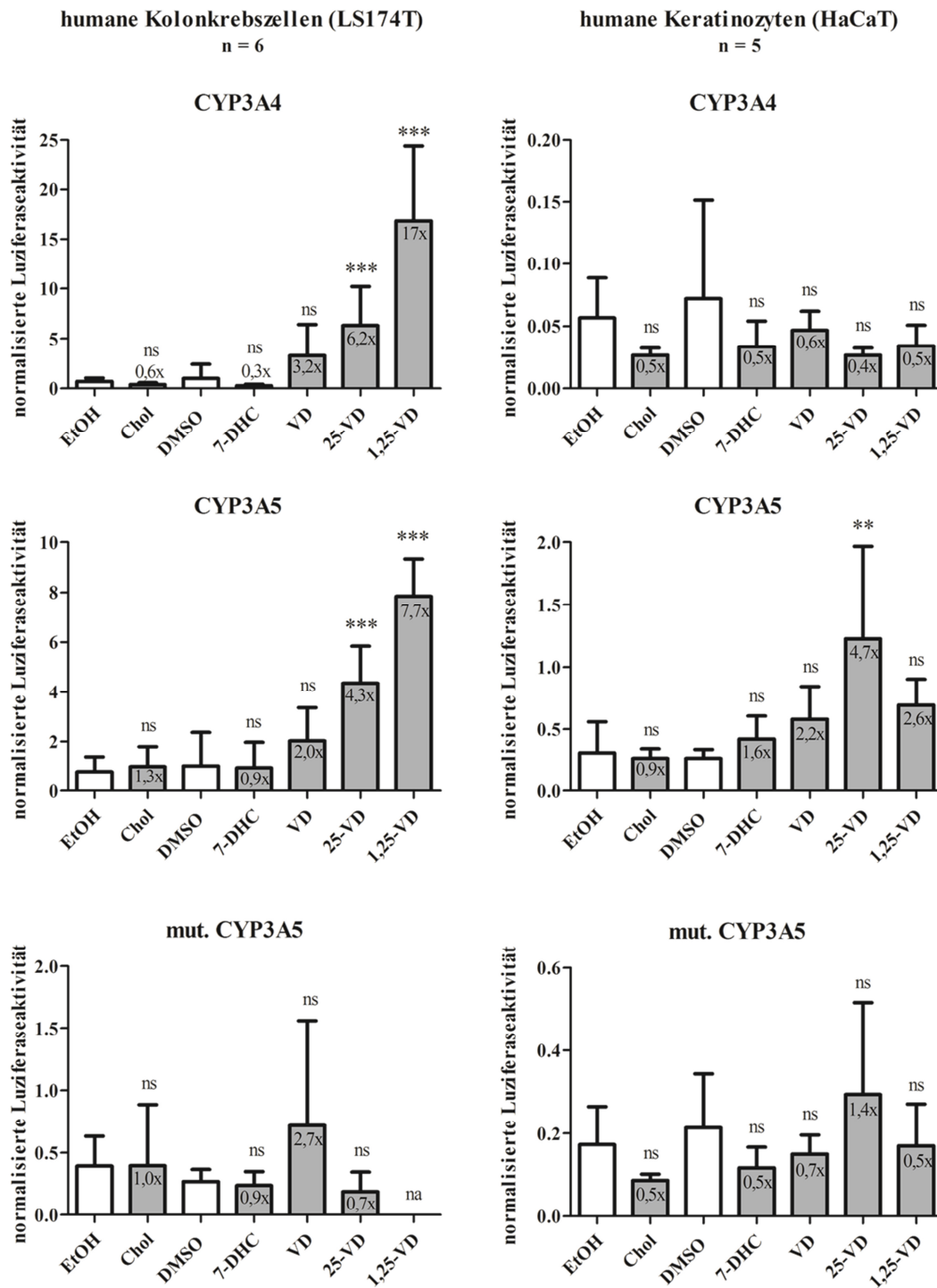


Abb. 30: Vitamin D-abhängige Aktivität der proximalen *CYP3A*-Promotoren im Reportergen-Assay. Transfiziert wurden die unterschiedlichen Reportergen-Konstrukte zum einen in menschliche Kolonkrebszellen (LS174T, links) sowie in menschliche Keratinozyten (HaCaT, rechts). Die transfizierten Konstrukte enthalten eine Firefly-Luziferase unter der Kontrolle von ca. 350 bp der proximalen Promotoren von *CYP3A4* und *CYP3A5*. Für *CYP3A5* wurde zudem ein Konstrukt untersucht, in dem das proximale ER6-Motiv, welches u. A. die Bindung des VDR ermöglicht, mutiert wurde (mut. *CYP3A5*). Dieses Konstrukt wurde freundlicherweise von Dr. Oliver Burk (IKP Stuttgart) zur Verfügung gestellt. 6 h nach der Transfektion wurden die Zellen weitere 40 h mit Cholesterin (10  $\mu$ M), 7-DHC (10  $\mu$ M), VD (10  $\mu$ M), 25-VD (1  $\mu$ M), 1,25-VD (500 nM) oder der entsprechenden Konzentration des Lösungsmittels behandelt. Jede Versuchsbedingung wurde in Triplikaten durchgeführt und an fünf (HaCaT) bzw. sechs (LS174T) unterschiedlichen Zellpassagen und Tagen wiederholt. Dargestellt ist die mittlere normalisierte Luziferaseaktivität der Behandlungsgruppen gemessen in RLU mit Standardabweichung. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mit parametrischer one-way ANOVA gegen die mit dem entsprechenden Lösungsmittel-behandelte Zellen (weiße Balken) und Bonferroni-Korrektur für multiples Testen. Für die Effektstärke ist die unterschiedliche Skalierung der Y-Achsen zu beachten. Es gilt \*\* für  $P < 0,01$ , \*\*\* für  $P < 0,001$  und ns für  $P > 0,05$ . Nicht-gemessene Bedingungen sind mit na gekennzeichnet.

Im Vergleich zu Dünndarmzellen zeichnete sich in Hautzellen ein deutlich anderes Bild sowohl bezüglich der Induktionspotenz der einzelnen Substanzen, als auch der Responsivität der beiden *CYP3A*-Promotoren. So war die Promotoraktivität von *CYP3A4* durch keinen der VD-Metaboliten beeinflusst. Daneben veränderte Rifampicin als Standard-Induktor von *CYP3A4* die Promotoraktivität unabhängig von der Überexpression von VDR oder PXR nicht (Abb. S 1 im Anhang). *CYP3A5* auf der anderen Seite wurde reguliert - 2-, 5- und 3-fach durch VD, 25-VD bzw. 1,25-VD – und damit für Calcitriol weniger stark als in Darmzellen. Diese Effekte ließen sich zumindest in Keratinozyten durch die Überexpression von VDR noch steigern (Daten nicht dargestellt). Dies legte neben Daten anderer Arbeitsgruppen nahe, dass es sich um VDR-vermittelte Effekte handelt. In beiden Zelllinien waren die Substanz-vermittelten Effekte abhängig von der Funktionalität des ER6-Bindemotivs im proximalen Promotor von *CYP3A5*. Der vermittelnde Rezeptor wurde im Weiteren mittels 2-Hybrid-Assay untersucht. Die Ergebnisse hierzu werden im Folgenden beschrieben.

### VDR-vermittelte Induktion durch Vitamin D-Metaboliten

Untersucht wurden die ligandenabhängige Interaktion zwischen den jeweiligen Rezeptoren mit deren Heterodimerisierungspartner RXR $\alpha$  und die Substanz-vermittelte Aktivierung unabhängig von der Promotorsequenz möglicher Zielgene. Allgemein zeigten weder Cholesterol noch 7-DHC Auswirkungen auf die Heterodimerisierung der untersuchten nukleären Rezeptoren. Auch die anderen VD-Metaboliten beeinflussten die Interaktion des RXR $\alpha$  mit PXR, CAR-SV1 (Wildtyp) und CAR-SV2 nicht (Abb. S 2 im Anhang). VDR hingegen zeigte eine 14-, 54- bzw. 45-fach gesteigerte Interaktion mit RXR $\alpha$  durch VD, 25-VD respektive 1,25-VD (Abb. 31).

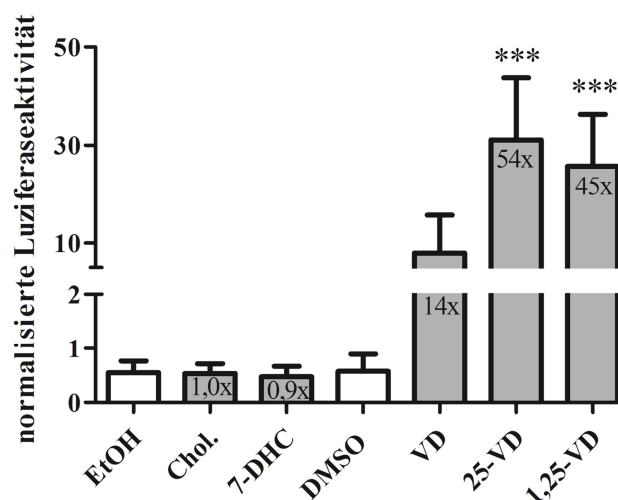


Abb. 31: Vitamin D-abhängige Interaktion des VDR mit RXR $\alpha$  im 2-Hybrid-System. Dargestellt ist die Substanz-vermittelte Aktivierung der Interaktion von VDR mit RXR $\alpha$  durch die Lösungsmittel Ethanol und DMSO, bzw. Cholesterol (Chol.), 7-Dehydrocholesterol (7-DHC), Vitamin D (VD), 25-Hydroxyvitamin D (25-VD) und 1,25-Dihydroxyvitamin D (1,25-VD). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung der normalisierten Luziferaseaktivität gemessen in relativen Lichteinheiten (RLU). Der Einfluss der Behandlung wurde parametrisch mit one-way ANOVA und Bonferroni post-hoc test gegen Lösungsmittel-behandelte Zellen (weiße Balken) verglichen. Nicht-überzufällige Ergebnisse sind als ns für nicht signifikant gekennzeichnet. Gemäß der Definitionen des verwendeten Programms GraphPad Prism v5.01 gilt für \*\*\*  $P < 0,001$ .

Die halbmaximale Aktivierung des VDR (Abb. 32) durch 1,25-VD erfolgte im nanomolaren Bereich mit einer  $EC_{50}$  von etwa 2 nM. Für VD und 25-VD lag diese im mikromolaren Bereich bei 5,99 respektive 2,42  $\mu\text{M}$  und damit um Faktor 1300 bzw. 3100 höher als für 1,25-VD.

Die Regulation der CYP3A-Expression erfolgte somit durch VDR. Wie Versuche an primären Keratinozyten zeigten, hatte dabei weder die Basalexpression des VDR noch der CYP3A5\*3-Genotyp einen Einfluss auf die Induzierbarkeit der CYP3A-mRNA. Da nur zwei der 13 Zellspender Träger des \*1-Allels waren, zeigten diese zwar eine 1,3-fach höhere CYP3A5-mRNA-Expression, jedoch war diese statistisch zufällig (Abb. S 3 im Anhang).

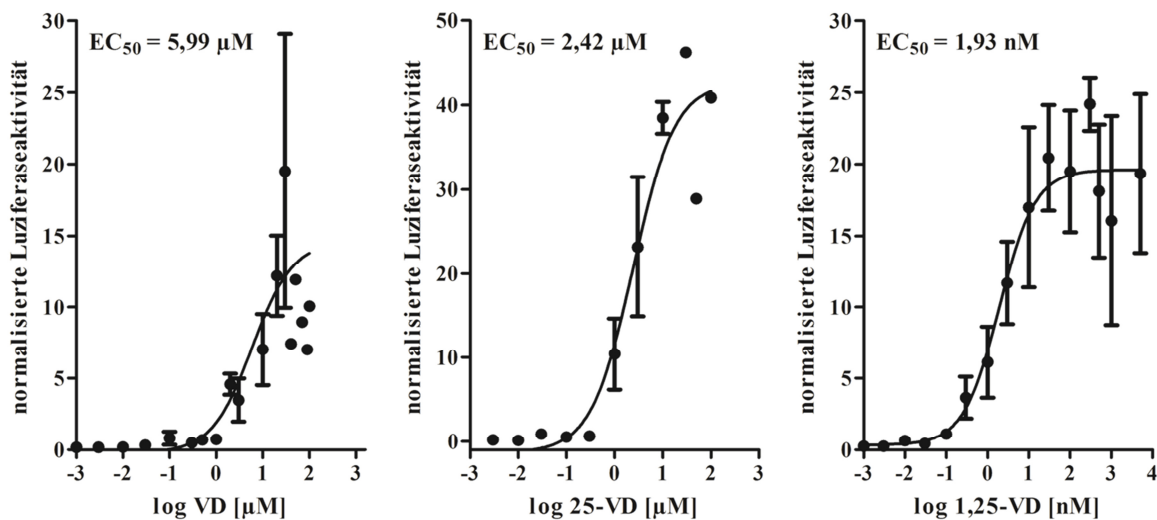


Abb. 32: Dosisabhängigkeit der VDR-vermittelten Induktion durch ausgewählte Vitamin D-Metaboliten  
Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardfehler der normalisierten Luziferaseaktivität in Abhängigkeit der log-transformierten Konzentration von VD (links, in  $\mu\text{M}$ ), 25-VD (Mitte, in  $\mu\text{M}$ ) und 1,25-VD (rechts, in nM). Die Berechnung der mittleren effektiven Konzentration ( $EC_{50}$ ) wurde mit nichtlinearer Regression gemäß der Methode der kleinsten Quadrate berechnet. Hierfür wurden COS-7 Zellen mit 2-Hybrid-Konstrukten zur Untersuchung der Interaktion des VDR mit RXR $\alpha$  transfiziert und für 40 h induziert. Die Versuche wurden in Triplikaten an 3-4 unterschiedlichen Tagen und Zellpassagen durchgeführt ( $n = 3-4$ ). Solvens-behandelte Zellen dienten als Kontrolle und zeigten keine überzufälligen Veränderungen der Aktivierung (Daten nicht gezeigt).

### Effekt von UVB-Bestrahlung auf die Zellviabilität und CYP3A-Expression

Für die Untersuchung der Substanz- und bestrahlungsabhängigen Expressionsänderung der CYP3A in Keratinozyten wurden vorab HaCaT-Zellen mit unterschiedlichen Dosen UVB bestrahlt und hinsichtlich der Zellviabilität begutachtet. Die durchschnittliche Viabilität bei konstanter Strahlungsintensität von  $0,105 \text{ mW/cm}^2$  zeigte einen stark negativen Zusammenhang mit der applizierten Strahlungsdosis ( $R^2 = -1$ ,  $P < 0,0001$ , Abb. 33). Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit VD-Metaboliten oder entsprechendem Lösungsmittel zeigte, dass v. a. die Behandlung mit Cholesterol zu einer Abnahme der Zellviabilität führt. Alle anderen Substanzen zeigten in den verwendeten Konzentrationen keine Effekte auf die Viabilität der Zellen. Allgemein bestätigte sich hier die zytotoxische Wirkung von UVB-Bestrahlung, da die bestrahlten Zellen durchweg weniger vital waren

als die unbestrahlten mit etwa gleichem Verhältnis der Viabilitäten innerhalb der Substanz-behandelten Gruppen.

Doch in Anbetracht der für die VD-Synthese notwendige Strahlung von etwa 20 mJ/cm<sup>2</sup> und einer trotz vergleichbarer Strahlungsintensität mit nur 50 % deutlich geringeren Viabilität der Zellen im Vergleich zu anderen Studien (Lehmann et al. 2000b, Lehmann et al. 2001, Lehmann et al. 2004) wurde auf die genauere Untersuchung der Expressionsregulation der CYP3A durch UVB-Behandlung verzichtet.

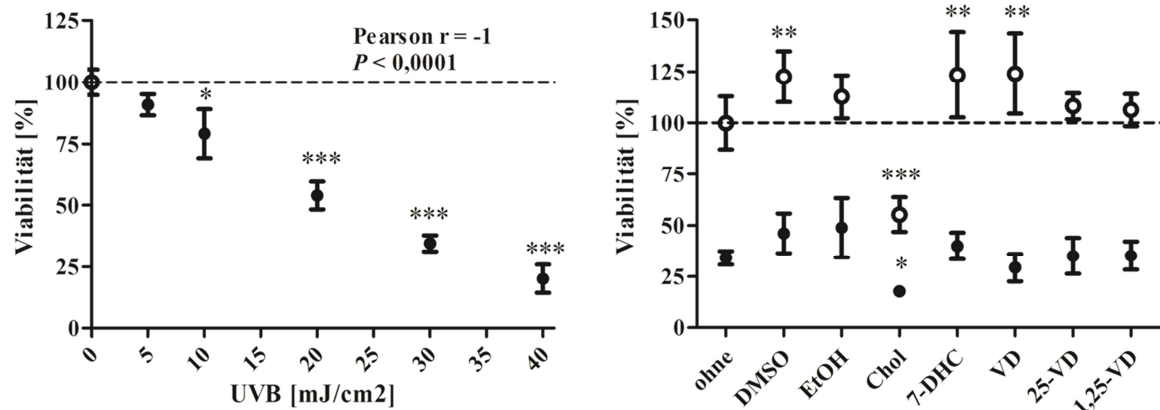


Abb. 33: Viabilität der HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung und Behandlung mit Vitamin D-Metaboliten  
Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler der einzelnen Behandlungsgruppen. HaCaT-Zellen wurden im 96 well-Format à 8.000 Zellen/well ausgesät. Nach 24 h wurde ein Teil der Zellen mit einer UVB-Dosis von 30 mJ/cm<sup>2</sup> (gefüllte Kreise) bei einer Intensität von 0,11 mW/cm<sup>2</sup> bestrahlt, der andere Teil blieb unbestrahlt (offene Kreise). Für Versuche der rechten Abbildung wurden die Zellen danach weitere 24 h in Anwesenheit der unterschiedlichen Substanzen inkubiert. Für die Messung der Viabilität wurden die Zellen nach Behandlungsende 4 h mit MTT-Reagenz inkubiert und mit Isopropanol (100 %) extrahiert. Die Absorption des entstandenen Formazans wurde bei 570 nm bestimmt. Dargestellt ist die prozentuale Viabilität der Zellen relativ zum Mittelwert der unbehandelten und unbestrahlter Zellen, markiert durch die unterbrochene Linie bei 100 %. Die Viabilität und UVB-Dosis zeigten einen stark negativen Zusammenhang berechnet als Korrelation nach Pearson. Der Einfluss der Substanzen auf die Viabilität wurde mit one-way ANOVA relativ zu unbehandelten, jedoch analog bestrahlten Zellen getestet. Korrigiert wurden für multiples Testen post-hoc nach Dunn. Für die P-Werte gilt \* für  $P < 0,05$ , \*\* für  $P < 0,01$  und \*\*\* für  $P < 0,001$ .

Die CYP3A-Expression zeigte sich durch die UV-Bestrahlung wenig beeinflusst und gegenüber unbestrahlten Kontrollen als weniger oder nicht durch die einzelnen VD-Metaboliten induziert. Aufgrund der geringeren Viabilität der Zellen müssen diese Erkenntnisse jedoch als vorläufig eingeschätzt werden.

## Expression von CYP3A und NR1I in psoriatischer Haut

Bereits 2003 zeigten Smith und Kollegen eine um 50 % reduzierte CYP3A5-Expression in psoriatischer Haut in Vergleich zur Haut gesunder Freiwilliger (Smith et al. 2003). Auch die Arbeiten von Lam Tsoi von der University of Michigan untersuchen die veränderte Transkriptomik in läsionaler und nicht-läsionaler Haut psoriatischer Patienten und vergleichen diese mit gesunder Haut (Tsoi et al. 2011, Li et al. 2014). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Expressionsdaten der CYP3A zwischen gesunder und psoriatischer Haut anhand von RNA-seq-Daten verglichen. Dabei zeigte sich nicht nur die CYP3A5-mRNA, sondern die CYP3A-mRNA insgesamt vermindert, nämlich um 80 %, 50 % bzw. 40 % für

CYP3A4, CYP3A5 respektive CYP3A7 (Abb. 34). Für CYP3A43 ist aufgrund der sehr geringen Expression in psoriatischer Haut keine quantitative Aussage möglich.

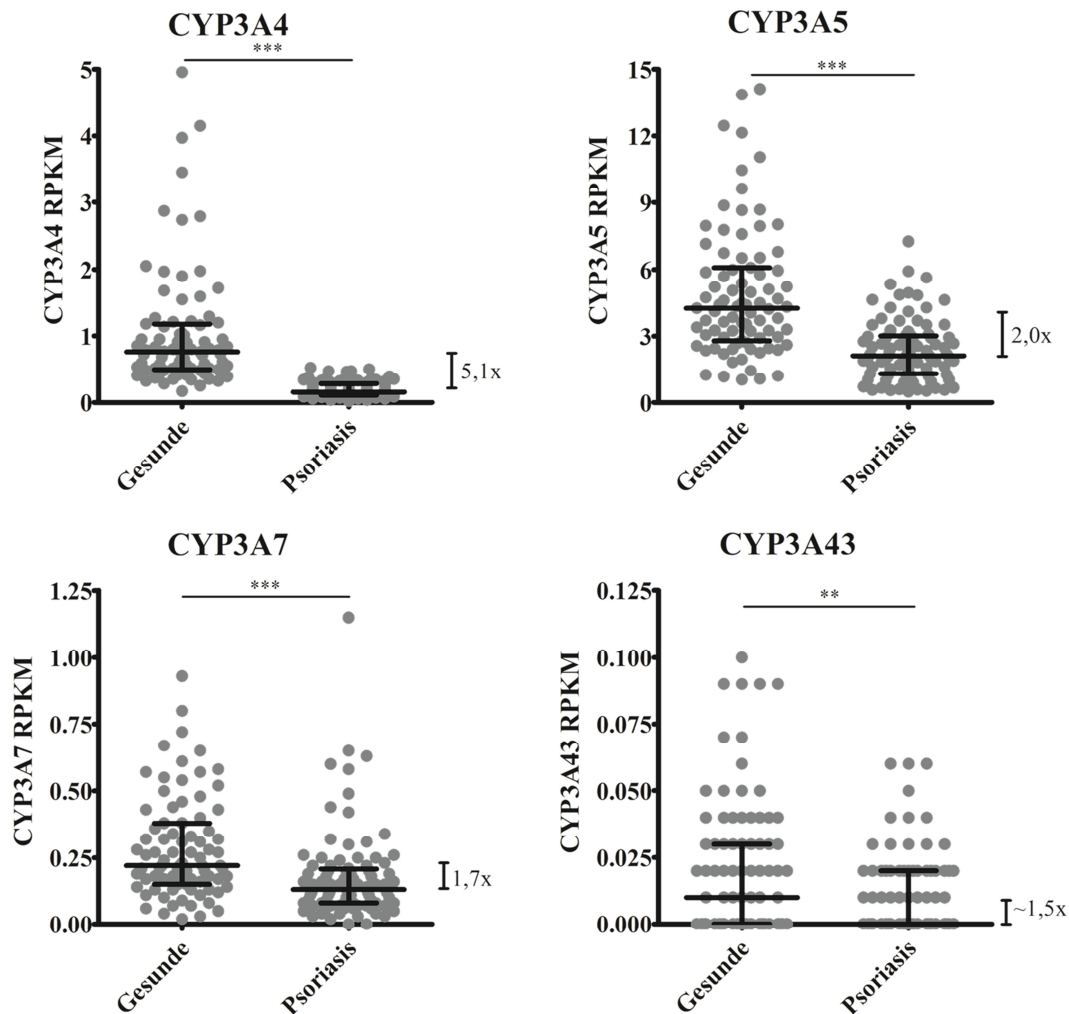


Abb. 34: CYP3A-Expression in psoriatischer und gesunder Haut

Daten von 83 Hautproben gesunder Probanden und 92 läsionale Hautproben psoriatischer Patienten wurden freundlicherweise von Dr. Lam Tsoi zur Verfügung gestellt (Tsoi et al. 2011, Li et al. 2014). Dargestellt sind Expressionsdaten in RPKM (*reads per kilobase per million mapped reads*) von CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 und CYP3A43 als Individualdaten (graue Punkte) sowie als Medianwerte und Interquartilsrange der Gruppen. Der Vergleich der Expression gesunder und psoriatischer Häute erfolgte mit zweiseitigem, nicht-parametrischem t-Test nach Mann-Whitney. Dabei gilt für \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  und \*\*\*  $P < 0,001$ .

Bei der Betrachtung der Expression in erkrankter und gesunder Haut von drei psoriatischen Patienten zeigte sich nur für CYP3A5 eine überzufällig reduzierte Expression um 40 % (Abb. S 4, rechts) und für CYP3A4 eine trendweise Reduktion um 60 % in psoriatischen Läsionen (Abb. S 4, links). Größere Datensätze zum Vergleich erkrankter und gesunder Haut psoriatischer Patienten sind hier für eine größere Trennschärfe und Aussagekraft nötig und werden zur Zeit durch Tsoi und Kollegen generiert (persönliche Aussage Dr. Lam Tsoi).

Für die Expression von VDR und PXR zeigte sich keine Veränderung in psoriatischer gegenüber gesunder Haut. Die mRNA-Expression des CAR hingegen war um das 1,3-fache in erkrankter Haut erhöht (Abb. 35).

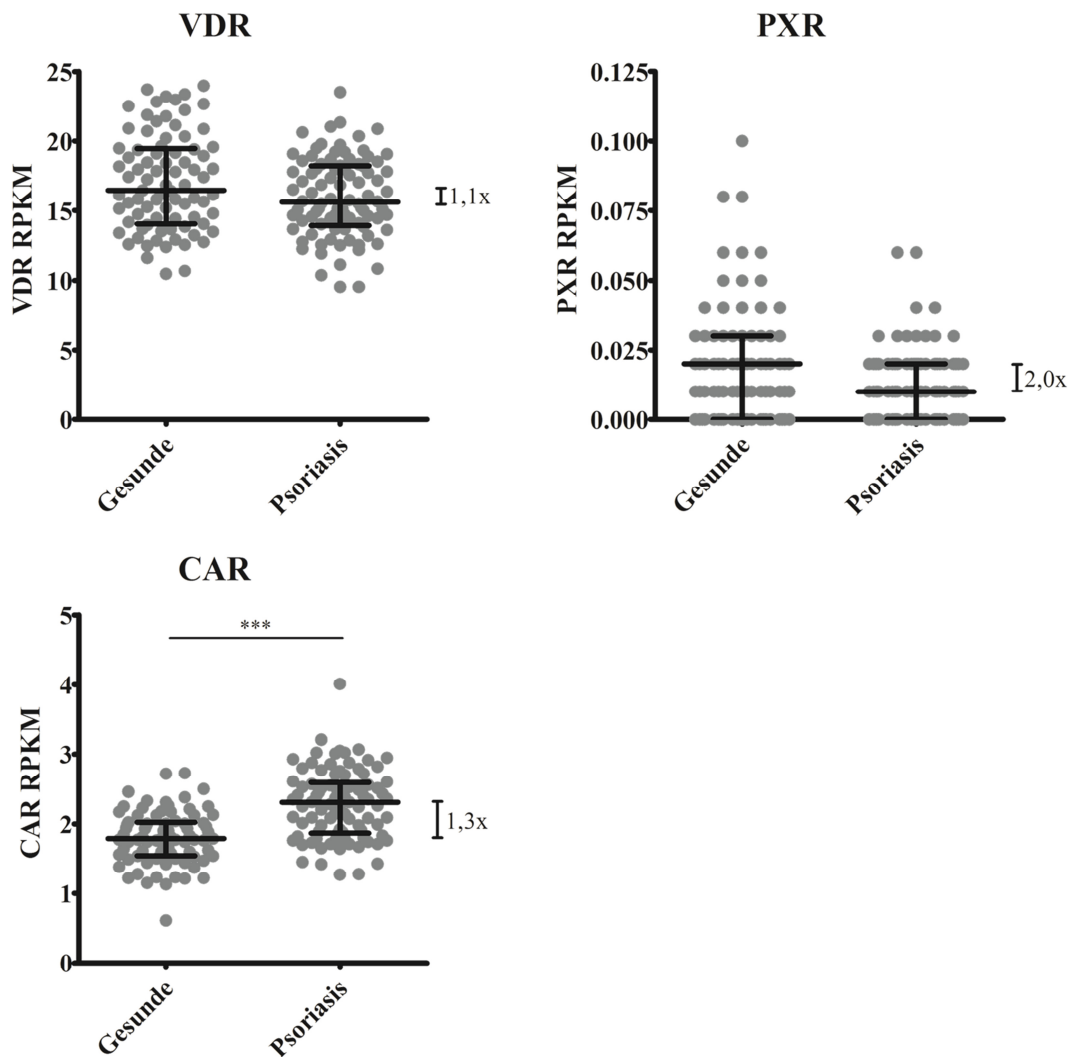


Abb. 35: Expression der NR11 mRNA in psoriatischer und gesunder Haut

Die Daten wurden freundlicherweise von Dr. Lam Tsoi zur Verfügung gestellt (Tsoi et al. 2011, Li et al. 2014). Dargestellt sind Expressionsdaten in RPKM (*reads per kilobase per million mapped reads*) von VDR, PXR, CAR in 83 Hautproben gesunder Probanden und in 92 läsionalen Hautproben psoriatischer Patienten als Individualdaten (graue Punkte) sowie als Medianwerte und Interquartilsrange der Gruppen. Die Expression gesunder und psoriatischer Häute erfolgte mit zweiseitigem, nicht-parametrischem t-Test nach Mann-Whitney. Dabei gilt für \*\*\*  $P < 0,001$ .

## Vitamin D-Metabolismus durch CYP3A-Enzyme

Die katabole Kapazität der CYP3A-Enzyme wurde mit rekombinant exprimierten Proteinen untersucht. Zum einen ging es dabei um den Einfluss der VD-Metaboliten auf die CYP3A-Enzymaktivität auf der einen und die katabole Aktivität der CYP3A gegenüber VD-Metaboliten auf der anderen Seite. Zum Einsatz dabei kam ein Biolumineszenz-basierter Assays zur Messung der Aktivität und deren Inhibition durch VD-Metaboliten sowie die HPLC zur Auftrennung der VD-Metaboliten. Die anschließende Detektion erfolgte mit UV und Massenspektrometrie.

## Änderung der CYP3A-Aktivität durch Vitamin D-Metaboliten

Die Aktivität rekombinant exprimierter CYP3A-Enzyme wurde als Luziferaseaktivität gemessen. rCYP3A bauen dabei ein Proluziferin zu Luziferin ab, das durch Luziferase u.

A. in messbare Biolumineszenz umgewandelt wird und gemessen werden kann. Dabei wurde das Enzym mit 7-DHC, VD, 25-VD, 1,25-VD oder der gleichen Konzentration des Lösungsmittels inkubiert. Dabei zeigten sich bei CYP3A4, wie auch bei CYP3A5 und CYP3A7 reproduzierbare Effekte bekannter Aktivatoren und Inhibitoren der CYP3A-Aktivität (Abb. 36, obere Reihe). So hemmte das Lösungsmittel DMSO trotz einer von Herstellerseite empfohlenen Höchstkonzentration von 0,1 % bereits ab einer Konzentration von 0,05 % sowohl die CYP3A4- als auch CYP3A7-Aktivität um 45 respektive 40 % (Abb. 36, DMSO 0,05 %), die CYP3A5-Aktivität jedoch kaum. Der Standard-Inhibitor der CYP3A, Ketokonazol, verminderte die Aktivität aller drei getesteten CYP3A-Isozyme um > 90 %, ebenso Clotrimazol mit einer Hemmung von > 98 % (Abb. 36, KET bzw. CLO). Nefidepin wurde als Induktor der CYP3A4-Aktivität, Testosteron als Aktivator von CYP3A4 und CYP3A5 beschrieben (Sobol et al. 2006). Nefidepin steigerte die CYP3A4-Aktivität auf das 1,24-fache und hemmte die CYP3A5-Aktivität um 53 % (Abb. 36, NEF). Testosteron zeigte stärkere Effekte und aktivierte CYP3A4 und CYP3A5 um Faktor 2,6 respektive 2,0 (Abb. 36, TES).

Für die VD-Metaboliten konnten keine starken Veränderungen der gemessenen relativen Lichteinheiten beobachtet werden. Lediglich 1,25-VD verdoppelte die CYP3A4-Aktivität (Abb. 36). Darüber hinaus ergaben sich letztlich keine eindeutigen Effekte obwohl der Versuchsaufbau mit allen Kontrollsubstraten erwartete Ergebnisse lieferte.

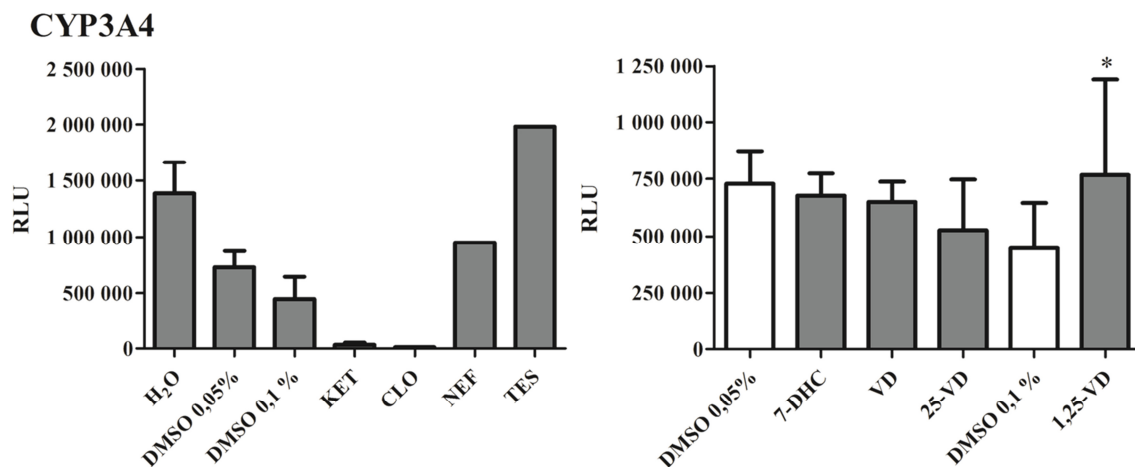


Abb. 36: Regulation der CYP3A4-Aktivität

Gemessen wurde die Luziferaseaktivität durch die Umsetzung von Proluziferin (Luziferin-PFBE) zu Luziferin durch CYP3A-Isozyme in Anwesenheit bekannter Aktivatoren und Inhibitoren der CYP3A-Enzyme (links) sowie der VD-Metaboliten (rechts). Die getesteten Substanzen (Endkonzentration 5µM) waren zum einen Ketokonazol (KET), Clotrimazol (CLO), Nefidepin (NEF) sowie Testosteron (TES), und zum anderen 7-Dehydrocholesterol (7-DHC), Vitamin D<sub>3</sub> (VD), 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (25-VD) und 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25-VD). Da die Kontrollsubstanzen lediglich zur Kontrolle der Versuchsbedingungen dienten, wurden sie zwecks Ressourcenschonung z. T. nur einmalig angewendet. Daher entfiel hier allgemein die statistische Auswertung. Dargestellt sind die in 3-4 verschiedenen Experimenten nach einer Integrationszeit von 10 sec gemessenen relativen Lichteinheiten (RLU, für n = 3-4). Dargestellt sind Mittelwerte der Behandlungsgruppen und Standardfehler. Der Vergleich der mittleren Aktivitäten der einzelnen Behandlungen erfolgte gegen Lösungsmittel-behandeltes Enzym (weiße Balken) mit one-way ANOVA. Aufgrund von Schwankungen der absoluten RLU-Werte zwischen einzelnen Experimenten wurden die Messwerte eines Versuchs zusammengelassen nach Friedman getestet und nach Dunn post-hoc gegen multiples Testen korrigiert. Für den P-Wert gilt \* P < 0,05.

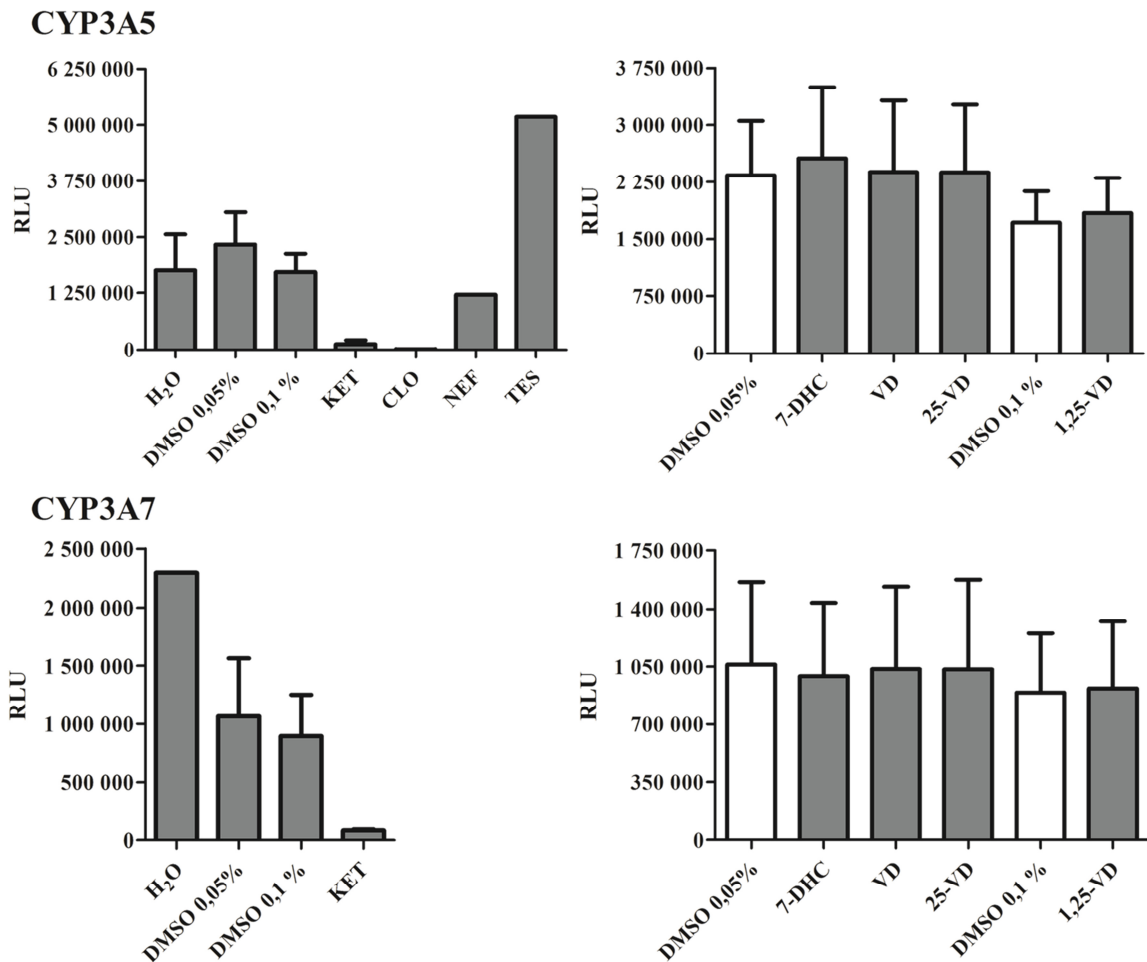


Abb. 37: Regulation der Aktivität von CYP3A5 und CYP3A7

Gemessen wurde die Luziferaseaktivität durch die Umsetzung von Proluziferin (Luziferin-PFBE) zu Luziferin durch CYP3A-Isozyme in Anwesenheit bekannter Aktivatoren und Inhibitoren der CYP3A-Enzyme (links) sowie der VD-Metaboliten (rechts). Die getesteten Substanzen (Endkonzentration 5µM) waren zum einen Ketokonazol (KET), Clotrimazol (CLO), Nefidipin (NEF) sowie Testosteron (TES), und zum anderen 7-Dehydrocholesterol (7-DHC), Vitamin D<sub>3</sub> (VD), 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (25-VD) und 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25-VD). Da die Kontrollsubstanzen lediglich zur Kontrolle der Versuchsbedingungen dienten, wurden sie zwecks Ressourcenschonung z. T. nur einmalig angewendet. Daher entfiel hier allgemein die statistische Auswertung. Dargestellt sind die in 3-4 verschiedenen Experimenten nach einer Integrationszeit von 10 sec gemessenen relativen Lichteinheiten (RLU, für n = 3-4). Dargestellt sind Mittelwerte der Behandlungsgruppen und Standardfehler. Der Vergleich der mittleren Aktivitäten der einzelnen Behandlungen erfolgte gegen Lösungsmittel-behandeltes Enzym (weiße Balken) mit one-way ANOVA. Aufgrund von Schwankungen der absoluten RLU-Werte zwischen einzelnen Experimenten wurden die Messwerte eines Versuchs zusammengehörig nach Friedman getestet und nach Dunn post-hoc gegen multiples Testen korrigiert. Für den P-Wert gilt \* P < 0,05.

### Metabolisierung von Vitamin D-Metaboliten durch rCYP3A

Zum direkten Nachweis der Metabolisierung einzelner VD-Metaboliten durch CYP3A wurden sie mit rekombinant exprimierten CYP3A-Isozymen inkubiert. Anschließend wurde das Metabolitenspektrum durch HPLC aufgetrennt und mittels UV-Licht bei 265 nm detektiert. Die Wiederfindungsrate des vor der Extraktion zugebenen VD<sub>2</sub> lag zwischen 34,5 und 88,6 %. Diese war unabhängig von der Verwendung von DPBS oder komplettiertem DMEM zum Aufnehmen der Zellen zur Extraktion. Die Sensitivität der Detektionsmethode variierte zwischen den einzelnen VD-Metaboliten von 7-DHC < 25-VD < 1,25-VD ≤ VD (Abb. 38).

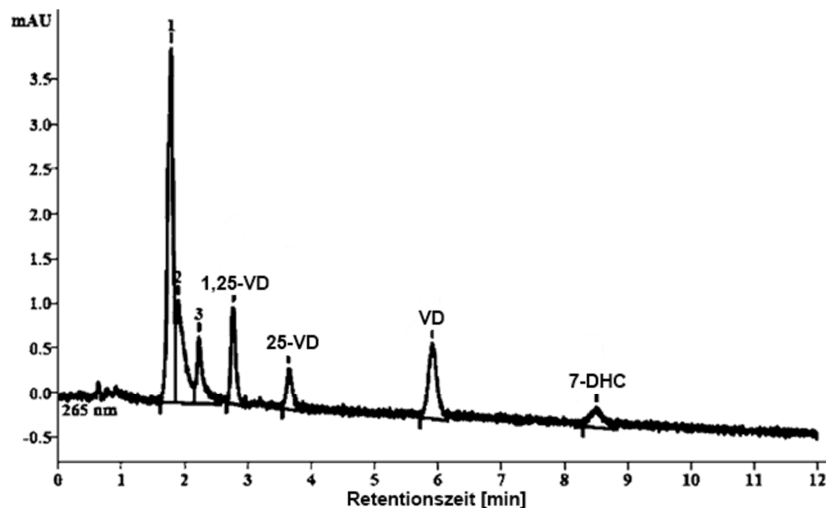


Abb. 38: Detektion der Vitamin D-Metaboliten mit UV-HPLC

Gemessen wurde ein Standard mit  $5 \mu\text{M}$  7-DHC,  $1,25 \mu\text{M}$   $\text{VD}_3$ ,  $2,5 \mu\text{M}$   $25\text{-VD}_3$  und  $1,25 \mu\text{M}$   $1,25\text{-VD}_3$ . Dabei erwies die Methode höchste Sensitivität gegenüber  $1,25\text{-VD}$  und niedrigste gegenüber 7-DHC.

Wie erwartet, zeigte sich bei der Inkubation mit  $25\text{-VD}$  eine Abnahme der  $25\text{-VD}$ -Menge in Anwesenheit von rCYP3A4 und rCYP3A5 (Abb. S 5 im Anhang und (Wang et al. 2012)). Dabei wurden zwei neu entstandene Peaks detektiert, von denen derjenige mit einer Retentionszeit von 2,88 min anhand der Standardreihe dem aktiven  $1,25\text{-VD}_3$  zugeordnet werden konnte. Auffällig war ein weiter Bereich absorbierender Substanz(en) bei einer Retentionszeit zwischen 3-3,5 min. Bei rCYP3A7 zeigten sich diese Veränderungen nicht. Aufgrund der geringen Sensitivität der Detektion mit UV wurde auf weitere Screening-Versuche verzichtet und der Abbau von 7-DHC und  $\text{VD}_3$  durch die einzelnen CYP3A-Enzyme mit LC-MS untersucht. Als positive Kontrolle diente hier der Abbau von  $25\text{-VD}$  durch CYP3A5 vornehmlich zu  $4\beta,25\text{-VD}$ , nicht aber zu  $24,25\text{-VD}$  (Wang et al. 2012). Erwartungsgemäß zeigte sich eine Abnahme des  $25\text{-VD}$  um 61 % von 221 ng/ml in der Kontrolle ohne aktives Enzym auf 86 ng/ml in Anwesenheit von CYP3A5 (Tab. 16).  $24,25\text{-VD}$  konnte als Metabolit von stets  $> 1$  ng/ml vernachlässigt werden. Sowohl bei CYP3A5 als auch bei CYP3A7 entstand wie zuvor beschrieben Calcitriol: 424 respektive 8,6 ng/ml, bei CYP3A7 ohne Änderung der  $25\text{-VD}$ -Konzentration.

Bei der Inkubation von 7-DHC (Abb. S 5 im Anhang) ergaben sich keine Veränderungen der mit UV detektierten Spektren in Anwesenheit von rCYP3A4 und rCYP3A5. Die Inkubation mit rCYP3A7 jedoch zeigte keinen Peak bei einer Retentionszeit um 3 min. Massenspektrometrisch zeigte sich in der Kontrollinkubation ohne aktives Enzym ein von den anderen Proben abweichend hoher Gehalt an  $\text{VD}_2$  von 16,17 ng/ml. In Anwesenheit von CYP3A4, CYP3A5 und CYP3A7 verringerte sich diese Konzentration auf verbleibende 26 %, 13 % respektive 0 %. Eine ähnliche Abnahme zeigte sich hier bei  $\text{VD}_3$ : von 0,67 ng/ml auf verbleibende 25 %, 30 % und 0 % bei CYP3A4, CYP3A5 bzw. CYP3A7.

Für  $\text{VD}$  (Abb. S 6 im Anhang) zeigte sich durch alle rCYP3A ein abweichendes Chromatogramm im Vergleich zum Ansatz ohne Enzym, da sich bei einer Retentionszeit

zwischen 3-3,7 min ein Anstieg des Höchstwertes zeigte. Dies bestätigte sich in einer Abnahme des eingesetzten VD<sub>3</sub> von 1293 ng/ml auf verbleibende 63 %, 72 % bzw. 75 % in Anwesenheit von CYP3A4, CYP3A5 oder CYP3A7. Dabei war keine Zunahme der anderen gemessenen Parameter, wie 25-VD<sub>3</sub> oder 1,25-VD<sub>3</sub> sichtbar. Dies bestätigt eine frühere Studie, die zeigte, dass CYP3A-Enzyme VD<sub>2</sub>, nicht aber VD<sub>3</sub> an der C25-Position hydroxylieren können (Gupta et al. 2004).

Tab. 16: Profil verschiedener Vitamin D-Vorstufen und -Metaboliten in Anwesenheit verschiedener rCYP3A-Enzyme  
Rekombinant exprimierte CYP3A-Enzyme wurden 90 min bei 37 °C mit 7-DHC, VD<sub>3</sub> oder 25-VD<sub>3</sub> inkubiert. Die lipophilen VD-Metaboliten wurden mit Methanol-Chloroform (1:1) extrahiert und eingedampft. Die LC-MS erfolgte in den Laboren von Prof. Burkhard Kleuser (Institut für Ernährungswissenschaft, Nuthetal bei Potsdam) mittels LC-MS. Angegeben sind die gemessenen Konzentrationen in ng/ml bei einer Bestimmungsgrenze von 0,02 ng/ml. Zur besseren Übersichtlichkeit sind die Messwerte der als Substrat eingesetzten VD-Metaboliten grau hinterlegt.

Substrat	Enzym	7-DHC	VD <sub>2</sub>	VD <sub>3</sub>	25-VD <sub>3</sub>	24,25 VD <sub>3</sub>	1,25-VD <sub>3</sub>
7-DHC	-	?	16,17	0,67	0	0	0
	rCYP3A4	?	4,25	0,17	0	0	0
	rCYP3A5	?	2,16	0,20	0	0	0
	rCYP3A7	?	0,0	0,0	0	0	0
VD <sub>3</sub>	-	?	2,40	<b>1293</b>	1,59	0	0
	rCYP3A4	?	3,28	<b>813</b>	1,01	0	0
	rCYP3A5	?	4,92	<b>931</b>	1,24	0	0
	rCYP3A7	?	3,81	<b>965</b>	1,42	0,19	0
25-VD <sub>3</sub>	-	?	3,46	0,38	<b>221</b>	0,29	0
	rCYP3A5	?	3,69	0,21	<b>85,5</b>	0,97	424
	rCYP3A7	?	2,44	0,67	<b>245</b>	0,35	8,56

### Einfluss des *CYP3A5*\*3-Allels auf Vitamin D-Status und Knochendichte

An zwei europäischen Studienkollektiven wurde der Einfluss der CYP3A5-Expression auf den VD-Status und die Knochengesundheit untersucht. Neben bereits erhobenen Patientenparametern (Tab. S 1 im Anhang), wurde der *CYP3A5*\*3-Genotyp als Marker des CYP3A5-Expressionsniveaus bestimmt. Insgesamt standen Daten von 250 und 438 Studienteilnehmern zur Verfügung. Von diesen konnten 201 bzw. 437 einem *CYP3A5*\*3-Genotyp und damit der Kategorie *low* oder *medium/high expresser* von CYP3A5 zugeordnet werden. Die genauen Genotypdaten der Studienpopulationen sind in Tab. 17 zusammengefasst. Beide Studienpopulation befanden sich am untersuchten Locus im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht und lagen mit einer Frequenz des \*3-Allels von 6 % bzw. 8 % im für europäische Populationen üblichen Bereich.

Der sehr hohe Anteil nicht-bestimmter Genotypen von 20 % im Falle der ungarischen Proben scheint in der langen Lagerzeit von über zehn Jahren und damit einhergehender DNA-Degradierung begründet. Auch die laut Aussage von Prof. Lakatos möglichen Schwankungen der DNA-Konzentration könnten zur schlechten Clusterbildung bei der Genotypisierung der Proben geführt haben (Applied Biosystems 2010).

Tab. 17: Genotypdaten zweier europäischer Studienpopulation am SNP rs776746

Die Proben wurden freundlicherweise von Profes. Petér Lakatos (Bacsi et al. 2007) und Heide Siggelkow zur Verfügung gestellt. Die Rekrutierung der Studienteilnehmer und Bestimmung von VD-Status wie auch Knochendichte erfolgte an der Osteoporose-Klinik Budapest bzw. Göttingen. Angegeben sind die Anzahl der Individuen nach Genotyp und die daraus abgeleitete Genotyp- sowie Allelfrequenz. Die Bezeichnung des \*1-Allel als Minor-Allel richtet sich dabei nach dem menschlichen Referenzgenom hg19 (*minor allele frequency*, MAF). Als Referenzwert (<sup>1</sup>) wurden Daten veröffentlichter Studienpopulationen europäischer Herkunft (Zeitraum 2002-2011, Abb. 1) und der HapMap-Populationen (CEU und TSI, Frazer et al. 2007) herangezogen.

			Budapest		Göttingen
Genotyp (Allel)	Genotyp (Basen)	Anzahl der Individuen	Genotypfrequenz	Anzahl der Individuen	Genotypfrequenz
*1/*1	AA	1	0,005	2	0,005
*1/*3	AG	21	0,104	69	0,158
*3/*3	GG	179	0,891	366	0,838
<b>Gesamt</b>		<b>201 (250)</b>		<b>437 (438)</b>	
Allel	Base	MAF	Referenz-MAF <sup>1</sup>	MAF	Referenz-MAF <sup>1</sup>
*3	G	0,06	0,00-0,18	0,08	0,00-0,18

Der *CYP3A5*\*3-Genotyp zeigte dabei beim Gruppenvergleich keinen Einfluss auf VD-Status (Abb. 39) und Knochenmineraldichte (Abb. 40).

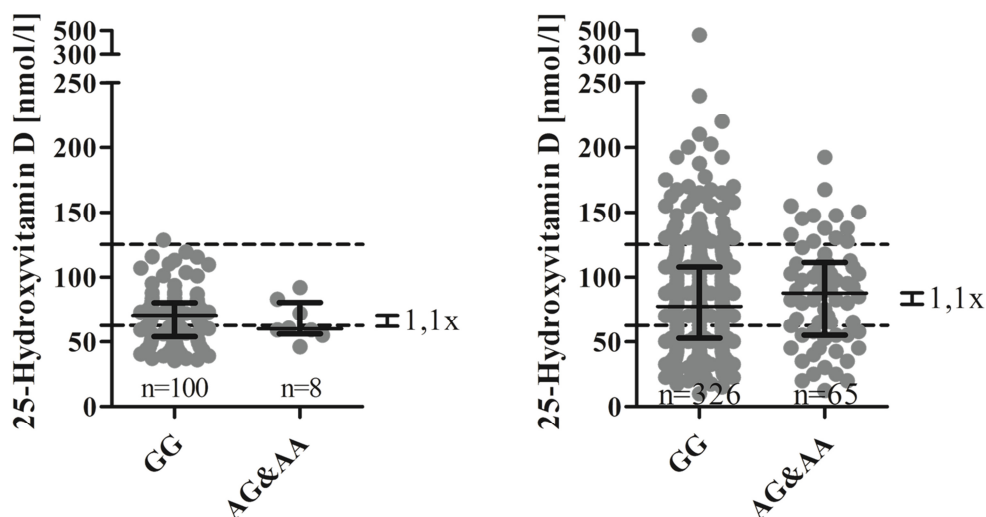
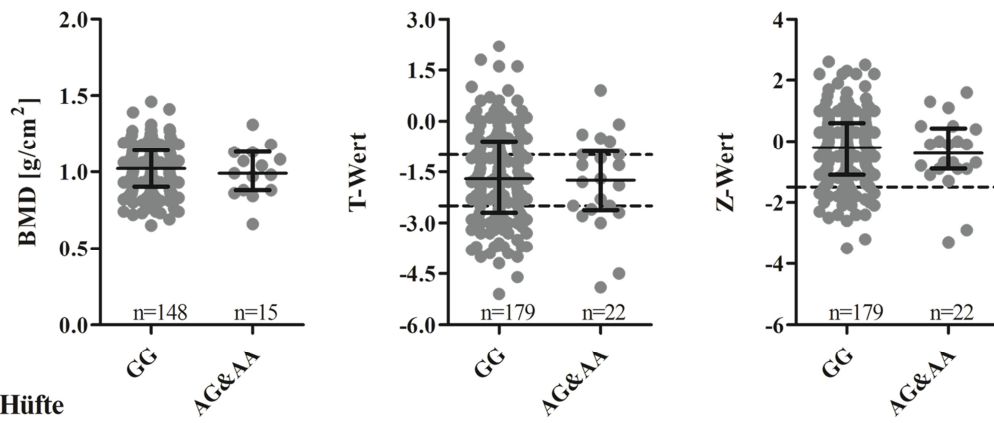


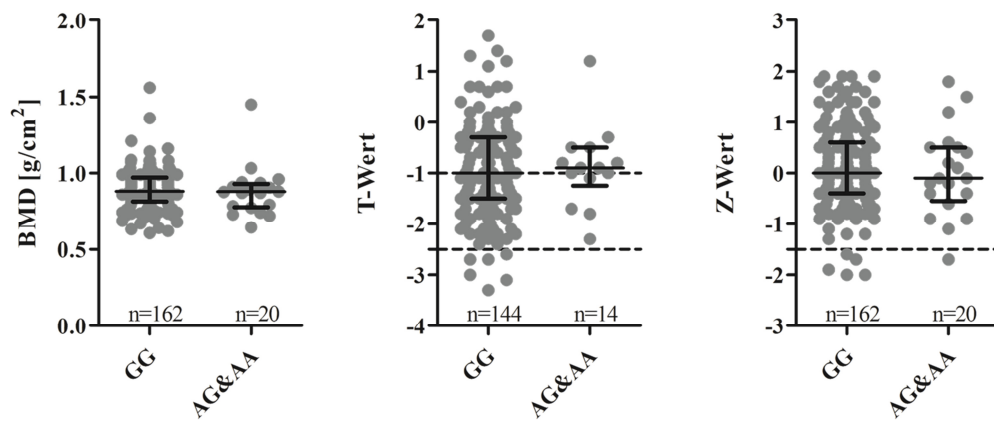
Abb. 39: Einfluss des *CYP3A5*\*3-Genotyps auf den Vitamin D-Status zweier europäischer Studienpopulationen  
DNA-Proben und Daten zum VD-Status wurden freundlicherweise von Profes. Petér Lakatos (links) und Heide Siggelkow (rechts) zur Verfügung gestellt. Dargestellt ist die Serumkonzentration von 25-VD [nmol/l]. Die unterbrochenen Linien markieren die Schwelle von VD-Mangel (25-VD < 62,5 nmol/l) und VD-Insuffizienz (25-VD < 125 nmol/l). Die Proben wurden im Rahmen dieser Arbeit genotypisiert. Der Gruppenvergleich des VD-Status zwischen \*1-Allel-Trägern (Genotyp AA&AG) und Trägern des \*3/\*3-Genotyps (GG) erfolgte mit einem parametrischen t-Test. Aufgrund der Untersuchung des Genotypeneffekts auf insgesamt sieben Variablen wurde nach Bonferroni manuell korrigiert.

Abb. 40: Einfluss des *CYP3A5*\*3-Genotyps auf die Knochendichte der Wirbelkörper und der Hüfte  
Die Abbildung befindet sich auf der Folgeseite. Probanden zweier europäischer Studienpopulationen aus Budapest (oben) und Göttingen (unten) wurden hinsichtlich der Knochendichte an Hüfte und Wiebel charakterisiert. Dargestellt sind die Messwerte der einzelnen Proben als Punkte sowie die Gruppenmittelwerte mit Standardabweichung getrennt nach Trägern des A-Allels am Locus *CYP3A5*\*3 und Trägern des GG-Genotypus. Die unterbrochenen Linien der T-Werte zeigen Schwellenwerte für normale Knochendichte ( $T \geq -1$ ), Osteopenie ( $-2,5 < T < -1$ ) und Osteoporose ( $T \leq -2,5$ ) an (Kanis 1994). Bei Z-Werten ist die Schwelle von  $< -1,5$  als Indiz einer sekundären Osteoporose markiert (Richmond 2003). Der Gruppenvergleich zwischen \*1-Allel-Trägern (Genotyp AA&AG) und Trägern des \*3/\*3-Genotyps erfolgte mit Ausnahme der Knochendichte der Hüfte zweiseitig parametrisch mittels t-Test. Aufgrund der Untersuchung des Genotypeneffekts auf insgesamt sieben Variablen wurde nach Bonferroni manuell korrigiert.

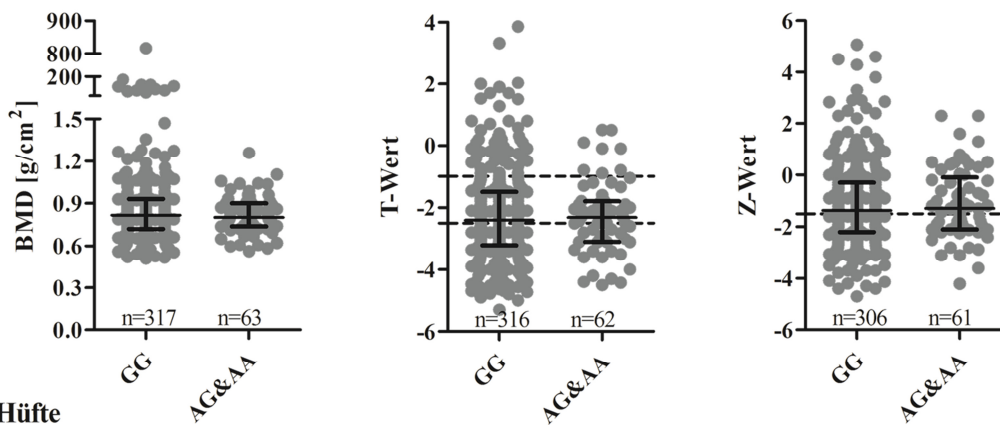
Wirbel



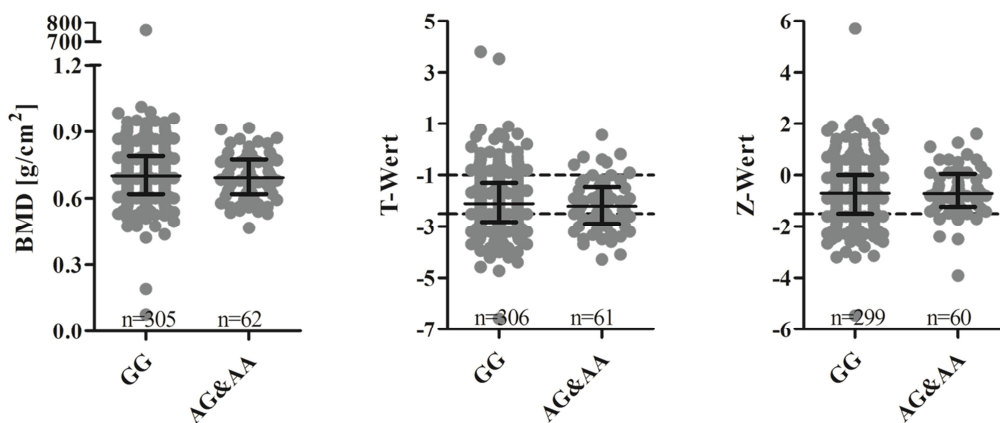
Hüfte



Wirbel



Hüfte



Die Proben der Göttinger Studienpopulation wurden kontinuierlich in einem Zeitraum von acht Jahren gesammelt und vermessen. Wie erwartet (Ross et al. 2011) zeigte der VD-Status eine saisonale Variabilität. So war der VD-Status der Patienten, deren Blutentnahme im Februar, März, April, November oder Dezember erfolgte im Mittel um 37, 26, 21, 20 respektive 34 % gegenüber den im Juni entnommenen Proben verschlechtert. Dabei wiesen 16 % der Patienten suffiziente, 49 % insuffiziente VD-Spiegel und 35 % einen VD-Mangel auf.

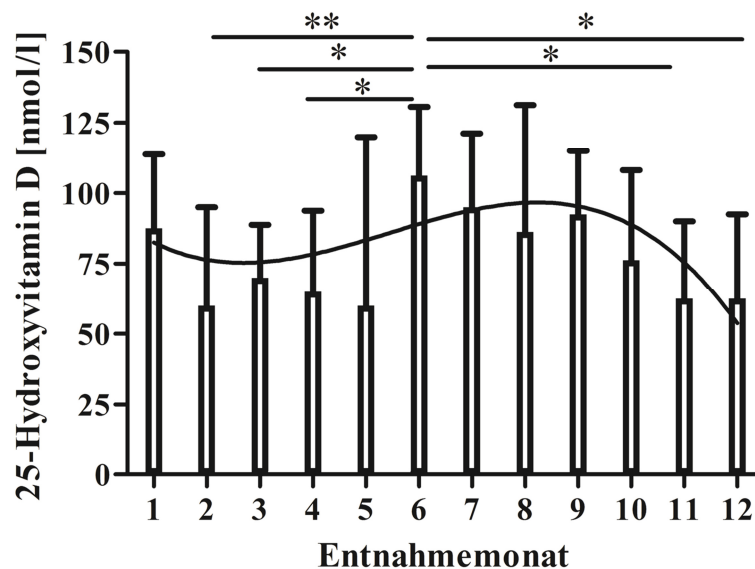


Abb. 41: Saisonale Variabilität des 25-Hydroxyvitamin D-Spiegels der Göttinger Studienpopulation  
Gezeigt ist die mittlere Serukonzentration und Interquartilsbreite gruppiert nach dem Entnahmemonat von Januar (1) bis Dezember (12) der Jahre 1998 bis 2005. Der Vergleich aller Gruppenmittelwerte erfolgte nach Kruskal-Wallis gefolgt von Dunns Korrektur bei multiplem Testen. Für *P*-Werte gilt \* bei  $P < 0,05$  und \*\* bei  $P < 0,01$ . Der saisonale Verlauf wurde mit polynomischer Regression dritter Ordnung nach der Methode der kleinsten Quadrate berechnet und als durchgängige S-Kurve dargestellt.

## Diskussion

Die Hypothese dieser Arbeit besagt, dass die positive Selektion im *CYP3A*-Lokus in Europa durch Rachitis, eine VD-Mangel bedingte Störung der Knochenbildung, verursacht wurde und die Expression der *CYP3A* als Anpassung an eine verminderte Sonneneinstrahlung in nördlichen Breitengraden vermindert ist.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es die *CYP3A* in humaner Haut als einer der VD-Syntheseorte genauer zu charakterisieren und deren Rolle im VD-Metabolismus zu untersuchen. Neben der Quantifizierung und Lokalisierung der *CYP3A* und deren interindividueller Variabilität in Humanhaut stand dabei sowohl die Regulation der *CYP3A*-Expression und -Aktivität durch VD-Metaboliten als auch der enzymatische Abbau der Vorstufen des physiologisch aktiven Hormons Calcitriol durch *CYP3A* im Vordergrund. Zuletzt sollte anhand klinischer Patientendaten untersucht werden, ob die Expression der *CYP3A* nachteilig für den VD-Status sowie für eine gesunde Knochendichte ist.

### ***CYP3A5* als dominantes *CYP3A*-Isozym in menschlicher Haut**

Aufgrund meist geringer Probenanzahl, der begrenzten Untersuchung oftmals nur einzelner *CYP3A*-Isozyme oder diskrepanter Ergebnisse bezüglich der relativen Expression der einzelnen *CYP3A*-Isozyme in menschlicher Haut, wurde deren kutane Expression im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal umfassend und isozymspezifisch charakterisiert. An zwei unabhängigen Datensätzen aus 96 und 83 Biopsien gesunder Humanhaut wurden die *CYP3A* isozymspezifisch auf mRNA- und ersterer darüber hinaus auf Proteinebene quantifiziert und histologisch lokalisiert.

Für die RNA-Isolation wurden zunächst zwei Protokolle der RNA-Aufreinigung getestet. Dabei zeigten die nur mit Ethanol gewaschenen, photometrisch reinen RNA-Proben eine deutlich schlechtere Amplifikation sowohl des internen Standards 18S rRNA als auch der einzelnen mRNAs. Als mögliche Ursache können die RNA-Integrität oder Rückstände von PCR-Inhibitoren nicht ausgeschlossen werden. Letzteres gilt v. a. für etwaige EDTA-Rückstände des DNase-Puffers oder des GITCs, die durch die Aufreinigung über eine Säule, alternativ zu den Waschschritten mit Ethanol, entfernt werden. EDTA cheliert Magnesiumionen, die so bei der PCR als Kofaktoren der Taq-Polymerase fehlen. Ein weiterer Unterschied der Extraktionsmethoden war die Verwendung von N-Laurylsarcosin und  $\beta$ -Mercaptoethanol bei der Homogenisierung vor der Aufreinigung über eine Säule. Ähnlich dem GITC des Homogenisierungspuffers bzw. von TriFast, hemmen N-Laurylsarcosin und  $\beta$ -Mercaptoethanol RNasen, doch anders als GITC irreversibel. Die gleich zweifache und zudem irreversible Hemmung der RNasen könnte zur Stabilisierung der RNA während und nach der Isolation beigetragen haben. Aufgrund dieser Resultate und der Beständigkeit der etablierten, Säulen-basierten RNA-Isolation (Berglund et al.

2007) wurde am im Kapitel Methodik beschriebenen Protokoll für die RNA-Präparation aus Hautgewebe festgehalten.

In den darauffolgenden Untersuchungen zeigte sich CYP3A5 als das dominante CYP3A-Isozym in humaner Haut, gefolgt von CYP3A4 und CYP3A7. Aufgrund der meist nicht-messbaren Expression in Haut ist anzunehmen, dass es sich bei CYP3A43 auch in der Haut um ein Pseudogen handelt. Dies zeigte sich in beiden untersuchten Datensätzen und unterstreicht die Unabhängigkeit dieser Ergebnisse von methodischen Faktoren sowie der biopsierten Körperregion. Auch in *CYP3A5*-Luc-Mäusen, die das Luziferasereporter gen unter Kontrolle des humanen *CYP3A5*-Promotors exprimieren, zeigte sich messbare Luziferaseaktivität in der Haut *in vivo* und in Gewebehomogenaten. Letztere überstieg sogar die normalisierten Aktivitäten der bis dato untersuchten Organe mit höchster Aktivität, wie Dünndarm und Vormagen, aber auch die anderer Organe wie Leber und Niere (Nem et al. 2012). Dies betont die Allgemeingültigkeit einer basalen CYP3A5-Expression in der Haut trotz möglicher und wenig bekannter Unterschiede in der Expression und Aktivität der murinen Orthologe der CYP3A-Regulatoren.

In Humanhaut lag die Expression der CYP3A-mRNA sowie -Proteine stets deutlich unterhalb der hepatischen und zeigt, dass sich die Expression der kutanen CYP3A-Isozyme sowohl relativ zueinander als auch absolut stark von der hepatischen unterscheidet. Zwar gelang eine Aktivitätsmessung der kutanen CYP3A-Enzyme im Rahmen dieser Arbeit nicht, doch konnte eine geringe, aber messbare enzymatische Basalaktivität der CYP3A in humaner Haut (Rolsted et al. 2008, Henkler et al. 2011, Götz et al. 2012a, Götz et al. 2012b) sowie in Hautmodellen (Götz et al. 2012a) gemessen werden.

Betrachtet man nicht nur die einzelnen Isozyme, sondern die Gesamtexpression der CYP3A der einzelnen untersuchten Hautproben, so zeigte sich ein bimodaler Trend zur allgemein hohen bzw. allgemein niedrigeren CYP3A-Expression. Dies wurde auch bereits für die Leber (Westlind-Johnsson et al. 2003, Burk et al. 2004) beschrieben. Begründet werden könnte dies durch die Kopplung des *CYP3A*-Lokus und damit den expressionssteigernden respektive -vermindernden Allelen, die letztlich in CYP3A-exprimierenden Zellen die phänotypische Ausprägung zurückliegender selektiver Prozesse des *CYP3A*-Lokus aufzeigen (Hustert et al. 2001a, Kuehl et al. 2001, Thompson et al. 2004, Semiz et al. 2011).

Hepatische CYP3A sind v. a. in den Hepatozyten exprimiert, die 60 % der Leberzellen bilden (Kmiec 2001). Die CYP3A-Expression der Haut ist v. a. in den Keratinozyten lokalisiert, die ca. 80 % der Epidermis ausmachen (Brohem et al. 2011). Betrachtet man beide Organe als Ganzes, mit der Leber von durchschnittlich 968-1860 g (Molina & DiMaio 2012) und der Haut als Organ von 2 m<sup>2</sup> Fläche und einem Gewicht der Epidermis von 3-4 kg (Doll et al. 2010). So entspricht die Gesamtmenge der CYP3A5-mRNA-Spezies der Haut etwa einem Drittel oder der Hälfte derer der Leber. Daher gilt es die enzymatische Gesamtkapazität der kutanen CYP3A als wichtige Einflussgröße zu

berücksichtigen. Nun könnte man vermuten, dass die Haut bezüglich der Fremdstoffexposition eine eher lokale und die Leber v. a. eine systemische Rolle spielt. Doch ist die Leber mit 30 ml/min pro 100 g im Ruhezustand gerade einmal dreifach stärker durchblutet als die Haut (Schaps 2005, S. 499). Betrachtet man jedoch die 15 meist verschriebenen Arzneimittelgruppen, enthält lediglich die Gruppe der Analgetika dermale Darreichungsformen, wohingegen die anderen v. a. oral verabreicht werden (Schwabe & Paffrath 2012, S. 4). Damit spielt beim Großteil der eingenommenen Medikamente der Metabolismus bei der ersten Darm- und Leberpassage eine weitaus bedeutendere Rolle als der der Haut. Bei dermalen Gabe von Arzneimitteln oder beim Folge-Stoffwechsel der in Dünndarm und Leber abgebauten Substanzen hingegen dürfte die Haut sehr wohl aufgrund von Organgröße, Durchblutung und der Expressionsstärke der CYP3A eine Rolle spielen.

Lokalisiert wurden die CYP3A-Proteine v. a. in den epidermalen Keratinozyten, den Vorläuferzellen der holokrinen Talgdrüsen und im Endothel des dermalen Blutgefäßsystems, also in Strukturen sowohl epidermalen als auch dermalen Ursprungs. Auffällig ist zum einen, dass diese Bereiche die Grenze der Haut nach außen zur Umwelt und nach innen zur systemischen Zirkulation bilden. So könnten die CYP3A dort regulatorische Funktion in den Talgdrüsen gegenüber endogenen oder exogenen Stimuli übernehmen. In Sebozyten wäre dadurch der Abbau von entlang des Haarschafts penetrierten Xenobiotika gewährleistet. Da CYP3A die 6 $\beta$ -Hydroxylierung von Testosteron nicht nur in Leber (Kamdem et al. 2004) sondern auch in der Haut katabolisieren (Kürschner 2007, Götz et al. 2012a, Welch et al. 2013), könnten sie daneben physiologisch in der Haut in die Regulation der kutanen Testosteron-Homöostase eingreifen (Niemann & Horsley 2012). Die Expression der CYP3A im Endothel könnte auf ähnliche Weise beim Übertritt systemisch zirkulierender Substanzen in die Haut beteiligt sein: zum einen durch den Abbau etwaiger toxischer Substanzen deren Übertritt in die Haut verhindern oder zum anderen aber genau durch die Metabolisierung toxische Metaboliten in der Haut anreichern. Letzteres könnte eine Rolle bei der Entstehung immunologischer und nicht-immunologischer unerwünschter Arzneimittelwirkungen spielen, von denen sich bis zu 45 % in der Haut manifestieren (Nayak & Acharjya 2008).

Darüber hinaus gilt es in Anbetracht der Hypothese dieser Arbeit in besonderer Weise hervorzuheben, dass die Orte der CYP3A-Expression mit denen der kutanen VD-Synthese übereinstimmen (Norman 1998, Zouboulis 2000, Glossmann 2010). Zwar wurde der Abbau der VD-Metaboliten bisher nicht in der Haut oder mit Hautmikrosomen untersucht, doch finden sich mehrere Hinweise für einen Einfluss der CYP3A auch auf die kutane VD-Synthese. Zunächst wurde gezeigt, dass sowohl Calcidiol als auch Calcitriol durch CYP3A4 und CYP3A5 in weniger aktive Metaboliten abgebaut werden (Abb. 4 und darin genannte Referenzen). Dies konnte für Calcidiol in dieser Arbeit reproduziert und überdies für VD gezeigt werden. Zwar nicht explizit in Haut, Hautmodellen oder Hautmikrosomen sondern an rekombinant exprimierten Enzymen untersucht, erlauben daneben die Kolo-kalisation von VD-Synthese und CYP3A-Expression, die messbare kutane Aktivität

der CYP3A (Henkler et al. 2011, Götz et al. 2012a, Götz et al. 2012b) und die Entstehung prinzipiell aller VD-Metaboliten hin zum aktiven Hormon auch in der Haut (Lehmann et al. 2003) den Rückschluss auf eine Beteiligung der CYP3A am kutanen VD-Stoffwechsel. Zum einen könnte diese in der lokalen Regulation von Differenzierung und Proliferation der Keratinozyten liegen, die u. A. von Calcitriol beeinflusst wird (Lu et al. 2005, Bikle et al. 2007, Lehmann et al. 2010). Ferner konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass CYP3A4, CYP3A5 und CYP3A7 VD in einen oder mehrere bis dato noch unbekannte Metaboliten, nicht jedoch in 25-Hydroxyvitamin D, den direkten Vorläufer des aktiven VD, metabolisieren. Da das physiologisch wirksame Calcitriol zu 90 % aus dem kutan synthetisierten VD entsteht (Tremezaygues et al. 2011), ist die Expression und letztlich Aktivität der CYP3A in der Haut durchaus als Einflussfaktor auf den systemischen VD-Status denkbar.

### **Regulation der CYP3A-Expression durch Vitamin D-Metaboliten**

Für die Untersuchung der Regulation der CYP3A durch VD-Metaboliten wurden primäre und immortalisierte Keratinozyten, sowie transfizierte Dünndarm- und Hautzellen mit dem aktiven Hormon Calcitriol (1,25-VD) und dessen Vorläufern behandelt. Neben der Expressionsregulation und der Promotoraktivität wurde die enzymatische Aktivität rekombinant exprimierter CYP3A in Anwesenheit der einzelnen VD-Metaboliten bestimmt.

### **Induktion der CYP3A-Promotoraktivität durch Vitamin D**

Dabei waren CYP3A4, CYP3A5 und CYP3A7 in allen untersuchten epidermalen Hautzellen exprimiert und mehr oder weniger durch VD, 25-VD und 1,25-VD induziert. Ähnlich zu einer Induktionsstudie an humanen Dünndarmbiopsien mit dem CYP3A-Induktor Rifampicin (Burk et al. 2004) zeigte sich die VD-vermittelte Induktion von CYP3A5 trotz uneinheitlicher Studienlagen bezüglich seiner allgemeinen Induzierbarkeit auch in Keratinozyten von Spendern des *CYP3A5\*3/\*3*-Genotyps. CYP3A4 war trotz der geringen Basalexpression am responsivsten gegenüber einer Behandlung mit Calcitriol und dessen direkten Vorstufen. Auch die CYP3A7-Expression in Keratinozyten wurde durch Calcidiol und Calcitriol erhöht, obwohl bisher zumindest in Darmzellen keine Induktion der CYP3A7-mRNA-Spezies durch 1,25-VD detektiert wurde (Hara et al. 2004). Die Expression und Regulation von CYP3A7 als vornehmlich fötal exprimiertes CYP3A mit zumeist geringerer metabolischer Kapazität im Vergleich zu CYP3A4 (Williams et al. 2002) ist in der Haut Erwachsener jedoch wahrscheinlich zu vernachlässigen. Seine Rolle während der Fötalperiode und bei Trägern des *CYP3A7\*1C*-Allels mit ins Erwachsenenalter persistierender CYP3A7-Expression (Kuehl et al. 2001) bedürfte einer differenzierten und gezielten Untersuchung. Die zu CYP3A5 ähnliche Streuung der kutanen Expression des untersuchten Probenmaterials (Abb. S 7 im Anhang), könnte auf den Einfluss des *CYP3A7\*1C*-Allels in der Haut hindeuten.

Zur Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen der Induktion wurden Promotor- und Interaktionsanalysen angeschlossen. Hierfür wurden Keratinozyten mit Reportergen-Konstrukten transient transfiziert und mit VD-Metaboliten behandelt. Als positive Kontrolle dienten parallel behandelte Dünndarmzellen, für die die Regulation von CYP3A4 durch Calcitriol bereits charakterisiert wurde (Pavek et al. 2010). In beiden Zellsystemen zeigten sich die Substanz-vermittelten Effekte an den untersuchten proximalen Promotorbereichen abhängig von der Funktionalität des ER6-Bindemotivs. Zwar wurde dies nur für einen kleinen Promotorabschnitt und nur für den CYP3A5-Promotor untersucht, trifft aber höchst wahrscheinlich aufgrund starker Paralogie der proximalen Promotoren auch für das verwendete CYP3A4-Konstrukt zu (Pavek et al. 2010, Qiu et al. 2010). Bei der Promotoraktivität zeigten sich allgemein vergleichbare Effekte zwischen den verwendeten Zelllinien, mit der einzigen Ausnahme, dass der CYP3A4-Promotor nur in Dünndarm-, nicht jedoch in Hautzellen induziert wurde. Methodische Probleme sind hier ausgeschlossen, da sowohl die Transfektionseffizienz der Versuche stabil war als auch die verwendeten Konstrukte bei zeitgleichen Versuchen mit gleichen Reagenzien in Dünndarmzellen sehr wohl induziert wurden. Da der CYP3A4-Promotor über eine große Komplexität und eine Vielzahl weiterer Bindestellen nukleärer Rezeptoren v. a. außerhalb der verwendeten proximalen Bereiche verfügt (Qiu et al. 2010), könnten gewebsspezifisch in Hautzellen zusätzlich andere distale Promotorregionen für die VD-vermittelte Effekte entscheidend sein. Dies konnte in Dünndarmzellen - ebenfalls LS174T-Zellen - bereits gezeigt werden. So waren u. A. zwei weitere regulatorische Bereiche des CYP3A4-Promotors an der Induktion durch Calcitriol beteiligt: zum einen das *xenobiotic response enhancer module* (XREM) etwa 7 kb und zum zweiten das *constitutive liver enhancer module* von CYP3A4 (CLEM4) zirka 12 kb vom Transkriptionsstart entfernt (Pavek et al. 2010). Für die Relevanz des distalen CYP3A4-Promotors spräche zudem die beobachtete Induktion der endogenen CYP3A-Expression, auch der von CYP3A4, in immortalisierten und primären Keratinozyten. Hier bestätigten sich Calcidiol und Calcitriol als höchst potente Induktoren der CYP3A-Expression und anders als in Reportergen-Studien CYP3A4 als am stärksten induziert.

Lu und Kollegen zeigten ein anderes Bild der VD-vermittelten Effekte (Lu et al. 2005). Die Autoren konnten nach 16 h Behandlung mit 100 nM 1,25-VD lediglich eine Verdopplung der CYP3A-Expression messen. Doch da sich sowohl Inkubationsdauer, die VD-Konzentration als auch die verwendete Keratinozyten-Zelllinie von der in dieser Arbeit untersuchten unterschied, besteht aufgrund der mangelnden Vergleichbarkeit bezüglich der Expressionsregulation kein Widerspruch zu den über mehrere Testsysteme hinweg kongruenten Effekte der VD-Behandlung auf die CYP3A-Expression.

Da auch der Status der Differenzierung und Proliferation von Keratinozyten u. A. von Calcitriol beeinflusst wird (Bikle et al. 2007, Lehmann et al. 2010), wurden die Zelldichte und -morphologie vor und nach der Behandlung mikroskopisch beurteilt. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen Zellpassagen und Behandlungsgruppen. Auch

die Kontrolle der mRNA-Expression eines frühen und eines späten Differenzierungsmarker, Keratin 10 und Involucrin, zeigte keine gegenläufige Expression in Anwesenheit der einzelnen VD-Metaboliten, weshalb letztlich ein Zusammenhang zwischen Hautzellstatus und CYP3A-Expression zumindest *in vitro* als unwahrscheinlich anzunehmen ist.

Aufgrund dieser VD-vermittelten Regulation der CYP3A läge es nahe, dass auch Sonnenexposition zu einer ähnlichen Induktion der CYP3A-Expression führt, da durch UVB-Strahlung die kutane VD-Synthese vermittelt wird. Bisherige Studien zeigten jedoch keine Induktion durch UVB-Strahlung (Smith et al. 2003, Kürschner 2007) oder eine etwa 3- bis 4-fache Induktion der CYP3A5-Expression, nicht aber von CYP3A4 oder CYP3A7, durch Bestrahlung mit UVA (Gonzalez et al. 2001). Eigene Versuche zeigten keinen Effekt von UVB-Bestrahlung auf die CYP3A-Expression, wobei diese Daten aufgrund der hohen Zellsterblichkeit zum Zeitpunkt der Messung nicht aussagekräftig sind.

*In vivo* zeigte sich jedoch mehrfach ein paralleler Verlauf des saisonal variablen, UV-abhängigen VD-Status mit dem Plasmaspiegel der CYP3A-Substrate Tacrolimus und Sirolimus (Lindh et al. 2011), der intestinalen CYP3A-vermittelten Metaboliten von Midazolam (Thirumaran et al. 2012) und der Aktivierung von Tamoxifen zu Endoxifen durch CYP3A der Leber (Teft et al. 2013). Teft und Kollegen zeigten darüber hinaus, dass die Endoxifen-Konzentration unter VD-Supplementierung erhöht war, was eine Induktion des Tamoxifen-Metabolismus und letztlich der CYP3A nahe legt (Teft et al. 2013). Doch endogene Marker der CYP3A-Aktivität, die 6 $\beta$ -Hydroxylierung von Cholesterol und Cortisol, zeigten keinen Zusammenhang mit Jahreszeit und damit der UVB-Strahlung oder dem VD-Status (Wild et al. 2000, Björkhem-Bergman et al. 2013). Dabei hatte selbst die Supplementierung mit VD keinen Einfluss auf die CYP3A-Aktivität (Björkhem-Bergman et al. 2013). Zwar zeigen die hier dargestellten *in vitro*-Daten, dass VD in der Haut geringere Effekte auf die Expression der CYP3A vermittelt als Calcidiol oder Calcitriol, doch bewirkt die Supplementierung mit VD auch einen Anstieg von Calcidiol (Rizzoli et al. 2013), nicht aber des aktiven, streng regulierten Calcitriol, das in den beschriebenen Ergebnisse dieser Arbeit und anderer Studien stets die stärkste Induktion der CYP3A-Expression vermittelte.

Da die 6 $\beta$ -Hydroxylierung von Cholesterol v. a. die hepatische CYP3A-Aktivität beschreibt (Björkhem-Bergman et al. 2013), könnte diese aufgrund der in dieser Arbeit bestätigten sehr geringen VDR-Expression in der Leber die VD-vermittelten Effekte nicht oder sehr geringfügig anzeigen. Eine ähnliche Argumentation verfolgten Wild und Kollegen, die ebenfalls keine saisonale Variabilität eines weiteren Markers der endogenen CYP3A-Aktivität, des im Urin messbaren CYP3A-Metabolit 6 $\beta$ -Hydroxycortisol, aufzeigten (Wild et al. 2000). Die Autoren führten dies und die damit einhergehende Diskrepanz zum Plasmaspiegel eines anderen, vornehmlich hepatischen CYP3A-Substrats,

auf die zusätzlich extrahepatische 6 $\beta$ -Hydroxylierung von Cortisol in Niere und Dünndarm zurück (Wild et al. 2000).

### **VDR als Vermittler der Induktion der CYP3A durch Vitamin D**

Des Weiteren wurde das Expressionsprofil der Regulatoren der CYP3A-Expression, der nukleären Rezeptoren der 1I-Familie, untersucht. Allgemein erwiesen sich die mRNA-Daten der kutanen Expression der NR1I wie auch für CYP3A in Ihrer Verteilung innerhalb verschiedener Studienpopulationen als sehr vergleichbar und bestätigen die Validität der Daten unabhängig von methodischer Herangehensweise oder dem untersuchten Hautareal. Ergänzend zeigten Knuschke et al. am Beispiel der kutanen, UVB-abhängigen VD-Synthese, dass verschiedene Hautareale auch funktionell über eine vergleichbare VD-Synthese und wahrscheinlich auch Expression VD-metabolisierender Enzyme sowie deren Regulatoren verfügen (Knuschke et al. 10/2012).

Die parallel untersuchten Leberproben zeigten in absoluten Größenordnungen mit der Haut vergleichbare, aber stärker interindividuell variable Expressionsstärken der untersuchten nukleären Rezeptoren. VDR, beim Menschen vornehmlich endogener Regulator der Kalzium-Phosphat-Homöostase (Reschly & Krasowski 2006), zeigte eine deutlich niedrigere hepatische Expression im Vergleich zu den klassischen Xenosensoren PXR und CAR. Anders jedoch als für die Expression der CYP3A ist die VDR-Expression der Haut ähnlich stark wie die Expression der hepatischen Xenosensoren CAR und PXR.

Aufgrund der geringen Probenanzahl gilt es für die Expressionsdaten der Leber besonders zu berücksichtigen, dass diese sich zwischen den einzelnen Proben sehr stark sowohl in ihrer CAR- als auch PXR-, nicht jedoch in der VDR-Expression unterscheiden. In Anbetracht der CYP3A- und VDR-Expressionsdaten, bei denen sich die gute Vergleichbarkeit der verschiedenen Datensätze trotz unterschiedlicher Herkunft der Proben und methodischer Herangehensweise zeigte, liegt nahe, dass die Unterschiede in der CAR- und PXR-Expression eher der hohen interindividuellen Variabilität als der Invalidität der Daten geschuldet sind.

Die Expression der NR1I in ähnlichen Größenordnungen in beiden Organen könnte bedeuten, dass zwischen Leber und Haut prinzipiell ähnliche Mechanismen der Expressionsregulation bei jedoch unterschiedlicher Sensitivität gegenüber bestimmten Liganden gelten. Hinweis hierfür geben die zuvor beschriebenen Untersuchungen der VD-vermittelten Effekte auf die CYP3A-Promotoraktivität in verschiedenen Zellsystemen kutanen und nicht-kutanen Ursprungs. Dies und auch die relative Expression der einzelnen NR1I untereinander legen eine gewebsspezifische Rolle der CYP3A nahe. Die Leber mit der hohen Expression der Xenosensoren CAR und PXR und der starken Induzierbarkeit v. a. von CYP3A4 durch Fremdstoffe spielt eine große Rolle in der Entgiftung. Die nahezu fehlende Expression des PXR in der Haut erklärt hingegen die fehlende Induktion der

CYP3A-Promotoren in Hautzellen durch Rifampicin, einen in Leber- und Dünndarm stark induzierenden PXR-Liganden (Burk et al. 2004).

Eine neuere Studie beschreibt interessanterweise auch CAR im Zusammenhang mit dem VD-Metabolismus. So wiesen CAR<sup>-/-</sup>-Mäuse signifikant erhöhte Calcitriol-Serumspiegel und Knochendichten bei gleichzeitig verminderter Expression der murinen 1 $\alpha$ -Hydroxylase CYP27B1 im Vergleich zu wildtypischen Mäusen auf (Cho et al. 2013). Die Autoren selbst sehen dies jedoch eher als indirekten Nebeneffekt der globalen CAR-Deletion, der dadurch gesteigerten CYP2B-Expression in der Leber und damit einhergehenden erhöhten Testosteron-Spiegeln in CAR<sup>-/-</sup>-Mäusen (Cho et al. 2013). Dementsprechend zeigte CAR in humanen epidermalen Keratinozyten keinen direkten Einfluss auf die Regulation der CYP3A durch VD-Metaboliten. Im 2-Hybrid-System bestätigte sich VDR, nicht aber CAR oder PXR, als beteiligter Rezeptor bei der VD-abhängigen Regulation der CYP3A. Zwar erfasst der 2-Hybrid-Assay vielmehr die Interaktion der einzelnen nukleären Rezeptoren mit deren Heterodimerisierungspartner, in diesem Falle mit RXR $\alpha$ , doch decken sich die relativen Größenordnungen der EC<sub>50</sub>-Daten (Tab. 18) mit der Bindungsaffinität der einzelnen Metaboliten an VDR: 1,25-VD > 25-VD > VD (Falsone et al. 2001, Holick 2003). So erfolgte die halbmaximale Aktivierung des VDR durch Calcitriol im nanomolaren Bereich mit einer EC<sub>50</sub> von etwa 2 nM. Für VD und Calcidiol lagen die Konzentrationen entsprechend der Bindungsaffinität des VDR in mikromolaren Bereich (Pascussi et al. 2003), um Faktor 1300 respektive 3100 höher als für Calcitriol.

Tab. 18: Zusammenfassung der ermittelten EC<sub>50</sub>-Werte der Vitamin D-vermittelten Effekte

Dies waren zum einen die Induktion der CYP3A-mRNA-Spezies in Hautzellen und zum anderen die Interaktion von VDR mit RXR $\alpha$ . Als Orientierung dienen physiologische Plasmakonzentrationen *in vivo* (Blaney et al. 2009). na kennzeichnet Endpunkte mit geringer Veränderung in Anwesenheit der VD-Metaboliten, für die die Berechnung der EC<sub>50</sub> im Rahmen der durchgeführten Experimente nicht möglich war.

<b>Induktor</b>	<b>Endpunkt</b>	<b>EC<sub>50</sub></b>	<b>Plasmakonzentration</b>
Vitamin D, VD	CYP3A5 mRNA	na	0,5-25 ng/ml
	CYP3A4 mRNA	na	
	CYP3A7 mRNA	na	1,5-65 nM
	VDR-RXR $\alpha$ -Interaktion	5,99 $\mu$ M	
Calcidiol, 25-VD	CYP3A5 mRNA	61,63 $\mu$ M	20-60 ng/ml
	CYP3A4 mRNA	8,96 $\mu$ M	
	CYP3A7 mRNA	na	50-150 nM
	VDR-RXR $\alpha$ -Interaktion	2,42 $\mu$ M	
Calcitriol, 1,25-VD	CYP3A5 mRNA	9,25 nM	20-60 pg/ml
	CYP3A4 mRNA	6,56 nM	
	CYP3A7 mRNA	19,39 nM	50-150 pM
	VDR-RXR $\alpha$ -Interaktion	1,93 nM	

Die geringe kutane Expression der Xenosensoren CAR und PXR könnte die geringe oder fehlende Induktion der CYP3A in der Haut durch deren Liganden allgemein - wie bereits für Dexamethason (Du et al. 2006a, Götz et al. 2012b) oder Rifampicin in dieser Arbeit gezeigt - erklären. Ähnlich bezeichneten Li et al. die Funktion der CYP3A in der Haut als

konstitutiv und gewebsspezifisch (Li et al. 1994). Die kutane Induzierbarkeit der CYP3A hingegen konnte sehr wohl durch VD-Metaboliten in dieser Arbeit gezeigt und VDR als vermittelnder Rezeptor identifiziert werden. Dabei erscheint der Phase I-Stoffwechsel der Haut - mit basal niedriger Expression, aber starker Induzierbarkeit zumindest durch VDR-Liganden - als limitierender und regulierender Schritt des kutanen Stoffwechsels (vgl. Luu-The et al. 2009). Die CYP3A erfüllen dabei wahrscheinlich eine vornehmlich physiologisch, homöostatisch Funktion v. a. im VD-Metabolismus.

### **Regulation der CYP3A-Aktivität durch Vitamin D-Metaboliten**

Bei der Regulation der enzymatischen CYP3A-Aktivität durch VD-Metaboliten zeigten sich keine eindeutigen Effekte obwohl der Versuchsaufbau mit allen Kontrollsubstraten erwartete Ergebnisse lieferte. Alleinig CYP3A4 zeigte eine Aktivitätssteigerung in Anwesenheit von Calcitriol um das Zweifache. Dies bedeutet, dass die CYP3A4-Aktivität sowohl auf Ebene des Proteins durch Calcitriol aktiviert, als auch auf Ebene der mRNA-Expression stark induziert wird, was letztlich die Gesamt-Menge und -Aktivität von CYP3A4 zumindest *in vitro* potenziert. Dieser positive Feedback-Mechanismus ist typisch für CYP3A4, und CYP3A-Enzyme im Allgemeinen, durch den CYP3A-Substrate häufig ihren eigenen Abbau induzieren (Willson & Klierer 2002). So auch die Lithocholsäure (LCA), ein Gallensalz, das die Aktivität des humanen CYP3A4 um das Fünffache steigert (Kumar et al. 2009). Neben der Aktivierung induziert LCR *in vivo* auch seinen eigenen intestinalen Abbau durch VDR-vermittelte Induktion von CYP3A4 ohne anders als Calcitriol in den Kalzium-Phosphat-Haushalt einzugreifen (Ishizawa et al. 2008, Cheng et al. 2013).

Bei den anderen CYP3A-Isozymen und VD-Metaboliten zeigte sich keine Veränderung der gemessenen Biolumineszenz. Es bleibt hingegen offen, ob tatsächlich keine Interaktion stattfand. Die angewendeten Methode kann sowohl die native Enzymaktivität, z. B. in Mikrosomen aus Gewebe oder auch die der rekombinanten, in verschiedenen Expressionssystemen, wie *E. coli* oder Insektenzellen, heterolog exprimierten CYPs messen. Darüber hinaus können Inhibition, Aktivierung und Induktion der CYP untersucht werden. Dabei bezieht sich Induktion - wie oben definiert - nicht auf das Enzym selbst, sondern vielmehr auf dessen Expression in intakten Zellen. Die Induktion der Genexpression und sekundär der Enzymmenge spiegelt sich letztlich in einer messbaren Zunahme der Lumineszenz wider. Die erfasste gesteigerte Umsetzung des Proluziferins zu Luziferin liegt hier also nicht an einer gesteigerten Aktivität eines einzelnen Enzyms, sondern an der Gesamtmenge des aktiven Enzyms. Inhibition und Aktivierung werden i. d. R. am Enzym und Substanz-abhängige Effekte in einer zellfreien Inkubation untersucht. Beides, Aktivierung und Hemmung, spiegelt sich letztlich im hier verwendeten Versuchsaufbau in einer erhöhten oder verminderten Lumineszenz aufgrund der gesteigerten oder reduzierten Metabolisierung des Proluziferins wider.

Dabei gilt es zu beachten, dass bei diesem Versuchsaufbau grundsätzlich nicht darauf geschlossen werden kann, ob es sich bei einer Inhibition um eine kompetitive oder nicht-kompetitive handelt. Bei einer kompetitiven Hemmung bindet der Inhibitor an das aktive Zentrum des Enzyms. Dies wäre z. B. dann zu erwarten, wenn die zugegebene Substanz selbst ein Substrat für das Enzym ist und mit dem Proluziferin um das aktive Zentrum konkurriert. Bei einer nicht-kompetitiven Hemmung bindet der Inhibitor nicht an das aktive, sondern das allosterische Zentrum. Diese Bindung ändert die Konformation des Enzyms so, dass das Substrat entweder nicht mehr binden, das Enzym die Reaktion nicht mehr katalysieren oder das Reaktionsprodukt nicht mehr vom Enzym dissoziieren kann. Alle Formen der Hemmung würden sich letzten Endes in einer geringeren Umsetzung des Proluziferins und einer geringeren Biolumineszenz zeigen.

Da für 25-VD bereits bekannt ist, dass es sowohl Substrat für CYP3A4 als auch CYP3A5 ist (Wang et al. 2012), wäre zu erwarten, dass sich dies als kompetitive Hemmung durch ein konkurrierendes Substrat in einer geringeren Biolumineszenz bemerkbar macht. Dass dies nicht der Fall ist, könnte möglicherweise an einer gleichzeitig stattfindenden Aktivierung der Enzymaktivität liegen und so netto zu gleichbleibenden Messwerten führen. Letztlich bliebe ein solcher Sachverhalt mit der angewandten Methode unentdeckt. Eine Untersuchung in Abhängigkeit der Inhibitorkonzentration könnte über mögliche Mechanismen Aufschluss geben. Zu beachten sind auch die großen Schwankungen der Messwerte zwischen einzelnen Versuchen, was die Detektion geringer Effekte erschwert haben dürfte, zumal der Einsatz der fünffachen Menge der VD-Metaboliten also 25  $\mu\text{M}$  sowie die Lösung des 1,25-VD in Ethanol weder deutlichere Effekte noch geringere Schwankung zwischen den einzelnen Versuchen bewirkte.

### **Metabolismus der Vitamin D-Vorstufen durch CYP3A-Enzyme**

Bereits bekannt ist, dass CYP3A4 und CYP3A5 sowohl Calcitriol (Xu et al. 2006), als auch Calcidiol (Wang et al. 2012) abbauen. Da diese ebenso in der Haut produziert werden (Lehmann et al. 2003), könnten hier CYP3A bereits eine lokale Rolle in der VD-Homöostase der Haut und damit der Regulation von Proliferation und Differenzierung der epidermalen Keratinozyten spielen (Bikle et al. 2007, Lehmann et al. 2010). Das VD als Vorstufe des systemisch aktiven Calcitriol entsteht zu 90 % photolytisch in der Haut aus 7-DHC (Tremezaygues et al. 2011).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die metabolisierende Aktivität der CYP3A gegenüber 7-DHC und VD durch Auftrennung und Detektion der Metaboliten mittels UV-HPLC und LC-MS isozymspezifisch untersucht. Die Erkenntnisse aus diesen Untersuchungen sind in Abb. 42 zusammengefasst. Mit UV-HPLC zeigten sich Hinweise auf den Abbau von 7-DHC durch CYP3A7, nicht aber CYP3A4 und CYP3A5. Dies bestätigte eine vorherige Studie, die 7-DHC als Substrat für CYP3A4 bereits ausschloss (Shinkyō et al. 2011). Die massenspektrometrische Untersuchung des Abbaus von 7-DHC erfolgte am Institut für

Ernährungswissenschaften in Potsdam. Dabei wurde 7-DHC zwar (noch) nicht unmittelbar bestimmt, doch konnte zumindest die CYP3A-abhängige Bildung von Calcitriol und dessen unmittelbaren Vorstufen ausgeschlossen werden. Bei der Verwendung des 7-DHC konnte stets sowohl VD<sub>2</sub> also auch VD<sub>3</sub> detektiert werden. Beide zeigten eine Abnahme in Anwesenheit aller drei CYP3A-Isozyme, was für eine Metabolisierung beider Substanzen durch CYP3A4, CYP3A5 und CYP3A7 spricht. Für VD<sub>2</sub> wurde hierfür die 25-Hydroxylierung zu 25-VD<sub>2</sub> durch CYP3A4 bereits beschrieben, für VD<sub>3</sub> hingegen ausgeschlossen (Gupta et al. 2004). Zur Klärung sollte die Messung von 25-VD<sub>2</sub> erfolgen. Die Herkunft beider Substanzen per se jedoch ließe im Falle des VD<sub>2</sub> auf eine Kontamination des verwendeten 7-DHC mit VD<sub>2</sub> selbst oder dessen Vorläufer Ergosterol aus Hefe/Pilzen schließen (Japelt & Jakobsen 2013). Darüber hinaus ist für das gemessene VD<sub>2</sub> und VD<sub>3</sub> eine zumindest geringfügige Photolyse und thermische Isomerisierung des 7-DHC/Ergosterols zu VD<sub>3</sub> bzw. VD<sub>2</sub> (vgl. Abb. 4) vor oder während der Inkubation denkbar.

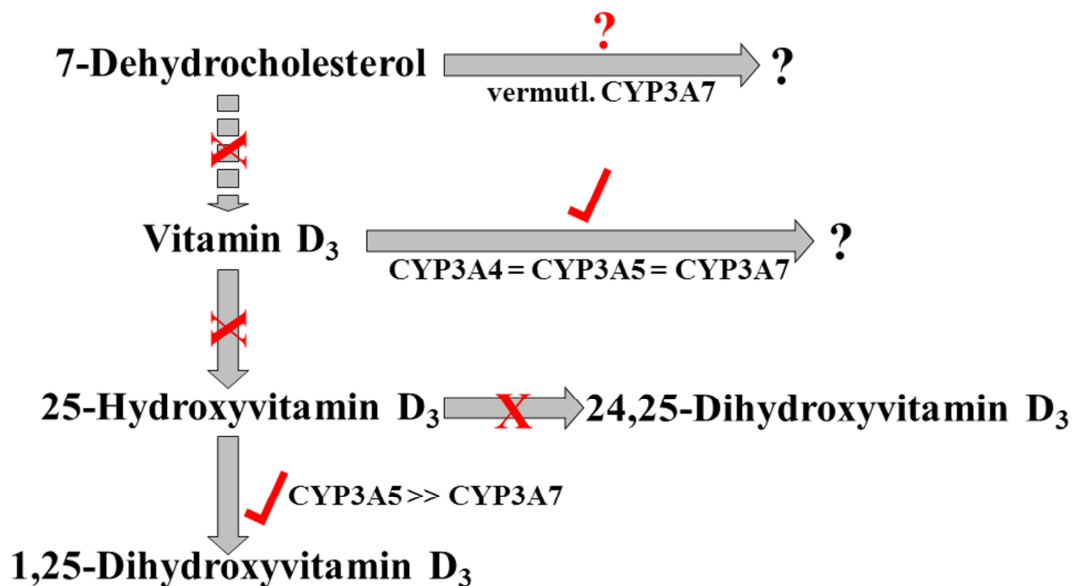


Abb. 42: Erkenntnisse zur Metabolisierung von 7-Dehydrocholesterol und Vitamin D<sub>3</sub> durch CYP3A-Enzyme. Gezeigt ist der physiologische Syntheseweg von 7-DHC über VD<sub>3</sub>, 25-VD<sub>3</sub> hin zum aktiven Hormon 1,25-VD<sub>3</sub>. Das sehr instabile Prä-VD<sub>3</sub> als Zwischenstufe von 7-DHC zu VD<sub>3</sub> wurde aufgrund seiner Kurzlebigkeit zur Vereinfachung ausgelassen (unterbrochener Pfeil). In rot markiert sind die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur Beteiligung der CYP3A-Enzyme: für durch CYP3A katalysierte Reaktionen ist ein Haken und das/die entsprechende/n Isozym/e genannt, für mit einem X markierte Stoffwechselschritte wurde die Beteiligung der CYP3A ausgeschlossen. Für die Versuche wurden rekombinant exprimiertes CYP3A4, CYP3A5 oder CYP3A7 mit 7-DHC, VD<sub>3</sub> oder 25-VD<sub>3</sub> inkubiert. Anschließend wurde das Metabolitenspektrum aufgetrennt und mit UV bzw. massenspektrometrisch detektiert. Letzteres diente der Verifizierung und ferner der Quantifizierung von VD<sub>2</sub>, VD<sub>3</sub>, 25-VD<sub>3</sub>, 24,25-VD<sub>3</sub> wie auch 1,25-VD<sub>3</sub> und wurde am Institut für Ernährungswissenschaften in Potsdam.

Für die 25-Hydroxylierung des VD<sub>3</sub> konnte die Beteiligung der CYP3A-Enzyme bisher ausgeschlossen werden (Gupta et al. 2004). Doch da die verwendeten Enzyme dieser Studie z. T. ohne den notwendigen Kofaktor Zytochrom b<sub>5</sub> exprimiert wurden (Kamdem 2006, Dong et al. 2013) kann hier zum einen kein endgültiger Ausschluss und zum anderen kein exakter Vergleich der Affinitäten der CYP3A-Isozyme erfolgen. Da es für die Untersuchung der Hypothese primär nicht um die 25-Hydroxylierung von VD, sondern um

dessen Abbau im Allgemeinen ging, wurde auch VD eingesetzt und letztlich als Substrat für CYP3A4, CYP3A5 und CYP3A7 bestätigt. Bei keiner der Reaktionen konnte dabei eine Zunahme des 25-VD<sub>3</sub> gemessen werden. Die Frage nach dem oder den entstandenen Metaboliten bleibt offen. Dies bestätigt die oben genannte Studie und steht der 25-Hydroxylaseaktivität von CYP3A4 gegenüber VD<sub>2</sub> (Gupta et al. 2004) entgegen. Dies betont zum einen die Spezifität der 25-Hydroxylierung in Abhängigkeit des Substrats und zum zweiten die Unterschiedlichkeit der Aktivität von CYP3A4 und CYP3A5 gegenüber VD-Metaboliten, da letzteres in der gleichen Studie VD<sub>2</sub> nicht an Position C25 hydroxylierte (Gupta et al. 2004). Genau diese Spezifität ist es, die die Frage aufwirft, welche Rolle CYP3A4 im physiologischen VD-Metabolismus von VD<sub>2</sub> spielt. Studien an *Cyp2r1*<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigten verringerte 25-VD-Konzentrationen bei normalen 1,25-VD-Spiegeln im Serum. Ein zusätzlicher *knock-out* des *Cyp27a1* brachte keine weitere Veränderung (Zhu et al. 2013b). Dies spricht für CYP2R1 als Hauptenzym bei der 25-Hydroxylierung von VD<sub>3</sub> *in vivo* und für eine geringe Beteiligung von CYP27A1. Aufgrund gleichbleibender Calcitriol-Konzentrationen schlossen die Autoren auf eine weitere nicht unwichtige 25-Hydroxylase neben CYP2R1 (Zhu et al. 2013b), bei der es sich möglicherweise um murine Orthologe des humanen CYP3A4, CYP3A5 und/oder CYP3A7 handeln könnte.

Bei der Inkubation der CYP3A-Enzyme mit 25-VD als Substrat zeigte sich eine Abnahme des 25-VD bei CYP3A5 bei gleichzeitiger Zunahme des Calcitriol auf 424 ng/ml, bei CYP3A7 blieben die gemessenen Mengen 25-VD konstant bei einer geringfügigen Zunahme des Calcitriol auf 8,6 ng/ml. Die Metabolisierung des 25-VD durch CYP3A4 und CYP3A5 ist bekannt (Wang et al. 2012, Wang et al. 2013). Die Autoren merkten zudem an, dass CYP3A4 möglicherweise auch an der Hydroxylierung von Calcidiol zu Calcitriol beteiligt sein könnte (Wang et al. 2012).

Die Behandlung mit Rifampicin, einem PXR-vermittelten CYP3A-Induktor, führte in humanen primären Hepatozyten sowie in gesunden Probanden jedoch zu einem Anstieg der CYP3A-vermittelten 4 $\beta$ -Hydroxylierung von 25-VD bei gleichzeitiger Abnahme des systemischen Calcitriol-Spiegels (Wang et al. 2012). Wie vorläufige Daten zum VD-Abbau durch CYP3A dieser Arbeit andeuten, wäre bei induziertem CYP3A-System eine gesteigerte 1 $\alpha$ -Hydroxylierung von 25-VD zu 1,25-VD durch CYP3A5 zu erwarten. Hierbei gilt es zu berücksichtigen, dass CYP3A5 zwar nicht nur in der Leber sondern u. A. auch renal exprimiert (Koch et al. 2002), jedoch dort nicht durch PXR-Liganden induzierbar ist (Nem et al. 2012). Zudem ist CYP3A5 polymorph in nur wenigen Nicht-Afrikanern exprimiert. CYP3A4 auf der anderen Seite ist das in Leber und Dünndarm stets meist exprimierte CYP3A (Koch et al. 2002), stark durch Rifampicin induzierbar (Li & Chiang 2006) und vermittelt die 24-Hydroxylierung und letztlich Inaktivierung von 25-VD (Wang et al. 2012) und 1,25-VD (Xu et al. 2006, Deb et al. 2012). Die durch Rifampicin verminderten 1,25-VD-Spiegel sprechen so netto für die Überlegenheit des induzierten Katabolismus von 25-VD und 1,25-VD durch hepatisches CYP3A4 über die renale und

extrarenale 1,25-VD-Synthese durch v. a. CYP27A1 und vermutlich auch CYP3A5. Dabei könnte die 1 $\alpha$ -Hydroxylierung von 25-VD zu 1,25-VD durch CYP3A5 in der Leber sowohl in Niedrig- als auch Hochexprimierern durchaus durch Rifampicin gesteigert sein und die Folgen eines verstärkten VD-Abbaus abmildern.

Die Autoren zeigten jedoch darüber hinaus, dass die Hauptmetaboliten - 4 $\alpha$ ,25- und 4 $\beta$ ,25-VD - zunächst durch Optimierung des chromatographischen Trennverfahrens vom ähnlichen 1,25-VD unterschieden werden mussten (Wang et al. 2012). Ob es sich also bei dem hier gemessenen 1,25-VD nicht vielmehr um 4,25-VD handelt, bedarf weiteren Untersuchungen. Zudem galt die renale 1 $\alpha$ -Hydroxylierung des 25-VD bisher als ausschließlich durch CYP27B1 vermittelt und als elementar für suffiziente Calcitriolspiegel für Mensch und Maus (Kim et al. 2007, Christakos et al. 2013). So ist auch im Serum von *Cyp27b1*<sup>-/-</sup>-Mäusen kein 1,25-VD nachweisbar (Christakos et al. 2013). Bei niereninsuffizienten und anephrischen Patienten hingegen wurden lediglich verringerte, doch messbare 1,25-VD-Spiegel festgestellt (Lambert et al. 1982, Koenig et al. 1992, Yumita et al. 1996, Ishimura et al. 1999), die durch Supplementierung mit 25-VD ausgeglichen werden konnten (Jean et al. 2008, Dusso 2011). Zusammengefasst spricht dies für die große Relevanz von CYP27B1 in der 1 $\alpha$ -Hydroxylierung von 25-VD v. a. in der Niere jedoch auch für dessen extrarenale Expression (Zehnder et al. 2001) und Aktivität.

Doch auch bei Patienten der VD-abhängigen Rachitis Typ I (VDDR I), einer rezessiv vererbten Dysfunktionalität des CYP27B1, sind geringe Spiegel von 1,25-VD messbar (Scriver et al. 1978, Yan et al. 2011), was entweder für die unvollständige Penetranz der Mutationen in *CYP27B1* spräche oder aber auch auf ein weiteres Enzym in der 1 $\alpha$ -Hydroxylierung von 25-VD möglicherweise auch außerhalb der Niere schließen ließe. So konnte schon 1995 an Rattenleber gezeigt werden, dass dort mikrosomale Enzyme diese Reaktion katabolisieren, jedoch mit geringerer Affinität als das mitochondriale CYP27B1 der proximalen Tubuli der Niere (Negrea et al. 1995). Interessanterweise erniedrigte sich die Michaelis-Menten-Konstante der mikrosomalen Enzyme der Leber in niereninsuffizienten Ratten, was als Kompensation der geringeren renalen Aktivität gewertet werden könnte (Negrea et al. 1995). Auch Untersuchungen von Wang und Kollegen an primären Hepatozyten legen nahe, dass CYP3A4 bei der Inkubation mit 25-VD sowohl in Rifampicin-behandelten Zellen als auch unter Kontrollbedingungen signifikant zur Bildung von 1,25-VD beitrug (Wang et al. 2013). Zwar zeigen *Cyp3a*<sup>-/-</sup>-Mäuse keine auffälligen physiologischen Veränderungen auch bezüglich der Disposition steroidaler Substanzen wie Testosteron, doch wurden in dieser Studie weder Parameter des VD-Stoffwechsels noch der Knochengesundheit erhoben (van Herwaarden et al. 2007). Zusammen mit der geringen wie auch vermutlich eher katabolen Aktivität der CYP3A im VD-Metabolismus, wären in *Cyp3a*<sup>-/-</sup>-Mäusen eher höhere 25-VD-Spiegel zu erwarten, die sich aufgrund der engen hormonellen Kontrolle des aktiven Calcitriols vermutlich keine Auswirkungen auf die Knochengesundheit hätten. Auch toxische Effekte eines stark

erhöhten 25-VD-Spiegels scheinen in Anbetracht der intakten 25-VD-24-Hydroxylase CYP24A1 *in vivo* unwahrscheinlich (Jones 2008 und darin enthaltene Referenzen). Zudem wird der VD-Bedarf von Labornagern v. a. über die Nahrung und weniger über die kutane Synthese gedeckt, was die Interpretation solcher Daten am Tiermodell ohne gezielte Frage nach der Rolle der CYP3A im Metabolismus von VD erschwert.

Die Relevanz von CYP3A5 bei der 1 $\alpha$ -Hydroxylierung von 25-Hydroxyvitamin D scheint angesichts dessen trotz renaler und extrarenaler Expression denkbar aber eher gering, bedarf jedoch weiterer Untersuchung.

### **Interindividuelle Variabilität der CYP3A in menschlicher Haut**

Wie bereits für Leber (Kuehl et al. 2001), Niere (Bolbrinker et al. 2012) und Dünndarm (Burk et al. 2004) beschrieben führt das CYP3A5\*3-Allel auch in der Haut zu einer überzufällig geringeren CYP3A5-Expression der mRNA und des Proteins. Dabei korrelierten die CYP3A5-mRNA- und -Proteinmengen, die von CYP3A4/7 jedoch nicht. Dies könnte zum einen an unterschiedlichen posttranskriptionellen Mechanismen oder zum anderen an den unterschiedlichen Nachweisgrenzen und Messgenauigkeiten der einzelnen Methoden liegen. Bei allgemein geringer Expression, wie der von CYP3A4 und CYP3A7 würden sich letztere stärker bemerkbar machen. Für ersteres spräche die Detektion zweier Banden für CYP3A5 in Gewebeproben, nicht jedoch bei rekombinant exprimiertem Protein. Das verwendete Protein wurde in Insektenzellen exprimiert und verfügt demnach über die meisten posttranskriptionellen Modifikationen, jedoch nicht über n-gekoppelte Glykosylierung und  $\gamma$ -Karbonylierung (Fernandez & Hoeffler 1999). Ferner unterschieden sich die Bandengrößen zwischen den untersuchten Organen, was eine Gewebsspezifität solcher Veränderungen nahe legt.

Zwar waren die Unterschiede zwischen \*1-Allel-Trägern und Häuten des \*3/\*3-Genotyps nur etwa halb so groß wie in der Niere und dreimal geringer als in der Leber, aber v. a. in physiologischen Mechanismen spielen bereits geringe Unterschiede eine Rolle. So geht eine Schwangerschaft neben hormonellen Veränderungen auch mit einem erhöhten Cholesterolspiegel und einer etwa verdoppelten CYP3A-Aktivität einher (Nylen et al. 2011), was sich letztlich bereits in einem veränderten Medikamentenabbau bemerkbar macht (Jeong 2010).

Auf Aktivitätsebene können zum Effekt des CYP3A5\*3-Allels in Haut im Rahmen dieser Arbeit keine Angaben gemacht werden, da trotz einer guten Auftrennung mikrosomaler und zytosolischer Proteine bis zum Abschluss dieser Arbeit keine CYP3A-Aktivität, weder in Haut- noch in parallel aufbereiteten Leberproben, gemessen werden konnte. Da der Immunoblot das Apoprotein, nicht aber das funktionell relevante Holoprotein nachweist, muss der fehlende Nachweis der CYP3A-Aktivität in Haut gesondert betrachtet werden: zum einen kann die Enzymaktivität während der Präparation aufgrund von Wärme oder mechanisch durch Scherkräften verloren gegangen sein, zum zweiten könnte der Zeitraum

zwischen Entnahme des Gewebematerials und Einfrieren der Proben oder die Lagerung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  über mehrere Monaten zur Abnahme der Aktivität geführt haben oder zum dritten könnte schlicht keine CYP3A-Aktivität in Haut vorhanden sein. Letzteres konnte jedoch durch mehrere Studien ausgeschlossen werden (Rolsted et al. 2008, Henkler et al. 2011, Götz et al. 2012a, Götz et al. 2012b). Da jedoch auch in parallel untersuchten Leberproben ebenfalls nahezu keine Aktivitäten gemessen werden konnten, scheinen die Lagerung und Präparationstechnik als wahrscheinlichste Ursachen für den hier fehlenden Nachweis der CYP3A-Aktivität in Haut.

Betrachtet man jedoch den Trend von geringer werdenden Unterschieden auf Proteinebene im Vergleich zur RNA, könnte man vermuten, dass der Effekt des *CYP3A5\*3*-Allels auf funktioneller Ebene ebenfalls nochmals geringer als 1,8-fach wäre, zumindest auf Basalniveau. Da sich CYP3A jedoch v. a. durch ihre starke Induzierbarkeit auch durch kutane VD-Vorstufen auszeichnen, könnten letztlich die hier beschriebene basale interindividuelle Variabilität in Anwesenheit von Induktoren noch verstärkt werden (Luu-The et al. 2009). Bei der  $6\beta$ -Hydroxylierung von Testosteron, einem Aktivitätsmarker der CYP3A-Enzyme (Kamdem et al. 2004), zeigten sich ebenso mitunter recht große interindividuelle Unterschiede von  $\pm 40$  bis  $\pm 59\%$  in menschlicher (Götz et al. 2012a, Welch et al. 2013) und etwas geringere Variabilität von  $\pm 23\%$  in Rattenhaut (Mukhtar et al. 1987), wenn auch der Einfluss genetischer Faktoren hier nur vermutet werden kann. Zwar konnte für die  $6\beta$ -Hydroxylierung von Testosteron an rekombinant exprimierten CYP3A-Enzymen gezeigt werden, dass CYP3A4 eine etwa 5-fach höhere metabolische Kapazität gegenüber CYP3A5 besitzt (Kamdem et al. 2004), doch ist in der Haut anders als in der Leber selbst in sogenannten *low expressers* CYP3A5 das dominante Isozym; CYP3A4 spielt eine eher untergeordnete Rolle. Es ist daher anzunehmen, dass die kutane  $6\beta$ -Hydroxylierung von Testosteron v. a. die CYP3A5-Aktivität widerspiegelt.

Welch und Kollegen zeigten zudem beim Vergleich frischer und gefrorener Haut, dass die gemessene Aktivität in gefrorener Haut nur noch die Hälfte im Vergleich zu frischer Haut beträgt und, dass auch die interindividuelle Variabilität stark reduziert war (Welch et al. 2013). Dies könnte zum einen auch der Grund für die nicht-messbaren CYP3A-Aktivität im Rahmen dieser Arbeit erklären und zum anderen zur Unterschätzung der Rolle des *CYP3A5\*3*-Allels für die kutane CYP3A5-Expression und -Aktivität geführt haben. Einschränkend ist jedoch zu bemerken, dass in dieser Studie die untersuchten Häute der verschiedenen Testbedingungen von unterschiedlichen Spendern stammten und dies letztlich auch als Ursache für die unterschiedlichen CYP3A-Aktivitäten denkbar ist (Welch et al. 2013).

### **Einfluss des CYP3A5-Expressionsstatus auf Vitamin D-Spiegel und Knochendichte**

Funktionell wurde in dieser Arbeit der Einfluss des *CYP3A5\*3*-Genotyps als Marker der CYP3A5-Expression auf den VD-Status wie auch auf die Knochenmineraldichte zweier

Studienpopulationen europäischer Herkunft untersucht. Hier zeigte sich bei beiden Variablen und Studiengruppen kein überzufälliger Einfluss der CYP3A5-Expression. Für die ungarische Population konnten Bacsı und Kollegen jedoch bereits zeigen, dass homozygote Träger der *CYP3A7\*1C*-Variante eine verringerte Knochendichte der Lendenwirbel aufwiesen bei zugleich verändertem Serumspiegel des Dehydroepiandrosteron-Sulfat (Bacsı et al. 2007). Dies legt nahe, dass durchaus Kovariablen berücksichtigt werden müssen. Eine differenzierte Betrachtung ist ferner aufgrund der geringen Kopplung der Allele *CYP3A5\*3* und *CYP3A7\*1C* notwendig, wie Daten der europäischen HapMap-Populationen (Release 3, CEU und TSI) bei Betrachtung mit Haploview zeigen (Barrett et al. 2005). Aufgrund fehlender Determination der sieben SNPs des *CYP3A7\*1C* im Rahmen des HapMap-Projekts lassen diese zwar nur eine grobe Beurteilung des Kopplungsgrades zu, zeigen aber, dass benachbarte SNPs des *CYP3A7* eine geringe Kopplung zu *CYP3A5\*3* aufweisen und letzteres darüber hinaus nicht zum gleichen Kopplungsblock gehört, der neben Teilen des *CYP3A4* und *CYP3A5* das gesamte *CYP3A7* einschließt.

Denkbare Kofaktoren für eine statistische Kovarianzanalyse wären zum einen der Entnahmezeitpunkt der Proben, um die gezeigte saisonale Variabilität des VD-Status zu berücksichtigen, zum zweiten die Einnahme von CYP3A-regulierenden Medikamenten, die so möglicherweise die Prädikivität des *CYP3A5\*3*-Allels für die Expression mindern. Vorangegangene Studien zeigten, dass auch der BMI der Probanden aufgrund der starken Lipophilie der VD-Metaboliten für den VD-Status relevant ist (vgl. Kremer et al. 2009, S. 107, Lagunova et al. 2009, Baradaran et al. 2012).

### **Die Rolle der CYP3A in psoriatischer Haut**

Auch bei Psoriasis wurde eine verminderte CYP3A5-Expression beschrieben. Bereits 2003 zeigten Smith et al., dass die CYP3A5-mRNA in psoriatischer Haut um 50 % gegenüber Haut gesunder Probanden trotz gleichzeitiger Expansion epidermaler Kompartimente als Hauptexpressionsort der CYP3A reduziert war (Smith et al. 2003, Li et al. 2014). Psoriasis (Schuppenflechte) ist eine chronische Entzündung der Haut, bei der die betroffenen Hautareale, sogenannte Plaques, gerötet sind, silbrig-weiße Schuppen aufweisen und mit Juckreiz einhergehen (Mason et al. 2013). In RNA-seq-Daten konnte sowohl die Reduktion der CYP3A5-mRNA reproduziert als auch zudem für alle CYP3A-Isozyme gezeigt werden. Auch zeigte sich in weiteren Daten psoriatischer Haut, dass sich die Reduktion auf läsionale Haut beschränkt und nicht per se generell in Haut psoriatischer Patienten auftritt. Interessanterweise korreliert die Prävalenz der Schuppenflechte wie auch die Expression der CYP3A mit dem geographischen Breitengrad, d. h. je nördlicher desto geringer die CYP3A-Expression und desto höher die Inzidenz der Psoriasis (Menter & Stoff 2010, S. 11). So tritt Psoriasis am seltensten in Asien, und in Afrika etwa halb so häufig wie in Europa auf (Menter & Stoff 2010, S. 11). Doch auch in US-Bürgern afrikanischer Herkunft ist die Inzidenz verringert. Hier wäre im Falle der Abhängigkeit

von UV-Strahlung zu erwarten, dass die Prävalenz aufgrund der geringeren Sonneneinstrahlung und verminderten VD-Synthese wie in der endogenen Bevölkerung erhöht sein müsste, im Falle eines Zusammenhangs der genetischen Herkunft und nicht zuletzt dem CYP3A-Expressionsniveau jedoch nicht. Im Schweregrad unterliegt die Erkrankung wie auch der VD-Status saisonalen Schwankungen und ist im Winter stärker ausgeprägt als im Sommer. So ist es nicht überraschend, dass zur topischen Therapie der Schuppenflechte u. A. auch VD-Analoga eingesetzt werden (Mason et al. 2013). Zwar wurden in dieser Arbeit nur physiologische VD-Metaboliten eingesetzt und *in vitro* getestet, doch könnte die Behandlung mit VD-Analoga die CYP3A-Expression der Haut auch *in vivo* induzieren. So würde die erniedrigte Expression in erkrankten Hautarealen möglicherweise auf das von nicht-involvierter Haut erhöht. Ob dies jedoch tatsächlich der Fall ist und dann eher einen Nebeneffekt der Behandlung darstellt oder möglicherweise einen Anteil am Therapieerfolg hat, bleibt offen.

### **Selektion der *CYP3A*-Lokus in Europäern**

Entsprechend der Hypothese ist zu erwarten, dass die positiv selektierte *CYP3A*-Variante zeitlich und räumlich mit der Migration der Bevölkerung und damit einhergehender verminderter UV-Exposition zusammenfiel und es im Zuge dessen zu Veränderungen der Allelfrequenzen ähnlich den Genen der Pigmentierung gekommen ist. Zum einen könnte dies vor etwa 60.000 Jahren nach der großen Migration des modernen Menschen aus Afrika (Jobling 2004, S. 283, 286 u. A.) bzw. parallel zum Einsetzen der Selektion der Depigmentierung vor 30.000 Jahren gewesen sein (Beleza et al. 2013). Denkbar wäre auch der Zeitraum der neolithischen Expansion, bei der sich die neolithische Bevölkerung mit ihrer Landwirtschaftskultur erst nach der letzten Kaltzeit vor 10.000 Jahren in den Norden Europas verbreitete. Auch dieser Zeitraum überlappt mit den in Europa selektierten Allelen der Depigmentierung (Beleza et al. 2013). In der jeweiligen ancestralen Population, der neolithischen der Schwarzmeerregion bzw. der afrikanischen, sollte somit der ancestrale *CYP3A*-Haplotypus vermehrt auftreten. Mit anderen Worten sollten die als positiv selektierten *CYP3A*-Varianten wesentlich seltener sein als in heutigen Europäern. Vergleichbare Frequenzen hingegen würden einen selektionsunabhängigen Gründereffekt unterstützen oder zumindest für einen anderen Zeitpunkt der Selektion sprechen. Betrachtet man das Alter des *CYP3A5\*3*-Allels von ca. 76.000 Jahren (Bains et al. 2013), so liegt dies zumindest vor beiden großen Migrationsbewegungen des modernen Menschen Europas und schließt die Entstehung dieses Polymorphismus während der Besiedelungswelle des modernen Menschen aus. Auch die Allelfrequenzen rezenter afrikanischer Populationen, die sich deutlich von nicht-afrikanischen unterscheiden (Abb. 1), legt die Selektion während der Wanderung „*out-of-Africa*“ beginnend vor 60.000 Jahren nahe.

Ob die Selektion jedoch später stattfand, kann so nicht ausgeschlossen werden. Über die Allelfrequenz des *CYP3A5\*3*- und anderer funktionell relevanter *CYP3A*-Allele lagen bis

dato keine Daten paläolithischer oder neolithischer Populationen vor, sodass eine Einschätzung und Datierung des *selective sweeps* auf Basis populationsgenetischer Daten zwar auf den Zeitraum von vor 60.000 Jahren bis heute eingegrenzt, jedoch nicht genauer erfolgen konnte. Im Rahmen ihrer Promotion untersuchte Frau Sandra Wilde der Arbeitsgruppe Paläogenetik des anthropologischen Instituts der Johannes Gutenberg-Universität Mainz 60 neolithische Skelettfunde der pontischen Steppe an mehreren funktionellen genetischen Marker, darunter der Locus des *CYP3A4\*1B*-Allels. Die pontische Steppe im Norden und Nord-Osten des Schwarzen Meeres gilt als ein möglicher Ausgangspunkt der neolithischen Expansion (Bramanti et al. 2009). Dabei wiesen alle untersuchten Individuen bereits das in Europa vorherrschende A-Allel auf (persönliche Mitteilung von Frau Sandra Wilde, November 2013). Nimmt man an, dass die untersuchten Individuen der tatsächlich ancestralen Population entsprachen, so könnte der Zeitpunkt der Selektion zwischen 60.000 und 3.500 Jahren vor heute eingegrenzt werden. Dies spräche eher für eine Selektion während der Wanderung des anatomisch modernen Menschen aus Afrika.

Aufgrund der starken Kopplung der Allele *CYP3A4\*1B* und *CYP3A5\*3*, von denen letzteres sehr wohl auf mRNA- und Proteinmenge in humaner Haut funktionell relevant ist, schlägt dies den Bogen der Signaturen positiver Selektion auf DNA-Ebene (Schirmer et al. 2006, Polimanti et al. 2012) zu einem funktionellen Phänotyp, der Ansatzpunkt natürlicher Selektion gewesen sein könnte. Auch das Vorhandensein des genetischen Polymorphismus nicht zu lange vor der Migration des modernen Menschen aus Afrika, sowie die Korrelation dessen Häufigkeit mit geographischer Breite v. a. in nördlicher Richtung (Bains 2013) schließt VD als selektierenden Faktor nicht aus. Die fehlende Korrelation der Inzidenz des *CYP3A5\*3*-Allels in südlichen Breiten (Bains et al. 2013) könnte in der rezenteren Besiedelung von weniger als 20.000 Jahren in (Süd-) Amerika und Ozeanien (Jobling 2004, S. 351f und 355f) sowie der geringen Ausgangspopulationsgröße mit verstärktem Einfluss von Gründereffekten und genetischem Drift begründet sein. Auch die heutige Bevölkerung konzentriert sich zu 90 % auf der nördlichen Hemisphäre (Heineberg 2006) und ermöglicht so aufgrund der höheren Datendichte eine genauere Kartierung genetischer Unterschiede. Interessanterweise zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der UV-abhängigen VD-Syntheserate und der Hautfarbe (Bogh et al. 2010), was wie einleitend beschrieben zum einen an der eingesetzten UVB-Strahlungsdosis liegen könnte. Zum anderen spricht eine dunklere Haut vereinfacht gesprochen für einen zumindest höheren Anteil des afrikanischen Genpools und eine damit einhergehende erhöhte *CYP3A*-Expression durch die höhere Frequenz des *CYP3A5\*1*-Allels. Diese könnte letztlich mit dem verstärkten Abbau des produzierten VD und dessen Vorstufen einhergehen.

Trotz der polymorphen *CYP3A5*-Expression an allen Hauptorganen der VD-Synthese - Haut, Leber und Niere - konnte bislang kein Zusammenhang des *CYP3A5\*3*-Allels weder mit dem systemischen VD-Status noch der Knochenmineraldichte gezeigt werden. Dies bestätigt zwar genomweite Studien zur Genetik von Osteoporose (Zheng et al. 2011), nicht

aber die Hypothese dieser Arbeit. Streng genommen wird letztere dadurch aber auch nicht falsifiziert. Zum einen ermöglicht die Knochendichte nur indirekte und wenig prädiktive Rückschlüsse auf eine gesunde Knochenstruktur (Kassenärztliche Bundesvereinigung Berlin 04/2013, Fortelka 21.02.2013). Zum anderen ist auch der Einfluss des VD-Status auf die Entstehung von Osteoporose eher gering (Kremer et al. 2009, Zheng et al. 2011), bei Rachitis hingegen evident (Ray et al. 2009). Nicht zuletzt ist auch das Krankheitsbild der Osteoporose anders als Rachitis und Osteomalazie vielmehr mit dem oft altersabhängigen Abbau der Knochensubstanz als der initialen Knochenentwicklung assoziiert (Bartl & Bartl 2004, S. 5ff). Dies betrifft demnach die post-reproduktive Lebensphase (Melton et al. 1999, Felsenberg et al. 2002, Lorrain et al. 2003) und nimmt letztlich keinen Einfluss auf die Fertilität. Osteoporose beeinflusst aufgrund von Frakturen v. a. die Lebensqualität der Betroffenen, wenn auch die Sterblichkeit nach einer Oberschenkelfraktur von 12-34% liegt (Bartl & Bartl 2004, S. 3). Dies wurde jedoch bislang nur für ältere Patienten beschrieben (Bliuc et al. 2009) und geht daher höchst wahrscheinlich mit der allgemein erhöhten, altersbedingten Mortalität bzw. Komorbidität einher. Osteoporose ist aufgrund dessen als selektionsrelevanter Phänotyp per se auszuschließen. Nichts destotrotz ist einzugestehen, dass die Auswahl der Studienpopulation zwar u. A. aufgrund der allgemein schlechten Verfügbarkeit solcher klinischen Daten und Proben zumindest für die Verifizierung der Hypothese hätte dienen können, für die Falsifizierung jedoch nicht optimal war. Ein Vergleich der *CYP3A5*\*3-Allelfrequenz zwischen rachitischen Patienten und einer entsprechenden Kontrollgruppe könnte hier deutlich klarere Aussagen ermöglichen.

## Fazit

Diese Arbeit liefert Hinweise für die Rolle der CYP3A im VD-Stoffwechsel. CYP3A4, CYP3A5 und CYP3A7 bauen VD zu einem oder mehreren bislang noch nicht identifizierten Metaboliten, nicht jedoch in 25-V<sub>D</sub>, den unmittelbaren Vorläufer des aktiven Hormons Calcitriol ab. VD entsteht zu 90 % photolytisch in der Haut. Dort zeigen CYP3A-Enzyme allgemein und CYP3A5 im Besonderen, eine beachtenswerte Expression und koloalisieren mit den Orten der kutanen VD-Synthese. Die kutane Expression der CYP3A wie auch die deren Regulatoren, den nukleären Rezeptoren der NR1I-Familie unterscheidet sich qualitativ wie auch quantitativ von der der Leber. Neben mRNA-Daten zeigen Reporter-Gen-Versuche, dass CYP3A durch Calcitriol und dessen direkte Vorstufen induziert werden und VDR auch in der Haut als Hauptvermittler dieser Effekte am Beispiel der untersuchten CYP3A gilt. Die Affinitäten der einzelnen VD-Metaboliten deckten sich mit deren Potenz die Expression der CYP3A allgemein und von CYP3A4 im Besonderen zu induzieren. Die niedrige Expression der CYP3A wie auch die Expressionsregulation durch VD-Metaboliten und das Profil der Expressionsregulatoren mit VDR als deutlich am stärksten exprimierten Vertreter sprechen zusammen mit der katabolen Aktivität der CYP3A gegenüber VD-Metaboliten für eine eher physiologische als Arzneimittel-metabolisierende Rolle der CYP3A in der Haut. Neben einer lokal relevanten ist darüber hinaus eine systemisch wirksame Regulation der VD-Synthese wahrscheinlich. Da CYP3A5 als dominantes CYP3A-Isozym auch in der Haut polymorph abhängig vom CYP3A5\*3-Allel exprimiert ist, legt dies nahe solche interindividuelle Unterschiede im klinischen Umfeld zu berücksichtigen. Da CYP3A5 darüber hinaus in allen Organen der primären VD-Synthese - Haut, Leber und Niere - polymorph exprimiert ist, könnte die Rolle der CYP3A im VD-Metabolismus die positive Selektion des CYP3A-Lokus in Europäern vermittelt haben.

## Anhang

Tab. S 1: Verfügbare Parameter zweier europäischer Studienpopulationen  
Zu den DNA-Proben wurden weitere bereits bestimmte Messwerte von Profes. Petér Lakatos (Bacsi et al. 2007) und Heide Siggelkow zur Verfügung gestellt. Aufgeführt sind alle Parameter unter Angabe der Einheit und Anzahl der verfügbaren individuellen Messwerte sowie z. T. eine Beschreibung des gemessenen Parameters.

Parameter	Beschreibung	Budapest, n = 250	Göttingen, n = 461
Entnahmezeitpunkt	nicht variabel/Datum verfügbar	250 (nv)	460 (Dv)
Alter (Untersuchung)	Jahre	250	439
Alter (Menarche)	Jahre	211	na
Geschlecht	M/W	0/250	125/317
Gewicht	kg	236	436
Größe	m	236	438
Taillenumfang	cm	140	na
Körperoberfläche	m <sup>2</sup>	na	440
<b>Knochengesundheit</b>			
Hüfte BMD	Messung am Femurals bzw. an der Gesamthüfte, g/cm <sup>2</sup>	201	386
Hüfte Z-Wert	berechnet mit der jeweiligen Gerätesoftware anhand der deutschen Referenzpopulation	195	376
Hüfte T-Wert		226	384
Wirbel BMD	Messung an L2-L4 bzw. L1-L4, g/cm <sup>2</sup>	226	398
Wirbel Z-Wert	berechnet mit der jeweiligen Gerätesoftware anhand der deutschen Referenzpopulation	250	384
Wirbel T-Wert		250	395
Frakturen	Anzahl, ohne Trauma	212	434
Osteoporose	Diagnose: primär, sekundär, Osteopenie, gesund	250	399/394
Größenabnahme	cm	na	424
<b>allgemeine Krankengeschichte</b>			
Diabetes mellitus		na	434
Magen-Darm	Magen-OP, chron. Darmerkrankungen, Durchfall	na	434
Niere	Nierensteine, -OP, chron. Nierenerkrankung	na	434
Leber	chron. Lebererkrankung, Pankreatitis	na	434
Immunsystem	Asthma bronchiale, rheumatische Erkrankungen	na	434
Gefäßsystem	Lungeninfarkt, Venenprobleme, Hypertonus, Schlaganfall	na	434
Geschlechtsorgane	Brustkrebs, Eierstockentfernung	na	434
Schilddrüse	Über-/Unterfunktion, OP	na	434
Sonstiges		na	358
<b>Blutparameter</b>			
25-VD	VD-Status, nmol/l	137	408
Kalzium	mmol/l	na	428
Phosphat	mmol/l	169	423
Kreatinin	µmol/l	169	416
Alkalische Phosphatase	Einheiten/l	168	429
Kalzium	mmol/l	169	428
Albumin	mg/l	169	na

Triglyzeride	mmol/l	146	na
DHEAS	µmol/l	245	na
PTH	pg/ml	na	416
<b>Urinparameter</b>			
Urinvolumen	ml	na	405
Kalzium	mg/dl	na	416
DPD	nM pro mM Kreatinin	na	418
Kreatinin	mg/dl	na	405
<b>Kofaktoren</b>			
Raucher	Ja/Nein	212	408
Alkohol	Ja/Nein	na	408
Diät	Milchprodukte, Sonstiges	na	396
Bewegung	Sport, Immobilität	na	392
<b>Medikation</b>			
Antiepileptika	Ja/Nein	na	427
Cortisol	Ja/Nein	na	428
Steroide	Ja/Nein	212	303
Schilddrüsenhormone	Ja/Nein	na	427
Antacida	Ja/Nein	na	424
Antirheumatika	Ja/Nein	na	424
Schlafmedikation	Ja/Nein	na	425
Calcitonin	Ja/Nein, Dauer	na	433
Bisphosphonate	Ja/Nein, Dauer	na	432
Flouridin	Ja/Nein, Dauer	na	432
SERM	Ja/Nein, Dauer	na	432
Hormone	Ja/Nein, Dauer	na	432
<b>Nahrungsergänzung</b>			
VD	Ja/Nein, Dauer	na	432
Kalzium	Ja/Nein, Dauer	na	432

Tab. S 2: Einbettprogramme histologischer Schnitte  
 Programm 1 oder 2 wurden mit dem Automaten Sakura Tissue Tek VIP E150/300 durchlaufen.

Programm 1 (MTA-Schule)			Programm 2 (Neuropathologie)		
Lösung	Dauer	Temperatur	Lösung	Dauer	Temperatur
50 % Isopropanol	30 min	40 °C	4 % Formalin	2 h	35 °C
70 % Isopropanol	je 1 h		70 % Ethano	je 55 min	
80 % Isopropanol			96 % Ethanol		
96 % Isopropanol			96 % Ethanol		
96 % Isopropanol			100 % Ethanol		
100 % Isopropanol			100 % Ethanol		
100 % Ethanol			100 % Ethanol		
Xylol-Ersatz			Xylol		
Xylol-Ersatz			Xylol		
Xylol-Ersatz			Xylol		
Paraffin		mind. 1 h	60 °C		Paraffin
Paraffin	Paraffin				
Paraffin	Paraffin				
Paraffin	Paraffin				

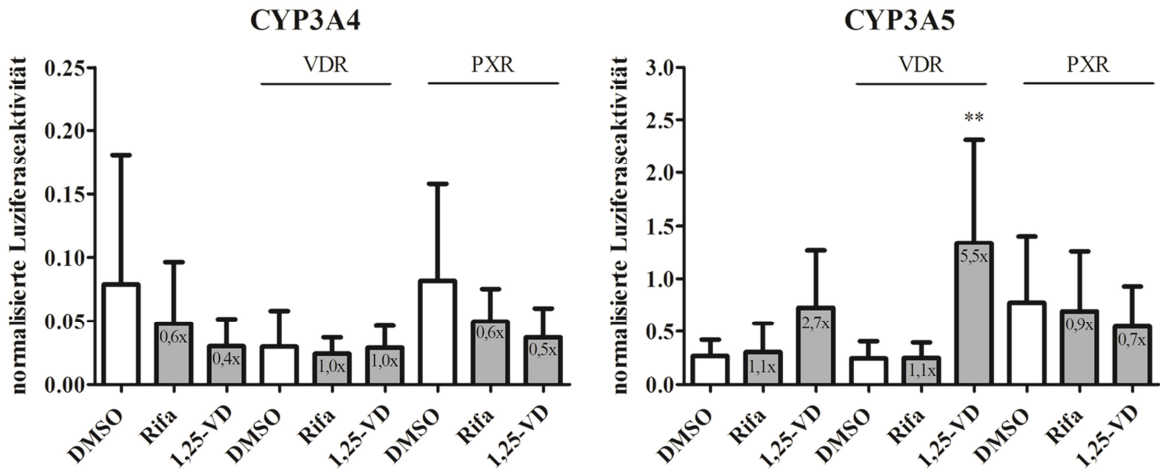


Abb. S 1: Substanz-abhängige Aktivität der proximalen *CYP3A*-Promotoren im Reporter-Gen-Assay  
 Dargestellt ist die mittlere normalisierte Luziferaseaktivität der Behandlungsgruppen gemessen in RLU mit Standardabweichung. Die proximalen Promotoren von *CYP3A4* (links) und *CYP3A5* (rechts) wurden mit Expressionsplasmiden von VDR bzw. PXR transient in humane immortalisierte Keratinozyten (HaCaT) transfiziert, Kontrollen mit der entsprechenden DNA-Menge des Leervektors. Die Zellen wurden anschließend mit Rifampicin (Rifa, 10 µM), 1,25-VD (500 nM) oder der entsprechenden Konzentration des Lösungsmittels (weiße Balken) behandelt. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mit parametrischer one-way ANOVA gegen die mit dem entsprechenden Lösungsmittel behandelte Zellen (weiße Balken) und Bonferroni-Korrektur für multiples Testen. Die Balkenbeschriftung gibt die Vielfache Änderung der gemessenen Reporteraktivität relativ zu Lösungsmittel-behandelten Zellen. Gemäß der Definitionen des verwendeten Programms GraphPad Prism v5.01 gilt für \*\*  $P < 0,01$ .

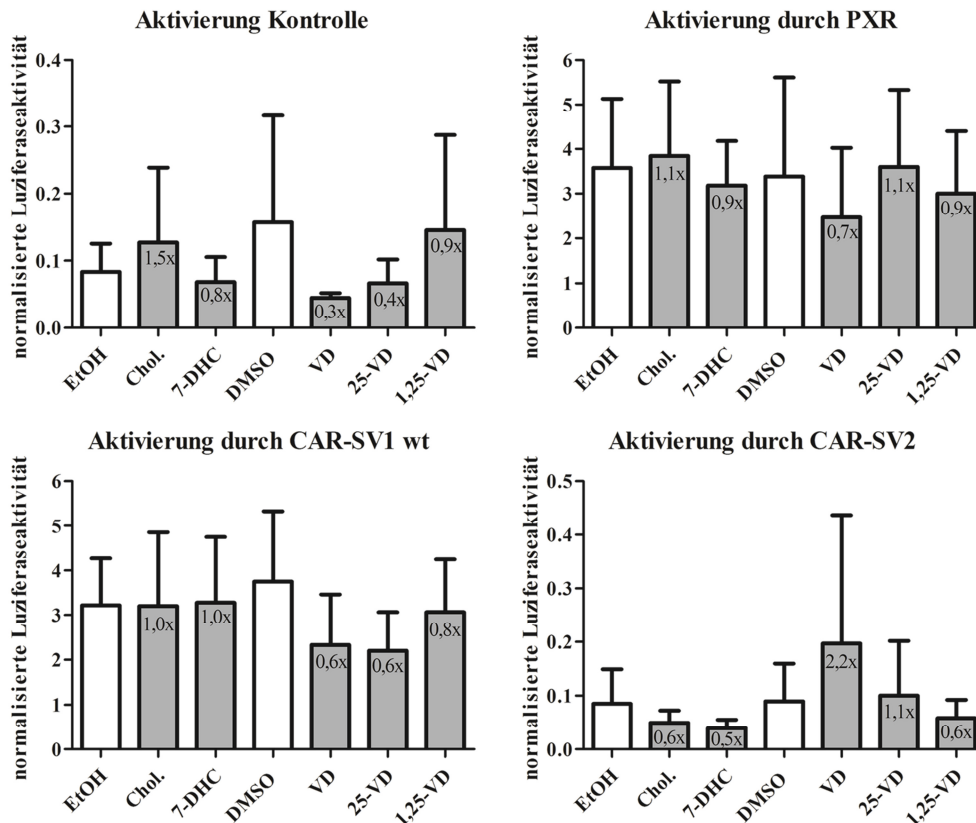


Abb. S 2: Aktivierung nukleärer Rezeptoren der II-Familie durch Vitamin D-Metaboliten  
 Dargestellt ist die Substanz-vermittelte Aktivierung der Interaktion des Leervektors ohne Ligandenbindedomäne sowie von PXR, CAR-SV1 wt und CAR-SV2 mit RXR $\alpha$  durch die Lösungsmittel Ethanol und DMSO, bzw. Cholesterol (Chol.), 7-Dehydrocholesterol (7-DHC), Vitamin D (VD), 25-Hydroxyvitamin D (25-VD) und 1,25-Dihydroxyvitamin D (1,25-VD). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung der normalisierten Luziferaseaktivität gemessen in relativen Lichteinheiten (RLU). Der Einfluss der Behandlung wurde parametrisch mit one-way ANOVA und Bonferroni post-hoc Test gegen Lösungsmittel-behandelte Zellen (weiße Balken) verglichen.

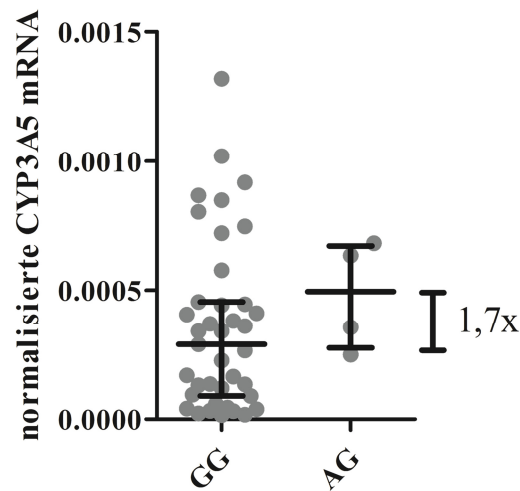


Abb. S 3: CYP3A5-mRNA-Expression in primären Keratinozyten nach *CYP3A5*\*3-Genotyp  
Gezeigt ist die relative CYP3A5-mRNA-Expression normalisiert auf die 18s rRNA-Menge nach der  $\Delta$ CT-Methode ( $2^{-\Delta CT}$ -Werte). Einzelne Punkte geben die pro Spender und Passage gemessenen Expression in DMSO-behandelten Zellen an. Für die Gruppen sind zudem Median und Interquartilsrange angegeben. Der Vergleich der Gruppenmittelwerte erfolgte mit einem einseitigen nicht-parametrischen t-Test nach Mann-Whitney. Der ermittelte *P*-Wert hierbei betrug  $P = 0,16$ .

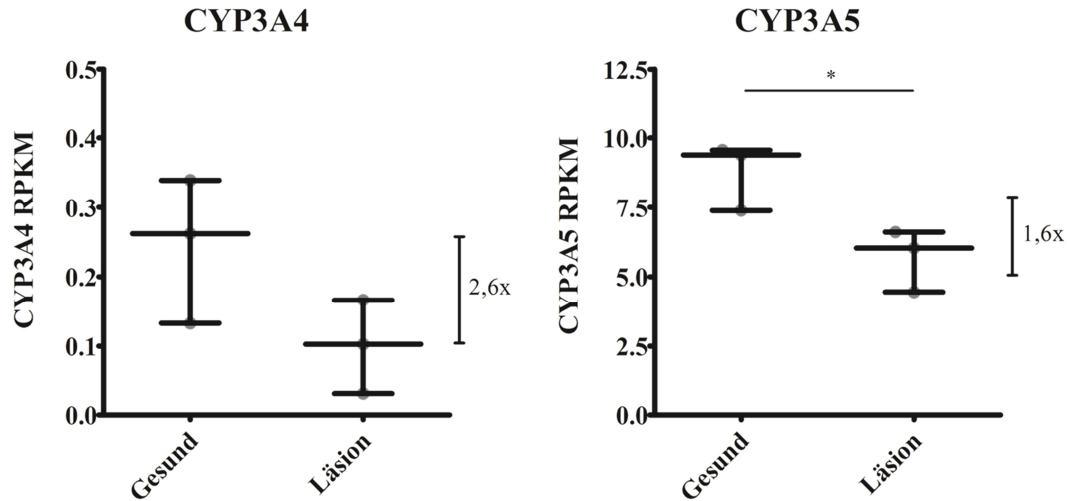


Abb. S 4: Expression von CYP3A4 und CYP3A5 in läsionaler und unbetreffener Haut psoriatischer Patienten  
Daten von läsionaler und gesunder Haut dreier Patienten stammen von Myrte Farinas (Jabbari et al. 2012). Dargestellt sind Expressionsdaten in RPKM (*reads per kilobase per million mapped reads*) von CYP3A4 und CYP3A5 als Individualdaten (graue Punkte) sowie als Medianwerte und Interquartilsrange der Gruppen. Der Vergleich der Expression gesunder und psoriatischer Häute erfolgte mit zweiseitigem, nicht-parametrischem t-Test nach Mann-Whitney. Dabei gilt für \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  und \*\*\*  $P < 0,001$ .

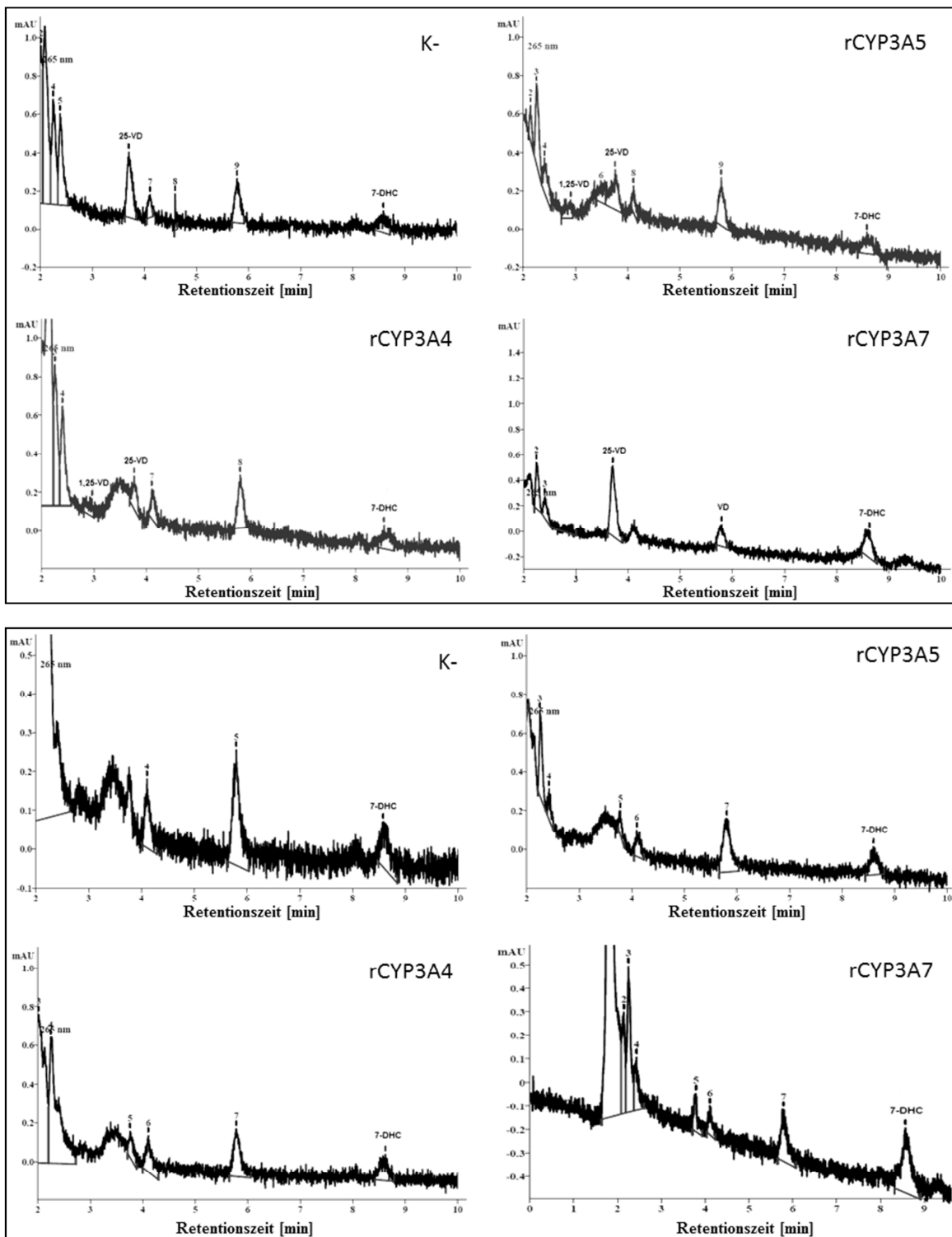


Abb. S 5: UV-Chromatogramme der Inkubation rekombinant exprimierter rCYP3A-Isozyme mit 25-Hydroxyvitamin D und 7-Dehydrocholesterol

10  $\mu$ M des 25-VD (oben) oder 7-DHC (unten) wurden mit 20 pmol rCYP3A (rCYP3A4, rCYP3A5, rCYP3A7) oder der entsprechenden Menge Cytochrom  $b_5$  als negative Kontrolle (K-) für 10 min bei 37 °C und 500 rpm im Heizblock inkubiert. Durch die Zugabe von 1 Vol 1x NADPH-Regenerationsystem wurde die Reaktion gestartet und weitere 90 min bei 37 °C und 500 rpm inkubiert. Alle Reaktionen wurden lichtgeschützt durchgeführt. Beendet wurde die Reaktion durch Fällung mit Methanol:Chloroform (1:1). Die lipophilen Substanzen der Chloroformphase wurden eingedampft und bei -20 °C gelagert. Für die HPLC wurden sie in 100  $\mu$ l Acetonitril mit 0,1 % Tetrahydrofluran aufgenommen. Für die erste Messung wurden 10  $\mu$ l injiziert. Die UV-Detektion erfolgte bei 265 nm. Die Zuordnung einzelner VD-Metaboliten erfolgte anhand einer Standardreihe und durch Zugabe des entsprechenden Metaboliten bei einer zweiten Injektion.

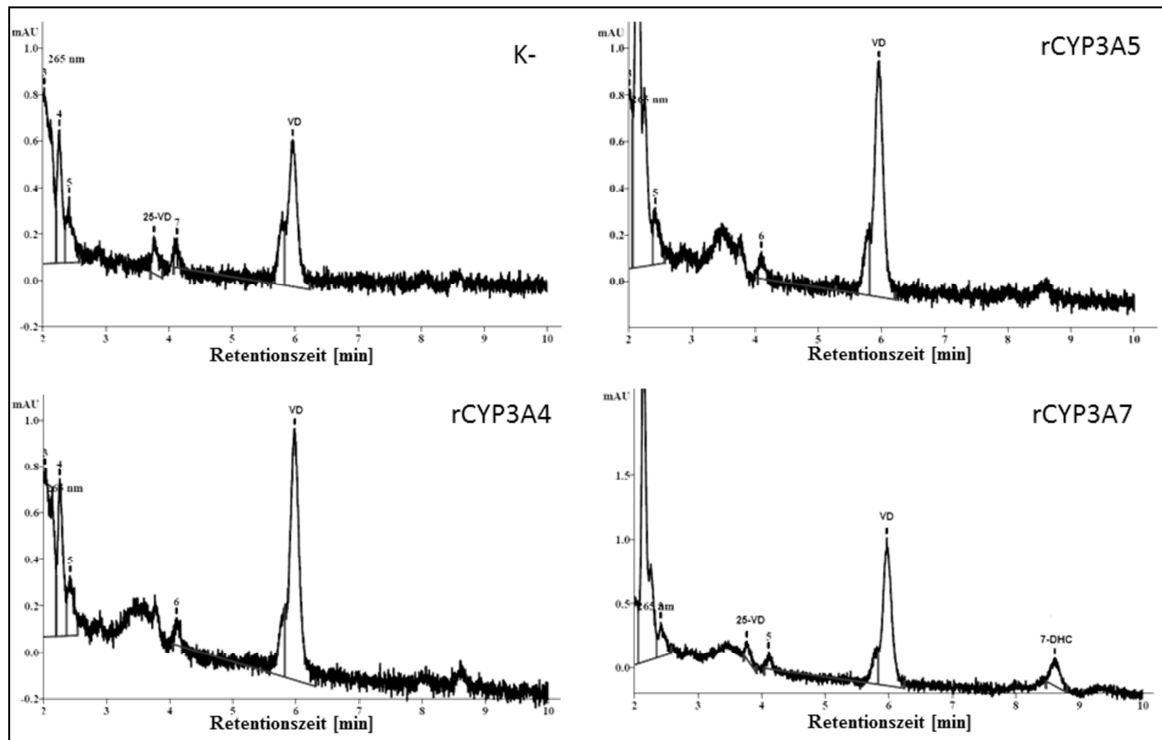


Abb. S 6: UV-Chromatogramme der Inkubation rekombinant exprimierter rCYP3A-Isozyme mit Vitamin D  $10 \mu\text{M}$  des VD wurden mit  $20 \text{ pmol}$  rCYP3A (rCYP3A4, rCYP3A5, rCYP3A7) oder der entsprechenden Menge Zytochrom  $b_5$  (K-) für  $10 \text{ min}$  bei  $37^\circ\text{C}$  und  $500 \text{ rpm}$  im Heizblock inkubiert. Durch die Zugabe von  $1 \text{ Vol } 1\times$  NADH-Regenerationsystem wurde die Reaktion gestartet und weitere  $90 \text{ min}$  bei  $37^\circ\text{C}$  und  $500 \text{ rpm}$  inkubiert. Alle Reaktionen wurden lichtgeschützt durchgeführt. Beendet wurde die Reaktion durch Fällung mit Methanol:Chloroform (1:1). Die lipophilen Substanzen der Chloroformphase wurden eingedampft und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Für die HPLC wurden sie in  $100 \mu\text{l}$  Acetonitril mit  $0,1\%$  Tetrahydrofluran aufgenommen. Für die erste Messung wurden  $10 \mu\text{l}$  injiziert. Die UV-Detektion erfolgte bei  $265 \text{ nm}$ . Die Zuordnung einzelner VD-Metaboliten erfolgte anhand einer Standardreihe und durch Zugabe des entsprechenden Metaboliten bei einer zweiten Injektion.

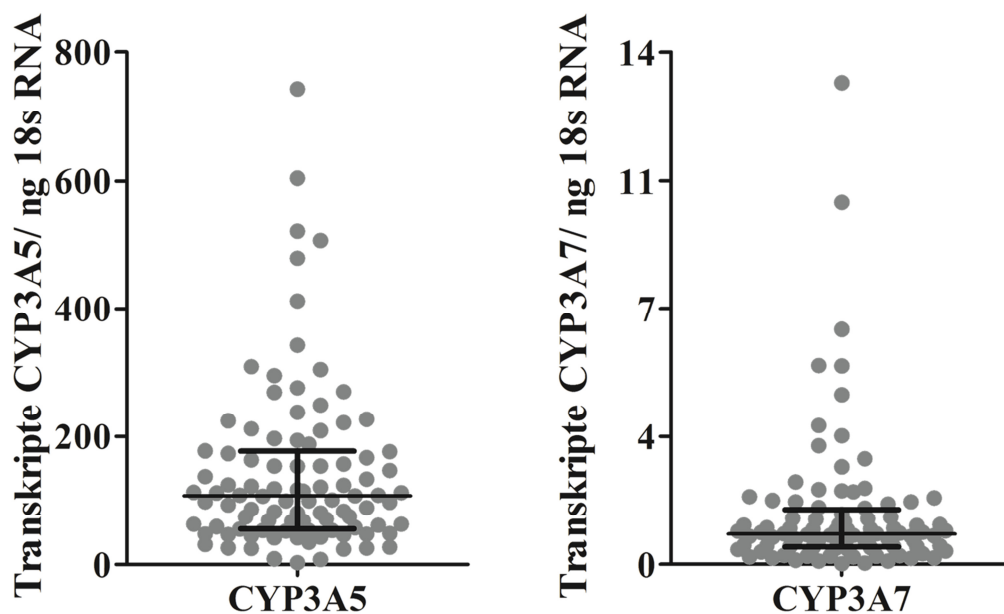


Abb. S 7: Expression von CYP3A5 und CYP3A7 in 96 humanen Hautbiopsien. Gezeigt ist die normalisierte mRNA-Expression von CYP3A5 (links) und CYP3A7 (rechts). Die Quantifizierung erfolgte mit qRT-PCR normalisiert auf die Expression der 18S rRNA nach der  $\Delta\text{CT}$ -Methode relativ zu einer Standardreihe.

## Bibliographie

- Ahn, J. et al. 2008. Serum vitamin D concentration and prostate cancer risk: a nested case-control study. *J Natl Cancer Inst* 100: 796-804
- Aoki, K. 2002. Sexual selection as a cause of human skin colour variation: Darwin's hypothesis revisited. *Ann Hum Biol* 29: 589-608
- Applied Biosystems, A. 2010. TaqMan OpenArray Genotyping Troubleshooting guide. 4401671  
[http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms\\_065473.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_065473.pdf) (27.11.2013)
- Arnold, K. A. et al. 2004. Alternative splicing affects the function and tissue-specific expression of the human constitutive androstane receptor. *Nucl Recept* 2: 1
- Bacsi, K. et al. 2007. CYP3A7\*1C polymorphism, serum dehydroepiandrosterone sulfate level, and bone mineral density in postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 80: 154-9
- Baden, H. P. et al. 1987. Isolation and characterization of a spontaneously arising long-lived line of human keratinocytes (NM 1). *In Vitro Cell Dev Biol* 23: 205-13
- Bains, R. K. et al. 2013. Molecular diversity and population structure at the Cytochrome P450 3A5 gene in Africa. *BMC Genet* 14: 34
- Baradaran, A. et al. 2012. Association of body mass index and serum vitamin D level in healthy Iranian adolescents. *Endokrynol Pol* 63: 29-33
- Baron, J. M. et al. 2001. Expression of multiple cytochrome p450 enzymes and multidrug resistance-associated transport proteins in human skin keratinocytes. *J Invest Dermatol* 116: 541-8
- Barrett, J. C. et al. 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21: 263-5
- Bartl, R. & Bartl, C. 2004. Osteoporose-Manual. Diagnostik, Prävention und Therapie. Springer, Berlin Heidelberg
- Basu, A. et al. 2008. Genome-wide distribution of ancestry in Mexican Americans. *Hum Genet* 124: 207-14
- Beleza, S. et al. 2013. The timing of pigmentation lightening in Europeans. *Mol Biol Evol* 30: 24-35
- Berglund, S. R. et al. 2007. Optimized methodology for sequential extraction of RNA and protein from small human skin biopsies. *J Invest Dermatol* 127: 349-53
- Bigby, M. 2001. Rates of cutaneous reactions to drugs. *Arch Dermatol* 137: 765-70
- Bikle, D. et al. 2007. Sequential regulation of keratinocyte differentiation by 1,25(OH)2D3, VDR, and its coregulators. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103: 396-404
- Bikle, D. D. et al. 1994. Production of 1,25 dihydroxyvitamin D3 by perfused pig skin. *J Invest Dermatol* 102: 796-8
- Bikle, D. D. et al. 1986a. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 production by human keratinocytes. Kinetics and regulation. *J Clin Invest* 78: 557-66
- Bikle, D. D. et al. 1986b. Neonatal human foreskin keratinocytes produce 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Biochemistry* 25: 1545-8
- Björkhem-Bergman, L. et al. 2013. Serum levels of 25-hydroxyvitamin D and the CYP3A biomarker 4beta-hydroxycholesterol in a high-dose vitamin D supplementation study. *Drug Metab Dispos* 41: 704-8
- Blaney, G. P. et al. 2009. Vitamin D metabolites as clinical markers in autoimmune and chronic disease. *Ann N Y Acad Sci* 1173: 384-90
- Bliuc, D. et al. 2009. Mortality risk associated with low-trauma osteoporotic fracture and subsequent fracture in men and women. *JAMA* 301: 513-21
- Bogh, M. K. et al. 2010. Vitamin D production after UVB exposure depends on baseline vitamin D and total cholesterol but not on skin pigmentation. *J Invest Dermatol* 130: 546-53
- Bognar, A. 1992. [Determination of vitamin D in food using high performance liquid chromatography (HPLC). Results of collaborating studies of the working group "Vitamin Analysis" according to section 35 of the German Food Act]. *Z Lebensm Unters Forsch* 194: 469-75
- Bolbrinker, J. et al. 2012. CYP3A5 genotype-phenotype analysis in the human kidney reveals a strong site-specific expression of CYP3A5 in the proximal tubule in carriers of the CYP3A5\*1 allele. *Drug Metab Dispos* 40: 639-41
- Boukamp, P. et al. 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106: 761-71
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54

- Bramanti, B. et al. 2009. Genetic discontinuity between local hunter-gatherers and central Europe's first farmers. *Science* 326: 137-40
- Brawand, D. et al. 2011. The evolution of gene expression levels in mammalian organs. *Nature* 478: 343-8
- Brohem, C. A. et al. 2011. Artificial skin in perspective: concepts and applications. *Pigment Cell Melanoma Res* 24: 35-50
- Bros, M. et al. 2003. The human fascin gene promoter is highly active in mature dendritic cells due to a stage-specific enhancer. *J Immunol* 171: 1825-34
- Burk, O. et al. 2005. Antimalarial artemisinin drugs induce cytochrome P450 and MDR1 expression by activation of xenosensors pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Mol Pharmacol* 67: 1954-65
- Burk, O. et al. 2004. The induction of cytochrome P450 3A5 (CYP3A5) in the human liver and intestine is mediated by the xenobiotic sensors pregnane X receptor (PXR) and constitutively activated receptor (CAR). *J Biol Chem* 279: 38379-85
- Burk, O. et al. 2002. Molecular mechanisms of polymorphic CYP3A7 expression in adult human liver and intestine. *J Biol Chem* 277: 24280-8
- Cali, J. et al. 2005. Screen for cytochrome P450 activity using a luminescent assay. *Cell Notes* 13: 8-10
- Campbell, F. C. et al. 2010. The yin and yang of vitamin D receptor (VDR) signaling in neoplastic progression: operational networks and tissue-specific growth control. *Biochem Pharmacol* 79: 1-9
- Carpenter, K. J. & Zhao, L. 1999. Forgotten mysteries in the early history of vitamin D. *J Nutr* 129: 923-7
- Cerqueira, C. C. et al. 2012. Predicting Homo pigmentation phenotype through genomic data: from Neanderthal to James Watson. *Am J Hum Biol* 24: 705-9
- Chen, H. et al. 2010. Population differentiation as a test for selective sweeps. *Genome Research* 20: 393-402
- Chen, X. et al. 2009. Molecular population genetics of human CYP3A locus: signatures of positive selection and implications for evolutionary environmental medicine. *Environ Health Perspect* 117: 1541-8
- Cheng, J. et al. 2013. Intestinal CYP3A4 protects against lithocholic acid-induced hepatotoxicity in vitamin D receptor intestine-deficient mice. *J Lipid Res*
- Cho, H. Y. et al. 2013. In vivo deletion of CAR resulted in high bone mass phenotypes in male mice. *J Cell Physiol*
- Christakos, S. et al. 2013. Vitamin D: beyond bone. *Ann N Y Acad Sci* 1287: 45-58
- Christophers, E. & Ständer, M. 2003. *Haut- und Geschlechtskrankheiten*. Urban & Fischer München 7
- Clemens, T. L. et al. 1982. Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesise vitamin D<sub>3</sub>. *Lancet* 1: 74-6
- Daly, A. K. 2006. Significance of the minor cytochrome P450 3A isoforms. *Clin Pharmacokinet* 45: 13-31
- Deb, S. et al. 2012. Cytochrome P450 3A-mediated microsomal biotransformation of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in mouse and human liver: drug-related induction and inhibition of catabolism. *Drug Metab Dispos* 40: 907-18
- Deeb, K. K. et al. 2007. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 7: 684-700
- Diczfalusy, U. & Bjorkhem, I. 2011. Still another activity by the highly promiscuous enzyme CYP3A4: 25-hydroxylation of cholesterol. *J Lipid Res* 52: 1447-9
- Diczfalusy, U. et al. 2009. 4 $\beta$ -hydroxycholesterol as an endogenous marker for CYP3A4/5 activity. Stability and half-life of elimination after induction with rifampicin. *Br J Clin Pharmacol* 67: 38-43
- Diczfalusy, U. et al. 2008. 4 $\beta$ -hydroxycholesterol is a new endogenous CYP3A marker: relationship to CYP3A5 genotype, quinine 3-hydroxylation and sex in Koreans, Swedes and Tanzanians. *Pharmacogenet Genomics* 18: 201-8
- Diczfalusy, U. et al. 2011. 4 $\beta$ -Hydroxycholesterol, an endogenous marker of CYP3A4/5 activity in humans. *Br J Clin Pharmacol* 71: 183-9
- Diffey, B. L. 1991. Solar ultraviolet radiation effects on biological systems. *Phys Med Biol* 36: 299-328
- Doll, A. et al. 2010. *Duale Reihe. Anatomie*. Georg Thieme Verlag 2: 1165
- Dong, M. S. et al. 2013. Co-expression of human cytochrome b5 increases expression of cytochrome P450 3A4 in *Escherichia coli* by stabilizing mRNA. *Protein Expr Purif* 89: 44-50
- Drocourt, L. et al. 2002. Expression of CYP3A4, CYP2B6, and CYP2C9 is regulated by the vitamin D receptor pathway in primary human hepatocytes. *J Biol Chem* 277: 25125-32
- Du, L. et al. 2006a. Differentiation-specific factors modulate epidermal CYP1-4 gene expression in human skin in response to retinoic acid and classic aryl hydrocarbon receptor ligands. *J Pharmacol Exp Ther* 319: 1162-71

- Du, L. et al. 2006b. Effects of the differentiated keratinocyte phenotype on expression levels of CYP1-4 family genes in human skin cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 213: 135-44
- Dusso, A. S. 2011. Kidney disease and vitamin D levels: 25-hydroxyvitamin D, 1,25-dihydroxyvitamin D, and VDR activation. *Kidney International Supplements* 1: 136-141
- Easterbrook, J. et al. 2001. Effects of organic solvents on the activities of cytochrome P450 isoforms, UDP-dependent glucuronyl transferase, and phenol sulfotransferase in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 29: 141-4
- Ellfolk, M. et al. 2009. Regulation of human vitamin D(3) 25-hydroxylases in dermal fibroblasts and prostate cancer LNCaP cells. *Mol Pharmacol* 75: 1392-9
- Emrich, F. (03.07.2012) Grundlagen zur UV-Strahlung. Vol. 1.3.2013. pp. Bundesamt für Strahlenschutz (BfS),
- Emrich, F. (27.06.2012) Wie wirkt UV-Strahlung?, Vol. 1.3.2013. pp. Bundesamt für Strahlenschutz (BfS),
- Engelman, C. D. et al. 2010. Genome-wide association study of vitamin D concentrations in Hispanic Americans: the IRAS family study. *J Steroid Biochem Mol Biol* 122: 186-92
- Evetts, I. W. et al. 2000. The impact of the principles of evidence interpretation on the structure and content of statements. *Sci Justice* 40: 233-9
- Fabian, E. et al. 2011. Intake of medication and vitamin status in the elderly. *Ann Nutr Metab* 58: 118-25
- Falsone, S. F. et al. 2001. Ligand affinity, homodimerization, and ligand-induced secondary structural change of the human vitamin d receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 285: 1180-5
- Felsenberg, D. et al. 2002. Incidence of vertebral fracture in europe: results from the European Prospective Osteoporosis Study (EPOS). *J Bone Miner Res* 17: 716-24
- Fernandez, J. M. & Hoeffler, J. P. 1999. Gene expression systems : using nature for the art of expression. Academic Press, San Diego
- Fisher, J. M. et al. 1999. First-pass midazolam metabolism catalyzed by 1alpha,25-dihydroxy vitamin D3-modified Caco-2 cell monolayers. *J Pharmacol Exp Ther* 289: 1134-42
- Fleige, S. & Pfaffl, M. W. 2007. Einfluss der RNA-Integrität auf die quantitative real-time RT-PCR. *Laborwelt* 8: 4-8
- Fortelka, K. 21.02.2013. Pressemitteilung Nr. 05/2013. Gemeinsamer Bundesausschuss gemäß § 91 SGB V <http://www.g-ba.de/downloads/34-215-474/05-2013-02-21-Osteodensitometrie.pdf> (20.12.2013)
- Frazer, K. A. et al. 2007. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 449: 851-61
- Fuchs, I. et al. 2013. Effect of the CYP3A inhibitor ketoconazole on the PXR-mediated induction of CYP3A activity. *Eur J Clin Pharmacol* 69: 507-13
- Gacad, M. A. & Adams, J. S. 1991. Endogenous blockade of 1,25-dihydroxyvitamin D-receptor binding in New World primate cells. *J Clin Invest* 87: 996-1001
- Gallagher, J. C. et al. 2013. Effects of vitamin D supplementation in older African American women. *J Clin Endocrinol Metab* 98: 1137-46
- Gebeyehu, E. et al. 2011. Sex and CYP3A5 genotype influence total CYP3A activity: high CYP3A activity and a unique distribution of CYP3A5 variant alleles in Ethiopians. *Pharmacogenomics J* 11: 130-7
- Geick, A. et al. 2001. Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. *J Biol Chem* 276: 14581-7
- Gellner, K. et al. 2001. Genomic organization of the human CYP3A locus: identification of a new, inducible CYP3A gene. *Pharmacogenetics* 11: 111-21
- Genomes Project, C. et al. 2012. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 491: 56-65
- Givens, R. C. et al. 2003. CYP3A5 genotype predicts renal CYP3A activity and blood pressure in healthy adults. *J Appl Physiol* (1985) 95: 1297-300
- Glossmann, H. H. 2010. Origin of 7-dehydrocholesterol (provitamin D) in the skin. *J Invest Dermatol* 130: 2139-41
- Gluzman, Y. 1981. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23: 175-82
- Godar, D. E. 2005. UV doses worldwide. *Photochem Photobiol* 81: 736-49
- Gödtel-Armbrust, U. et al. 2007. Variability in PXR-mediated induction of CYP3A4 by commercial preparations and dry extracts of St. John's wort. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 375: 377-82
- Gonzalez, M. C. et al. 2001. Cytochrome P450 4A11 expression in human keratinocytes: effects of ultraviolet irradiation. *Br J Dermatol* 145: 749-57

- Goodarzi, M. O. et al. 2008. Association of CYP3A7\*1C and serum dehydroepiandrosterone sulfate levels in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 2909-12
- Götz, C. et al. 2012a. Effects of the genotoxic compounds, benzo[a]pyrene and cyclophosphamide on phase 1 and 2 activities in EpiDerm models. *Xenobiotica* 42: 526-37
- Götz, C. et al. 2012b. Xenobiotic metabolism capacities of human skin in comparison with a 3D epidermis model and keratinocyte-based cell culture as in vitro alternatives for chemical testing: activating enzymes (Phase I). *Exp Dermatol* 21: 358-63
- Götz, C. et al. 2010. The COLIPA skin metabolism project: Do in vitro alternatives comprise adequate detoxification capacities for chemical testing in skin? *Toxicology Letters* 196: S145
- Gupta, R. P. et al. 2004. CYP3A4 is a human microsomal vitamin D 25-hydroxylase. *J Bone Miner Res* 19: 680-8
- Guryev, O. et al. 2003. A pathway for the metabolism of vitamin D3: unique hydroxylated metabolites formed during catalysis with cytochrome P450scc (CYP11A1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 14754-9
- Haddad, J. G. et al. 1993. Human plasma transport of vitamin D after its endogenous synthesis. *J Clin Invest* 91: 2552-5
- Hahn, T. J. et al. 1972a. Phenobarbital-induced alterations in vitamin D metabolism. *J Clin Invest* 51: 741-8
- Hahn, T. J. et al. 1972b. Effect of chronic anticonvulsant therapy on serum 25-hydroxycalciferol levels in adults. *N Engl J Med* 287: 900-4
- Hara, H. et al. 2004. Loss of CYP3A7 gene induction by 1,25-dihydroxyvitamin D3 is caused by less binding of VDR to the proximal ER6 in CYP3A7 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 321: 909-15
- Harmsen, S. et al. 2008. Comparison of two immortalized human cell lines to study nuclear receptor-mediated CYP3A4 induction. *Drug Metab Dispos* 36: 1166-71
- Heineberg, H. (2006) Einführung in die Anthropogeographie. *Humangeographie: Grundriss Allgemeine Geographie*. pp. 448. UTB, Schöningh
- Henkler, F. et al. 2011. Ersatzmethoden zum Tierversuch. Charakterisierung der metabolischen Kapazität von in vitro-Hautmodellen zum Zwecke der Identifizierung eines optimalen Modells für die Hauttoxizitätsprüfung sowie zur Expositionsabschätzung von Substanzen der dermalen Biotransformation. Technische Informationsbibliothek und Universitätsbibliothek TIB Berlin Reportnr. 0315226A, 0315226B, 0315226C, 0315226D, 0315226E, 01064212; <https://getinfo.de/app/download?id=TIBKAT%3a733818099&cluster=tib&term=0315226A&tib=zbwkat&tib=blcp&tib=dkf&tib=rdat&tib=tibkat&tib=blse&tib=sudoc&tib=tema&tib=iud&tib=zbmkm&tib=zbmqj&tib=kmoav&tib=arxv&tib=zmat&tib=frpu&tib=etde&tib=temaext&tib=insp&tib=prob&tib=epo&page=1> (22.08.2013)
- Hess, A. F. et al. 1922. Experimental Rickets in Rats : VII. The Prevention of Rickets by Sunlight, by the Rays of the Mercury Vapor Lamp, and by the Carbon Arc Lamp. *J Exp Med* 36: 427-46
- Hidiroglou, M. & Karpinski, K. 1989. Providing vitamin D to confined sheep by oral supplementation vs ultraviolet irradiation. *J Anim Sci* 67: 794-802
- Hill, J. R. 2004. In vitro drug metabolism using liver microsomes. *Curr Protoc Pharmacol Chapter 7: Unit7 8*
- Hintzpeter, B. et al. 2008. Higher prevalence of vitamin D deficiency is associated with immigrant background among children and adolescents in Germany. *J Nutr* 138: 1482-90
- Ho, H. et al. 2005. Association between the CYP3A5 genotype and blood pressure. *Hypertension* 45: 294-8
- Holick, M. F. 1981. The cutaneous photosynthesis of previtamin D3: a unique photoendocrine system. *J Invest Dermatol* 77: 51-8
- Holick, M. F. 2003. Evolution and function of vitamin D. *Recent Results Cancer Res* 164: 3-28
- Holick, M. F. 2005. Stay tuned to PXR: an orphan actor that may not be D-structive only to bone. *J Clin Invest* 115: 32-4
- Holick, M. F. 2008. Vitamin D and sunlight: strategies for cancer prevention and other health benefits. *Clin J Am Soc Nephrol* 3: 1548-54
- Holick, M. F. 2009. Vitamin D and Health: Evolution, Biologic Functions, and Recommended Dietary Intakes for Vitamin D. *Clinic Rev Bone Miner Metab* 7: 2-19
- Holick, M. F. et al. 1980. Photosynthesis of previtamin D3 in human skin and the physiologic consequences. *Science* 210: 203-5
- Holick, M. F. et al. 1981. Regulation of cutaneous previtamin D3 photosynthesis in man: skin pigment is not an essential regulator. *Science* 211: 590-3
- Honda, A. et al. 2011. Cholesterol 25-hydroxylation activity of CYP3A. *J Lipid Res* 52: 1509-16
- Hosseinpour, F. et al. 2007. Phenobarbital suppresses vitamin D3 25-hydroxylase expression: a potential new mechanism for drug-induced osteomalacia. *Biochem Biophys Res Commun* 357: 603-7

- How, K. L. et al. 1994. Dietary vitamin D dependence of cat and dog due to inadequate cutaneous synthesis of vitamin D. *Gen Comp Endocrinol* 96: 12-8
- Hu, T. et al. 2010. Xenobiotic metabolism gene expression in the EpiDermin vitro 3D human epidermis model compared to human skin. *Toxicol In Vitro* 24: 1450-63
- Hustert, E. et al. 2001a. The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics* 11: 773-9
- Hustert, E. et al. 2001b. Natural protein variants of pregnane X receptor with altered transactivation activity toward CYP3A4. *Drug Metab Dispos* 29: 1454-9
- Ishimura, E. et al. 1999. Serum levels of 1,25-dihydroxyvitamin D, 24,25-dihydroxyvitamin D, and 25-hydroxyvitamin D in nondialyzed patients with chronic renal failure. *Kidney Int* 55: 1019-27
- Ishizawa, M. et al. 2008. Lithocholic acid derivatives act as selective vitamin D receptor modulators without inducing hypercalcemia. *J Lipid Res* 49: 763-72
- Jabbari, A. et al. 2012. Transcriptional profiling of psoriasis using RNA-seq reveals previously unidentified differentially expressed genes. *J Invest Dermatol* 132: 246-9
- Jablonski, N. G. 2011. Why human skin comes in colours. *AnthroNotes* 32: 7-10
- Jablonski, N. G. & Chaplin, G. 2010. Colloquium paper: human skin pigmentation as an adaptation to UV radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 Suppl 2: 8962-8
- Jackh, C. et al. 2011. Characterization of enzyme activities of Cytochrome P450 enzymes, Flavin-dependent monooxygenases, N-acetyltransferases and UDP-glucuronyltransferases in human reconstructed epidermis and full-thickness skin models. *Toxicol In Vitro* 25: 1209-14
- Janmohamed, A. et al. 2001. Quantification and cellular localization of expression in human skin of genes encoding flavin-containing monooxygenases and cytochromes P450. *Biochem Pharmacol* 62: 777-86
- Japelt, R. B. & Jakobsen, J. 2013. Vitamin D in plants: a review of occurrence, analysis, and biosynthesis. *Front Plant Sci* 4: 136
- Jean, G. et al. 2008. Evidence for persistent vitamin D 1-alpha-hydroxylation in hemodialysis patients: evolution of serum 1,25-dihydroxycholecalciferol after 6 months of 25-hydroxycholecalciferol treatment. *Nephron Clin Pract* 110: c58-65
- Jeong, H. 2010. Altered drug metabolism during pregnancy: hormonal regulation of drug-metabolizing enzymes. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 6: 689-99
- Jewell, C. 1996. In vitro models for the assessment of skin xenobiotic metabolism. PhD Thesis at the Department of Environmental and Occupational Medicine, The Medical School, University of Newcastle Upon Tyne: 1-289
- Jobling, M. A., Hurles, M., Tyler-Smith, C. 2004. Human evolutionary genetics - origins, peoples & disease. Garland Science, New York, Abingdon
- Jones, G. 2008. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. *Am J Clin Nutr* 88: 582S-586S
- Jurutka, P. W. et al. 2005. Molecular and functional comparison of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) and the novel vitamin D receptor ligand, lithocholic acid, in activating transcription of cytochrome P450 3A4. *J Cell Biochem* 94: 917-43
- Juzeniene, A. et al. 2009. Development of different human skin colors: a review highlighting photobiological and photobiophysical aspects. *J Photochem Photobiol B* 96: 93-100
- Kalueff, A. V. et al. 2004. Increased grooming behavior in mice lacking vitamin D receptors. *Physiol Behav* 82: 405-9
- Kamdern, L. K. 2006. Impact of CYP3A5 Genetic Polymorphism on the Biotransformation of Drugs and Environmental Toxins.
- Kamdern, L. K. et al. 2004. Limited contribution of CYP3A5 to the hepatic 6beta-hydroxylation of testosterone. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 370: 71-7
- Kamino, H. & Tam, S. T. 1991. Immunoperoxidase technique modified by counterstain with azure B as a diagnostic aid in evaluating heavily pigmented melanocytic neoplasms. *J Cutan Pathol* 18: 436-9
- Kanebratt, K. P. et al. 2008. Cytochrome P450 induction by rifampicin in healthy subjects: determination using the Karolinska cocktail and the endogenous CYP3A4 marker 4beta-hydroxycholesterol. *Clin Pharmacol Ther* 84: 589-94
- Kang-Sickel, J. C. et al. 2011. The utility of naphthyl-keratin adducts as biomarkers for jet-fuel exposure. *Biomarkers* 16: 590-9
- Kanis, J. A. 1994. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group. *Osteoporos Int* 4: 368-81
- Kassenärztliche Bundesvereinigung Berlin, I.-B. 04/2013. 34600 - Osteodensitometrie (Photonenabsorptions-Technik). V. 7.1. <http://www.kbv.de/ebm2013/html/000/OI1000JR10000H0.html> (20.12.2013)

- Kassner, N. et al. 2008. Carbonyl reductase 1 is a predominant doxorubicin reductase in the human liver. *Drug Metab Dispos* 36: 2113-20
- Khojasteh, S. C. et al. 2011. Chemical inhibitors of cytochrome P450 isoforms in human liver microsomes: a re-evaluation of P450 isoform selectivity. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 36: 1-16
- Kim, C. J. et al. 2007. Vitamin D 1alpha-hydroxylase gene mutations in patients with 1alpha-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 3177-82
- Kmiec, Z. 2001. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 161: III-XIII, 1-151
- Knuschke, P. et al. 10/2012. UV-abhängige Vitamin D Synthese - Bilanzierung der Expositionszeit durch UV zur Protektion des optimalen Vitamin D3-Bedarfs im menschlichen Körper - Vorhaben 3607S04538. Ressortforschungsberichte zur kerntechnischen Sicherheit und zum Strahlenschutz, BfS-RESFOR-70/12 <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:0221-201210029658> (06.02.2013)
- Koch, I. et al. 2002. Interindividual variability and tissue-specificity in the expression of cytochrome P450 3A mRNA. *Drug Metab Dispos* 30: 1108-14
- Koenig, K. G. et al. 1992. Free and total 1,25-dihydroxyvitamin D levels in subjects with renal disease. *Kidney Int* 41: 161-5
- Kostner, K. M. 2007. Understanding Cholesterol Synthesis and Absorption Is the Key to Achieving Cholesterol Targets. *Asia-Pacific Cardiology* 1: 7-10
- Koszewski, N. J. et al. 2012. Importance of apical membrane delivery of 1,25-dihydroxyvitamin D3 to vitamin D-responsive gene expression in the colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 303: G870-8
- Kremer, R. et al. 2009. Vitamin D status and its relationship to body fat, final height, and peak bone mass in young women. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 67-73
- Kuang, Z. M. et al. 2013. Revealing the contribution of Cytochrome P450 to salt-sensitive hypertension using DNA microarray. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 17: 3148-56
- Kuehl, P. et al. 2001. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 27: 383-91
- Kumar, S. et al. 2009. Ligand diversity of human and chimpanzee CYP3A4: activation of human CYP3A4 by lithocholic acid results from positive selection. *Drug Metab Dispos* 37: 1328-33
- Kumarakulasingham, M. et al. 2005. Cytochrome p450 profile of colorectal cancer: identification of markers of prognosis. *Clin Cancer Res* 11: 3758-65
- Kürschner, U. 2007. Untersuchungen zur Toxizität und Biotransformation an der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) vorgelegt der Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Lagunova, Z. et al. 2009. The dependency of vitamin D status on body mass index, gender, age and season. *Anticancer Res* 29: 3713-20
- Lamba, J. K. et al. 2004a. Expression of constitutive androstane receptor splice variants in human tissues and their functional consequences. *J Pharmacol Exp Ther* 311: 811-21
- Lamba, V. et al. 2004b. PXR (NR1I2): splice variants in human tissues, including brain, and identification of neurosteroids and nicotine as PXR activators. *Toxicol Appl Pharmacol* 199: 251-65
- Lambert, P. W. et al. 1982. Evidence for extrarenal production of 1 alpha ,25-dihydroxyvitamin D in man. *J Clin Invest* 69: 722-5
- Lang, T. et al. 2001. Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver. *Pharmacogenetics* 11: 399-415
- Langaee, T. Y. et al. 2007. Association of CYP3A5 polymorphisms with hypertension and antihypertensive response to verapamil. *Clin Pharmacol Ther* 81: 386-91
- Leclerc, G. M. et al. 2000. Development of a destabilized firefly luciferase enzyme for measurement of gene expression. *Biotechniques* 29: 590-1, 594-6, 598 passim
- Lee, A. et al. 2001. Constitutive expression and distribution of cytochrome P450 isozymes in normal human skin. *Journal of Investigative Dermatology* 117: 528-528
- Lee, Y. H. et al. 2012. Pathway analysis of genome-wide association study for bone mineral density. *Mol Biol Rep* 39: 8099-106
- Lehmann, B. 1997. HaCaT cell line as a model system for vitamin D3 metabolism in human skin. *J Invest Dermatol* 108: 78-82

- Lehmann, B. et al. 2004. Role for tumor necrosis factor- $\alpha$  in UVB-induced conversion of 7-dehydrocholesterol to 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in cultured keratinocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90: 561-5
- Lehmann, B. et al. 2001. UVB-induced conversion of 7-dehydrocholesterol to 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in an in vitro human skin equivalent model. *J Invest Dermatol* 117: 1179-85
- Lehmann, B. et al. 2000a. A novel pathway for hormonally active calcitriol. *Horm Res* 54: 312-5
- Lehmann, B. et al. 2000b. UVB-induced conversion of 7-dehydrocholesterol to 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (calcitriol) in the human keratinocyte line HaCaT. *Photochem Photobiol* 72: 803-9
- Lehmann, B. & Meurer, M. 2003. Extrarenal sites of calcitriol synthesis: the particular role of the skin. *Recent Results Cancer Res* 164: 135-45
- Lehmann, B. & Meurer, M. 2010. Vitamin D metabolism. *Dermatol Ther* 23: 2-12
- Lehmann, B. et al. 1998. Human keratinocyte line HaCaT metabolizes 1 $\alpha$ -hydroxyvitamin D<sub>3</sub> and vitamin D<sub>3</sub> to 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (calcitriol). *J Dermatol Sci* 18: 118-27
- Lehmann, B. et al. 2000c. Conversion of vitamin D<sub>3</sub> to 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in human skin equivalents. *Exp Dermatol* 9: 97-103
- Lehmann, B. et al. 2003. Demonstration of UVB-induced synthesis of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (calcitriol) in human skin by microdialysis. *Arch Dermatol Res* 295: 24-8
- Lehmann, B. et al. 2010. Conversion of vitamin D<sub>3</sub> to hormonally active 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in cultured keratinocytes: relevance to cell growth and differentiation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 121: 322-3
- Levy, D. et al. 2009. Genome-wide association study of blood pressure and hypertension. *Nat Genet*
- Li, B. et al. 2014. Transcriptome Analysis of Psoriasis in A Large Case-Control Sample: Rna-Seq Provides Insights Into Disease Mechanisms. *J Invest Dermatol*
- Li, T. & Chiang, J. Y. 2006. Rifampicin induction of CYP3A4 requires pregnane X receptor cross talk with hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  and coactivators, and suppression of small heterodimer partner gene expression. *Drug Metab Dispos* 34: 756-64
- Li, X.-Y. et al. 1994. Cytochrome P450 3A5 is the major 3A subfamily member expressed in normal human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 102: 601
- Lieb, W. et al. 2006. No association of the CYP3A5\*1 allele with blood pressure and left ventricular mass and geometry: the KORA/MONICA Augsburg echocardiographic substudy. *Clin Sci (Lond)* 111: 365-72
- Liebich, H. G. 2009. Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis + Histologie, 5 ed. Schattauer,
- Lindh, J. D. et al. 2011. Seasonal variation in blood drug concentrations and a potential relationship to vitamin D. *Drug Metab Dispos* 39: 933-7
- Liu, X. et al. 2013. Detecting and characterizing genomic signatures of positive selection in global populations. *Am J Hum Genet* 92: 866-81
- Lorrain, J. et al. 2003. Population demographics and socioeconomic impact of osteoporotic fractures in Canada. *Menopause* 10: 228-34
- Lu, J. et al. 2005. Transcriptional profiling of keratinocytes reveals a vitamin D-regulated epidermal differentiation network. *J Invest Dermatol* 124: 778-85
- Luu-The, V. et al. 2009. Expression profiles of phases 1 and 2 metabolizing enzymes in human skin and the reconstructed skin models Episkin and full thickness model from Episkin. *J Steroid Biochem Mol Biol* 116: 178-86
- M'Buyamba-Kabangu, J. R. et al. 1987. Calcium, vitamin D-endocrine system, and parathyroid hormone in black and white males. *Calcif Tissue Int* 41: 70-4
- MacLaughlin, J. A. et al. 1982. Spectral character of sunlight modulates photosynthesis of previtamin D<sub>3</sub> and its photoisomers in human skin. *Science* 216: 1001-3
- MacLaughlin, J. A. et al. 1991. Cultured human keratinocytes cannot metabolize vitamin D<sub>3</sub> to 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *FEBS Lett* 282: 409-11
- Maguire, O. et al. 2012. Regulation of CYP3A4 and CYP3A5 expression and modulation of "intracrine" metabolism of androgens in prostate cells by liganded vitamin D receptor. *Mol Cell Endocrinol* 364: 54-64
- Mason, A. et al. 2013. Topical treatments for chronic plaque psoriasis: An abridged Cochrane Systematic Review. *J Am Acad Dermatol* 69: 799-807
- Matsumoto, K. et al. 1991. Involvement of endogenously produced 1,25-dihydroxyvitamin D-3 in the growth and differentiation of human keratinocytes. *Biochim Biophys Acta* 1092: 311-8

- Matsuoka, L. Y. et al. 1989. In vivo threshold for cutaneous synthesis of vitamin D3. *J Lab Clin Med* 114: 301-5
- Melton, L. J., 3rd et al. 1999. Fracture incidence in Olmsted County, Minnesota: comparison of urban with rural rates and changes in urban rates over time. *Osteoporos Int* 9: 29-37
- Menter, A. & Stoff, B. 2010. Psoriasis. Manson Publishing, London
- Miernik, A. et al. 2011. Complete removal of the foreskin--why? *Urol Int* 86: 383-7
- Molina, D. K. & DiMaio, V. J. 2012. Normal organ weights in men: part II-the brain, lungs, liver, spleen, and kidneys. *Am J Forensic Med Pathol* 33: 368-72
- Morris, J. G. 1999. Ineffective vitamin D synthesis in cats is reversed by an inhibitor of 7-dehydrocholesterol-delta7-reductase. *J Nutr* 129: 903-8
- Morris, J. G. et al. 1999. Plasma 25-hydroxyvitamin D in growing kittens is related to dietary intake of cholecalciferol. *J Nutr* 129: 909-12
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63
- Mukhtar, H. et al. 1987. Cytochrome P-450 dependent metabolism of testosterone in rat skin. *Biochem Biophys Res Commun* 145: 749-53
- Murray, G. I. et al. 1988. The Immunocytochemical Localization and Distribution of Cytochrome-P-450 in Normal Human Hepatic and Extrahepatic Tissues with a Monoclonal-Antibody to Human Cytochrome-P-450. *British Journal of Clinical Pharmacology* 25: 465-475
- Nayak, S. & Acharjya, B. 2008. Adverse cutaneous drug reaction. *Indian J Dermatol* 53: 2-8
- Negrea, L. A. et al. 1995. 1,25-Dihydroxyvitamin D synthesis in rat liver microsomes. *Horm Metab Res* 27: 461-4
- Neis, M. M. et al. 2010. Expression and induction of cytochrome p450 isoenzymes in human skin equivalents. *Skin Pharmacol Physiol* 23: 29-39
- Nem, D. et al. 2012. Pregnane X receptor and yin yang 1 contribute to the differential tissue expression and induction of CYP3A5 and CYP3A4. *PLoS One* 7: e30895
- Nemanic, M. K. et al. 1985. In vitro synthesis of vitamin D-3 by cultured human keratinocytes and fibroblasts: action spectrum and effect of AY-9944. *Biochim Biophys Acta* 841: 267-77
- Newton-Cheh, C. et al. 2009. Genome-wide association study identifies eight loci associated with blood pressure. *Nat Genet*
- Niemann, C. & Horsley, V. 2012. Development and homeostasis of the sebaceous gland. *Semin Cell Dev Biol* 23: 928-36
- Nishimura, M. et al. 2004. Tissue-specific mRNA expression profiles of human nuclear receptor subfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet* 19: 135-49
- Niu, W. et al. 2010. Confirmation of top polymorphisms in hypertension genome wide association study among Han Chinese. *Clin Chim Acta*
- Nollet, L. M. L. 2012. Fat-Soluble Vitamins. In: Nollet, L. M. L. & Toldrá, F. ed. *Food analysis by HPLC*. pp. 271-324. CRC Press, Boca Raton, Fla. [u.a.]
- Norman, A. W. 1998. Sunlight, season, skin pigmentation, vitamin D, and 25-hydroxyvitamin D: integral components of the vitamin D endocrine system. *Am J Clin Nutr* 67: 1108-10
- Nylen, H. et al. 2011. Cytochrome P450 3A activity in mothers and their neonates as determined by plasma 4beta-hydroxycholesterol. *Eur J Clin Pharmacol* 67: 715-22
- Ogunkolade, B. W. et al. 2002. Vitamin D receptor (VDR) mRNA and VDR protein levels in relation to vitamin D status, insulin secretory capacity, and VDR genotype in Bangladeshi Asians. *Diabetes* 51: 2294-300
- Okano, T. et al. 1989. Identification and determination of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in rat skin by high-performance liquid chromatography and radioreceptor assay. *J Chromatogr* 493: 63-70
- Olds, W. 2010. Elucidating the links between UV radiation and vitamin D synthesis : using an in vitro model. PhD thesis, Queensland University of Technology. <http://eprints.qut.edu.au/32073/> (22.08.2013)
- Org, E. et al. 2009. Genome-wide scan identifies CDH13 as a novel susceptibility locus contributing to blood pressure determination in two European populations. *Hum Mol Genet* 18: 2288-96
- Pascussi, J. M. et al. 2003. The expression of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 genes: a tangle of networks of nuclear and steroid receptors. *Biochim Biophys Acta* 1619: 243-53
- Pascussi, J. M. et al. 2005. Possible involvement of pregnane X receptor-enhanced CYP24 expression in drug-induced osteomalacia. *J Clin Invest* 115: 177-86

- Pavek, P. et al. 2010. Intestinal cell-specific vitamin D receptor (VDR)-mediated transcriptional regulation of CYP3A4 gene. *Biochem Pharmacol* 79: 277-87
- Polimanti, R. et al. 2012. Human genetic variation of CYP450 superfamily: analysis of functional diversity in worldwide populations. *Pharmacogenomics* 13: 1951-60
- Promega Corporation, M. 2012. P450 Glo Assays. *Promega Technical Bulletin* 325: 1-44
- Pybus, M. et al. 2013. 1000 Genomes Selection Browser 1.0: a genome browser dedicated to signatures of natural selection in modern humans. *Nucleic Acids Res*
- Qiu, H. et al. 2010. The unique complexity of the CYP3A4 upstream region suggests a nongenetic explanation of its expression variability. *Pharmacogenet Genomics* 20: 167-78
- Qiu, H. et al. 2008. CYP3 phylogenomics: evidence for positive selection of CYP3A4 and CYP3A7. *Pharmacogenet Genomics* 18: 53-66
- Ramagopalan, S. V. et al. 2010. A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: associations with disease and evolution. *Genome Research* 20: 1352-60
- Ray, D. et al. 2009. Predisposition to vitamin D deficiency osteomalacia and rickets in females is linked to their 25(OH)D and calcium intake rather than vitamin D receptor gene polymorphism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 71: 334-40
- Rebbeck, T. R. et al. 1998. Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst* 90: 1225-9
- Reschly, E. J. & Krasowski, M. D. 2006. Evolution and function of the NR1I nuclear hormone receptor subfamily (VDR, PXR, and CAR) with respect to metabolism of xenobiotics and endogenous compounds. *Curr Drug Metab* 7: 349-65
- Rezen, T. et al. 2011. Interplay between cholesterol and drug metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1814: 146-60
- Rice, R. H. et al. 1993. Elevation of cell cycle control proteins during spontaneous immortalization of human keratinocytes. *Mol Biol Cell* 4: 185-94
- Rice, T. et al. 2006. Meta-analysis of genome-wide scans for blood pressure in African American and Nigerian samples. The National Heart, Lung, and Blood Institute GeneLink Project. *Am J Hypertens* 19: 270-4
- Richards, J. B. et al. 2012. Genetics of osteoporosis from genome-wide association studies: advances and challenges. *Nat Rev Genet* 13: 576-88
- Richmond, B. 2003. DXA scanning to diagnose osteoporosis: do you know what the results mean? *Cleve Clin J Med* 70: 353-60
- Risikobewertung, B.-B. f. (22.10.2012) *Ausgewählte Fragen und Antworten zu Vitamin D*. Vol. 2013. pp. Deutsche Gesellschaft für Ernährung e. V., Max Rubner-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel,
- Rizzoli, R. et al. 2013. Vitamin D supplementation in elderly or postmenopausal women: a 2013 update of the 2008 recommendations from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO). *Curr Med Res Opin* 29: 305-13
- Robien, K. et al. 2012. Genetic and environmental predictors of serum 25-hydroxyvitamin D concentrations among middle-aged and elderly Chinese in Singapore. *Br J Nutr*: 1-10
- Robins, A. H. 2009. The evolution of light skin color: role of vitamin D disputed. *Am J Phys Anthropol* 139: 447-50
- Rolsted, K. et al. 2008. Evaluation of cytochrome P450 activity in vitro, using dermal and hepatic microsomes from four species and two keratinocyte cell lines in culture. *Arch Dermatol Res* 300: 11-8
- Ross, A. C. et al. 2011. *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D*. National Academia Press Washington <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK56059/> (22.08.2013)
- Sabeti, P. C. et al. 2007. Genome-wide detection and characterization of positive selection in human populations. *Nature* 449: 913-8
- Saeki, M. et al. 2002. mRNA expression of multiple cytochrome p450 isozymes in four types of cultured skin cells. *Int Arch Allergy Immunol* 127: 333-6
- Sampaio Netto, O. et al. 2007. Análise da nova classificação de laudos de densitometria óssea. *Radiologia Brasileira* 40: 23-25
- Savkur, R. S. et al. 2003. Alternative splicing within the ligand binding domain of the human constitutive androstane receptor. *Mol Genet Metab* 80: 216-26
- Schaps, K.-P. 2005. Physiologie. Blutkreislauf. In: Emminger, H. ed. *Physikum EXAKT. Das gesamte Prüfungswissen für die 1. ÄP*. pp. 484-502. Georg Thieme, Stuttgart
- Schirmer, M. et al. 2006. Genetic signature consistent with selection against the CYP3A4\*1B allele in non-African populations. *Pharmacogenet Genomics* 16: 59-71

- Schmiedlin-Ren, P. et al. 1997. Expression of enzymatically active CYP3A4 by Caco-2 cells grown on extracellular matrix-coated permeable supports in the presence of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Mol Pharmacol* 51: 741-54
- Schmiedlin-Ren, P. et al. 2001. Induction of CYP3A4 by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> is human cell line-specific and is unlikely to involve pregnane X receptor. *Drug Metab Dispos* 29: 1446-53
- Schmuth, M. et al. 2013. Role of PPAR, LXR, and PXR in epidermal homeostasis and inflammation. *Biochim Biophys Acta*
- Schote, A. B. et al. 2007. Nuclear receptors in human immune cells: expression and correlations. *Mol Immunol* 44: 1436-45
- Schuessler, M. et al. 2001. Skin is an autonomous organ in synthesis, two-step activation and degradation of vitamin D(3): CYP27 in epidermis completes the set of essential vitamin D(3)-hydroxylases. *Steroids* 66: 399-408
- Schwabe, U. & Paffrath, D. (2012) *Arzneiverordnungs-Report 2012 : Aktuelle Daten, Kosten, Trends und Kommentare*. pp. Imprint: Springer, Berlin, Heidelberg
- Schwartz, G. G. 2005. Vitamin D and the epidemiology of prostate cancer. *Semin Dial* 18: 276-89
- Scriver, C. R. et al. 1978. Serum 1,25-dihydroxyvitamin D levels in normal subjects and in patients with hereditary rickets or bone disease. *N Engl J Med* 299: 976-9
- Semiz, S. et al. 2011. Analysis of CYP3A4\*1B and CYP3A5\*3 polymorphisms in population of Bosnia and Herzegovina. *Med Glas (Zenica)* 8: 84-9
- Shinkyō, R. et al. 2011. Conversion of 7-dehydrocholesterol to 7-ketocholesterol is catalyzed by human cytochrome P450 7A1 and occurs by direct oxidation without an epoxide intermediate. *J Biol Chem* 286: 33021-8
- Sim, S. C. et al. 2005. CYP3A7 protein expression is high in a fraction of adult human livers and partially associated with the CYP3A7\*1C allele. *Pharmacogenet Genomics* 15: 625-31
- Smit, P. et al. 2005. A common polymorphism in the CYP3A7 gene is associated with a nearly 50% reduction in serum dehydroepiandrosterone sulfate levels. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 5313-6
- Smith, G. et al. 2003. Quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of drug metabolizing and cytoprotective genes in psoriasis and regulation by ultraviolet radiation. *J Invest Dermatol* 121: 390-8
- Smith, G. et al. 2006. Regulation of cutaneous drug-metabolizing enzymes and cytoprotective gene expression by topical drugs in human skin in vivo. *Br J Dermatol* 155: 275-81
- Smith, P. K. et al. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85
- Sobol, M. et al. 2006. Novel bioluminescent substrates to measure CYP3A4 activity in cell-based and microsome assays. *Drug Metabolism Reviews* 38: 60-60
- Spornitz, U. 2004. *Anatomie und Physiologie. Lehrbuch und Atlas für Pflege- und Gesundheitsfachberufe*. Springer Medizin Verlag Heidelberg 4
- Sturm, R. A. & Duffy, D. L. 2012. Human pigmentation genes under environmental selection. *Genome Biol* 13: 248
- Swanson, H. I. 2004. Cytochrome P450 expression in human keratinocytes: an aryl hydrocarbon receptor perspective. *Chem Biol Interact* 149: 69-79
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-95
- Takeuchi, F. et al. 2010. Blood pressure and hypertension are associated with 7 loci in the Japanese population. *Circulation* 121: 2302-9
- Tayo, B. O. et al. 2009. Association of regions on chromosomes 6 and 7 with blood pressure in Nigerian families. *Circ Cardiovasc Genet* 2: 38-45
- Teft, W. A. et al. 2013. CYP3A4 and seasonal variation in vitamin D status in addition to CYP2D6 contribute to therapeutic endoxifen level during tamoxifen therapy. *Breast Cancer Res Treat* 139: 95-105
- Thelen, P. et al. 1999. Quantification by competitive quantitative RT-PCR of VEGF121 and VEGF165 in renal cell carcinoma. *Anticancer Res* 19: 1563-5
- Thirumaran, R. K. et al. 2012. Intestinal CYP3A4 and midazolam disposition in vivo associate with VDR polymorphisms and show seasonal variation. *Biochem Pharmacol* 84: 104-12
- Thompson, E. E. et al. 2004. CYP3A variation and the evolution of salt-sensitivity variants. *Am J Hum Genet* 75: 1059-69
- Timsit, Y. E. & Negishi, M. 2007. CAR and PXR: the xenobiotic-sensing receptors. *Steroids* 72: 231-46

- Tom, B. H. et al. 1976. Human colonic adenocarcinoma cells. I. Establishment and description of a new line. *In Vitro* 12: 180-91
- Traish, A. M. et al. 2011. Dehydroepiandrosterone (DHEA)--a precursor steroid or an active hormone in human physiology. *J Sex Med* 8: 2960-82; quiz 2983
- Trapnell, C. et al. 2012. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc* 7: 562-78
- Tremezaygues, L. & Reichrath, J. 2010. [The significance of vitamin D metabolism in human skin. An update]. *Hautarzt* 61: 478, 480-6
- Tremezaygues, L. et al. 2011. Minireview: Endokrines Vitamin-D-System in der humanen Haut. *Aktuelle Dermatologie* 37: 12-18
- Tsoi, L. et al. (2011) Large-scale transcriptome analysis using RNA-seq reveals new insights into psoriasis biology (Poster Abstract/ Program 815F). In: 12. International Congress of Human Genetics 2011/ 61. Annual Meeting of The American Society of Human Genetics. pp., Montreal, Canada
- V, C. D. O. e. V. 2009. DVO-Leitlinie 2009 zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Erwachsenen. Langfassung. *Osteologie* 18: 304-328
- van Eijl, S. et al. 2012. Elucidation of xenobiotic metabolism pathways in human skin and human skin models by proteomic profiling. *PLoS One* 7: e41721
- van Herwaarden, A. E. et al. 2007. Knockout of cytochrome P450 3A yields new mouse models for understanding xenobiotic metabolism. *J Clin Invest* 117: 3583-92
- Vantieghem, K. et al. 2006a. Dermal fibroblasts pretreated with a sterol Delta7-reductase inhibitor produce 25-hydroxyvitamin D3 upon UVB irradiation. *J Photochem Photobiol B* 85: 72-8
- Vantieghem, K. et al. 2006b. UVB-induced production of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and vitamin D activity in human keratinocytes pretreated with a sterol delta7-reductase inhibitor. *J Cell Biochem* 98: 81-92
- Vieth, R. 2003. Effects of Vitamin D on Bone and Natural Selection of Skin Color: How Much Vitamin D Nutrition are We Talking About? In: Agarwal, S. C. & Stout, S. D. ed. *Bone Loss and Osteoporosis: An Anthropological Perspective*. pp. 139-154. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York
- Vieth, R. 2004. Why the optimal requirement for Vitamin D3 is probably much higher than what is officially recommended for adults. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90: 575-9
- Vondracek, M. et al. 2001. Cytochrome P450 expression and related metabolism in human buccal mucosa. *Carcinogenesis* 22: 481-8
- Vyas, P. M. et al. 2006. Enzyme-mediated protein haptentation of dapsone and sulfamethoxazole in human keratinocytes: I. Expression and role of cytochromes P450. *J Pharmacol Exp Ther* 319: 488-96
- Wallemacq, P. et al. 2009. Opportunities to optimize tacrolimus therapy in solid organ transplantation: report of the European consensus conference. *Ther Drug Monit* 31: 139-52
- Wang, T. J. et al. 2010. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *Lancet* 376: 180-8
- Wang, T. T. et al. 2005. Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D3 target genes. *Mol Endocrinol* 19: 2685-95
- Wang, Z. et al. 2013. Enhancement of hepatic 4-hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D3 through CYP3A4 induction in vitro and in vivo: implications for drug-induced osteomalacia. *J Bone Miner Res* 28: 1101-16
- Wang, Z. et al. 2012. An inducible cytochrome P450 3A4-dependent vitamin D catabolic pathway. *Mol Pharmacol* 81: 498-509
- Webb, A. R. et al. 1988. Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D3: exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D3 synthesis in human skin. *J Clin Endocrinol Metab* 67: 373-8
- Weir, B. S. & Cockerham, C. C. 1984. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population-Structure. *Evolution* 38: 1358-1370
- Welch, J. et al. (2013) Assessment of skin Metabolism capacity in vitro: luciferin assays. In: 2. Skin Metabolism Meeting. pp. 32. Valbonne, France
- Westlind-Johnsson, A. et al. 2003. Comparative analysis of CYP3A expression in human liver suggests only a minor role for CYP3A5 in drug metabolism. *Drug Metab Dispos* 31: 755-61
- Wild, C. P. et al. 2000. Environmental and genetic determinants of aflatoxin-albumin adducts in the Gambia. *Int J Cancer* 86: 1-7

- Wilkinson, G. R. 2005. Drug metabolism and variability among patients in drug response. *N Engl J Med* 352: 2211-21
- Williams, J. A. et al. 2002. Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7. *Drug Metab Dispos* 30: 883-91
- Willson, T. M. & Kliewer, S. A. 2002. PXR, CAR and drug metabolism. *Nat Rev Drug Discov* 1: 259-66
- Wojnowski, L. & Kamdem, L. K. 2006. Clinical implications of CYP3A polymorphisms. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2: 171-82
- Wolbold, R. et al. 2003. Sex is a major determinant of CYP3A4 expression in human liver. *Hepatology* 38: 978-88
- Wolkenstein, P. et al. 1998. Covalent binding of carbamazepine reactive metabolites to P450 isoforms present in the skin. *Chem Biol Interact* 113: 39-50
- Xu, Y. et al. 2006. Intestinal and hepatic CYP3A4 catalyze hydroxylation of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3): implications for drug-induced osteomalacia. *Mol Pharmacol* 69: 56-65
- Yamaguchi, A. et al. 1986. Bone in the marmoset: a resemblance to vitamin D-dependent rickets, type II. *Calcif Tissue Int* 39: 22-7
- Yamazaki, H. & Shimada, T. 1999. Effects of arachidonic acid, prostaglandins, retinol, retinoic acid and cholecalciferol on xenobiotic oxidations catalysed by human cytochrome P450 enzymes. *Xenobiotica* 29: 231-41
- Yan, Y. et al. 2011. Vitamin D-dependent rickets type 1: a rare, but treatable, cause of severe hypotonia in infancy. *J Child Neurol* 26: 1571-5
- Yengi, L. G. et al. 2003. Quantitation of cytochrome P450 mRNA levels in human skin. *Anal Biochem* 316: 103-10
- Yokose, T. et al. 1999. Immunohistochemical study of cytochrome P450 2C and 3A in human non-neoplastic and neoplastic tissues. *Virchows Arch* 434: 401-11
- Youn, H. Y. et al. 2011. In vitro ultraviolet-induced damage in human corneal, lens, and retinal pigment epithelial cells. *Mol Vis* 17: 237-46
- Yumita, S. et al. 1996. Levels of serum 1,25(OH)<sub>2</sub>D in patients with pre-dialysis chronic renal failure. *Tohoku J Exp Med* 180: 45-56
- Zehnder, D. et al. 2001. Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin d(3)-1  $\alpha$ -hydroxylase. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 888-94
- Zella, L. A. et al. 2009. The enhanced hypercalcemic response to 20-epi-1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> results from a selective and prolonged induction of intestinal calcium-regulating genes. *Endocrinology* 150: 3448-56
- Zhai, G. et al. 2011. Eight common genetic variants associated with serum DHEAS levels suggest a key role in ageing mechanisms. *PLoS Genet* 7: e1002025
- Zhang, H. et al. 2011. Comparing statistical methods for removing seasonal variation from vitamin D measurements in case-control studies. *Stat Interface* 4: 85-93
- Zhang, W. et al. 2010. CYP3A4\*1G genetic polymorphism influences CYP3A activity and response to fentanyl in Chinese gynecologic patients. *Eur J Clin Pharmacol* 66: 61-6
- Zheng, H. F. et al. 2011. Insights into the genetics of osteoporosis from recent genome-wide association studies. *Expert Rev Mol Med* 13: e28
- Zheng, X. E. et al. 2012. Human PXR-mediated induction of intestinal CYP3A4 attenuates 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3) function in human colon adenocarcinoma LS180 cells. *Biochem Pharmacol* 84: 391-401
- Zhu, H. et al. 2013a. A genome-wide methylation study of severe vitamin D deficiency in African American adolescents. *J Pediatr* 162: 1004-9 e1
- Zhu, J. G. et al. 2013b. CYP2R1 is a major, but not exclusive, contributor to 25-hydroxyvitamin D production in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 15650-5
- Zouboulis, C. C. 2000. Human skin: an independent peripheral endocrine organ. *Horm Res* 54: 230-42
- Zouboulis, C. C. 2004. The human skin as a hormone target and an endocrine gland. *Hormones (Athens)* 3: 9-26
- Zuo, X. C. et al. 2013. Effects of CYP3A4 and CYP3A5 polymorphisms on tacrolimus pharmacokinetics in Chinese adult renal transplant recipients: a population pharmacokinetic analysis. *Pharmacogenet Genomics* 23: 251-61