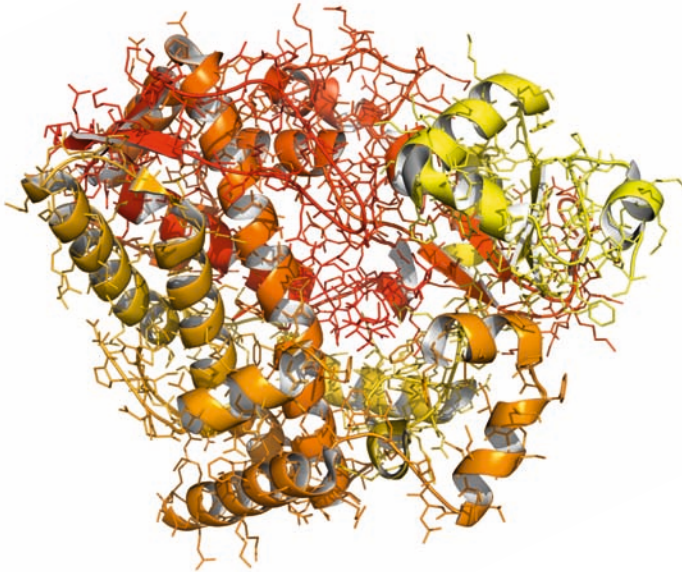


# Polymorphismen in den Cytochrom-P450-Enzymen des Hundes

---

**Clarissa Prinzing**



**INAUGURALDISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. Joachim Geyer

# **Polymorphismen in den Cytochrom-P450-Enzymen des Hundes**

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Clarissa Prinzinger**  
Tierärztin aus Frankfurt am Main

Gießen 2015

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Joachim Geyer  
Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger

Tag der Disputation: 19.01.2015

*..... wer nach etwas Höherem strebt, muss die  
Augen zudrücken, träumen und sich Regen und  
Trübsal wegdenken. ....dann klärt sich alles zum  
Guten und man schafft (nicht nur) den  
„Dr.med.vet.“*

*Für meine Eltern*



# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	IV
Tabellenverzeichnis .....	VI
Abkürzungen .....	VIII
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 Phase I und Phase II im Arzneistoffmetabolismus .....	1
1.2 Die Cytochrom-P450-Enzyme .....	2
1.3 Polymorphismen in den Cytochrom-P450-Enzymen.....	5
1.4 Polymorphismen in den Cytochrom-P450-Enzymen des Hundes.....	8
1.4.1 CYP1A2.....	10
1.4.2 CYP2B11 .....	13
1.4.3 CYP2C21 und CYP2C41 .....	14
1.4.4 CYP2D15.....	15
1.4.5 CYP3A12.....	17
1.5 Funktionelle Messungen .....	18
1.6 Zielsetzung der Arbeit .....	20
<b>2 MATERIAL .....</b>	<b>22</b>
2.1 Molekularbiologisches Material .....	22
2.1.1 Allgemeines .....	22
2.1.2 Enzyme.....	22
2.1.3 Vektoren .....	23
2.1.4 Bakterienstämme .....	24
2.1.5 cDNA .....	24
2.1.6 Quantitative <i>real-time</i> PCR (qPCR).....	24
2.1.7 Längenstandards .....	25
2.1.8 Kommerziell erhältliche Kits und Materialien .....	25
2.1.9 Puffer und Medien.....	26
2.2 Agarosegelelektrophorese.....	26
2.2.1 Native Agarosegelelektrophorese (DNA) .....	26
2.2.2 Denaturierende Agarosegelelektrophorese (RNA) .....	27
2.3 Chemische Substanzen und Reagenzien.....	28
2.4 Geräte .....	28
2.5 Verbrauchsmaterial .....	29
2.6 Bioinformatische Programme und Datenbanken .....	29
<b>3 METHODEN .....</b>	<b>31</b>
3.1 Allgemeine Methoden in der Molekularbiologie .....	31
3.1.1 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung.....	31
3.1.2 Native Agarosegelelektrophorese .....	32
3.1.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	33

3.1.4	Aufreinigung von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab.....	33
<b>3.2</b>	<b>Isolierung und Aufarbeitung von RNA .....</b>	<b>34</b>
3.2.1	Probenmaterial .....	34
3.2.2	Isolierung von Total-RNA aus Geweben .....	36
3.2.3	Denaturierende Agarosegelelektrophorese .....	37
3.2.4	DNase-Verdau.....	38
3.2.5	RNA-Aufreinigung.....	39
3.2.6	RNA-Quantifizierung mittels <i>Agilent 2100 Bioanalyzer</i> .....	40
3.2.7	cDNA-Synthese aus Total-RNA .....	42
3.2.8	Isolierung von genomischer DNA aus Blut.....	43
<b>3.3</b>	<b>Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....</b>	<b>44</b>
3.3.1	Allgemeine Regeln zur Primerauswahl.....	44
3.3.2	PCR-Reaktionsansatz.....	45
3.3.3	Standard-PCR .....	46
3.3.4	Quantitative <i>real-time</i> PCR .....	46
<b>3.4</b>	<b>DNA-Klonierung.....</b>	<b>48</b>
3.4.1	TOPO-Klonierung .....	49
3.4.2	Transformation.....	49
<b>3.5</b>	<b>Sequenzierung und Auswertung von Sequenzspuren.....</b>	<b>50</b>
<b>3.6</b>	<b>Referenzsequenzen .....</b>	<b>53</b>
3.6.1	CYP1A2.....	53
3.6.2	CYP2B11 .....	53
3.6.3	CYP2C21.....	54
3.6.4	CYP2D15.....	54
3.6.5	CYP3A12.....	54
3.6.6	CYP2C41.....	54
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>55</b>
<b>4.1</b>	<b>Polymorphismen in den Cytochrom-P450-Enzymen des Hundes.....</b>	<b>55</b>
4.1.1	CYP1A2-Sequenzpolymorphismen.....	55
4.1.2	CYP2B11-Sequenzpolymorphismen.....	57
4.1.3	CYP2C21-Sequenzpolymorphismen.....	57
4.1.4	CYP2D15-Sequenzpolymorphismen.....	58
4.1.5	CYP3A12-Sequenzpolymorphismen.....	62
4.1.6	Erstbeschreibung des CYP2C41-Gens.....	65
4.1.7	Zusammenfassung der Polymorphismen in den Cytochrom-P450-Enzymen des Hundes .....	77
<b>4.2</b>	<b>Expressionsunterschiede in den Cytochrom-P450-Enzymen des Hundes .....</b>	<b>78</b>
4.2.1	RNA-Quantifizierung mittels <i>Agilent 2100 Bioanalyzer</i> .....	78
4.2.2	Expression mit den Housekeeping-Genen B2M und ACTB.....	79
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>85</b>
<b>5.1</b>	<b>Polymorphismen in den Cytochrom-P450-Enzymen des Hundes.....</b>	<b>86</b>
5.1.1	CYP1A2.....	92
5.1.2	CYP2B11 .....	92
5.1.3	CYP2C21.....	92

5.1.4	CYP2D15.....	93
5.1.5	CYP3A12.....	96
5.1.6	CYP2C41.....	96
<b>5.2</b>	<b>Beurteilung der Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) mittels <i>SIFT</i> .....</b>	<b>98</b>
5.2.1	Allgemeine Methodik.....	99
5.2.2	Wie funktioniert <i>SIFT</i> ? .....	100
5.2.3	Aussagekraft von <i>SIFT</i> und funktionelle Relevanz .....	101
<b>5.3</b>	<b>Expressionsunterschiede in den Cytochrom-P450-Enzymen des Hundes .....</b>	<b>103</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>105</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>107</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>109</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>116</b>
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNGEN.....</b>	<b>124</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Nomenklatur der Cytochrom-P450-Enzymfamilie. ....	3
Abb. 1.2: Phylogenetischer Baum von fünf wichtigen Cytochrom-P450-Subfamilien verschiedener Spezies. ....	4
Abb. 1.3: Beispiel für die Auswirkung eines CYP-Polymorphismus auf den Plasmakonzentrationsverlauf eines Arzneistoffs. ....	7
Abb. 1.4: SNP 1117C>T im caninen CYP1A2 Gen .....	13
Abb. 1.5: Aminosäure-Sequenzalignment des caninen CYP2D15 in der <i>full-length</i> -Variante (cCYP2D15) und in der kürzeren Variante mit Deletion von 51 AS (delExon3) sowie des humanen CYP2D6 (hCYP2D6). ....	17
Abb. 3.1: Darstellung eines Elektropherogramms und des davon abgeleiteten Gelbildes. ....	42
Abb. 3.2: Alignment zweier Sequenzen aus Plasmid-DNA von zwei unterschiedlichen Klonen mit der originalen Sequenz aus der GenBank-Sequenzdatenbank. ....	52
Abb. 3.3: Chromatogramm eines PCR-Produktes, zur Unterscheidung eines hetero- oder homozygoten Polymorphismus. ....	52
Abb. 4.1: Repräsentatives Bild einer Agarosegelelektrophorese mit den <i>full-length</i> PCR-Amplifikaten für CYP2D15. ....	59
Abb. 4.2: CYP2C41 “ <i>Exon 7-PCR</i> “ mit genomischer DNA von zehn Hunden. ....	66
Abb. 4.3: PCR Exon 1-9, CYP2C41 & CYP2C21, mit einem Träger des CYP2C41-Gens (Hund #1) und einem Nicht-Träger (Hund #2). .	66
Abb. 4.4: Schematische Darstellung der Sequenzierungsstrategie für das CYP2C41-Gen. ....	67
Abb. 4.5: Schematische Darstellung des humanen CYP2C-Clusters auf Chromosom 10 und des CYP2C-Clusters des Hundes auf Chromosom 28. ....	73
Abb. 4.6: Übersicht über die gefundenen Polymorphismen. ....	77
Abb. 4.7: Verhältnis der in dieser Arbeit neu identifizierten Polymorphismen im Vergleich zu bereits bekannten Polymorphismen. ....	78

Abb. 4.8: Virtuelles Gelbild nach einer Messung im <i>Agilent 2100</i> <i>Bioanalyzer</i> . .....	79
Abb. 4.9: Graphische Darstellung der durchschnittlichen $C_t$ -Werte ( $av C_t$ ) aller Targets und Housekeeping-Gene, dargestellt als Whisker-box plot.....	83
Abb. 4.10: Gemittelte delta $C_t$ -Werte der einzelnen Tiere jedes CYPs. ....	84
Abb. 4.11: Gemittelte delta $C_t$ -Werte der einzelnen Tiere jedes CYPs.....	84
Abb. 5.1: Aminosäure-Sequenzalignment der humanen (h) und der caninen (c) CYP2C-Subfamilie.....	89
Abb. 5.2: Schematische Darstellung der Genstruktur des humanen CYP2C18 und des caninen CYP2C41. ....	90
Abb. 5.3: Homologiemodell des caninen CYP2D15 auf Basis der Proteinstruktur von CYP2D6 (Wang et al. 2012). ....	95
Abb. 5.4: Schematische Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse untersuchter Hunderassen. ....	98

---

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Pharmakologische Besonderheiten der Cytochrom-P450-Enzyme des Hundes. ....	9
Tab. 1.2: Vergleich der CYP2D15 Sequenz-Varianten.....	16
Tab. 3.1: Übersicht über die ersten 31 Hunde bzw. Katzen (Ktz.), von welchen Leberbiopsien untersucht wurden. ....	35
Tab. 4.1: Übersicht über die im CYP1A2-Gen identifizierten SNPs der 24 untersuchten Hunde. ....	55
Tab. 4.2: Übersicht über die identifizierten CYP1A2-Haplotypen. ....	56
Tab. 4.3: Übersicht über die CYP1A2-Haplotypen der untersuchten Hunde.....	56
Tab. 4.4: Übersicht über die CYP2B11-Polymorphismen der 20 untersuchten Hunde. ....	57
Tab. 4.5: Häufigkeit des $\Delta$ Exon 3 Polymorphismus der 20 untersuchten Hunden nach Typisierung mittels Agarosegelelektrophorese der <i>full-length</i> PCR-Amplifikate. ....	59
Tab. 4.6: Übersicht über die CYP2D15-Polymorphismen der 20 untersuchten Hunde. ....	60
Tab. 4.7: Übersicht über die identifizierten CYP2D15-Haplotypen. ....	61
Tab. 4.8: Übersicht über die CYP2D15-Haplotypen der untersuchten Hunde.....	62
Tab. 4.9: Übersicht über die im CYP3A12-Gen identifizierten SNPs der 20 untersuchten Hunde. ....	63
Tab. 4.10: Übersicht über die identifizierten CYP3A12-Haplotypen. ....	63
Tab. 4.11: Übersicht über die CYP3A12-Haplotypen der untersuchten Hunde.....	64
Tab. 4.12: Darstellung der Exon- und Intron-Sequenzen von CYP2C41.....	68
Tab. 4.13: Auflistung der 34 verschiedenen auf CYP2C41 getesteten Hunderassen. ....	75
Tab. 4.14: Auflistung der $C_t$ - und gemittelten $C_t$ -Werte ( $av C_t$ ) aller Targets und Houskeeper-Gene. ....	81
Tab. 5.1: Gegenüberstellung der humanen Cytochrom-P450-Enzyme und deren caninen Homologe. ....	86

Tab. 5.2: Unterschiede zwischen dem humanen und caninen Genom. ....	87
Tab. 5.3: Ähnlichkeiten zwischen humanem und caninem Genom. ....	87
Tab. 5.4: Gemeinsame Substrate humaner und caniner CYPs.....	87
Tab. 5.5: Aminosäureidentitäten (in %) der verschiedenen Vertreter der CYP2C-Subfamilien verschiedener Säugetier-Spezies.....	91
Tab. 5.6: Darstellung einiger Methoden zur Bewertung von nsSNPs, welche als <i>online-tools</i> verfügbar sind.....	100

## Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ABC	ATP Binding Cassette
ACTB	β-Aktin
AS	Aminosäure
ASA	Aminosäureaustausch
av Ct	average Ct
B2M	β-2-Microglobulin
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare, base pairs
cDNA	complementary DNA
Cox	Cyclooxygenase
cRNA	complementary RNA
C <sub>T</sub>	signal threshold cycle
CYP	Cytochrom-P450
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
del	Deletion
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid/ Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dT	Desoxythymidin
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E	Extinktionskoeffizient
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EB	Ethidiumbromid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Extensive Metabolizer
europ.	europäisch

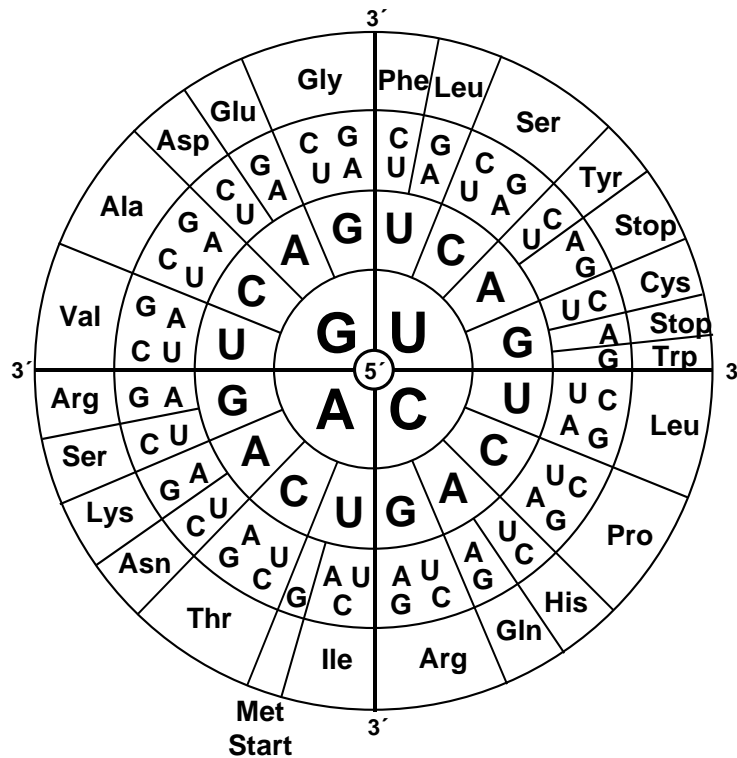
Ex	Exon
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
<i>g</i>	Erdschwerebeschleunigung
gek.	Gekauft
HELLS	helicase, lymphoid-specific
IM	Intermediate Metabolizer
kb	kilo base pair
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante
Ktz.	Katze
M	Molar (mol/l)
mA	Milliampere
MDR	Multidrug Resistance
MGB	Minor Groove Binder
MOPS	4-Morpholinepropanesulfonic acid
mRNA	messenger RNA
MRP	Multidrug Resistance-associated Protein
NAT	N-Acetyltransferase
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometer
nsSNP	non-synonymous Single Nucleotide- Polymorphism
nt	Nukleotid
NTCP	$\text{Na}^+$ /Taurocholate Cotransporting Polypeptide
OATP	Organic Anion Transporting Polypeptide
OCT	Organic Anion Transporter
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame / offener Leserahmen
OSCP	Organic Solute Carrier Protein
OST	Organic Solute Transporter
PCR	Polymerase Chain Reaction / Polymerase Kettenreaktion
PDLIM1	Protein Domain und LIM Domain 1
PM	Poor Metabolizer
PSI	Position-Specific Iterative

qRT-PCR	Quantitative Real-Time PCR
Ref.	Referenz
RIN	RNA Integrity Number
RNA	Ribonucleic Acid / Ribonukleinsäure
ROX	6-Carboxy-X-Rhodamin
Rpm	rotations per minute / Umdrehungen pro Minute
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
Sub.	Substrat
S	Sedimentationsverhalten in Svedberg
SD	Standard Deviation
SI	International System of Units
SIFT	Sorting Intolerant From Tolerant
SLCO	Solute Carrier Family O
SNP	Single Nucleotide-Polymorphism
SOAT	Sodium-dependent Organic Anion Transporter
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
UAWs	Unerwünschte Arzneimittelwirkungen
UV	Ultraviolett
V	Volt
V <sub>max</sub>	Maximale Aufnahmegeschwindigkeit
WT	Wildtyp
λ	Wellenlänge

**Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren**

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

**Der genetische Code**



---

---

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Phase I und Phase II im Arzneistoffmetabolismus

Jedes Lebewesen wandelt exogene (körperfremde) und endogene (körpereigene) Stoffe metabolisch um. Diesen Prozess nennt man Biotransformation. Beispiele für endogene Stoffe sind z.B. Steroide. Als exogene Stoffe kommen Arzneistoffe in Betracht. Bereits 1959 teilte Williams die Biotransformation in zwei Phasen ein: Phase I beinhaltet Prozesse wie die Oxidation, Reduktion und Hydrolyse. In dieser Phase werden funktionelle Gruppen in das zu metabolisierende Molekül eingebaut. In Phase II werden die gebildeten Zwischenprodukte dann mit körpereigenen Stoffen (z.B. Schwefelsäure, Glutathion oder Glucuronsäure) konjugiert (Williams 1959; Josephy et al. 2005)

Lipophile Substanzen können schlecht über Faeces oder Urin ausgeschieden werden. Monooxygenasen, wie die Cytochrom-P450-Enzyme, katalysieren in der Phase-I-Reaktion den Metabolismus von vorwiegend lipophilen Stoffen. Sie wandeln sie in besser wasserlösliche und weniger toxische Produkte um und ermöglichen somit eine bessere Ausscheidung. Es können jedoch auch reaktive Zwischenprodukte entstehen, welche toxischer sind als die Ausgangssubstanz und kanzerogene Eigenschaften besitzen (Eichelbaum & Burk 2001). Gewisse Arzneistoffe, die sog. Prodrugs, machen sich diese Funktionsweise zu Nutze: Die in ihnen enthaltenen pharmakologisch wirksamen Verbindungen werden erst durch diese Biotransformation freigesetzt und erzielen so ihre Wirkung (Josephy et al. 2005).

## 1.2 Die Cytochrom-P450-Enzyme

2013 jährte sich die Entdeckung der Cytochrom-P450-Enzyme zum 50. Mal. Doch bereits 1950, in einer Ära der Erforschung des Steroidhormonmetabolismus, wurden Forscher auf Cytochrom-P450-Enzyme in Lebermikrosomen aufmerksam, ohne zu dieser Zeit deren Namen oder Funktion genau zu kennen (Estabrook 2003). Der deutsche Biochemiker Martin Klingenberg brachte 1958 einen kurzen Artikel im *Journal of Biological Chemistry* heraus, in dem er ein Pigment beschrieb, welches er aus Lebermikrosomen von Ratten isoliert hatte und welches in seiner mit Kohlenmonoxid komplexierten Form eine starke Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm zeigte (Klingenberg 1958). Diese Entdeckung prägte später den Namen der Cytochrom-P450-Enzyme. Vier Jahre später wurde dieses Pigment als Hämprotein identifiziert (Omura & Sato 1962). 1963, also vor gut 50 Jahren, konnte schließlich die Rolle von P450 im Metabolismus von Steroidhormonen aufgeklärt werden (Estabrook et al. 1963).

Cytochrom-P450-Enzyme bilden eine der größten Proteinfamilien im humanen Genom. Die P450-Gene, auch CYPs genannt, finden sich aber in so gut wie allen Organismen. Beim Säuger befinden sie sich die CYPs membrangebunden, teils an der inneren Mitochondrienmembran, teils an der Membran des endoplasmatischen Retikulums (Werck-Reichhart & Feyereisen 2000).

Als Monooxygenasen übertragen die Cytochrom-P450-Enzyme im Rahmen des Phase-I-Metabolismus ein Sauerstoffäquivalent auf ein Zielmolekül, welches dadurch polarer und in der Regel besser wasserlöslich wird.

Es ist gut bekannt, dass die Cytochrom-P450-Enzymfamilien 1-3 für etwa 70-80 % aller Phase-I-Arzneistoffmetabolisierungsreaktionen verantwortlich sind. In 90 % dieser Fälle wird die metabolische Aktivität von den folgenden sechs Enzymen bestimmt (in absteigender Bedeutung für den Arzneistoffmetabolismus): CYP3A4, CYP2C9, CYP2D6, CYP2C19, CYP1A2, CYP2C8, CYP2B6 (Wijnen et al. 2007; Zanger et al. 2008).

Basierend auf ihrer Sequenzhomologie werden die CYPs in Familien und Subfamilien eingeteilt. Bei einer Übereinstimmung der Aminosäuresequenz

von über 40 % spricht man von einer Familie. Diese Familie taucht als arabische Ziffer hinter der Überfamilie (CYP) im Namen auf. Von einer Subfamilie spricht man bei einer Sequenzhomologie von über 55 %. Subfamilien werden in Großbuchstabe dargestellt. Hinter der Subfamilie zeigt eine zweite Ziffer das einzelne Isoenzym an (Abb. 1.1). Hierbei erfolgt die Vergabe chronologisch in Reihenfolge der Entdeckung bzw. deren Beschreibung (Werck-Reichhart & Feyereisen 2000). Spezies-unabhängig kommt jedes CYP nur ein einziges Mal vor. Die Nomenklatur wird durch diesen Umstand zwar erleichtert, ein struktureller oder funktioneller Vergleich homologer CYPs verschiedener Spezies stellt sich aber als kompliziert dar. Einen Überblick über die Cytochrome einiger wichtiger Subfamilien zeigt der phylogenetische Baum in Abb. 1.2.

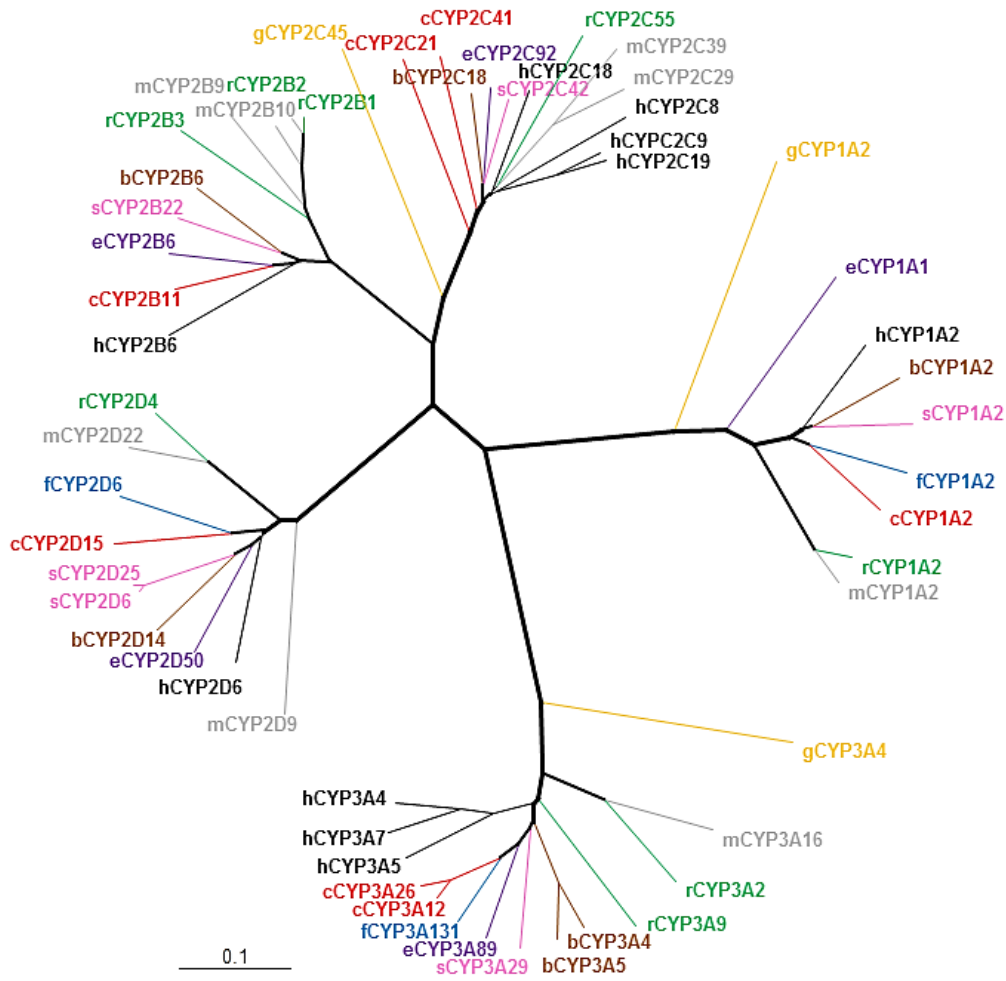
Seit 1999 werden alle funktionell relevanten humanen polymorphen CYP-Allele benannt und auf der *Human Cytochrome P450 Allele (CYP-allele) Nomenclature Web site* (<http://www.cypalleles.ki.se>) veröffentlicht. Bis heute beinhaltet die Seite mehr als 660 Allele von 29 Cytochrom-P450-Enzymen (Sim & Ingelman-Sundberg 2013).

Überfamilie	Familie	Subfamilie	Isoenzym
CYP	1	A	2

**Abb. 1.1: Nomenklatur der Cytochrom-P450-Enzymfamilie.**

Die Nomenklatur der Cytochrom-P450-Enzyme beinhaltet die Überfamilie (Cytochrom), die Familie (erste arabische Ziffer), die Subfamilie (Buchstabe) und das Isoenzym (zweite arabische Ziffer).

Neun CYPs sind derzeit beim Hund beschrieben: CYP1A1, CYP1A2, CYP2B11, CYP2C21, CYP2C41, CYP2D15, CYP2E1, CYP3A12, und CYP3A26 (Kamimura 2006). Im Vergleich zum humanen Cytochrom-P450-Enzym Substratspektrum, gibt es hierzu bisher allerdings nur wenige Informationen (Graham et al. 2006). Fünf der neun bekannten caninen CYPs werden als polymorph beschrieben: CYP1A2, CYP2C41, CYP2D15, CYP2E1 und CYP3A12 (Blaisdell et al. 1998; Roussel et al. 1998; Paulson et al. 1999; Lankford et al. 2000; Mise et al. 2004a; Kamimura 2006).



**Abb. 1.2: Phylogenetischer Baum von fünf wichtigen Cytochrom-P450-Subfamilien verschiedener Spezies.**

Diese Abbildung stellt die Verwandtschaftsverhältnisse verschiedener CYP-Subfamilien schematisch dar. Je weiter zwei Isoenzyme voneinander entfernt sind, desto geringer ist deren Sequenzhomologie. Dargestellt sind nur ausgewählte Isoenzyme folgender Spezies: B = *Bos taurus* (Rind), c = *Canis familiaris* (Hund), e = *Equus caballus* (Pferd), f = *Felis catus* (Katze), g = *Gallus gallus* (Haushuhn) h = *Homo sapiens* (Mensch), m = *Mus musculus* (Hausmaus), r = *Rattus norvegicus* (Ratte), s = *Sus scrofa* (Schwein).

Zur Darstellung wurde ein Alignment der Sequenzen mit dem *ClustalW* Algorithmus berechnet und das Ergebnis mit *TreeView 1.6.6* visualisiert. Die Linien stellen Äste dar, welche die Änderungen evolutionärer Verzweigungen darstellen. Je länger ein Ast ist, umso größer ist der Gehalt an „Veränderung“. Als Maßstab hierfür dient die Linie mit der Zahl 0.1. Diese Zahl repräsentiert den Gehalt an genetischen Veränderungen/Unterschieden von 0.1 und bezieht sich auf Nukleotid Substitutionen pro Position. Das ist die Anzahl pro Substitutionen geteilt durch die Länge der Gesamt-Sequenz.

### 1.3 Polymorphismen in den Cytochrom-P450-Enzymen

Jedes Individuum ist ein Produkt der Interaktionen seiner Gene und der Umwelt. Die Pharmakogenetik beschäftigt sich mit der unterschiedlichen Reaktion von Patienten auf Arzneistoffe, welche beeinflusst werden durch genetische Variationen. Mittels der Pharmakogenetik wird es bald möglich sein auf DNA-Ebene verschiedene „genotypische Profile“ zu generieren und deren spezifische Resonanz auf einen Arzneistoff vorherzusehen (Roses 2000).

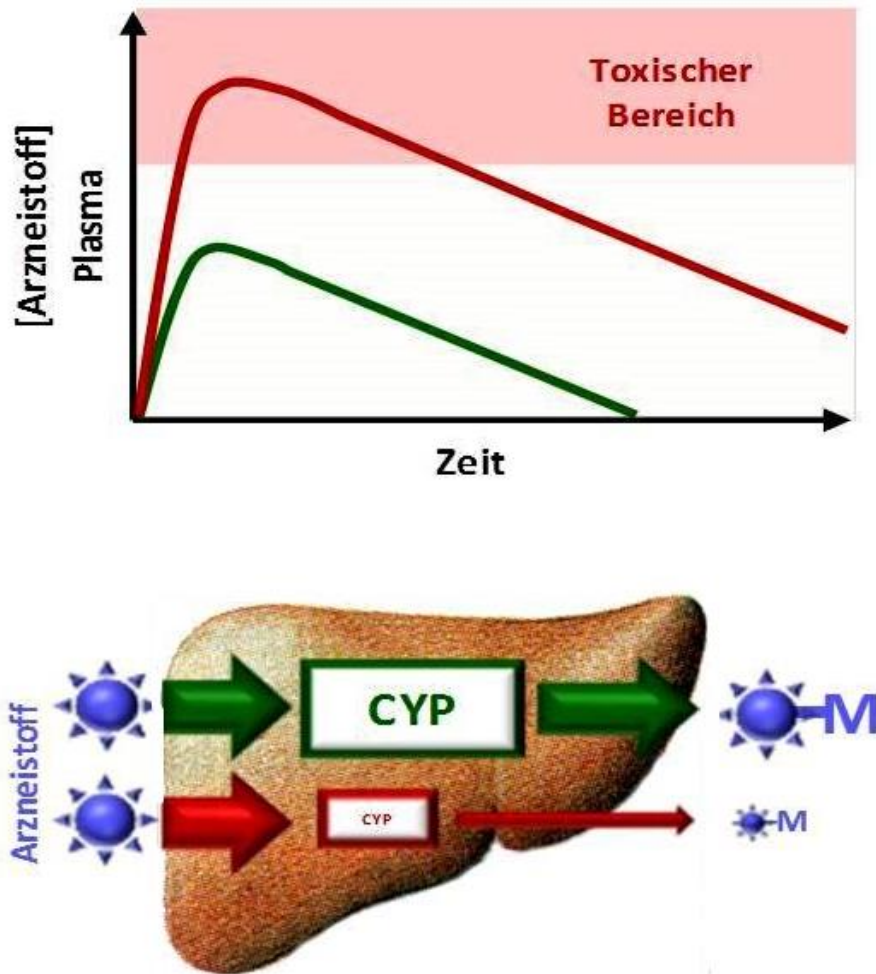
Die Aktivität der Cytochrom-P450-Enzyme hängt jedoch nicht nur von genetischen Polymorphismen ab. Weitere wichtige Faktoren sind zum Beispiel Umwelteinflüsse, welche über Inhibition oder Induktion die CYP-Enzymaktivität beeinflussen können. Hinzu kommen biologische Faktoren, wie Geschlecht und physiologische Determinanten, welche zum Beispiel Hormonstatus, Krankheiten oder den circadianen Rhythmus betreffen (Zanger et al. 2008).

Patienten, die sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin mit Standarddosierungen oder mit Dosierungen bezogen auf kg Körpermasse behandelt werden, können aus diesen Gründen unter dem Auftreten von unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAWs) leiden, oder aber die Arzneistoffwirkung bleibt aus (Wijnen et al. 2007).

Genetische Mutationen in Cytochrom-P450-Genen können zu einer Überexpression, zum Fehlen des kompletten aktiven Proteins oder zur Expression eines Enzyms mit verminderter Enzymaktivität führen (Božina et al. 2009). Diese Variationen in der Enzymfunktion können unter anderem den Plasmaspiegel eines Arzneistoffs ansteigen lassen, was zu erheblichen Komplikationen bis hin zu Vergiftungserscheinungen führen kann (Abb. 1.3). Die genetischen Variationen stellen sich meist in Form von Einzelnukleotidaustauschen (Single-Nucleotide-Polymorphisms, SNPs), Deletionen, Insertionen oder Duplikationen von Sequenzabschnitten (ganzen Genen oder Einzelbasen) dar. SNPs sind hierbei die weitaus häufigste Form der genetischen Variation. Mehr als 90 % der menschlichen Gene enthalten mindestens einen SNP und von diesen sind mehr als 60 000 in der

codierenden Region der Gene lokalisiert. Zahlreiche dieser SNPs beeinflussen dabei die Arzneistoffantwort (Ma & Lu 2011).

Viele dieser genetischen Variationen im Arzneistoffmetabolismus können die Enzymaktivität und damit die Metabolisierungskapazität für bestimmte Arzneistoffe beeinflussen. Hinsichtlich dessen werden vier verschiedene Phänotypen unterschieden: Ein „*poor metabolizer*“ (PM) hat keine, oder nur geringe Enzymaktivität für eine bestimmte Metabolisierungsreaktion, ein „*extensive metabolizer*“ (EM) stellt die Norm hinsichtlich der Enzymaktivität dar, während ein „*intermediate metabolizer*“ (IM) eine Mittelstellung einnimmt und ein „*ultrarapid metabolizer*“ durch eine besonders hohe Metabolisierungskapazität gekennzeichnet ist (Wijnen et al. 2007; Božina et al. 2009). Ein gutes Beispiel hierfür bilden die genetischen Variationen im humanen CYP2D6, welches zahlreiche wichtige Arzneistoffe metabolisiert, wie z.B. Beta-Blocker oder Opioide (Lynch & Price 2007): 7 % der weißhätigen Weltbevölkerung gelten als CYP2D6 „*poor metabolizer*“, 10-15 % als „*intermediate metabolizer*“ (Raimundo et al. 2000) und 1-2 % als „*ultrarapid metabolizer*“ (Saarikoski et al. 2000). Zusätzlich zu den Polymorphismen in den CYPs können auch genetische Variationen in Genen von Arzneistofftransportern auftreten, welche ebenfalls eine wichtige Rolle in der Pharmakokinetik und Organverteilung von Arzneistoffen haben (Petzinger & Geyer 2006). Hierunter fallen zum Beispiel diverse Polymorphismen in den humanen Genen für den *multidrug resistance carrier* MDR1 (ABCB1), das *organic anion transporting polypeptide* OATP1B1 (SLCO1B1), das *breast cancer resistance protein* (BCRP, ABCG2) und die *organic cation transporter* OCT1 (SLC22A1) und OCT2 (SLC22A2) (Kerb 2006; Ma & Lu 2011).



**Abb. 1.3: Beispiel für die Auswirkung eines CYP-Polymorphismus auf den Plasmakonzentrationsverlauf eines Arzneistoffs.**

Cytochrom-P450-Enzyme sind Proteine, welche darüber bestimmen können, wie schnell ein Arzneistoff metabolisiert und aus dem Körper eliminiert wird. Genetische Polymorphismen können zu einem vollständigen Funktionsverlust oder zu einer stark herabgesetzten Enzymaktivität führen. Dies kann für die interindividuelle Variabilität der Sicherheit und Wirksamkeit einer Therapie mitverantwortlich sein. Sollten nun Patienten mit solchen genetischen Variationen eine Standarddosis erhalten, so kann es durch eine langsamere Ausscheidung über die Leber zu einem Anstieg der Plasmakonzentration kommen. Unerwünschte und toxische Arzneimittelwirkungen können die Folge sein (Mosher & Court 2010). (Abbildung modifiziert nach Prof. Dr. Joachim Geyer)

## 1.4 Polymorphismen in den Cytochrom-P450-Enzymen des Hundes

Hunde stellen in der heutigen Zeit in zweierlei Hinsicht ein wichtiges Forschungsobjekt der Pharmakogenetik dar: Sie repräsentieren zum einen einen großen Anteil der Patienten in der tierärztlichen Praxis, zum anderen werden sie als Versuchstiere für präklinische Studien, z.B. im Rahmen der Zulassung neuer Arzneistoffe, eingesetzt. In der Literatur wird immer wieder zu einem Einsatz von genetisch homogenen Hunden in diesen Studien geraten, um das bekannte Auftreten interindividueller Unterschiede durch Polymorphismen in den CYP-Genen zu verringern (Kamimura 2006).

Obwohl die Datenlage zu genetischen Variationen in der Veterinärmedizin immer noch sehr gering ist, wurden bereits einige Beispiele für interindividuelle Unterschiede in der Antwort auf endogene und exogene Substanzen bei verschiedenen Tierspezies beschrieben. Darüber hinaus sind zahlreiche genetisch determinierte Spezies- und Rasseunterschiede bekannt, welche in den Bereich der Pharmakogenetik fallen, z.B. für die Spezies Rind, Schaf, Huhn, Schwein und Hund. Trotzdem ist die Menge an pharmakogenetischen Daten in der Veterinärmedizin im Gegensatz zu denen der Humanmedizin als sehr gering zu bewerten (Fleischer et al. 2008). Diese großen Lücken im Wissen über die Diversität der caninen CYPs resultieren aus folgenden Schwierigkeiten (nach Martinez et al. 2013):

- Unterschiede zwischen Mensch und Hund in der Spezifität und Affinität der Substrate und Inhibitoren
- Fehlen von validierten *in vivo* Versuchen über Testsubstanzen der caninen CYPs
- Fehlen einer adäquaten Identifikation von Polymorphismen in den Genen der caninen CYPs und deren klinische Konsequenzen
- Problem der Beschaffung einer ausreichenden Menge geeigneten Probenmaterials, um rassespezifische Polymorphismen zu charakterisieren (speziell bezogen auf Leberbiopsien)
- Es gibt keine Hunde-spezifische *high-throughput* Genotypisierungs-Plattform, um die Rasseverteilung bestimmter Polymorphismen zu bestimmen

Trotz all dieser Schwierigkeiten macht auch die Forschung im Bereich der veterinärmedizinischen Pharmakogenetik Fortschritte. So wurde 2005 die erste komplette Genomsequenz eines weiblichen Boxer-Hundes veröffentlicht und aus Sequenzen weiterer Rassen über 2,5 Millionen SNPs

identifiziert (Lindblad-Toh et al. 2005). Wie bereits oben erwähnt, stellen sich fünf der neun bekannten caninen CYPs als polymorph dar: CYP1A2, CYP2C41, CYP2D15, CYP2E1 und CYP3A12 (Blaisdell et al. 1998; Roussel et al. 1998; Paulson et al. 1999; Lankford et al. 2000; Mise et al. 2004a; Kamimura 2006). In Tab. 1.1 sind fünf der wichtigsten caninen CYPs und deren bisher bekannten Besonderheiten zusammengefasst.

**Tab. 1.1: Pharmakologische Besonderheiten der Cytochrom-P450-Enzyme des Hundes.**

Enzym	Pharmakogenetische Besonderheit und Polymorphismus	Literatur
CYP1A2	SNP 1117C>T bedingt ein vorzeitiges Stopcodon mit Zerstörung der Enzymaktivität. Hunde (homozygot betroffen) sind schlechte Metabolisierer für CYP1A2-Substrate wie Theobromin, AC-3933 oder YM-64227. Neun versch. Haplotypen mit div. SNPs.	Mise et al. 2004a, 2004b, Tenmizu et al. 2004, 2006, Collica 2012
CYP2B11	Es gibt rassespezifische Unterschiede. Propofol, Ketamin und Midazolam sind Substrate. Greyhounds zeigen eine 3-fach niedrigere Enzymaktivität als Beagles und eine verlängerte Aufwachzeit nach Propofol-Gabe.	Zoran et al. 1993, Court et al. 1999, Hay Kraus et al. 2000
CYP2C41	Sowohl das Substratspektrum als auch die genomische Sequenz sind unbekannt. Es gibt einen Gendeletions-Polymorphismus. Nur zwei von zehn (20 %) Mischlingshunden und 2 von 18 Beagle-Hunden (11%) haben das CYP2C41-Gen.	Blaisdell et al. 1998
CYP2D15	Ein Ortholog zu dem humanen CYP2D6. Eingeschränkte Celecoxib-Hydroxylaseaktivität, bedingt durch eine <i>in frame</i> Deletion von Exon 3 (CYP2D15 $\delta$ /CYP2D15v2). Sechs Alloenzyme mit unterschiedlicher Enzymaktivität.	Roussel et al. 1998, Paulson et al. 1999
CYP3A12	Fünf SNPs mit Aminosäureaustausch und zwei SNPs mit stiller Mutation.	Paulson et al. 1999

Eine speziell den Phase II-Metabolismus betreffende Besonderheit des Hundes wäre hier noch zusätzlich zu nennen: Hunde sind nicht in der Lage bestimmte Arzneistoffe zu N-acetylieren. Das Enzym, welches hierfür erforderlich wäre, fehlt ihnen gänzlich. Es handelt sich um die N-Acetyltransferase (NAT), welche an der Metabolisierung von Arylamin- und Hydrazin-Arzneistoffen beteiligt ist, z.B. Hydralazin oder Sulfonamide. Interessant ist zudem der Umstand, dass so gut wie jede andere Säugetierspezies über eine NAT verfügt (Marshall 1954; Poirier et al. 1963; Glinsukon et al. 1975). Das Fehlen dieses Enzyms kann zu einer erhöhten

Empfindlichkeit von Hunden gegenüber Sulfonamiden führen (Cribb & Spielberg 1990). Im Genom des Hundes fehlt das NAT-Gen komplett, wie mittels Southern Blot gezeigt werden konnte (Trepanier et al. 1997).

Zusätzlich zu den in Tab. 1.1 zusammengefassten Polymorphismen der caninen CYPs und der Besonderheit der fehlenden NAT, ist auch der sog. MDR1-Gendefekt beim Hund als ein bedeutungsvolles Beispiel der veterinärmedizinischen Pharmakogenetik zu nennen. Der *multi drug resistance transporter* MDR1 hat eine wichtige Funktion an der Blut-Hirn-Schranke: Er transportiert hier diverse Arzneistoffe aus dem Gehirn zurück zum Blut. Der Defekt stellt sich als eine 4-Basenpaardeletion (del4) an Nukleotidposition nt230 des codierenden Leserahmens dar und führt zu einem frühzeitigen Stopcodon. Homozygot betroffene Hunde exprimieren kein funktionelles MDR1-Transporterprotein und stellen den Phänotyp eines Ivermectin-sensitiven Hundes dar, welcher typischerweise auf das makrozyklische Lakton Ivermectin mit neurotoxischen Symptomen reagiert (Mealey et al. 2001).

Betroffene Rassen sind der Collie und andere Hütehunde, wie z.B. der Australien Shepherd (Geyer et al. 2005; Gramer et al. 2011).

In den folgenden Kapiteln sollen auf der Basis dieser Aspekte und Fragen die einzelnen Cytochrom-P450-Enzyme des Hundes näher beleuchtet werden.

### **1.4.1 CYP1A2**

Zwei Isoformen der CYP1A-Subfamilie (CYP1A1 und CYP1A2) wurden aus Lebergewebe des Beagles isoliert (Uchida et al. 1990). Diese beiden CYPs machen zusammen einen Anteil von 4 % am CYP-Totalgehalt in der Leber von Beagle-Hunden aus (Eguchi et al. 1996).

Im Jahre 2003 entdeckten Mise et al. einen Polymorphismus in der Pharmakokinetik des Stoffes AC-3933 in einer Testgruppe von 20 Beagle-Hunden. AC-3933 ist eine psychoaktive Substanz, welche in der Humanmedizin die kognitiven Fähigkeiten steigern soll (*cognitive enhancement*). Bei den Beagle-Hunden war eine interindividuelle Variabilität in der Hydroxylierung dieses Stoffes zu finden. Es konnte phänotypisch eine

Gruppe von *extensive metabolizer* (EM) und *poor metabolizer* (PM) Beagle unterschieden werden. Mittels eines Inhibitions-Experiments mit Hilfe von  $\alpha$ -Naphthoflavon (ein bekannter CYP1A2-Inhibitor) konnte AC-3933 als Substrat von CYP1A2 identifiziert werden. In Western Blot-Experimenten konnte zudem gezeigt werden, dass in den als PM charakterisierten Hunden kein CYP1A2 nachzuweisen war. Der CYP1A2 Gehalt bei den EM-Hunden war jedoch prominent. Es wurde die Vermutung aufgestellt, dass das canine CYP1A2 Gen von genetischen Polymorphismen betroffen sein könnte (Mise et al. 2004a).

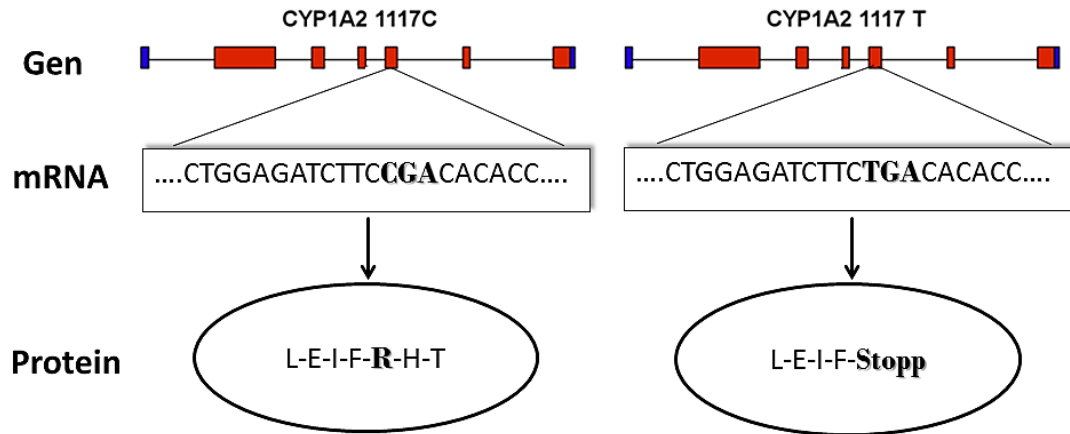
Der pharmakogenetische Hintergrund wurde ein Jahr später von Tenmizu et al. (2004) aufgeklärt. Auch hier wurde eine Gruppe von 21 Beagle-Hunden in PM und EM hinsichtlich der Hydroxylierung eines neuen Phosphodiesterase-(PDE4)-Hemmers (YM-64227) eingeteilt. Bei der anschließenden Sequenzierung der *full-length* CYP1A2 cDNA Nukleotidsequenz wurde der SNP 1117C>T gefunden, welcher zu einem vorzeitigen Stopcodon und somit in homozygoter Ausprägung zu einem Totalausfall des translatierten Enzyms führte (Abb. 1.4). Weitere Untersuchungen zeigten bei der Gruppe der PM ausschließlich den homozygoten Genotyp T/T, während sich die Gruppe der EM als homozygot C/C oder heterozygot C/T darstellte. Nach Genotypisierung von genomischer DNA von 65 Hunden stellte sich heraus, dass ca. 15 % der Hunde den homozygoten T/T Genotyp zeigen (Tenmizu et al. 2004).

Ebenfalls 2004 untersuchten auch Mise et al. wieder das Phänomen der EM und PM hinsichtlich ihres Substrats AC-3933 und kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass der SNP 1117C>T im CYP1A2 hierfür verantwortlich zu sein scheint (Mise et al. 2004b). Damit wurde dieser Polymorphismus in zwei unabhängigen Untersuchungen bestätigt.

Später sollte die Substratspezifität des caninen CYP1A2 im Vergleich zu der des Menschen untersucht werden. Es stellte sich heraus, dass es diesbezüglich deutliche Speziesunterschiede zwischen Hund und Mensch gibt. Phenacetin stellte sich z.B. als gutes Substrat sowohl für das canine als auch das humane CYP1A2 dar. Anders verhielt es sich z.B. mit Koffein, welches ein Substrat des humanen CYP1A2 ist, jedoch nicht über das canine CYP1A2 hydroxyliert wird. Dieser Umstand muss auf jeden Fall in

präklinischen Studien zur Pharmakokinetik und Toxikologie von Arzneistoffen berücksichtigt werden (Mise et al. 2008).

Im Jahr 2007 stellten Whiterock et al. die These auf, dass die Frequenz des 1117C>T Polymorphismus zwischen verschiedenen Hundepopulationen stark variiert. Sie untersuchten, im Gegensatz zu Tenmizu & Mise, Tiere verschiedener Beagle-Züchter und nicht nur die Tiere eines Genpools. Mittels *real-time* PCR wurden 69 Hunde genotypisiert. 61 (77 %) zeigten sich als Wildtyp C/C, 15 (19 %) als heterozygot C/T und drei (4 %) als homozygot T/T. Die Frequenz dieses SNPs erwies sich in dieser Untersuchung als signifikant niedriger, als in den früheren Untersuchungen von Tenmizu und Mise und zeigt, dass die Frequenz eines Polymorphismus zwischen Hundepopulationen variieren kann (Whiterock et al. 2007). Bei weiteren Untersuchungen, in welchen auch andere Hunderassen untersucht wurden, stellte sich heraus, dass diese Hunde entweder gar nicht vom homozygoten T/T-Polymorphismus (Scherr et al. 2010) oder aber nur bestimmte Rassen betroffen waren. So wurden in einer Studie 508 Hunde 38 verschiedener Rassen mittels allelischer Diskriminierung im TaqMan auf den CYP1A2 1117C>T Polymorphismus hin untersucht und es stellte sich heraus, dass 13 Rassen betroffen waren. Zu diesen gehörten: Australian Shepherd, Bearded Collie, Berger Blanc Suisse, Border Collie, Collie, Dalmatiner, Deerhound, Deutscher Schäferhund, Greyhound, Irischer Wolfshund, Jack Russell Terrier, Shetland Sheepdog und der Whippet (Aretz & Geyer 2010). Wichtige humane CYP1A2-Substrate, welche in der Veterinärmedizin eine Rolle spielen, sind z.B. Clomipramin, Lidocain, Naproxen, Odansetron, Propafenon, Propanolol und Verapamil (Gunes & Dahl 2008). Als Substrat des caninen CYP1A2 wäre Theobromin zu nennen, welches jedoch keinen Einsatz in der klinischen Praxis findet (Collica 2012).



**Abb. 1.4: SNP 1117C>T im caninen CYP1A2 Gen**

Auf Exon 5 des CYP1A2-Gens des Hundes befindet sich der SNP 1117C>T. Er führt zu einem vorzeitigen Stoppcodon in der proteincodierenden Sequenz. Das Basentriplet, welches normalerweise für die Aminosäure Arginin codiert, ändert sich durch den SNP in TGA (Stoppcodon). Dies führt schließlich zu einem kompletten Funktionsverlust des Enzyms. Der Nachweis des 1117C>T Polymorphismus und ob dessen Ausprägung in homozygoter (T/T) oder heterozygoter (C/T) Form vorliegt, kann z.B. mittels allelischer Diskriminierung in der PCR oder über Sequenzierung erfolgen. (Abbildung modifiziert nach Aretz & Geyer 2010)

### 1.4.2 CYP2B11

CYP2B11 ist das canine Ortholog zum humanen CYP2B6, mit einer Übereinstimmung von 78 % in der Aminosäuresequenz (Graves et al. 1990). Identifiziert wurde CYP2B11 von Eguchi et al. (1996). Hier zeigte es einen Anteil von 10 % am CYP-Totalgehalt in der Leber von Beagle-Hunden. Zum heutigen Zeitpunkt sind keine genetischen Polymorphismen im CYP2B11-Gen bekannt (Martinez et al. 2013). Unabhängig von dieser Tatsache belegen jedoch einige Studien, dass es bestimmte Variationen im Metabolismus durch CYP2B11 geben muss. Zum Beispiel zeigen Greyhounds eine 2-fach niedrigere Propofol-Clearance (kurz und schnell wirkendes Injektions-Anästhetikum) als Hunde einer anderen Rasse (Zoran et al. 1993). Andere Quellen belegen sogar eine 3-fach niedrigere mikrosomale Hydroxylaseaktivität beim Greyhound im Gegensatz zum Beagle (Court et al. 1999). Propofol ist ein Substrat von CYP2B11. Ein Erklärungsversuch dieser rasseabhängigen Unterschiede in der Metabolisierungsrate des Anästhetikums stellt eine Varianz im Gehalt des Enzyms in der Leber dar. Bei einer Untersuchung an Lebermikrosomen von Beagle und Greyhound Hunden, wurde bei vergleichbaren  $K_m$ -Werten

(Affinität des Enzyms für sein Substrat) ein Unterschied in der maximalen Umsatzgeschwindigkeit  $V_{max}$  (als Maß für die vorhandene Enzymmenge) festgestellt (Hay Kraus et al. 2000). Weitere Substrate des Enzyms sind Ketamin und Midazolam. Medetomidin fungiert als Inhibitor des Enzyms (Baratta et al. 2009).

In der mRNA-Expression von CYP2B11 gibt es keine Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Hunden (Graham et al. 2003). Andererseits konnte ein Unterschied in der Umsatzgeschwindigkeit festgestellt werden: in Lebermikrosomen männlicher Hunde konnte ein 3-fach höherer Enzymumsatz als in jenen von weiblichen Tieren nachgewiesen werden (Hay Kraus et al. 2000).

### **1.4.3 CYP2C21 und CYP2C41**

Die Sequenzen der caninen CYP2C21 und CYP2C41 mRNA-Transkripte sind bereits bekannt (Uchida et al. 1990; Blaisdell et al. 1998). 34 % des Totalgehaltes an CYP in der Leber von Beagle-Hunden fällt auf CYP2C21 (Eguchi et al. 1996). CYP2C21 und CYP2C41 zeigen 67-83 % Nukleotid- und Aminosäureidentität mit den humanen CYP2Cs, wobei die Identität hier die Anzahl an identischen Aminosäuren in Prozent beschreibt. Interessanterweise ließ sich die CYP2C41 mRNA-Expression nur bei einem von neun Hunden nachweisen (11 %), auf genomischer Ebene wurde das Gen bei 4 von 25 Hunden gefunden (16 %). Das Auftreten von CYP2C41 scheint unabhängig von Geschlecht und Rasse zu sein. CYP2C21 wurde im Gegensatz zu CYP2C41 konstitutiv von allen getesteten Hunden exprimiert (Blaisdell et al. 1998). Graham et al. (2003) fanden, dass die CYP2C41-mRNA in 5 von 11 (45 %) Beagles exprimiert wird. Dieser Polymorphismus im CYP2C41 könnte Einfluss auf den Metabolismus bestimmter Arzneistoffe haben, sollten diese ausschließlich über CYP2C41 metabolisiert werden können (Graham et al. 2003; Kamimura 2006).

Substrate von CYP2C21 und/oder CYP2C41 sind Testosteron, Diclofenac und (S)-Mephenytoin (Shou et al. 2003). Sonst ist das Substratspektrum der beiden caninen CYP2Cs weitestgehend unbekannt. Das canine CYP2C21 metabolisiert im Gegensatz zum humanen CYP2C9 jedoch keine

anionischen Substrate und ihm fehlt eine bestimmte *anion-binding-site*, welche die humane CYP2C9-Isoform aufweist (Locuson et al. 2011).

#### 1.4.4 CYP2D15

Das humane CYP2D6, welches mit großer Sequenzähnlichkeit ein Ortholog zum caninen CYP2D15 darstellt (Abb. 1.5), ist verantwortlich für den Metabolismus vieler weit verbreiteter Arzneimittel, wie z.B. Antiarrhythmika,  $\beta$ -Adrenorezeptor Antagonisten, Neuroleptika und trizyklische Antidepressiva (Roussel et al. 1998). CYP2D15 wird am stärksten in der Leber exprimiert, gefolgt von der Blase, in geringeren Mengen aber auch in Milz, Niere, Lunge und Gehirn. Es gibt keine Unterschiede in der Expression zwischen männlichen und weiblichen Tieren (Roussel et al. 1998).

Sakamoto et al. klonierten und sequenzierten 1995 erstmals ein Mitglied der CYP2D-Subfamilie des Hundes aus Lebermikrosomen. Diese in GenBank eingetragene Sequenz stellte unter anderem auch die Grundlage für die vorliegende Arbeit und für Versuche anderer Autoren dar. Die Aminosäuresequenz weist eine Homologie (wobei Homologie hier und im restlichen Text „Ähnlichkeit“ und nicht „Identität“ bedeutet) zum humanen CYP2D6 von 74,6 % auf. Diesem neu untersuchten caninen CYP, welches vorerst P450 DUT2 genannt wurde, wurde schon damals aufgrund großer funktioneller und struktureller Ähnlichkeiten zum humanen CYP2D6 eine größere Bedeutung als Modell für dieses zugesprochen (Sakamoto et al. 1995; Roussel et al. 1998). Bis heute sind verschiedene Varianten des caninen CYP2D15 bekannt (Tab. 1.2). Celecoxib, ein selektiver Cox-2-Hemmer, welcher auch als Tierarzneimittel zur Behandlung von Schmerzen und Entzündung in Zusammenhang mit degenerativen Gelenkerkrankungen beim Hund eingesetzt wird, ist z.B. ein Substrat von CYP2D15.

Das Fehlen des Exons 3 (Abb. 1.5) in der Sequenzvariante CYP2D15 $\delta$  führte in Metabolismusstudien zu einer verminderten Hydroxylaseaktivität und somit zu einer schlechteren Metabolisierungsrate von Celecoxib und stellt bis dato den einzig bekannten voraussichtlich funktionellen Polymorphismus dieses CYPs dar (Paulson et al. 1999). Interessant ist der Umstand, dass Celecoxib

beim Menschen nicht mittels CYP2D6, sondern von der CYP2C-Subfamilie biotransformiert wird (Martinez et al. 2013).

**Tab. 1.2: Vergleich der CYP2D15 Sequenz-Varianten.**

<b>CYP2D-Variante</b>	<b>Charakteristik</b>
P450 DUT2 (Sakamoto et al. 1995)	Ausgangssequenz
CYP2D15 WT2 (Roussel et al. 1998)	SNPs: 555A>G, 747A>T, 918A>G
CYP2D15 V2 (Roussel et al. 1998)	Deletion Nukleotide von G362-G515 > Elimination von 51 AS, entsprechen dem Exon 3 des humanen CYP2D6 SNPs: 555A>G, 747A>T, 918A>G
CYP2D15 V1 (Roussel et al. 1998)	SNPs: 555A>G, 747A>T, 918A>G 963C>T, 1011A>G, 1218A>G
CYP2D15*2 (Paulson et al. 1999)	SNP: 555A>G
CYP2D15*3 (Paulson et al. 1999)	SNPs: 747A>T, 918A>G
CYP2D15 $\delta$ (Paulson et al. 1999)	Deletion Nukleotide von G362-G515 > Elimination von 51 AS, entsprechen dem Exon 3 des humanen CYP2D6 SNP: 555A>G

cCYP2D15	1	MGLLTGDTLGLPLAVAVAI FLLLV DLMHRRRRWATRYPPGPTPVPMVGNLLQMDFOEPICY
delExon3	1	MGLLTGDTLGLPLAVAVAI FLLLV DLMHRRRRWATRYPPGPTPVPMVGNLLQMDFOEPICY
hCYP2D6	1	MGLEA---LVPLAVIVAIFLLLV DLMHRRRWAAARYPPGPTPPEGLGNLLHDFQNTPYC
cCYP2D15	61	FSQLOGRFGNVFSLELAWTPVVVLNGLEAVREALVHRSED TADRPPMPIYDHLGLGPESQ
delExon3	61	FSQLOGRFGNVFSLELAWTPVVVLNGLEAVREALVHRSED TADRPPMPIYDHLGLGPESQ
hCYP2D6	58	EDQLRRRFGDVFSLQLAWTPVVVLNGLAAVREALVTHGED TADRPPVPIIQILGFGPRSQ
cCYP2D15	121	GI FLARYGRAWREQRRFS STLRNEGLGKKSLEQWVTEEA SCLCAAF AEOA GRPFGPGAL
delExon3	121	-----GRPFGPGAL
hCYP2D6	118	GVFLARYGPAWREQRRFS STLRNLEGLGKKSLEQWVTEEA ACLCAAFANHS GRPFRPNGL
cCYP2D15	181	LNKAVSNV ISSLTYGRRFEYDDPRLLQLLELTQQALKQDSGFLREALNSIPVLLHIPGLA
delExon3	130	LNKAVSNV ISSLTYGRRFEYDDPRLLQLLELTQQALKQDSGFLREALNSIPVLLHIPGLA
hCYP2D6	178	LDKAVSNV IASLTCGRRFEYDDPRELRLLLLAQEG LKEESGFLREVLNAV P VLLHIPALA
cCYP2D15	241	SKVFSAQKAIITLTNEMIQEHRKTRDPTQPPRHLIDAFVDEIEKAKGNPKTSFNEENLCM
delExon3	190	SKVFSAQKAIITLTNEMIQEHRKTRDPTQPPRHLIDAFVDEIEKAKGNPKTSFNEENLCM
hCYP2D6	238	GKVLRFQKAFITQLDELLTEHRMTWDPAQPPRDLTEAF LAEMEKAKGNPESSFNENLCI
cCYP2D15	301	VTSDLFIAGMVSTISITLTWALLMILHPDVQRRVQOEIDEVIGREQLPEMGDQTRMPFTV
delExon3	250	VTSDLFIAGMVSTISITLTWALLMILHPDVQRRVQOEIDEVIGREQLPEMGDQTRMPFTV
hCYP2D6	298	VVADLESAGMVTSTITLAWLLMILHPDVQRRVQOEIDVIGQVRRPEMGDAHMPYTT
cCYP2D15	361	AVIHEVQRFGDIVPLGVPHMTSRDTEVQGF LIPKGTTLITNLSSVLKDEKVKWKKPFRFYP
delExon3	310	AVIHEVQRFGDIVPLGVPHMTSRDTEVQGF LIPKGTTLITNLSSVLKDEKVKWKKPFRFYP
hCYP2D6	358	AVIHEVQRFGDIVPLGVTHMTSRDTEVQGF LIPKGTTLITNLSSVLKDEAVWEKPFREHP
cCYP2D15	421	EHFLDAQGHFVKHEAFMPFSAGRRVCLGEPLARMELFLFFTC LLQRFSFSVPAGQPRPSD
delExon3	370	EHFLDAQGHFVKHEAFMPFSAGRRVCLGEPLARMELFLFFTC LLQRFSFSVPAGQPRPSD
hCYP2D6	418	EHFLDAQGHFVKPEAF PFSAGRRACLGEPLARMELFLFFTS LLQHFSFSVPTGQPRPSH
cCYP2D15	481	HGVFTFLKVPAPFQLCVEPR
delExon3	430	HGVFTFLKVPAPFQLCVEPR
hCYP2D6	478	HGVFAFLVTPSPVELCAVPR

**Abb. 1.5:** Aminosäure-Sequenzalignment des caninen CYP2D15 in der *full-length*-Variante (cCYP2D15) und in der kürzeren Variante mit Deletion von 51 AS (delExon3) sowie des humanen CYP2D6 (hCYP2D6).

Das Alignment wurde mit dem *ClustalW* Algorithmus berechnet und mit BOXSHADE 3.21 visualisiert. Schwarz hinterlegt zeigen sich Aminosäureidentitäten, grau schattiert die Aminosäureähnlichkeiten (Homologien). Zur Optimierung des Alignments wurden Lücken (-) eingefügt. Die 51 fehlenden AS bei der Exon 3 deletierten Variante des caninen CYP2D15 wurden rot umrandet.

### 1.4.5 CYP3A12

Die humane CYP3A-Subfamilie stellt hinsichtlich des Arzneistoffmetabolismus eine wichtige Familie dar. Es wird geschätzt, dass die humane CYP3A-Subfamilie verantwortlich ist für bis zu 50 % aller Arzneistoff-Biotransformationen (Komura & Iwaki 2008). Zum Substratspektrum gehören z.B. Makrolid-Antibiotika, Calciumkanal-Blocker und Cyclosporin (Fraser et al. 1997). Das canine CYP3A12, welches 1991 zum ersten Mal beschrieben wurde, ist zu 79,8 % identisch mit den CYP3A-Formen des Menschen (Ciaccio et al. 1991). Bereits sieben SNPs in der CYP3A12-Sequenz des Hundes sind bekannt. Fünf dieser SNPs führen zu

einem AS-Austausch, während die zwei anderen eine stille Mutation bedingen (Paulson et al. 1999). Es ist ein weiteres Cytochrom aus der CYP3A-Subfamilie des Hundes bekannt: CYP3A26. Dieses ist zu 96 % identisch mit CYP3A12 (Fraser et al. 1997). Vor der Entdeckung von CYP3A26 wurde der Anteil von CYP3A12 am Totalgehalt aller CYPs in der Leber auf 15 % bemessen (Eguchi et al. 1996), es ist aber unklar, ob hier tatsächlich nur der spezifische Gehalt an CYP3A12, oder aber der Gesamtgehalt an CYP3A bestimmt wurde (Martinez et al. 2013). Generell wird die CYP3A-Subfamilie am stärksten in der Leber exprimiert (Mealey et al. 2008).

## 1.5 Funktionelle Messungen

In Studien, welche sich mit dem Metabolismus spezifischer Arzneistoffe, speziell bezogen auf Cytochrom-P450-Enzyme, beschäftigen, finden häufig Lebermikrosomen oder Leberzellen von Mensch und Ratte Verwendung. Diese werden in Suspension für Metabolismusstudien oder in Kultur für Induktionsstudien eingesetzt (Parkinson et al. 2004)

Lebermikrosomen sind subzelluläre Fraktionen, welche die gängigen Arzneistoff-metabolisierenden Enzyme, wie Cytochrom-P450-Enzyme, Flavin-Monooxygenasen (FMOs), Carboxylesterasen, Hydrolasen und UDP-Glucuronyltransferasen (UGTs) und auch Epoxide enthalten. Da Lebermikrosomen in der Biotransformation von Xenobiotika unverzichtbar sind, stellen sie ein nützliches biologisches System dar, um verschiedene pharmakologische Fragestellungen zu beantworten.

So fanden zum Beispiel in einem *in vitro* „Propofol-Hydroxylase-Assay“ zur Bestimmung der Enzymaktivität des caninen CYP2B11, Lebermikrosomen von Greyhound und Beagle Verwendung. Für diesen Versuch wurden die Mikrosomen nach Isolierung aufbereitet und zusammen mit verschiedenen Puffern und dem Testsubstrat Propofol inkubiert. Mit Hilfe von Fluoreszenzchromatographie konnte nach dem Versuch der Gehalt von 4-Hydroxypropofol, einem Metaboliten von Propofol, bestimmt werden und hieraus Schlüsse über dessen Hydroxylierungsrate gezogen werden (Hay Kraus et al. 2000). Mit speziellen Substraten, welche als CYP-Inhibitoren fungieren, kann ebenfalls untersucht werden, inwieweit der Metabolismus

eines Stoffes hemmbar ist. Eine weitere, schnellere Methode, um die Enzymaktivität von CYPs zu testen, ist der „*rapid screening fluorometric assay*“, welcher ursprünglich Anwendung in der Erforschung der humanen CYPs fand. Der Assay basiert auf einer vom Cytochrom-P450-Enzym katalysierten Reaktion, welche ein Substrat in ein quantifizierbares fluoreszierendes Produkt umwandelt (Crespi et al. 1997). Auch dieser Assay wurde bereits erfolgreich eingesetzt, um die Aktivität verschiedener hepatischer CYPs von Katze, Hund und Mensch zu vergleichen.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Polymorphismen in den Genen der Cytochrom-P450-Enzyme (CYPs) des Hundes sind weniger gut erforscht als in den Genen des Menschen. Jedoch spielt der Hund eine wichtige Rolle als veterinärmedizinischer Patient und als Modelltier in der präklinischen Pharmakokinetik im Rahmen der Arzneistoffentwicklung und -zulassung. Die Forschungsarbeit zu Polymorphismen in den humanen CYPs hat in den vergangenen Jahren enorme Fortschritte gemacht und es hat sich gezeigt, dass genetische Variationen einen großen Einfluss auf den Metabolismus von Arzneistoffen haben können.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit sollte sein, das Wissen über die Variabilität der CYPs des Hundes zu erweitern, um langfristig in der Veterinärmedizin die therapeutische Sicherheit von Arzneistoffen zu verbessern und in pharmakokinetischen Studien, in welchen Hunde Verwendung finden, die Daten besser interpretierbar zu machen. Bis heute wurden neun canine CYPs identifiziert (CYP1A1, CYP1A2, CYP2B11, CYP2C21, CYP2C41, CYP2D15, CYP2E1, CYP3A12, CYP3A26). Für einige dieser Enzyme sind bereits Polymorphismen beschrieben.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Patientenkollektiv von Hunden unterschiedlicher Rassen, Herkunft und Geschlechts systematisch auf genetische Polymorphismen hin untersucht werden. Hierbei wurden sowohl bereits bekannte als auch mögliche unbekannte Sequenzvariationen berücksichtigt. Sechs Cytochrome wurden ausgewählt, welchen, in Anlehnung an den Menschen, die größte Rolle im Fremdstoffmetabolismus zugeschrieben wird: CYP1A2, CYP2B11, CYP2C21, CYP2C41, CYP2D15 und CYP3A12. cDNA aus Leber und genomische DNA aus Blut lieferten für diese Untersuchung das geeignete Probenmaterial. Das genetische Material wurde eingesetzt, um Variationen sowohl in der Expression als auch in den Sequenzen (Single-Nukleotid-Polymorphismen, Gendeletionen etc.) der caninen Cytochrom-P450-Enzyme zu identifizieren. Diese Inhalte bilden die wissenschaftliche Basis der Dissertation.

Vorliegende Arbeit präsentiert ein komplett neues Vorgehen in Bezug auf die großflächige Suche nach Polymorphismen, da bisher nur einheitliche Hundepopulationen (meist Beagle-Hunde eines Lieferanten) mit geringer genetischer Varianz, jedoch kein Querschnitt durch ein Patientenkollektiv untersucht wurden.

.

## 2 MATERIAL

### 2.1 Molekularbiologisches Material

#### 2.1.1 Allgemeines

- Ansätze, Puffer und Medien wurden mit bidestilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) auf das entsprechende Volumen aufgefüllt.
- Alle Dimensionsangaben entsprechen dem international verbindlichen „INTERNATIONAL SYSTEM OF UNITS“ (SI).  
(<http://physics.nist.gov/Pubs/SP330/sp330.pdf>)

#### 2.1.2 Enzyme

##### Hitzebeständige Polymerasen

<b>Taq DNA Polymerase</b> (recombinant) → keine 3' → 5' Exonuklease Aktivität	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
<b>Fast Start High Fidelity PCR System</b> → Mix aus Taq DNA Polymerase und einem thermostabilen Protein (proofreading)	Roche Diagnostics, Mannheim
<b>Phusion High-Fidelity DNA Polymerase</b> → 3' → 5' Exonuklease Aktivität → Mix aus Pyrococcus-like enzyme und einer progressiven, weiterentwickelten Domäne	Finnzymes, Espoo, Finnland
<b>Long PCR Enzyme Mix</b> → Mix aus Taq DNA Polymerase und thermostabiler DNA, <i>proofreading</i> activity → generiert aus genomischer DNA Amplikons bis zu einer Größe von 21 kb	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
<b>DyNAzyme DNA Polymerase</b>	MBI Fermentas, St. Leon-Roth

## Reverse Transkriptase

SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR     Invitrogen, Karlsruhe

## Sonstige Enzyme

DNase I, RNase-frei     Qiagen GmbH, Hilden  
 DNase I, RNase-frei (1U/μL)     MBI Fermentas, St. Leon-Roth

## Sonstiges Material

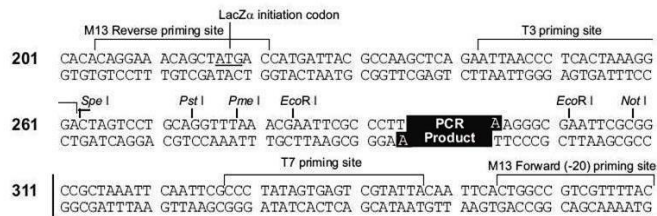
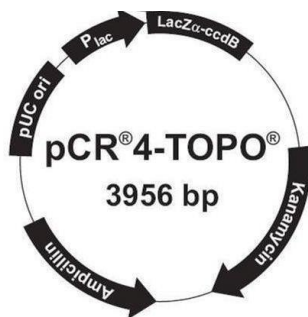
dNTPs (je 10 mM)     MBI Fermentas, St. Leon-Roth  
 Wasser für die Molekularbiologie     Roth, Karlsruhe

## 2.1.3 Vektoren

Der pCR4-TOPO-Vektor wurde zur Sequenzierung der CYP-Amplifikate verwendet.

### pCR4-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe)

3956 bp Gesamtlänge  
 CMV-Promotor, lac promotor Region,  
 M13 Reverse priming site, M13 Forward priming site,  
 T3/T7 Priming site,  
 Ampicillin resistance gene,  
 Kanamycin resistance gene  
 MCS: SpeI, PstI, PmeI, EcoRI, NotI



## 2.1.4 Bakterienstämme

### TOP10 chemically competent cells (Invitrogen, Karlsruhe)

Genotyp: F-mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 recA1  
araD139  $\Delta$ (ara-leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG  $\lambda$ -

### XL1-Blue supercompetent cells (Stratagene, Heidelberg)

Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB  
lacIqZ $\Delta$ M15 Tn10 (Tetr)]

## 2.1.5 cDNA

PCR Ready First Strand cDNA (BioChain, CA, USA)  
Catalog No.: C1734149, Dog Liver

## 2.1.6 Quantitative *real-time* PCR (qPCR)

### TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Darmstadt)

Nachfolgende Assays sind für den Hund aus kommerziell erhältlichen, bereits vorgefertigten Assays von Applied Biosystems ausgewählt. Folgende Präfixbedeutung wird verwendet: cf für *Canis familiaris*. Die Endung *\_m* bedeutet, dass die Sonde auf der Grenze zweier benachbarter Exons liegt. Dieser Assay kann somit keine genomische DNA detektieren und es ist kein DNase-Verdau notwendig. Die Endung *\_g* kennzeichnet, dass Primer und Sonde innerhalb eines Exons liegen und genomische DNA detektieren können; ein DNase-Verdau ist entsprechend notwendig.

### TaqMan Gene Expression Assays

CYP2C21 canis:	Cf02623107_m1
CYP3A12 canis:	Cf03417922_mH
CYP2B11 canis:	Cf02623107_m1
CYP2D15 canis:	Cf02628164_m1
CYP1A2 canis:	Cf02622290_m1
ACTB canis:	Cf03023880_g1
B2M canis:	Cf02659079_m1

Komponenten: zwei unmarkierte Primer zur Amplifikation  
 FAM-markierte TaqMan MGB (*minor groove binder*)  
 Sonde

### TaqMan Universal PCR Master Mix

Komponenten: AmpliTaq Gold DNA Polymerase  
 dNTPs mit dUTP  
 Referenzfarbstoff ROX  
 optimierte Pufferkomponenten

## 2.1.7 Längenstandards

### Agarosegelelektrophorese

Gene Ruler DNA Ladder Mix	100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1 000, 1 200, 1 500, 2 000, 2 500, 3 000, 3 500, 4 000, 5 000, 6 000, 8 000, 10 000 bp	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Gene Ruler Low Range DNA Ladder	25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 700 bp	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
FastRuler High Range DNA Ladder	500, 1 000, 2 000, 4 000, 10 000 bp	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
RiboRuler High Range RNA Ladder	200, 500, 1 000, 1 500, 2 000, 3 000, 4 000, 6 000 bp	MBI Fermentas, St. Leon-Roth

## 2.1.8 Kommerziell erhältliche Kits und Materialien

HiYield Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Gel-Aufreinigung)	SLG, Gauting
NucleoSpin Blood QuickPure Kit (Extraktion genomischer DNA aus Blut)	Macherey Nagel, Düren
Qiaprep Spin Mini Kit (Plasmidpräparation)	Qiagen GmbH, Hilden
RNeasy Mini Kit (RNA-Aufreinigung)	Qiagen GmbH, Hilden
RNA-6000-Nano-Marker	Ambion, Life Technologies GmbH, Darmstadt

RNA-6000 Nano LabChip Kit	Agilent Technologies, Böblingen
RNA Later Tissue Collection: RNA Stabilization Solution	Applied Biosystems, Darmstadt
SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (cDNA-Synthese)	Invitrogen, Karlsruhe
Tri Reagent (RNA-Isolierung)	Sigma, Taufkirchen

## 2.1.9 Puffer und Medien

<b>LB-Medium (1 L)</b>	NaCl	10 g
	Trypton	10 g
	Yeast-Extract	5 g
	→ pH 7,0 (NaOH)	
	→ autoklavieren	
	→ Selektionsantibiotikum (Ampicillin) hinzufügen, direkt vor Gebrauch	
<b>LB-Agar (1 L)</b>	LB-Medium	1 L
	Agar-Agar	20 g
	→ autoklavieren	
	→ auf 60 °C abkühlen	
	→ Selektionsantibiotikum (Ampicillin) hinzufügen	
	→ Platten unter Abzug gießen	
<b>S.O.C. Medium</b> (Invitrogen, Karlsruhe)	Trypton	2 %
	Yeast-Extract	0,5 %
	Glucose	20 mM
	NaCl	10 mM
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM
	MgSO <sub>4</sub>	10 mM
	KCl	2,5 mM

## 2.2 Agarosegelelektrophorese

### 2.2.1 Native Agarosegelelektrophorese (DNA)

<b>6 x Ladepuffer</b> (MBI Fermentas, St. Leon- Roth)	EDTA	60 mM
	Tris-HCL (pH 7,6)	10 mM
	Glycerin	60 %
	Bromphenolblau	0,03 %
	Xylen Cyanol FF	0,03 %

MATERIAL

<b>10 x TAE (1 L)</b>	Tris	400 mM	484 g
	17,4 M Essigsäure		114,2 mL
	0,25 M EDTA, pH 8,0	100 mM	400 mL
<b>1 x TAE (1 L)</b>	10 x TAE		100 mL
	Steril filtriertes H <sub>2</sub> O		900 mL
<b>EB-Färbelösung</b>	Ethidiumbromid in H <sub>2</sub> O	1 µg/µL	
<b>GelRed-Färbelösung</b> (Invitrogen, Karlsruhe)	GelRed		300 µL
	H <sub>2</sub> O		900 mL
	1M NaCl		100 mL
<b>1 % Agarosegel</b>	Agarose		1 g
	1 x TAE Puffer		100 mL

### 2.2.2 Denaturierende Agarosegelelektrophorese (RNA)

<b>DEPC-ddH<sub>2</sub>O (1 L)</b>	DEPC [1 mg/mL]	0,1 %	1 mL
	ddH <sub>2</sub> O → über Nacht auf Magnetrührer inkubieren → autoklavieren		1 L
<b>10 x MOPS-Puffer (400 mL)</b>	MOPS	200 mM	16,74 g
	Natriumacetat	100 mM	3,28 g
	20 mM EDTA	1 mM	20 mL
	DEPC-ddH <sub>2</sub> O		380 mL
	→ pH 7,0 (NaOH) → lichtgeschützt lagern → als 1 x verwenden		
<b>Agarosegel</b>	Agarose		1 g
	DEPC-ddH <sub>2</sub> O		40 mL
	10 x MOPS		5 mL
	→ kochen bis Agarose gelöst ist → Formaldehyd zugeben und Gel gießen		7 mL
<b>1,3 x Ladepuffer Roti- Load RNA</b> (Roth, Karlsruhe)	Formamid	55 %	
	MOPS	22 mM	
	Natriumacetat	8,8 mM	
	EDTA	1 mM	
	Formaldehyd	6,8 %	
	Bromphenolblau	0,03 %	
	Ethidiumbromid → pH 7,0	0,005 %	

## 2.3 Chemische Substanzen und Reagenzien

Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
Chloroform	Roth, Karlsruhe
DMSO	Roth, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol (> 99,8 %), EtOH abs.	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
GelRed Färbelösung	Invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid, KCl	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Molekularbiologisches Wasser	Roth, Karlsruhe
MOPS-Puffer	Sigma, Steinheim
Natriumchlorid, NaCl	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid, NaOH	Roth, Karlsruhe
S.O.C. Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure, HCl	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe

## 2.4 Geräte

Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Analysewaagen:	
AE 260 Delta Range	Mettler-Toledo, Gießen
C-30 Microbalance	Cahn Instruments, Cerritos, CA, USA
Precisa 3000C-6000D	DAK-Oerlikon, Zürich, Schweiz
Autoklav Sanoclav	Wolf, Geislingen
Autoklav Systec 3150 EL	Systec, Wettenberg
BioPhotometer Spectrophotometer UV/VIS	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Electrophoresis Power Supply EPS600	Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK
Elektrophorese-Kammern	Werkstatt MZI, Gießen
14,5 x 6,5 cm	
35,5 x 11,0 cm	
FastPrep-24 Instrument	MP Biomedicals, Eschwege
G24 Environmental Incubator Shaker	New Brunswick Scientific, Edison, N.J., USA
Gelschlitten	Werkstatt MZI, Gießen
12 x 18 cm, 7,5 x 5 cm	
Image Master VDS	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK
Laminar Flow, Clean Air, Typ DLF-REL 6	Heraeus, Hanau
Perkin-Elmer Gene Amp Cyclor Typ 2400	PerkinElmer, Weiterstadt

Spannungsgeber (0-200 mA, 1 kV, 150 W)  
 Thermocycler Primus 96 Advanced Gradient  
 Ultra-Turrax-Homogenisator T25  
 Vortex VF 2  
 Wärmeschrank 221  
 Wasserbad SW21  
 Zentrifugen:  
     Kühlzentrifuge 5471  
     Tischzentrifuge 5415D

Werkstatt MZI, Gießen  
 PeqLab, Erlangen  
 IKA, Staufen  
 Janke und Kunkel, Staufen  
 Melag, Berlin  
 Julabo, Seelbach  
  
 Eppendorf, Hamburg  
 Eppendorf, Hamburg

## 2.5 Verbrauchsmaterial

Einmalhandschuhe  
 Einmalpipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL)  
 Nitrilhandschuhe  
 PCR-tubes, 0,2 mL  
 Petrischalen  
 Pipettenspitzen (10 µL, 200 µL, 1000 µL)  
 Reaktionsgefäße (1,5 mL, 2 mL, 15 mL, 50 mL)  
 Schraubdeckelgefäße  
 Sterilfilter 0,22 µm

Roth, Karlsruhe  
 Sarstedt, Nümbrecht  
 Roth, Karlsruhe  
 ABgene, Epsom, UK  
 Nerbe plus, Winsen/Luhe  
 Sarstedt, Nümbrecht  
 Sarstedt, Nümbrecht  
 Sarstedt, Nümbrecht  
 Sarstedt, Nümbrecht

## 2.6 Bioinformatische Programme und Datenbanken

BLAST, NCBI  
[www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)  
 BOXSHADE 3.21  
[http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)  
 ClustalW  
[www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html)  
 DNASTar Version 8.0.2, Lasergene, Madison, USA  
 EditSeq  
 MegAlign  
 EMBL-EBI, European Bioinformatics Institute  
[www.ebi.ac.uk/Information/sitemap.html](http://www.ebi.ac.uk/Information/sitemap.html)  
 Ensembl, EBI  
[www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)  
 FinchTV (Geospiza)  
[www.geospiza.com/finchtv/](http://www.geospiza.com/finchtv/)  
 GraphPad Prism 4, San Diego, CA, USA  
[www.graphpad.com/prism/pdemo.htm](http://www.graphpad.com/prism/pdemo.htm)

Vergleich von Sequenzen  
 gegen die Datenbank  
 Visualisierung  
 Sequenzalignments  
 Sequenzalignments  
  
 Bearbeiten von Sequenzen  
 Sequenzvergleich und  
 Alignments  
  
 Datenbankportal Europa  
  
 Gen Browser  
  
 Auswertung von  
 Sequenzspuren  
  
 Berechnung und Darstellung  
 von Kinetiken, Graphiken,  
 statistische Auswertung

NCBI  
[www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

Datenbankportal des  
National Center for  
Biotechnology Information,  
USA (Literaturrecherche,  
Sequenzsuche)

PyMOL  
<http://www.pymol.org/>  
DeLano Scientific LLC, Schrödinger

3D-Grafiksoftware, zur  
Darstellung von  
Biomolekülen

SIFT  
<http://sift.jcvi.org/>

Bewertung von SNPs

TreeView 1.6.6  
[taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html](http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html)

Darstellung von  
Verwandtschafts-  
Diagrammen

## 3 METHODEN

### 3.1 Allgemeine Methoden in der Molekularbiologie

Folgende Seiten erläutern grundlegende molekularbiologische Methoden, welche in der Arbeit Anwendung fanden.

#### 3.1.1 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung

Die zu messende Lösung (z.B. DNA) wurde in ddH<sub>2</sub>O, im Verhältnis 5 µL Probe zu 95 µL Wasser (1:20), verdünnt. In einer Küvette wurde die optische Dichte bei 260 nm (OD<sub>260</sub>) im Photometer (Eppendorf) gemessen. Als Leerwert diente der Lösungspuffer der DNA bzw. RNA. Er wurde im gleichen Verhältnis wie die entsprechenden Proben mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt.

Die Konzentration wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{L}] = \frac{\text{OD}_{260} \times E \times \text{Verdünnungsfaktor}}{1000 \mu\text{L}}$$

E = Extinktionskoeffizient; E<sub>DNA</sub> = 50 µg; E<sub>RNA</sub> = 40 µg

Durch Bestimmung der OD<sub>280</sub> konnte zusätzlich die Reinheit der DNA bzw. der RNA ermittelt werden. Der Quotient von OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> sollte für DNA zwischen 1,7 und 2,0 und für RNA über 1,8 liegen.

### 3.1.2 Native Agarosegelelektrophorese

Für die Auftrennung und Identifizierung von DNA-Fragmenten können standardmäßig 1 % Agarosegele verwendet werden, welche eine gute Auftrennung von DNA-Fragmenten zwischen 500 bis 10 000 bp ermöglichen. Eine Anpassung der Agarosekonzentration an die Größe der DNA-Fragmente ist jedoch sinnvoll. Kleinere Amplifikate lassen sich besser auf einem hochprozentigen Gel auftrennen, größere hingegen auf einem niedrigprozentigen. Es wurden 0,8 bis 2 g Agarose in 100 mL 1 x TAE durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und nach leichtem Abkühlen auf ca. 60 °C das Gel gegossen. Das erhärtete Gel wurde in die mit 1 x TAE (Laufpuffer) gefüllte Elektrophorese-Kammer überführt und die mit 6 x Ladepuffer vermischten Proben auf das Gel aufgetragen. Zur Größenbestimmung dienten der Längenstandard *GeneRuler DNA Ladder Mix* (MBI Fermentas), *GeneRuler Low Range DNA Ladder Mix* (Thermo Scientific) oder *GeneRuler High Range DNA Ladder Mix* (MBI Fermentas). Die Elektrophorese erfolgte bei 5-10 V/cm bis die Bromphenol-Blaufont ca. 2/3 des Gels durchlaufen hatte. Im Anschluss wurden die Gele 20 min in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/µL) oder einer GelRed-Lösung gefärbt. Die mit Ethidiumbromidlösung gefärbten Gele mussten für 20 min gewässert werden. Dieser Schritt entfiel beim Färben mit GelRed.

Eine weitere Möglichkeit, DNA auf dem Agarosegel sichtbar zu machen, war es, das GelRed im Verhältnis 1:10 000 direkt in die heiße Agarose dazugeben. Das Gel konnte hierbei direkt nach dem Lauf mit dem *Image Master* (Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) fotografiert werden.

### 3.1.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurden mit dem *Hi Yield Gel/PCR DNA-Fragments-Extractions-Kit* von SLG aufgereinigt. Das nur kurz (5 min) in GelRed oder Ethidiumbromid gefärbte, niedrigprozentige, präparative Gel wurde auf dem UV-Transilluminator betrachtet und die gewünschte DNA-Bande mit einem Skalpell herausgeschnitten und mit einer Pinzette in ein vorgewogenes 2 mL Reaktionsgefäß überführt.

Das ausgeschnittene Stück sollte hierbei nicht schwerer als 300 mg sein. Es wurden 500 µL *DF Puffer* hinzugegeben, gevortext und bei 50-60 °C für 10-15 min inkubiert, bis sich das Gel-Stück komplett aufgelöst hatte. Das Reaktionsgefäß wurde alle 2-3 min geschwenkt. Im Anschluss wurde das Gemisch auf Raumtemperatur abgekühlt. 800 µL Gemisch wurde auf eine im Kit enthaltene Säule (*DF Column*) gegeben, welche in ein 2 mL Auffanggefäß gesetzt wurde. Es wurde für 30 s bei 13 200 rpm (*full speed*) zentrifugiert und das Eluat verworfen. Danach folgten zwei Waschschriffe, jeweils mit 600 µL *Wash Buffer*, welcher Ethanol enthält. Das Eluat war jedes Mal zu verwerfen. Zur Trocknung der Säule erfolgte anschließend eine Zentrifugation für 3 min. Zur Elution der DNA aus der Säule wurde diese in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und auf den Filter der Säule 40 µL *Elution Buffer* gegeben und 2 min gewartet. Nach der Zentrifugation bei *full speed* für 2 min befand sich die eluierte DNA im Durchfluss. Zur Überprüfung der aufgereinigten DNA erfolgt eine Agarosegelelektrophorese.

### 3.1.4 Aufreinigung von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab wurde das *Qiaprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen) verwendet. 4 mL LB-Ampicillin-Medium wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und für 16-18 h bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. 2 x 2 mL der Bakteriensuspension wurden bei 16 100 g (13 200 rpm) für 2 min zentrifugiert und das Bakterienpellet in 250 µL Puffer *P1* vollständig resuspendiert. Nach der zügigen Zugabe von 250 µL Puffer *P2* folgte der Zusatz von Puffer *N3*, wonach jeweils das Reaktionsgefäß zum Mischen invertiert wurde. Ein Pellet entstand danach durch 10 min

Zentrifugation des Präzipitats. Anschließend wurde der Überstand in eine *Qiaprep* Säule überführt und für 60 s durch die Silikamembran zentrifugiert. Das Waschen der Säule folgte mit 500 µL Puffer *PB* und 750 µL Puffer *PE*, wobei nach Zugabe 60 s zentrifugiert und das Eluat verworfen wurde. Die Elution der gebundenen Plasmid-DNA erfolgte mit 50 µL Puffer *EB* (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) oder ddH<sub>2</sub>O durch Zentrifugation in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß. Die Konzentration der eluierten DNA konnte im Photometer gemessen werden und diese danach bei -20 °C gelagert werden.

## 3.2 Isolierung und Aufarbeitung von RNA

### 3.2.1 Probenmaterial

Die RNA, die in dieser Arbeit nach Transkription in cDNA als Ausgangsmaterial zahlreicher Experimente genutzt wurde, z.B. für die PCR, wurde aus Leber-Gewebe isoliert. Es handelte sich um eine retrospektive Analyse von Leberbiopsien, welche nicht extra für diese Studie entnommen wurden. Sie stammen vom Patientengut der Klinik für Kleintiere, Chirurgie, der Justus-Liebig-Universität in Gießen. Die Spendertiere waren Hunde (Katzen), denen aus medizinischen Gründen zu diagnostischen Zwecken eine Leberbiopsie entnommen wurde. Überschüssiges Probenmaterial, welches nach Beendigung der diagnostischen Untersuchungen normalerweise vernichtet werden würde, wurde uns zur Verfügung gestellt. Diese „Restbiopsien“ variierten in Masse und Größe stark voneinander, da sie teilweise Ultraschall gestützt per Feinnadelaspiration (20 mg) oder in einer Laparotomie (500 mg) entnommen wurden. Die Leberbiopsien wurden in 2,0 mL Reaktionsgefäßen in *RNAlater* (Ambion) gesammelt und konnten auch in dieser Lösung bei -20 °C gelagert werden.

Daten über die beprobten Hunde und Katzen konnten aus dem Patientenverwaltungssystem der Klinik für Kleintiere entnommen werden, da alle Proben mit einer mehrstelligen fortlaufenden Nummer versehen wurden. Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden die Hunde (Katzen) bzw. die Leberbiopsien nach Eingangszeitpunkt einfach, fortlaufend nummeriert (Tab. 3.1).

**Tab. 3.1: Übersicht über die ersten 31 Hunde bzw. Katzen (Ktz.), von welchen Leberbiopsien untersucht wurden.**

Aufgrund von Konzentrations- oder Qualitätsunterschieden wurde die isolierte RNA nicht von allen hier aufgelisteten Hunden in die verschiedenen Versuche eingesetzt. Die Proben der Katzen wurden für potentielle andere Studien aufbewahrt. ♂k/♀k: männlich bzw. weiblich kastriert.

Patienten Nr. Klinik für Kleintiere	Proben Nummer (# Hund)	Geschlecht	Alter in Jahren	Rasse
kommerzielle Leber-cDNA (Biochain)	gek	♀	2	Beagle
72990	1	♂k	1	Englischer Cockerspaniel
74218	2	♀k	2	Golden Retriever
76006	3	♀k	13	Ktz. Europ. Kurzhaar
70721	4	♀k	2	Golden Retriever
76905	5	♂	2	Rottweiler
76905	6	♂k	14	Mischling
74848	7	♀k	13	Englischer Cockerspaniel
79749	8	♂	1	Labrador Retriever
82382	9	♀	2	Border Collie
13962	10	♂	15	West Highland White Terrier
82565	11	♀k	11	Mischling
16472	12	♂	10	Zwergpinscher
82054	13	♂k	7	Malteser
82968	14	♀	11	Jack-Russel Terrier
82659	15	♂k	12	Tibet Terrier
84389	16	♂	3	Tervueren
85840	17	♀	9	Dackel
87280	18	♂k	11	West Highland White Terrier
88997	19	♂k	4	Labrador Retriever
74774	20	♀k	20	Ktz. Mischling
90029	21	♂	10	Großer Münsterländer
92640	22	♀k	14	Mischling
92881	23	♂k	12	Ktz. Norwegische Waldkatze
99058	24	♂k	13	Mischling
101018	25	♀k	13	Jack-Russel Terrier
100438	26	♀k	7	Border Collie
102826	27	♀k	9	Mischling
103605	28	♀k	14	Australien Shepherd
105660	29	♀k	13	Dackel
108016	30	♀	6	Spitz
111316	31	♀k	4	Mischling

Die Qualität des Probenmaterials bzw. der daraus gewonnenen RNA variierte stark. Dies begründete sich zum einen in der Größe der Leberstücke: So konnte aus einer sehr kleinen Probe weniger RNA als aus einer großen isoliert werden. Zum anderen handelte es sich bei den

Spendertieren meist um leberkranke Patienten, welche z.B. das Bild einer Leberfibrose oder Fettleber zeigten. Auch diese Erkrankungen wirkten sich auf die Ausbeute, Reinheit und Qualität der RNA aus.

Dieser Umstand erklärt, warum nicht von jedem Hund alle CYPs amplifiziert werden konnten oder nicht die cDNA aller Hunde in der *real-time* PCR eingesetzt wurde. Die Versuchsergebnisse wären sehr stark von Qualitätsunterschieden im Ausgangsmaterial beeinflusst worden. Daher wurde dieses, wie z.B. bei den Expressionsuntersuchungen, zuvor qualitativ untersucht und nur Material mit vergleichbarer Qualität verwendet.

### **3.2.2 Isolierung von Total-RNA aus Geweben**

RNA ist gegenüber ubiquitär vorkommenden RNasen sehr empfindlich, daher musste die gesamte Arbeitsfläche vor Beginn mit *RNaseZap Wipes* und *RNase AWAY Reagent* (Ambion) gründlich gereinigt werden.

Die Isolierung von Total-RNA erfolgte mit der *TRI REAGENT* Methode von SIGMA. *RNAlater* wurde vom Lebergewebe abpipettiert. Anschließend wurde 1 mL *TRI REAGENT* pro 50-100 mg Gewebe hinzugegeben. Die Homogenisierung erfolgte entweder in 15 mL Sarstedt Reaktionsgefäße mit Hilfe eines elektrischen Rotor-Stator-Homogenisators, oder in 2,0 mL Reaktionsgefäßen, gefüllt mit speziellen Metall Perlen (*Lysing Matrix M*) mit Hilfe des *FastPrep-24* von MPbio. *TRI REAGENT* enthält Guanidinisothiocyanat und Phenol in einer einphasigen Lösung. Das Salz Guanidinisothiocyanat wirkt als chaotropes Agens, das Zellen lysiert und zugleich RNasen vollständig inaktiviert. Das gewonnene Homogenat wurde danach in Form von 1 mL Aliquots in 2 mL Reaktionsgefäße überführt und für 10 min bei 12 000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß überführt und anschließend für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 200 µL Chloroform je eingesetztem mL *TRI REAGENT* zugegeben, für 5 s kräftig geschüttelt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei 12 000 g und 4 °C zentrifugiert. Nach diesem Schritt separierten sich drei Phasen, wobei die RNA in der oberen wässrigen Phase enthalten war. Die DNA befand sich in der wässrigen Interphase, die Proteine verblieben

dagegen in der unteren organischen Phase, welche sich rot darstellte. Die obere Phase wurde abpipettiert und in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 500 µL Isopropanol pro eingesetztem 1 mL *TRI REAGENT* zugegeben, die Proben für 10 min bei RT inkubiert und anschließend für 10 min bei 12 000 g und 4 °C zentrifugiert. Nach dieser Zentrifugation sollte sich an der unteren Seite des Röhrchens ein weißliches RNA-Pellet bilden. Der Überstand wurde vorsichtig abgezogen und das Pellet zweimal mit 1 mL Ethanol (75 %) durch Zentrifugation bei 12 000 g bei 4 °C für 10 min gewaschen. Nach Lufttrocknung des Pellets wurde dieses in RNase-freiem Wasser gelöst und die Konzentration und Reinheit mittels Photometrie und stichprobenartig per denaturierender Gelelektrophorese bestimmt.

### **3.2.3 Denaturierende Agarosegelelektrophorese**

Zur Qualitätskontrolle der gewonnenen RNA wurde stichprobenartig eine Elektrophorese in einem Agarose/Formaldehyd-Gel (denaturierendes Gel) vorgenommen. Auch hier mussten zuerst Arbeitsfläche, Kammer und Agarose-Schlitten mit Ethanol (70 %) und anschließend mit DEPC-Wasser gut abgewischt werden. Es wurde 1 g Agarose in 40 mL DEPC-ddH<sub>2</sub>O und 5 mL 10 x MOPS-Puffer aufgekocht. Als die Lösung auf 50 °C abgekühlt war wurden 7 mL 37 % Formaldehyd zugegeben und in den Agarose-Schlitten gegossen. Nach Aushärtung wurden die Gele in die mit 1 x MOPS-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt. 1 µg RNA wurde mit 1,3 x Ladepuffer *Roti-Load RNA* (Roth) versetzt und bei 68 °C für 10 min denaturiert, auf Eis abgekühlt und in die Taschen des Gels pipettiert. Als Längenstandard dienten 3 µL *peqGOLD High Range RTU RNA-Leiter* (Peqlab), gemischt mit 6 µL Ladepuffer *Roti-Load RNA* (Roth). Der Lauf der Proben aus den Taschen erfolgte bei 30 mA für 15 min mit einer anschließenden Auftrennung der RNA bei 60 mA. Nach Färbung mit Ethidiumbromid konnte das Gel unter dem UV-Transilluminator begutachtet und fotografiert werden. Reine, nicht-degradierte RNA zeigt zwei Banden, eine bei ~ 1 800 bp (18S-rRNA) und eine bei ~ 5 000 bp (28S-rRNA). Eine verschmierte Bande stellte degradierte RNA dar.

### 3.2.4 DNase-Verdau

Um einen verbleibenden Rest von genomischer DNA zu verdauen, wurde mit der RNA eine DNase-Behandlung durchgeführt. Folgender Ansatz wurde mit der RNase-freien *DNase I* (Fermentas) hergestellt:

RNA	1 µg
10X Puffer mit MgCl <sub>2</sub>	1 µL
DEPC behandeltes Wasser	auf 9 µL auffüllen
DNase I, RNase-frei (1u/µL)	1 µL

Der Ansatz wurde für 30 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1 µL 25 mM EDTA erfolgte eine weitere Inkubation für 10 min bei 65 °C. Sollte die cDNA in die *real-time* PCR eingesetzt werden, so wurde die RNA vor der cDNA-Synthese mit dem *RNeasy Kit* von Qiagen aufgereinigt, um cDNA in einheitlicher Qualität zu erhalten. Vor dieser Aufreinigung wurde bei der extrahierten RNA eine abweichende DNase-Behandlung durchgeführt.

Folgender Ansatz wurde mit der *RNase free DNase I* von Qiagen in einem 0,5 mL Reaktionsgefäß angesetzt:

RNA	≈ 20 µg (≤ 87,5 µL)
Buffer RDD	10 µL
DNase I stock solution	2,5 µL
DEPC behandeltes Wasser	auf 100 µL auffüllen

Der Ansatz wurde für 10 min bei Zimmertemperatur (20-25 °C) inkubiert.

### 3.2.5 RNA-Aufreinigung

Mit dem *RNeasy Mini Kit* von Qiagen können bis zu 100 µg RNA aufgereinigt werden. Nach dem DNase-Verdau mit der *RNase freien DNase I* von Qiagen wurde dem entstandenen Ansatz von 100 µL, welcher meist 10-20 µg RNA enthielt, 350 µL *Buffer RLT* hinzugegeben. Der *Buffer RLT* wurde zuvor mit 10 µL β-Mercaptoethanol pro 1 mL *Buffer RLT* vermischt. β-Mercaptoethanol spielt eine große Rolle bei der Inaktivierung von RNasen. Nach der Zugabe von *Buffer RLT* wurde der Ansatz gut vermischt und 250 µL Ethanol (96-100 %) hinzu pipettiert. Schnell wurde die entstandene Mischung auf eine im Kit enthaltene Säule gegeben, platziert in einem 2 mL Reaktionsgefäß und dieses bei  $\geq 8\,000\text{ g}$  für 15 s zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen. Es folgten zwei Waschschrte mit 500 µL *Buffer RPE*, nach Zentrifugationen bei  $\geq 8\,000\text{ g}$  für 15 s und 2 min wurde das Eluat jeweils verworfen. Anschließend wurde die Säule in ein neues, leeres 2 mL Reaktionsgefäß gesetzt und zum Trocknen der Membran erneut bei *full speed* für 1 min zentrifugiert.

Nach diesem Schritt konnte die Säule mit an die Membran gebundener RNA in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß verbracht werden und die RNA durch Zugabe von 40 µL RNase freiem Wasser und Inkubation von 2 min gelöst und mittels Zentrifugation bei  $\geq 8\,000\text{ g}$  für 1 min eluiert werden. Die Konzentration und Reinheit der aufgereinigten RNA wurde anschließend mittels Photometrie bestimmt.

### 3.2.6 RNA-Quantifizierung mittels *Agilent 2100 Bioanalyzer*

Für bestimmte Versuche, wie z.B. die *real-time* PCR, musste die eingesetzte cDNA verschiedener Individuen eine vergleichbare Qualität aufweisen. Daher wurde die bereits aufgereinigte RNA vor der cDNA-Synthese in einem *Agilent 2100 Bioanalyzer* von Agilent Technologies hinsichtlich ihrer Qualität untersucht. Der Bioanalyzer analysiert DNA, RNA, Zellen und Proteine. Er bedient sich der automatisierten Kapillarelektrophorese mit Lab-on-Chip-Technologie.

Mit Hilfe dieser Kapillarelektrophorese werden die einzelnen Fraktionen der rRNA (5S, 18S, 28S), die mRNA, sowie fragmentierte RNAs der Größe nach aufgetrennt, visualisiert in einem Elektropherogramm und als „virtuelles Gelbild“ dargestellt. Zusätzlich generiert das System einen Zahlenwert von 1 bis 10, die sog. RNA *Integrity Number* (RIN). Hierbei repräsentiert ein Wert von 10 eine intakte, nicht degradierte und nicht fragmentierte RNA von sehr hoher Qualität. Ein Zahlenwert von 1 steht für komplett degradierte und fragmentierte RNA mit geringster Qualität. Nur RNA, welche einen RIN-Wert von  $\geq 6.5$  aufwies, wurde anschließend in die cDNA-Synthese eingesetzt und die gewonnene cDNA für die *real-time* PCR verwendet.

Nur 1  $\mu\text{L}$  RNA wird zur Analyse benötigt (50 pg Gesamt-RNA). Diese wird in einen RNA-LabChip eingesetzt, welcher ein miteinander verbundenes System von Mikrokanälen enthält, durch welches die Nukleinsäuren entsprechend ihrer Größe gesiebt und mit Hilfe der Elektrophorese aufgetrennt werden. Um ein Elektropherogramm darzustellen, misst der Bioanalyzer die Fluoreszenz der RNA-Proben über die Zeit. Zugehörig zu jeder Probe erstellt die Software ein vom Elektropherogramm abgeleitetes Gelbild.

Zur Analyse wurde das *RNA-6000-Nano-LabChip-Kit* verwendet. Alle zugehörigen Reagenzien, welche bei 4 °C gelagert wurden, sollten 30 min vor Versuchsbeginn abgedunkelt bei Raumtemperatur stehen.

Die Bestandteile des Kits setzen sich wie folgt zusammen:

RNA-Chips, RNA-Gel-Matrix, RNA-6000-Dye-Konzentrat, RNA-6000-Nano Marker, zwei Elektrodenreinigungschips, Spritzenet, Spin Filter.

Zusätzlich wurden benötigt:

Chip-Priming-Station, RNA-6000-Ladder zur Quantifizierung der RNA-Proben (Ambion).

Die Arbeitsschritte stellten sich wie folgt dar:

1. Ansetzen des Gel-Dye-Mixes:

400  $\mu\text{L}$  RNA-Gel Matrix wurde in den Spin-Filter pipettiert und bei 4 000 rpm für 10 min zentrifugiert. 130  $\mu\text{L}$  der filtrierten RNA-Gel Matrix wurden in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß mit 2  $\mu\text{L}$  RNA-Dye-Konzentrat gemischt.

2. Vorbereitung des RNA-Nano-Chips:

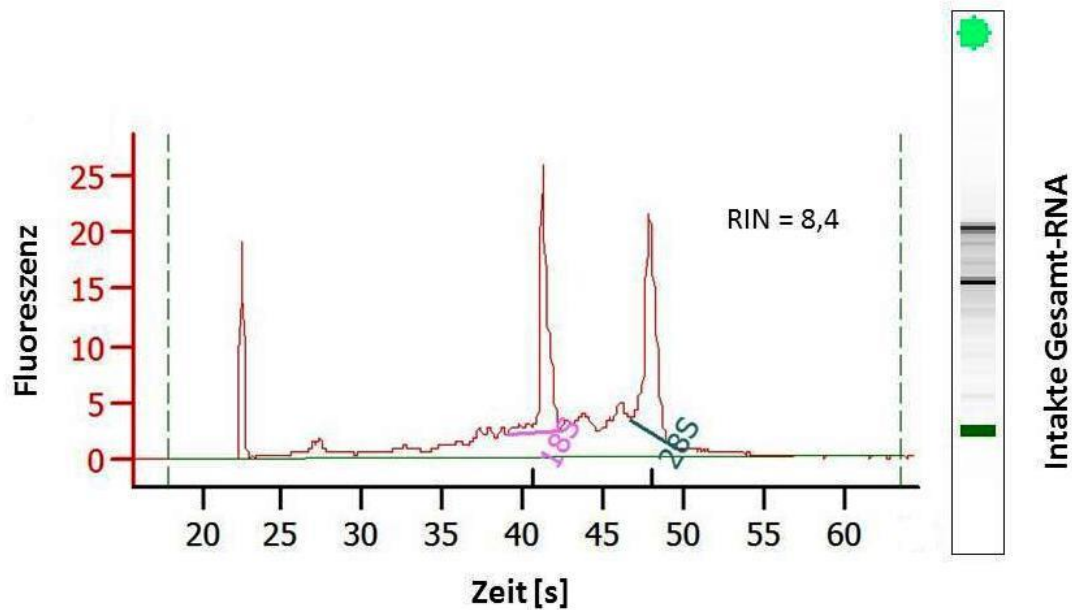
Ein RNA-Nano-Chip wurde in die Priming Station gesetzt. 9  $\mu\text{L}$  des vorbereiteten Gel-Dye-Mixes wurden in die auf dem Chip dafür vorgesehene Vertiefung pipettiert. Die Priming-Station besitzt einen Tauchkolben; mit dessen Hilfe konnte für 30 s ein definierter Druck auf den Chip ausgeübt werden, um diesen zu beladen. Auch in die beiden anderen gekennzeichneten Probenöffnungen wurden 9  $\mu\text{L}$  Dye-Mix pipettiert. Für den RNA-Nano-Marker sind ebenfalls Öffnungen vorgesehen, in diese wurden je 5  $\mu\text{L}$  des Markers gegeben. Anschließend wurde 1  $\mu\text{L}$  RNA-6000-Ladder in die mit einer Leiter markierte Vertiefung pipettiert.

3. Einfüllen der Proben:

Nach der Vorbereitung konnte jeweils 1  $\mu\text{L}$  der Proben in die entsprechenden zwölf Vertiefungen gegeben werden. Auch nicht genutzte Vertiefungen mussten mit 1  $\mu\text{L}$  RNA-6000-Nano-Marker befüllt werden. Der Chip wurde anschließend auf dem Vortexer gemischt.

4. Messung der Proben im *Agilent 2100 Bioanalyzer*.

Zwei ribosomale Peaks, sowie ein Marker-Peak sind Kriterien eines guten Laufes, welche im Elektropherogramm dargestellt werden (Abb. 3.1).



**Abb. 3.1: Darstellung eines Elektropherogramms und des davon abgeleiteten Gelbildes.**

Den ersten Ausschlag links im Graph stellt den Marker Peak dar, es folgen der 18S-rRNA Peak und der 28S-rRNA-Peak. Diese Peaks werden auch als zwei Banden auf dem digitalen Gelbild dargestellt. Hier ist das Ergebnis einer Qualitäts-Messung von RNA des Hundes #10 im *Agilent 2100 Bioanalyzer* abgebildet. Die Probe zeigte einen RIN-Wert von 8.4.

### 3.2.7 cDNA-Synthese aus Total-RNA

Für die cDNA-Synthese wurde das *SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* von Invitrogen benutzt. Laut Herstellerangaben können als Ausgangsmaterial 1 µg bis 5 µg Total-RNA eingesetzt werden. Für die Vergleichbarkeit in der quantitativen *real-time* PCR wurden immer 1 µg RNA umgeschrieben. Hierfür wurde die berechnete µL-Menge, die 1 µg Total-RNA ergab, in ein 0,5 mL Reaktionsgefäß pipettiert, mit 1 µL einer 10 mM dNTP Mischung und 1 µL *oligo (dT)<sub>20</sub>* (50 µM) oder *random hexamer* (50 ng/µL) Primern vermischt und auf 10 µL mit DEPC behandeltem H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 5 min im Wasserbad bei 65 °C, um die Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen, mit anschließender Kühlung auf Eis.

Inzwischen konnte ein cDNA-Mastermix in folgender Reihenfolge zusammen pipettiert werden:

10x RT Puffer	2 $\mu$ L
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4 $\mu$ L
0,1 M DTT	2 $\mu$ L
RNase OUT (40 U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
SuperScript III RT (200 U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L

Diese cDNA-Synthesemischung wurde der RNA/Primer/dNTP-Mischung zugegeben, vorsichtig durchgemischt und bei oligo(dT)-Primern für 50 min bei 50 °C oder bei Hexamer-Primern für 10 min bei 25 °C, gefolgt von 50 min bei 50 °C im Wasserbad, inkubiert. Die reverse Transkription wurde bei 85 °C für 5 min gestoppt und bei 4 °C abgekühlt. Nach kurzer Zentrifugation wurde 1  $\mu$ L *RNase H* pro Ansatz zugegeben, für 20 min bei 37 °C inkubiert und die cDNA anschließend bei -20 °C gelagert.

### 3.2.8 Isolierung von genomischer DNA aus Blut

Genomische DNA aus Blut wurde mit dem *NucleoSpin Blood QuickPure Kit* von Macherey-Nagel isoliert. Für diese Methode benötigte man 200  $\mu$ L EDTA Vollblut, welches auch problemlos bei Raumtemperatur gelagert werden konnte. Der erste Schritt war eine Lyse der Blutprobe; hierzu wurden 25  $\mu$ L *Proteinkinase K* und 200  $\mu$ L *Lysis Buffer BQ1* in einem 1,5 mL Gefäß zum Blut gegeben und der Ansatz gemischt. Die Lyse wurde mit einer Inkubation bei 70 °C für 10-15 min abgeschlossen. Um die Bindung der DNA zu gewährleisten wurden anschließend 200  $\mu$ L Ethanol (96-100 %) zugegeben und die Probe gevortext. Um die DNA an eine Matrix zu binden, wurde der Ansatz auf das zugehörige *NucleoSpin Blood QuickPure Column* pipettiert, dieses in ein Auffang-Tube platziert und für 1 min bei 11 000 g zentrifugiert. Um die Membran zu waschen und zu trocknen, musste die Säule in ein neues 2 mL Gefäß platziert werden und nach Zugabe von 350  $\mu$ L *Buffer BQ2* für 3 min bei 11 000 g zentrifugiert werden. Nachdem das Eluat verworfen wurde, konnte die DNA eluiert werden. Für diesen Schritt konnte die Säule in ein 1,5 mL Gefäß gegeben werden. Anschließend wurde auf 70 °C angewärmter *Buffer BE* auf die Membran pipettiert und bei Raumtemperatur

für 1 min inkubiert. Als letzten Schritt wurden durch 1-minütige Zentrifugation bei 11 000 g 50 µL genomische DNA aufgefangen. Bei dieser Methode war mit einer Totalausbeute an DNA von 4-6 ng zu rechnen.

### 3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode, um DNA *in vitro* zu vervielfältigen und spezifische DNA-Abschnitte nachzuweisen und zur Klonierung von Nukleinsäuren. Folgende Kapitel erläutern die einzelnen Techniken.

In dieser Arbeit wurde die cDNA in PCRs mit selbstdesignten Primern (s. Anhang) und einer *proofreading* Polymerase eingesetzt und so die *full-length* Transkripte der Cytochrome CYP1A2, CYP2B11, CYP2C21, CYP2C41, CYP2D15 und CYP3A12 der verschiedenen Hunde amplifiziert.

#### 3.3.1 Allgemeine Regeln zur Primerauswahl

Das Programm *Oligo 4.0*. half bei der Auswahl der Primer. Dabei wurden, soweit möglich, folgende generelle Rahmenbedingungen eingehalten:

- Primer trugen an ihrem 3'-Ende ein AC, AG, TC oder TG.
- (G+C)-Gehalt der Primer lag zwischen 50-60 %.
- Um Dimerbildungen zu vermeiden, waren insbesondere die 3'-Enden der Primer nicht untereinander und nicht mit sich selbst komplementär.
- Um Sekundärstrukturen im Primer zu vermeiden, war  $\Delta G$  für eine Loopbildung  $>0$ .

Die Primer wurden in einer Länge von 18-25 Basen ausgewählt. Die Schmelztemperaturen  $T_m$  von zu kombinierenden Vorwärts- und Rückwärts-Primern sollten möglichst ähnlich sein. Mit einer BLAST-Analyse wurde die Sequenzspezifität der ausgewählten Primer überprüft.

Die Synthese der Primer wurde von der Firma *MWG-Biotech* (Ebersberg) und *Metabion* (Martinsried) durchgeführt.

### 3.3.2 PCR-Reaktionsansatz

Verschiedene Polymerasen kamen je nach PCR-Anwendung zum Einsatz. Das *Fast Start High Fidelity PCR System* (Roche) und die *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Finnzymes) wurde bei benötigter hoher Lesegenauigkeit (Polymorphismen-Suche) ausgewählt, da die Polymerasen eine 3' → 5' Exonukleaseaktivität aufweisen. In PCR-Reaktionen, bei denen das Ergebnis eine einfache Information darstellen sollte, wie z.B. Amplifikat ja oder nein und mit dem PCR-Produkt nicht weiter gearbeitet wurde, wurde die *Taq DNA Polymerase* von Fermentas benutzt. Für besonders lange Amplifikate eignete sich der *Long PCR Enzyme Mix* (Fermentas).

Für jede Polymerase wurde ein speziell optimiertes Puffersystem eingesetzt.

Die Reaktionsansätze für eine Probe setzten sich wie folgt zusammen:

	<b>Fast Start High Fidelity</b>	<b>Phusion High Fidelity</b>	<b>Long PCR Enzyme Mix</b>	<b>Taq DNA Polymerase</b>
Enzym	0,5 µL	0,5 µL	0,35 µL	0,25 µL
10 x Puffer	5 µL	(5x) 10 µL	5 µL	5 µL
DMSO	2 µL	-	-	-
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	-	-	3 µL	10 µL
dNTP-Mix (je 10 mM)	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
Vorwärts-Primer (10 pmol/µL)	5 µL	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL
Rückwärts-Primer (10 pmol/µL)	5 µL	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL
DNA (cDNA, Plasmid-DNA)	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µL	ad 50 µL	ad 50 µL	ad 50 µL

Bei größeren Versuchsansätzen wurde aus den oben genannten Reagenzien ein Mastermix vorbereitet und zu jeder DNA-Probe gegeben. Die Amplifikation erfolgte von 5 µL cDNA oder Plasmid-DNA (50 ng). Die Proben wurden in 200 µL PCR-Cups gemischt, herunter zentrifugiert und in einem *Perkin-Elmer Gene Amp Cyclor Typ 2400* (PerkinElmer) oder *Thermocycler Primus 96 advanced gradient* (PeqLab) inkubiert.

### 3.3.3 Standard-PCR

Die Standard-PCR diene als Grundlage für viele PCR-Protokolle. Es sind beispielhafte Temperaturen und Zeiten aufgeführt, die je nach Polymerase und Primer Kombinationen variieren konnten.

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	1-3 min	1
Denaturierung	95 °C	30 s	
Annealing	T <sub>m</sub> -5 °C	30 s	25 - 40
Extension	72 °C	1 min/kb	
Finale Extension	72 °C	5-15 min	1

### 3.3.4 Quantitative *real-time* PCR

Die Expression auf mRNA-Ebene von CYP1A2, CYP3A12, CYP2B11, CYP2C21 und CYP2D15 mit den endogenen Kontrollen beta-Aktin (ACTB) und beta-2-Mikroglobulin (B2M) erfolgte mittels quantitativer PCR unter Verwendung des folgenden Reaktionsmixes in einer 96-well Platte:

ddH <sub>2</sub> O	6,25 µL
TaqMan Universal PCR Master Mix	12,5 µL
TaqMan Gene Expression Assay	1,25 µL
cDNA	5 µL

Die verwendeten Assays waren bereits vorgefertigt erhältlich (Applied Biosystems). Die verwendete cDNA stammte aus der Synthese mit dem *SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* von Invitrogen (s. 3.2.7).

Der Universal Mastermix enthält bereits Puffer, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, den Kontroll-Fluoreszenzfarbstoff ROX und eine Polymerase.

Die 96-well Platte wurde nach Verschließen zentrifugiert und die PCR-Reaktion im *ABI PRISM 7300* (Applied Biosystems) nach folgendem Schema durchgeführt:

Denaturierung	95 °C	10 min	} 45 Zyklen
Denaturierung	95 °C	15 s	
Primer-Anlagerung	60 °C	1 min	
Kühlung	4 °C	∞	

Das Prinzip der quantitativen *real-time* PCR mit dem TaqMan System lässt sich wie folgt erklären: Die Denaturierung trennt den DNA Doppelstrang auf, woraufhin sich Primer und Sonde an die jeweilige Zielsequenz anlagern können. Die räumliche Nähe zum Quencher unterdrückt die Fluoreszenz des Farbstoffes FAM an der Sonde. Während der Primer-Verlängerung gelangt die Taq-Polymerase an das 5'-Ende der angelagerten Sonde. Daraufhin wird die Sonde durch die 5' → 3' Exonukleaseaktivität der Polymerase abgebaut und der Farbstoff FAM entfernt sich vom Quencher. Durch Anregung von FAM kann das Fluoreszenzsignal detektiert werden. Mit jedem amplifizierten cDNA-Strang wird ein Fluoreszenzfarbstoff-Molekül abgespalten und somit steigt die Fluoreszenz proportional zum entstehenden DNA-Produkt (Gibson et al. 1996; Heid et al. 1996).

B2M steht für beta-2-Mikroglobulin (β2M) und ist die kleinere lösliche Protein-Untereinheit des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) der Klasse I. Nahezu alle kernhaltigen Zellen bei Wirbeltieren tragen diesen MHC-Klasse-I-Proteinkomplex auf ihrer Oberfläche. Er dient der Antigenpräsentation. Als konstitutiv exprimiertes Gen eignet sich B2M hervorragend als Housekeeping-Gen. Durch die konstante, ubiquitäre Expression dient es als endogene Kontrolle.

ACTB ist die Abkürzung für beta-Aktin. ACTB kommt als Strukturprotein in allen eukaryotischen Zellen vor. In diesen bildet es dynamische Aktinfilamente, welche im Zytoskelett die äußere Zellform stabilisieren. Auch ACTB ist ein Gen mit konstanter Expression und eignet sich somit gut als endogene Kontrolle.

Durch Einbeziehung der  $C_t$ -Werte des Housekeeping-Gens wird eine Normierung vollzogen, diese reduziert Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen oder experimentelle Fehler bei der *real-time* PCR, da hierbei sowohl das Zielgen, als auch das Housekeeping-Gen gleichermaßen betroffen wären.

Der  $C_t$ -Wert, abgekürzt für engl. *cycle threshold*, beschreibt den Anfang des exponentiellen Wachstums einer Kurve. Diese Größe charakterisiert den Teil der Kurve, in dem die Fluoreszenz erstmals exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt. Je mehr DNA vor der PCR im Ansatz vorhanden war, desto mehr Kopien entstehen in den Zyklen und umso eher kommt es zu Fluoreszenzsignalen und dementsprechend schneller übersteigt die Fluoreszenzintensität den Schwellenwert. Der Vergleich der  $C_t$ -Werte zweier Proben zeigt, welche vor der Amplifizierung mehr DNA bzw. cDNA enthielt.

Der delta  $C_t$ -Wert ( $\Delta C_t$ ) bezieht die Expression des Zielgens (hier die CYPs) auf die Expression des konstant exprimierten Referenzgens (Housekeeping-Gen). Der Wert wird mit folgender Formel berechnet:

$$\Delta C_t = C_{t \text{ Zielgen}} - C_{t \text{ Referenzgen}}$$

### 3.4 DNA-Klonierung

Die DNA-Klonierung beschreibt einen Prozess, bei welchem ein gewünschtes DNA-Fragment in einen Vektor (Plasmid) integriert wird und dessen anschließende Einbringung in eine Bakterienzelle. Eine Selektion der Bakterien, die Fremd-DNA aufgenommen haben, ist durch Antibiotika-Resistenzen möglich. Nach einer Vervielfältigung der Bakterien kann durch Isolierung der Plasmide ein Vielfaches der anfangs eingesetzten DNA-Menge gewonnen werden. In vorliegender Arbeit wurden die aufgereinigten PCR-Produkte (CYP- Amplifikate) in einen Sequenzier-Vektor (*pCR4-TOPO-Vektor*, Invitrogen) verbracht. Nach der Transformation in *E. coli* TOP10 Zellen und der Plasmidpräparation konnten die gewünschten Amplifikate sequenziert und ausgewertet werden.

### 3.4.1 TOPO-Klonierung

#### A-Überhänge

Zum Einbringen von DNA in den TOPO-Vektor benötigt das PCR-Produkt einen 3'-A-Überhang. Um sicher zu gehen, dass dieser Überhang nach dem Lagern der PCR-Produkte bei -20 °C nicht abgespalten wurde, wurde mit Hilfe der *Dynazyme II Polymerase* (Fermentas) ein Reaktionsansatz pipettiert, welcher dATPs im Überschuss enthielt und somit sicher einen 3'-A-Überhang an das PCR-Produkt anhängt. Der Reaktionsansatz setzte sich aus 5 µL aufgereinigtem PCR-Produkt, 0,75 µL Dynazyme Buffer 10 x, 0,125 µL dATPs, 0,175 µL *Dynazyme II* und 1,25 µL ddH<sub>2</sub>O zusammen. Nach dem Mischen erfolgte eine Inkubation im Wasserbad bei 72 °C für 20 min, mit anschließender Abkühlung auf Eis.

#### Ligation

2 µL des A-Überhang Mixes wurden mit 1 µL *Salt Solution* (Invitrogen) und 1 µL *TOPO-Vektor* (pCR4-TOPO-Vektor) vermischt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit findet die Ligation von Vektor und PCR-Produkt über die komplementären Enden statt, hierbei wird die Topoisomerase abgespalten.

### 3.4.2 Transformation

Für die Transformation wurde ein Aliquot (50 µL) der kompetenten TOP10 Bakterien (Invitrogen) auf Eis aufgetaut, 3 µL des Ligationsansatzes zugegeben, vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Hitzeschock für 45 s bei 42 °C durchgeführt und danach die Probe für 2 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 250 µL *S.O.C. Medium* (Invitrogen) (angewärmt auf 37 °C) wurde der Ansatz für 60 min bei 37 °C und 225 rpm im Warmluftinkubator geschüttelt und anschließend 2 x 150 µL des Ansatzes auf vorgewärmte LB-Ampicillin-Agarplatten ausplattiert. Während der Bebrütung bei 37 °C für 16 h gewährleistete das Ampicillin-Resistenzgen im transformierten Plasmid, dass nur Bakterien vermehrt wurden, die das Plasmid aufgenommen hatten. Einzelne Bakterienkolonien

(n=3) wurden selektiv vermehrt und die enthaltenen Plasmide über eine Minipräparation aufgereinigt (s. 3.1.4). Eine Sequenzierung diente zur Überprüfung der Plasmide.

### 3.5 Sequenzierung und Auswertung von Sequenzspuren

Die Firmen *LGC Genomics* (Berlin) und *GATC Biotech* (Konstanz) führten die Sequenzierung der DNA durch.

*LGC Genomics* benötigte für den sogenannten *Ready2 Run*, bei welchem DNA und Primer bereits vor dem Versenden zusammen pipettiert wurden, 10 µL DNA und 4 µL Primer (5 pmol/µL). Sollten Primer und DNA extra versendet werden, empfahl sich der *Flexi Run*. Hierfür wurden 15-40 µL DNA benötigt und Primer als Stock-Lösung (100 µM). Die Konzentration der DNA sollte bei Plasmid-DNA 100 ng/µL und bei PCR-Produkten je nach deren Größe 10-40 ng/µL betragen. Primer und DNA sollten in 1,5 mL Reaktionsgefäßen mit flachem Deckel verschickt werden.

Auch bei *GATC* gab es die Möglichkeit Primer und DNA bereits vor dem Versenden zusammen zu pipettieren. Für dieses sogenannte *LIGHTrun sequencing* wurden 5 µL DNA (Plasmid-DNA: 80-100 ng/µL, PCR-Produkt: 20-80 ng/µL) und 5 µL Primer (5 pmol/µL) benötigt. Sollten Primer und DNA getrennt voneinander versendet werden, bot *GATC* das *Single Read Sequencing* an. Für dieses Verfahren wurden jeweils 20 µL Primer (10 pmol/µL) und DNA (Plasmid-DNA: 30-100 ng/µL, PCR-Produkt: 10-50 ng/µL) in 1,5 mL Eppendorf-Gefäßen mit flachem Deckel versandt. Die Sequenzier-Ergebnisse standen online im FASTA-Format und als Chromatogramm zur Verfügung. Die Auswertung erfolgte mit den Programmen *DNASTAR* und *FinchTV*.

Bei der Suche nach Polymorphismen in den Cytochrom-P450-Enzymen des Hundes wurden immer mindestens 2-3 voneinander unabhängige Klone für die Sequenzierung herangezogen. Bei Auftauchen von Unsicherheiten oder Polymorphismen wurde zusätzlich das PCR-Produkt sequenziert (Abb. 3.2). Die Sequenzierung des PCR-Produktes lässt eine Unterscheidung von hetero- und homozygoten Polymorphismen zu (Abb. 3.3).

Alle gefundenen Polymorphismen wurden mit dem EDV Programm *SIFT* überprüft. *SIFT* berechnet für jede Position einer Aminosäure im Protein, ob deren Austausch gegen eine andere Aminosäure für die Funktion dieses Proteins tolerierbar ist oder nicht. Die Abkürzung *SIFT* steht für *Sorting Intolerant From Tolerant* und seine Funktion wird auf der zugehörigen Homepage (<http://sift.jcvi.org/>) folgendermaßen beschrieben:

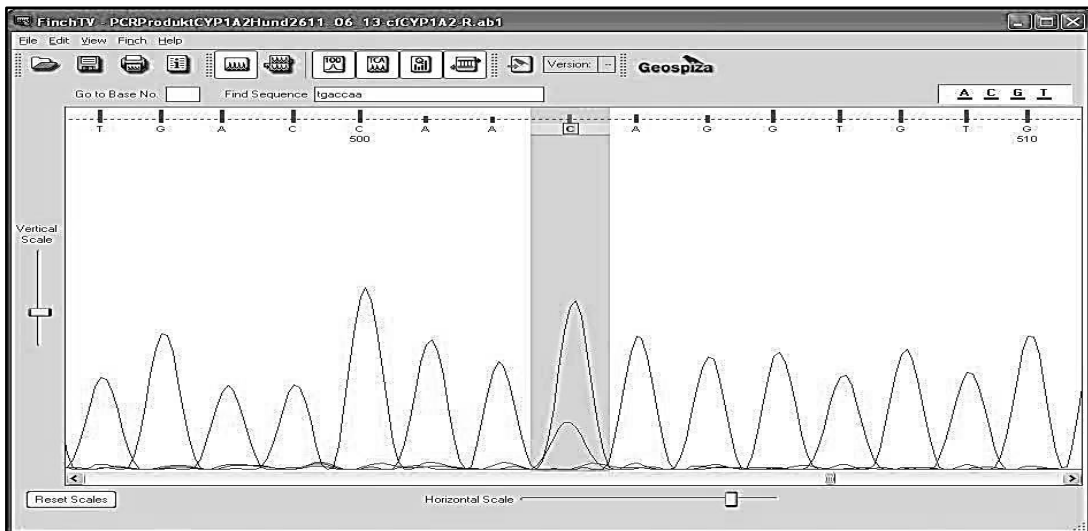
*„SIFT predicts whether an amino acid substitution affects protein function.*

*SIFT prediction is based on the degree of conservation of amino acid residues in sequence alignments derived from closely related sequences, collected through PSI-BLAST. SIFT can be applied to naturally occurring nonsynonymous polymorphisms or laboratory-induced missense mutations.“*

	ATAAACCAAGTGGCAGGTCAATCATGACCAACAGGTGTGGGGGATCCATTTGCATTCCGGCCA
	1220      1230      1240      1250      1260      1270
NM_001008720 CYP1A2 canis	ATAAACCAAGTGGCAGGTCAATCATGACCAACAGGTGTGGGGGATCCATTTGCATTCCGGCCA
CYP1A2 Hund 26b	ATAAACCAAGTGGCAGGTCAATCATGACCAACAGGTGTGGGGGATCCATTTGCATTCCGGCCA
CYP1A2 Hund 26a	ATAAACCAAGTGGCAGGTCAATCATGACCAACAGGTGTGGGGGATCCATTTGCATTCCGGCCA

**Abb. 3.2: Alignment zweier Sequenzen aus Plasmid-DNA von zwei unterschiedlichen Klonen mit der originalen Sequenz aus der GenBank-Sequenzdatenbank.**

Dieses Alignment zeigt den Sequenzvergleich der originalen CYP1A2-Sequenz, welche bei GenBank eingestellt ist, mit zwei Sequenzen aus Plasmid-DNA zweier Klone. Die originale Sequenz hat an markierter Position 1243 ein Cytosin, einer der beiden Klone zeigt an Position 1243 jedoch ein Guanin. Um einen Sequenzier- oder Polymerase-Fehler an dieser Stelle von einem heterozygoten Polymorphismus zu unterscheiden, musste das PCR-Produkt sequenziert werden.



**Abb. 3.3: Chromatogramm eines PCR-Produktes, zur Unterscheidung eines hetero- oder homozygoten Polymorphismus.**

Das Chromatogramm, welches von der Sequenzierfirma mit der Sequenz mitgeliefert wird, zeigt pro Nukleotid einen Peak in einer Farbe an. An markierter Position dieses PCR-Produktes sind zwei Peaks zu sehen, ein größeres C und ein kleineres G. Dieses Bild eines heterozygoten Polymorphismus mit einem Cytosin auf einem Allel und einem Guanin auf dem anderen gibt Klarheit über oben dargestelltes Problem eines unklaren Sequenzierergebnisses.

## 3.6 Referenzsequenzen

Die durch Sequenzierung erlangten Sequenzen der verschiedenen Cytochrom-P450-Enzyme der einzelnen Hunde wurden mit Referenzsequenzen verglichen, um Polymorphismen in Form von Abweichungen von diesen Referenzen zu identifizieren. In diesem Kapitel sollen die einzelnen Gene und die Referenzsequenzen dargestellt werden.

### 3.6.1 CYP1A2

Der volle Name des Gens lautet *cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2*. Es liegt auf Chromosom 30 und seine GenBank Accession No. lautet NM\_001008720. Das *full-length* Transkript umfasst von Start- bis Stoppcodon 1539 bp. In der GenBank-Sequenzdatenbank sind neben der Sequenz mit der Accession No. NM\_001008720 vier weitere CYP1A2-Sequenzen eingetragen, mit den Accession Nos. AB094347, AB094348, AB094349 und AB159771. AB094347 und AB094349 zeigen sich identisch mit der NM\_001008720 Sequenz. Die eingetragene Sequenz AB159771 weist hingegen den Single-Nukleotid-Polymorphismus (SNP) 1117C>T, welcher zu einem vorzeitigen Stoppcodon mit Zerstörung der Enzymaktivität führt (Mise et al. 2004a, 2004b; Tenmizu et al. 2004, 2006) und diverse weitere SNPs auf. Die Sequenz mit der Accession No. AB094348 trägt den SNP 1299C>T, welcher keinen Aminosäureaustausch (AS-Austausch) bedingt und den in der vorliegenden Arbeit ebenfalls gefundenen SNP 1451G>A.

### 3.6.2 CYP2B11

Der volle Name des Gens lautet *cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 11*. Es liegt auf Chromosom 1 und seine GenBank Accession No. lautet NM\_001006652. Das *full-length* Transkript umfasst von Start- bis Stoppcodon 1485 bp.

### 3.6.3 CYP2C21

Der volle Name des Gens lautet *cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 21*. Es liegt auf Chromosom 28 und seine GenBank Accession No. lautet NM\_001197044. Das *full-length* Transkript umfasst von Start- bis Stoppcodon 1473 bp.

### 3.6.4 CYP2D15

Der volle Name des Gens lautet *cytochrome P450, family 2, subfamily D, polypeptide 15*. Es liegt auf Chromosom 10 und seine GenBank Accession No. lautet NM\_001003333. Das *full-length* Transkript umfasst von Start- bis Stoppcodon 1503 bp.

### 3.6.5 CYP3A12

Der volle Name des Gens lautet *cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 12*. Seine Lokation auf einem Chromosom ist unbekannt und seine GenBank Accession No. lautet NM\_001003340. Das *full-length* Transkript umfasst von Start- bis Stoppcodon 1512 bp.

### 3.6.6 CYP2C41

Der volle Name des Gens lautet *cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 41*. Seine Lokation auf einem Chromosom ist unbekannt und seine GenBank Accession No. lautet NM\_001003334. Das *full-length* Transkript umfasst von Start- bis Stoppcodon 1470 bp.

Das CYP2C41-Gen besitzen nicht alle Hunde. Blaisdell et al. wies im Jahre 1997 das CYP2C41-Gen bei nur 14 % der Hunde einer Testgruppe (n=28) nach.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Polymorphismen in den Cytochrom-P450-Enzymen des Hundes

#### 4.1.1 CYP1A2-Sequenzpolymorphismen

Es wurden insgesamt 24 Hunde auf Polymorphismen im CYP1A2-Gen untersucht. Bei dieser Untersuchung zeigten 9 Hunde verschiedene Polymorphismen (SNPs), während 15 Hunde homozygot für die bei GenBank hinterlegte Referenzsequenz (Accession No. NM\_001008720) für CYP1A2 waren. Insgesamt wurden in den CYP1A2-Transkripten sechs SNPs identifiziert: 1165G>A, 1173C>G, 1243C>G, 1299C>T, 1303G>A und 1451G>A. Während die SNPs 1173C>G, 1243C>G, 1299C>T, 1303G>A und 1451G>A bereits zuvor bekannt waren (Tenmizu et al. 2004; Mise et al. 2004a), wurden der SNP 1165G>A erstmals im Rahmen dieser Arbeit identifiziert. Von diesen Polymorphismen führen nur vier zu einem AS-Austausch: 1165G>A → D389N, 1243C>G → G415E, 1303G>A → A435T und 1451G>A → R484K (Tab. 4.1). Zwar werden diese AS-Austausche von dem *SIFT*-Algorithmus alle als tolerierbar bezüglich der Proteinfunktion bewertet, jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass einer dieser Polymorphismen eine funktionelle Relevanz hat.

**Tab. 4.1: Übersicht über die im CYP1A2-Gen identifizierten SNPs der 24 untersuchten Hunde.**

SNP	AS-Austausch	Bewertung <i>SIFT</i>	In Haplotyp
1165G>A*	D389N	tolerierbar	-**
1173C>G	-	-	v1, v3
1243C>G	G415E	tolerierbar	v2, v3
1299C>T	-	-	v3
1303G>A	A435T	tolerierbar	v2, v3
1451G>A	R484K	tolerierbar	v1, v2, v3

\* Dieser SNP wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals identifiziert.

\*\*Dieser SNP ist heterozygot nur bei einem einzigen der 24 Hunde aufgetreten und wurde daher mangels weiterer Evidenz nicht in die Haplotypen-Bestimmung mit einbezogen. Dennoch wurde die polymorphe Sequenz für 1165G>A in der GenBank-Sequenzdatenbank hinterlegt (Accession No. HG965166, Prinzing et al. 2014).

Zur Bestimmung von CYP1A2-Haplotypen, wurden die *full-length* CYP1A2-Transkripte der 24 Hunde amplifiziert und kloniert, und im Anschluss jeweils drei Einzelklone aus der Klonierung sequenziert. Wenn die Sequenzen dieser Einzelklone identisch waren, wurde ein homozygoter Genotyp angenommen. Wichen diese Sequenzen voneinander ab, wurde die Existenz zweier Haplotypen für einen Hund angenommen (heterozygoter Zustand). Zur Überprüfung des Genotyps wurden auch einige PCR-Amplifikate direkt sequenziert und die Heterozygotie durch einen Doppelpeak im Sequenzspektrum bestätigt.

Tab. 4.2: Übersicht über die identifizierten CYP1A2-Haplotypen.

Allel	Nukleotidposition					Accession No.	Autor	Relative Allel-Häufigkeit [%]
	1173	1243	1299	1303	1451			
CYP1A2WT	C	C	C	G	G	NM_001008720, AB094347	Mise 2002	79,17
CYP1A2v1	G	C	C	G	A	HG974425	Prinzinger et al. 2014	2,08
CYP1A2v2	C	G	C	A	A	HG965165	Prinzinger et al. 2014	14,58
CYP1A2v3	G	G	T	A	A	HG965167	Prinzinger et al. 2014	2,08

Die unterschiedlichen Varianten wurden in Absprache mit Dr. Nelson (federführend für die P450-Nomenklatur) mit einem "v" für Variante und einer fortlaufenden Zahl benannt. (<http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>, Nelson 2009).

Tab. 4.3: Übersicht über die CYP1A2-Haplotypen der untersuchten Hunde.

Hund #	n	Genotyp
1-7, 9-16, 21, 25	16	WT/WT
17-19, 26, 27	5	WT/v2
28	1	v2/v3
24*	1	WT/1165G/A, 1173C/G
Kommerzielle Leber-cDNA Beagle	1	v1/v2

\*Da nur bei diesem Hund der SNP 1165G>A heterozygot aufgetreten ist, wurde hierfür kein Haplotyp definiert. Für diesen Hund ist daher der Genotyp für die SNPs aufgelistet.

### 4.1.2 CYP2B11-Sequenzpolymorphismen

Es wurden insgesamt 20 Hunde auf Polymorphismen im CYP2B11-Gen untersucht. Sechs Hunde zeigten sich polymorph hinsichtlich CYP2B11, 14 Hunde wiesen keinerlei SNPs auf. Fünf der untersuchten Hunde wiesen den SNP 966A>G auf, vier davon heterozygot und einer homozygot. Dieser SNP bedingt keinen AS-Austausch und ist daher vermutlich nicht funktionell relevant (Tab. 4.4). Bei Hund #12 wurde heterozygot der SNP 98G>A entdeckt. Dieser Polymorphismus bewirkt den AS-Austausch G33D und ist nach Bewertung durch *SIFT* nicht tolerierbar und daher wahrscheinlich funktionell relevant (Tab. 4.4). Die relative Häufigkeit des SNPs 98G>A bei den in dieser Arbeit untersuchten Hunden liegt bei 2,05 %, die des SNPs 966A>G bei 15 %. Damit entsprachen 82,95 % aller untersuchten CYP2B11-Gene der bereits in GenBank veröffentlichten Referenzsequenz. Da beide SNPs, 98G>A und 966A>G im Rahmen dieser Arbeit erstmal identifiziert wurden, erfolgte ein Eintrag der entsprechenden CYP2B11 *full-length* Transkripte in der GenBank-Sequenzdatenbank:

CYP2B11 966A>G: Accession No.: HG974426 (Prinzinger et al. 2014)

CYP2B11 98G>A: Accession No.: HG965163 (Prinzinger et al. 2014)

Tab. 4.4: Übersicht über die CYP2B11-Polymorphismen der 20 untersuchten Hunde.

SNP	AS-Austausch	Bewertung <i>SIFT</i>	Genotyp (Anzahl der Hunde)
98G>A	G33D	nicht tolerierbar	98G/A (1)
966A>G	-	-	966A/G (4) 966G/G (1)

### 4.1.3 CYP2C21-Sequenzpolymorphismen

Es wurden insgesamt 21 Hunde auf Polymorphismen im CYP2C21-Gen untersucht. Nur Hund #11 wies einen Polymorphismus auf. Dieser SNP 355A>C zeigte sich heterozygot und führt zu einem AS-Austausch K119Q, welcher laut *SIFT* ohne funktionelle Bedeutung ist. Dieser Polymorphismus trat nur mit einer sehr geringen relativen Häufigkeit von 2,38 % auf.

Da dieser Polymorphismus im Rahmen dieser Arbeit erstmals identifiziert wurde, wurde die Sequenz in der GenBank-Sequenzdatenbank wie folgt hinterlegt:

CYP2C21 355A>C: Accession No.: HG965164 (Prinzinger et al. 2014)

#### **4.1.4 CYP2D15-Sequenzpolymorphismen**

Es wurden insgesamt 20 Hunde auf Polymorphismen im CYP2D15-Gen untersucht. Bei der Suche nach SNPs zeigte sich das CYP2D15-Gen als sehr polymorph. Nur einer der 20 untersuchten Hunde wies die in GenBank hinterlegte Referenzsequenz (Accession No. NM\_001003333) auf. Alle anderen 19 Hunde zeigten diverse SNPs und/oder die bereits in der Literatur beschriebene *in frame* Deletion des Exon 3 ( $\Delta$ Exon 3) (Roussel et al. 1998; Paulson et al. 1999). Die Präsenz dieser Exon-Deletion war bereits nach der *full-length* Amplifikation des CYP2D15-Transkriptes auf dem Agarosegel sichtbar, wobei neben dem 1500 bp langen *full-length* Transkript auch das um 153 bp kürzere Transkript mit  $\Delta$ Exon 3 sichtbar war. Somit konnte bereits mittels Agarosegelelektrophorese unterschieden werden, welcher Hund heterozygot, homozygot oder gar nicht von diesem Polymorphismus betroffen war (Abb. 4.1). Sieben der 20 untersuchten Hunde wiesen die *in frame* Deletion des Exon 3 homozygot auf, weitere sieben Hunde waren gar nicht von diesem Polymorphismus betroffen (homozygot Wildtyp), und die übrigen sechs Tiere zeigten beide Varianten und waren demnach heterozygot für dieses Merkmal (Tab. 4.5).

Die meisten identifizierten SNPs waren stille Mutationen oder ihre AS-Austausche wurden von *SIFT* als tolerierbar bewertet. Viele von diesen traten immer wieder in Kombination auf und so konnten zehn verschiedene Haplotypen definiert werden, deren *full-length* Sequenzen jeweils in der GenBank-Sequenzdatenbank hinterlegt wurden (Tab. 4.6, Tab. 4.7).

Tab. 4.5: Häufigkeit des  $\Delta$ Exon 3 Polymorphismus der 20 untersuchten Hunden nach Typisierung mittels Agarosegelelektrophorese der *full-length* PCR-Amplifikate.

	$\Delta$ Exon 3	WT	WT/ $\Delta$ Exon 3
Anzahl Hunde [n]	7	7	6
Anzahl Hunde [%]	35	35	30

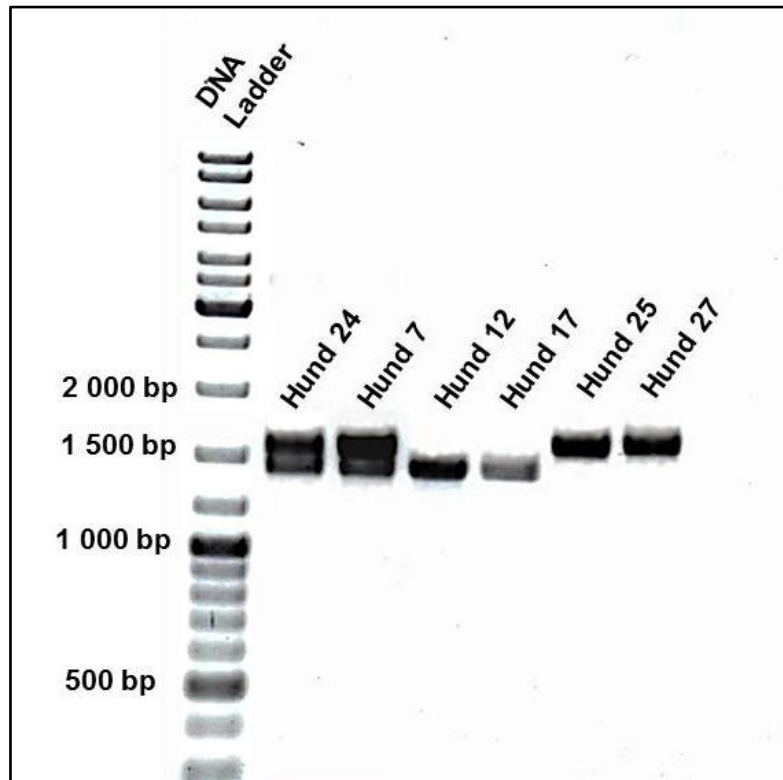


Abb. 4.1: Repräsentatives Bild einer Agarosegelelektrophorese mit den *full-length* PCR-Amplifikaten für CYP2D15.

8  $\mu$ L PCR-Produkt und 2  $\mu$ L Ladepuffer wurden auf ein 1,5 % Agarosegel aufgetragen. Nach anschließender Auftrennung wurde das Gel mit GelRed gefärbt und unter UV-Licht fotografiert. Bei Hund #24 und Hund #7 zeigte sich eine Doppelbande, was anzeigt, dass diese beiden Hunde sowohl das *full-length* CYP2D15-Transkript aufweisen, als auch die um 153 bp kürzere  $\Delta$ Exon 3 Variante. Hund #12 und #17 wiesen nur die verkürzte  $\Delta$ Exon 3 Variante auf, während die Hunde #25 und #27 keine Deletion von Exon 3 zeigten.

**Tab. 4.6: Übersicht über die CYP2D15-Polymorphismen der 20 untersuchten Hunde.**

<b>SNP</b>	<b>AS-Austausch</b>	<b>Bewertung <i>SIFT</i></b>	<b>In Haplotyp</b>
325 A → G	I109V	tolerierbar	v4, v6
345 G → C	L115F	tolerierbar	v3, v4
468 G → A	-	-	v8
556 A → G	S186G	tolerierbar	v1, v2, v5, v9
704 A → G	H235R	tolerierbar	v8
738 G → A	-	-	v4, v7, v8, v9
748 A → T	I250F	tolerierbar	v1-v5, v7-v10
799 C → T	P267S	nicht tolerierbar	v2, v5
863 A → G	N288S	tolerierbar	v2, v5
919 A → G	I307V	tolerierbar	v1-v5, v7-v10
1104 T → C	-	-	v2, v5
1117 G → A	V373I	tolerierbar	v8
1452 C → T	-	-	v2
1467 T → C	-	-	v2

Tab. 4.7: Übersicht über die identifizierten CYP2D15-Haplotypen.

Allel	Nukleotidposition														Full-length Sequenz (Accession No., Autor)	ΔExon 3 Sequenz (Accession No., Autor)
	325	345	468	556	704	738	748	799	863	919	1104	1117	1452	1467		
CYP2D15wt	A	G	G	A	A	G	A	C	A	A	T	G	C	T	NM_001003333 (Sakamoto et al. 1995)	-
CYP2D15v1	A	G	G	G	A	G	T	C	A	G	T	G	C	T	HG965186 (Prinzinger et al. 2014, Roussel et al. 1998)	HG965175 (Prinzinger et al. 2014, Paulson et al. 1999)
CYP2D15v2	A	G	G	G	A	G	T	T	G	G	C	G	T	C	-	HG965176 (Prinzinger et al. 2014, Paulson et al. 1999)
CYP2D15v3	A	C	G	A	A	G	T	C	A	G	T	G	C	T	HG965177 (Prinzinger et al. 2014)	-
CYP2D15v4	G	C	G	A	A	A	T	C	A	G	T	G	C	T	HG965178 (Prinzinger et al. 2014)	-
CYP2D15v5	A	G	G	G	A	G	T	T	G	G	C	G	C	T	-	HG965179 (Prinzinger et al. 2014, Paulson et al. 1999)
CYP2D15v6	G	G	G	A	A	G	A	C	A	A	T	G	C	T	HG965185 (Prinzinger et al. 2014)	HG965180 (Prinzinger et al. 2014, Paulson et al. 1999)
CYP2D15v7	A	G	G	A	A	A	T	C	A	G	T	G	C	T	HG965181 (Prinzinger et al. 2014)	-
CYP2D15v8	A	G	A	A	A	A	T	C	A	G	T	A	C	T	HG965182 (Prinzinger et al. 2014)	-
CYP2D15v9	A	G	G	G	A	A	T	C	A	G	T	G	C	T	HG965183 (Prinzinger et al. 2014)	-
CYP2D15v10	A	G	G	A	A	G	T	C	A	G	T	G	C	T	HG965184 (Prinzinger et al. 2014, Paulson et al. 1999)	-

Die unterschiedlichen Varianten wurden in Absprache mit Dr. Nelson (federführend für die P450-Nomenklatur) mit einem "v" für Variante und einer fortlaufenden Zahl benannt (<http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>, Nelson 2009).

**Tab. 4.8: Übersicht über die CYP2D15-Haplotypen der untersuchten Hunde.**

Hund #	n	Genotyp
14, 17, 26, kommerzielle Leber-cDNA Beagle	4	v1( $\Delta$ Exon 3)/v1( $\Delta$ Exon 3)
1, 6, 15	3	v1( $\Delta$ Exon 3)/v2( $\Delta$ Exon 3)
7, 19	2	v1/v1( $\Delta$ Exon 3)
4	1	v1/v3
6	1	WT/WT
8	1	v1( $\Delta$ Exon 3)/v4
9	1	v1/v2( $\Delta$ Exon 3)
10	1	v1/v1
11	1	v1/v10
12	1	v1( $\Delta$ Exon 3)/v5( $\Delta$ Exon 3)
21	1	v6/v7
24	1	v6( $\Delta$ Exon 3)/v6/v2
27	1	v7/v8
28	1	v1( $\Delta$ Exon 3)/v9

#### 4.1.5 CYP3A12-Sequenzpolymorphismen

Es wurden insgesamt 20 Hunde auf Polymorphismen im CYP3A12-Gen untersucht. Dreizehn der getesteten Hunde zeigten sich polymorph, während sieben Hunde homozygot für die bei GenBank hinterlegte Referenzsequenz (Accession No. NM\_001003340) für CYP3A12 waren. Insgesamt wurden in den CYP3A12-Transkripten fünf SNPs identifiziert: 387G>A, 439C>T, 660C>A, 963G>A, 1478T>C. Von diesen Polymorphismen führen nur vier zu einem Aminosäureaustausch : 387G>A  $\rightarrow$  M129I, 439C>T  $\rightarrow$  P147S, 660C>A  $\rightarrow$  F220L, 1478T>C  $\rightarrow$  V493A (Tab. 4.9). Diese AS-Austausche werden vom *SIFT*-Algorithmus alle als tolerierbar bezüglich der Proteinfunktion bewertet, bis auf den Austausch welcher aus dem SNP 439C>T hervorgeht. Es kann davon ausgegangen werden, dass dieser Polymorphismus eine funktionelle Relevanz hat. Alle diese SNPs wurden erstmals im Rahmen dieser Arbeit identifiziert.

**Tab. 4.9: Übersicht über die im CYP3A12-Gen identifizierten SNPs der 20 untersuchten Hunde.**

SNP	AS-Austausch	Bewertung <i>SIFT</i>	In Haplotyp
387G>A	M129I	tolerierbar	v1, v2, v5, v6
439C>T	P147S	nicht tolerierbar	v2, v6
660C>A	F220L	tolerierbar	-*
963G>A	-	-	v3, v5, v6
1478T>C	V493A	tolerierbar	v4

\*Dieser SNP ist heterozygot nur bei einem einzigen der 20 Hunde aufgetreten und wurde daher mangels weiterer Evidenz nicht in die Haplotypen-Bestimmung mit einbezogen. Dennoch wurde die polymorphe Sequenz für 660C>A in der GenBank-Sequenzdatenbank hinterlegt (Accession No. HG965172, Prinzing et al. 2014).

Vier der fünf beschriebenen Polymorphismen traten immer wieder in Kombination auf und so konnten sechs verschiedene Haplotypen definiert werden, deren *full-length* Sequenzen jeweils in der GenBank-Sequenzdatenbank hinterlegt wurden (Tab. 4.10).

**Tab. 4.10: Übersicht über die identifizierten CYP3A12-Haplotypen.**

Allel	Nukleotidposition				Accession No.	Autor	Relative Allel-Häufigkeit [%]
	387	439	963	1478			
<b>CYP3A12WT</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	NM_001003340	Ciaccio et al. 1991	45,0
<b>CYP3A12v1</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	HG974427	Prinzing et al. 2014	7,5
<b>CYP3A12v2</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	HG965170	Prinzing et al. 2014	20,0
<b>CYP3A12v3</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	HG965169	Prinzing et al. 2014	12,5
<b>CYP3A12v4</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	HG965168	Prinzing et al. 2014	7,5
<b>CYP3A12v5</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	HG965174	Prinzing et al. 2014	2,5
<b>CYP3A12v6</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	HG965171	Prinzing et al. 2014	2,5

**Tab. 4.11: Übersicht über die CYP3A12-Haplotypen der untersuchten Hunde.**

<b>Hund #</b>	<b>n</b>	<b>Genotyp</b>
6, 7, 8, 11, 12, 21, 24	7	WT/WT
10, 25	2	v1/v2
4, 28	2	WT/v3
1	1	v4/v4
9	1	v3/v3
14	1	v1/v6
16	1	v4/v2
17*	1	WT/660C>A
18	1	v2/v2
19	1	WT/v2
27	1	v2/v5
Kommerzielle Leber-cDNA Beagle	1	v2/v3

\*Da nur bei diesem Hund der SNP 660C>A heterozygot aufgetreten ist, wurde hierfür kein Haplotyp definiert. Für diesen Hund ist daher der Genotyp für die SNPs aufgelistet.

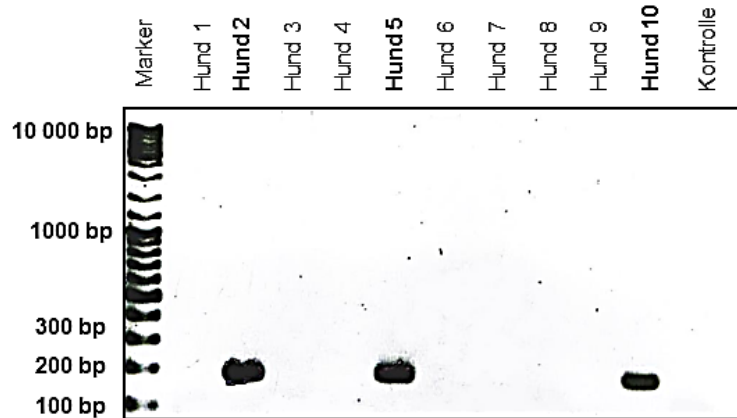
## 4.1.6 Erstbeschreibung des CYP2C41-Gens

### 4.1.6.1 *Full-length*-Klonierung und Etablierung einer „CYP2C41-Exon7-PCR“

Um verschiedene Hunde einer Population oder Testgruppe auf Ebene von cDNA und genomischer DNA als Träger oder Nicht-Träger des CYP2C41-Gens zu identifizieren, wurde eine PCR etabliert, welche das Exon 7 von CYP2C41 amplifiziert. Zu Beginn der Arbeit waren weder die genomische Sequenz oder die Exon-Intron-Grenzen des CYP2C41-Gens, noch seine chromosomale Lokalisation bekannt. Die Exon-Exon-Grenzen wurden nach Sequenzalignment mit dem humanen CYP2C18 vorerst von diesem übertragen, da sich beide Sequenzen sehr homolog darstellten. Die entwickelten Primer lagen auf Exon 7, beide flankierten ein Amplifikat von 185 bp. Sechs cDNAs, isoliert aus Lebergewebe und eine käuflich erworbene cDNA der Firma *Biochain* wurden in die PCR eingesetzt. Nur ein Hund (Hund #6) zeigte sich positiv. Es folgte eine *full-length*-PCR mit der cDNA des CYP2C41 positiven Hundes. Das Amplifikat wurde kloniert und sequenziert. Die cDNA-Sequenz stimmte mit der bereits bei GenBank hinterlegten CYP2C41-Sequenz überein, wurde aber dennoch erneut an GenBank übermittelt (Accession HF679527).

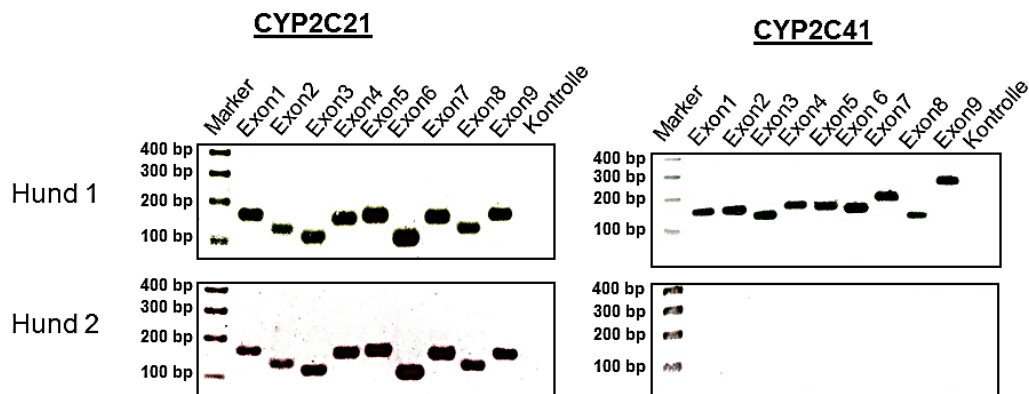
In die „*Exon 7-PCR*“ wurde anschließend genomische DNA von 100 verschiedenen Hunden eingesetzt. Auch hier funktionierte die PCR und 12 Hunde wurden als Träger des CYP2C41-Gens identifiziert (Abb. 4.2). Um diese „*Exon 7-PCR*“ weiter zu etablieren und die Exon-Intron-Grenzen zu bestätigen, wurden Primer für die acht weiteren Exons von CYP2C41 und für alle neun Exons von CYP2C21 modelliert. Diese lagen dabei immer jeweils innerhalb der einzelnen Exons und zwar jeweils an deren Anfang und Ende. Das CYP2C21-Gen wird von allen Hunden exprimiert und konnte somit als Positivkontrolle für einen negativ auf CYP2C41 getesteten Hund mitlaufen. Die PCR lieferte das erwartete Ergebnis. Ein zuvor mittels „*Exon 7-PCR*“ positiv auf CYP2C41 getesteter Hund zeigte in der *CYP2C41-Exon-PCR* mit Einsatz von genomischer DNA für alle neun Exons eine Bande auf dem Agarosegel, ebenso in der *CYP2C21-Exon-PCR*. Ein in der „*Exon 7-PCR*“ negativ auf CYP2C41 getesteter Hund zeigte jedoch nur in der *CYP2C21-*

*Exon-PCR* die erwarteten Amplifikate (Abb. 4.3). Daraus kann geschlossen werden, dass es sich um einen Gendeletions-Polymorphismus handelt. Im weiteren Verlauf der Versuche stellte sich heraus, dass beim caninen CYP2C41 Exon 7 und Exon 8 nicht von einem Intron getrennt werden, wie dies bei dem homologen CYP2C18 der Fall ist. CYP2C41 besteht daher nur aus acht Exons.



**Abb. 4.2: CYP2C41 “Exon 7-PCR“ mit genomischer DNA von zehn Hunden.**

10  $\mu$ L genomische DNA wurden in die PCR eingesetzt. Als Enzym wurde eine Taq DNA Polymerase verwendet. Es wurden 8  $\mu$ L PCR-Produkt und 2  $\mu$ L Ladebuffer aufgetragen. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte auf einem 2 % Agarosegel. Die Hunde #2, #5 und #10 sind als Träger des CYP2C41-Gens zu identifizieren; sie zeigen deutlich, im Gegensatz zu den sieben anderen Hunden, eine Exon 7-Bande bei 185 bp.

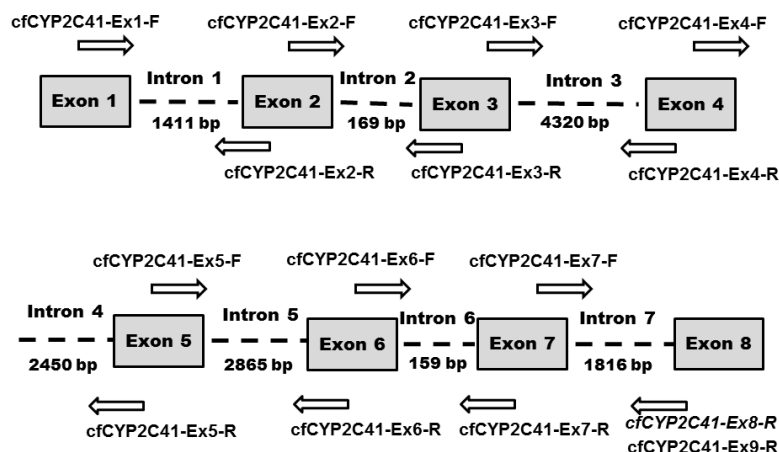


**Abb. 4.3: PCR Exon 1-9, CYP2C41 & CYP2C21, mit einem Träger des CYP2C41-Gens (Hund #1) und einem Nicht-Träger (Hund #2).**

Der zuvor bereits in der “Exon 7-PCR“ als Träger des CYP2C41-Gens identifizierte Hund zeigt sowohl für CYP2C21 als auch für CYP2C41 Banden bei allen neun Exons. Der andere Hund, welcher sich als Nicht-Träger des CYP2C41-Gens darstellt, weist nur Exon-Banden bei CYP2C21 auf, einem bei allen Hunden vorkommenden Gen. Die Exon-Intron-Grenzen konnten mittels dieser PCR und Einsatz von genomischer DNA bestätigt werden.

#### 4.1.6.2 Sequenzierung der bisher unbekannt genomischen Sequenz von CYP2C41

Die genomische Sequenz von CYP2C41 lag zu Beginn der Arbeit in der GenBank NCBI nicht vor. Die Hunde, deren Genom sequenziert wurde, waren offensichtlich keine Träger des CYP2C41-Gens. Die Exon-Intron-Grenzen waren aus diesen Gründen auch unbekannt. Die Exon-Grenzen ließen sich aber, aufgrund einer starken Sequenzhomologie zum humanen CYP2C18, ableiten. Zur Intron-Sequenzierung wurde eine PCR durchgeführt, bei welcher immer der Vorwärts-Primer eines Exons mit dem Rückwärts-Primer des dahinter liegenden Exons kombiniert wurde (Abb. 4.4). In der PCR zeigten sich für 7 Introns Amplifikate verschiedener Größe. Die Länge der Intron-Sequenzen variierte zwischen 159 bp und 4 320 bp (Abb. 4.4). Die Sequenzierung der längeren Introns stellte einige Schwierigkeiten dar, da die genomischen Sequenzen reich an T- und A-Clustern sind. Das reine, nicht klonierte PCR-Produkt, ließ sich nicht sequenzieren und wurde daher kloniert. Schlussendlich konnte die gesamte genomische Sequenz des CYP2C41-Gens mit einer Länge von 14 660 bp vollständig sequenziert und inklusive der Exon-Intron-Grenzen in der GenBank-Sequenzdatenbank eingetragen werden (Accession HF677515) (Tab. 4.12).



**Abb. 4.4:** Schematische Darstellung der Sequenzierungsstrategie für das CYP2C41-Gen.

Die Rechtecke stellen die acht Exons dar; die gestrichelten Linien repräsentieren die Introns. Die angegebenen Größen der Introns in bp ergaben sich aus den Sequenzierungen. Pfeile markieren die Vorwärts- und Rückwärts-Primer. Zu beachten ist, dass das Amplifikat für Intron 7 mit den Primern Ex7-F und Ex9-R generiert wurde. Erst im Laufe der Versuche stellte sich heraus, dass Exon 8 des CYP2C41-Gens der Sequenz der Exons 8 und 9 vom humanen CYP2C18 entspricht.





ERGEBNISSE

atataatcattggtcattctataatttaagggttagggaagaataataataaaaaatgagagaatggaatgtaaaagatgctttaactataagggttgatgta tga t g t a t  
aggagaaataca t g t a t c a t c a t g t g t c a g a g t t c c c c t c a g g t t c c c t c a g g t t c t c t a t g a c a c a g a g g a t t a c t t t a t a c a c a a a t g c a a a a t g c t c c c c a g a g a c a g a g a c c a t t t t g t c t  
t c a t c t c a t t t t t a a c c a g g g c t t g c a c g t t t a t a t a t a g c t t c a a a a c t t t t a a c t t t a t a a t t t t t t t t t t a t c t t t a a g g c c t a c a a t a g c c t t c c c t g c t t c c a t t c a t t a t c  
T C C A G G A A G C C A T A A C A A T A T T A A A A A T T T G C T T T C A T A A A A A G T T A C A T T T T G G A G A A A A T A A A A G A A C A C C A A G A A T C C T T C G A T G T T A C A A A T C C T C G G A T T C A T T G A T T A  
T T T C C T G A T A A A A A T G G A A C A G t a a a a t g c a g a t c a g t t a t t g t t a c t t g t g t t t t g g t t a c t t g a t t t g t t c t c t c t t a t t g a g g a t a t t t a a a a t t g t c a g g t a a g a a a t g c t t  
g a c a a t c a c t t t a g g t a c t t a t g a t g c a t a g a t g a g a t g c g t t g t a a a g a g c t a a t t c t a g a g a a g g a a g t t c c t t c a t c t g a g c c a t c a t t a c t t a t c c a a  
t c a c t t t g t a g c t c t g c t c a g a a a t g a a a c c a a t g a t a g t a c a t a a t g g c a a g a t g t c a a c g a t a a t g t t c a a a g a t g t c c c t g g a t t t c a a t t g g a c t g c t c a  
a a t c a c a t a t t c t a g g t a g a a t g a a g t g a g a a a c t g g t c a a g t g g t t g a a g a a a c t a g a a g a g t g a a g a a t t a a c t t c c a c t c t g c t t c t c t g c c a t t a g g g c a a t g a t t t t t a  
t c t t t c t a g e g a t c a g c t g a t t t g a a t c t g a t a a a a g t a t g g t c a c c t t c c c a g a a a t g t a c c t a t g t g c a t g t t t t t g t a t t t t g c a c a t a t t t t g a g g g a t t t c t c t a a t g t a  
g t a a g a c t c c c a c t g a t t c t a g g c t a a g g a a g t t c t g a c a t c t c a t a c t t c a a t t a a c t a g a t a t t t t c c t t a a c t a t a t t a a a a c t g c a t t g t c t c t c t g g a c t t c a t g a t a g t a  
t t t a g a t t c t a g c t t a t t a t c c t t t g t t g t t a a t a t c t t c a c a t a g t a t a a t t c a c a t a c c a t c c c a c a t c a a g c a a t t c a g t a a t t g t g t a t t t t t c a g a t t t g t g  
c a a c c a c c a c c a c a a t c a a t t a c c g a a c a t t t t c a t c a c c c t c a a a a g a a g c c c c a t a a g a t t g a g t a c t a t t c a t t a t t c t c a a g c c t t c c a g c t t c a g g a t t c a c t a t t c t a c t t t  
c t g t c t a t a g a t t a c t a t t c t g g a t g t t t c a c a g t a t a t a g t c t t t g t t c t a g c t t c t t c a c t t c a t t c c t t a g g c a t a a a a t t a g g c a t a a a a t t a g g c a t a a a a g t t g a t a  
a c c t a t g t g t a t g g a a g c a t g a t t c t c a a a t t t a c t t t a a c a g a t g g a a a t g c t a a t a a t g t t t t a t a a c t g a c c t a t t c o c t t t t c t g g c c t t c a g t a a t t t g g g g t t g g c a a g g t t a  
g a a a a g t g t g a t g t g a t g t t a c c a a t g g g t c t a g c a g t a g a c c a t t g a g g t t a a g c c t g c c t a a t g g a g t t g a t g a c a t g t t a g g c a t c c c g c a g g t c t t g g g g a t t g t a a g a a t t  
t t a t t a a t g t t g g c c t a g a g a c t g g a t a g g a a g a a a t t t t t t t g t g t a t t t t a g t a c t t c t t c a a t a t t c a a a t g g c c a c a t t g t t g t t g t c o a t t t t c a t g t c a c c c t t a t c  
t t a a a c c a a t t t c a g t t g t c o t t g t a g g t g c t t t a c t c c a c t t a a a a t t a t a g a t c t c t t t t t t t a a a t t t t t a t t a t t a t g a t a g g c a c a c a g a g a g a g a g a g a g a g a  
g a c a c a g g c a g a g g a g a a g c a g c t c c a t g c a c c g g g t c t a g g a t c g c g c c t g g g t c a a a g g c a g g c g c c a a a c c g c t g g g c c a c c c a g g g  
a c c c c a a c t t a t g a t c t o t t t g t a g t c a g t c t c t a t c o t c a g c a t c t g c c t c a c t c t c o t c a t c c a c t a t g g g t g g t t a a t g c t c a a a t t t t c t g t c t c a t g t c t g t a a t a t t c t  
a t t t g t a t c c c a t t a a t t c c t g c a c t t g t t t c o t a a c c a a a t t g c c t c c t c a c a t c t g g a t a c a a t a g c a g c t g g c c c c t t t t g t c t t t g t a a a t c c a t t c t c a c a a t a a t c t  
g t t c t c a g a t a t g c t g c c a t g t t a g c t t t t g c a t a t t t c a a c t a t a t a a t g a g t c c a t a g a a t t c t a c a c a g a a g a g a g a a t t g c a a a c t c t t t g a t c o a t  
g g t t a t g c c a t t t t c a a g a t a t g g c t a a t t a c t c a t t t c t a c a g t t a a g a c t g c a t t t g c c t a c c a a a g a g a a a c c c a a t t a a c a a t g t t t t a a a g a a a t a g t g g g t t t a t t  
t a c c t c a t g t a g a g a g a t a t c a t g t t g a g a g t c c c a g g a c t t g t a c a g t a g t c c t g a a g t a t c a t g g a c t c a g g t c t c t c o c a t t t t t a t t a t t a g a c t c t t t t t t t c t t t t t  
t t t t t t t t t t t a a g a t t t t a t t a c t t a t t t g a g a c a g a c c g a g a t a g t g a a g g a t g g g g a a a a g g a a a g g g a a a g c a g g c t t g c g g c t g a g c a g g g a t c c c c a t t  
c a g g c c t g a t c c c a g g a c t c c g g g a t c a t g a c c t g a g c a a a a c a g a t g c t t a a c t g a c t a g c c a c c a g g t g c c c t t t a t t t a g a t t c t t a g t a t g t a g g c t t c a t g t t c a t g t t  
t c c a g a t a t c t a t a c t g t c t c c a c c t a t a t g t g t g t a g c t c t g c a g t a a g a a g a a g a a g a a g t g a c a t a a a t a g g c a t t g g t a a g a a a t g g a t t g c t t g g c c c a a t t t a  
g c t g c a a a a g a g g c t a g g a a t g a a a t t t g t a g g a a g c a a a g g a a t a g g a a a t a a g a t t g g g t c a a t a a g a t t t c c a t a c c a c a c a g t t g t t a t t t t a a c a c t  
a c a g t t t c t a a g t t t g c t t a a c t t a a c g a t g t t a c t t t g g a t a a c a t a t c a t a t c c t g t g a a c c a g t a a a t a c t t a t g t a a a a t a t t c c t a g G A A A A G C A C A C C A G C C  
A T T G G A A T T T A C T T T C G A A A A C T T G A A A A C T A T T G C C A C T G A T T T G T T T G G A G T G G G A C A G A C A C A A C C C T A C G A T A T G T G T C C T G C T G C T G C T G C T G C T G C T G C T G C  
A C A G g t a t g g c c a g c a t g g t g g g c a g a g t g t g c t t g a g g c a t a a a a c t g a t g t t t a t a t g a t g t t g g a a t a c c t c a a a g a g t t c a t a t t a c c t g a a t t g g c a t g t a a a c g t a t g t a t g

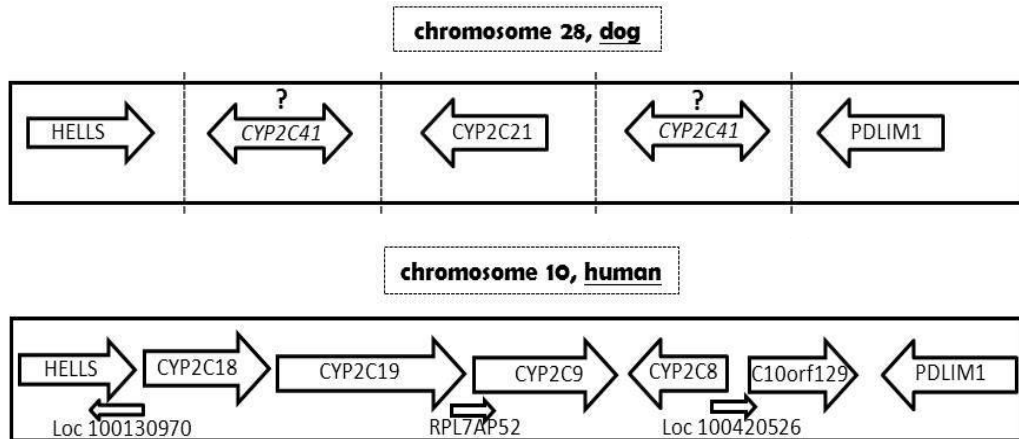


#### 4.1.6.3 Ermittlung einer Bruchstelle auf dem Chromosom 28 bei CYP2C41 negativen Hunden

Beim Menschen befinden sich alle Cytochrome der CYP2C-Subfamilie auf einem gemeinsamen Gen-Cluster auf Chromosom 10. Auf diesem Cluster werden sie flankiert von den Genen *HELLS* (eine Helicase) und *PDLIM1* (eine Proteindomäne) (Abb. 4.5). Beim Hund findet man einen ähnlichen Gen-Cluster auf Chromosom 28. Hier befindet sich das Gen CYP2C21, ebenfalls flankiert von *HELLS* und *PDLIM1* (Abb. 4.5). Die Position des CYP2C41 im Hundegenom ist unbekannt. Es lässt sich jedoch aus Ähnlichkeit zum humanen CYP2C18 vermuten, dass es sich auf oben beschriebenen Cluster auf Chromosom 28 befindet. Um den 45 kb großen Gen-Cluster bei einem CYP2C41 positiven und negativen Hund durchzusequenzieren, wurden Primer entwickelt, ausgehend von der genomischen Sequenz eines CYP2C41 negativen Hundes. Diese Primer deckten den Gen-Cluster auf Chromosom 28 vollständig ab. Die Primer konnten verschieden kombiniert werden, um Sequenzen von 1 000 bp bis zu 10 000 bp zu flankieren. Es wurden verschiedene Primer-Kombinationen und verschiedenen *long-range* Polymerasen getestet.

Ziel dieser Untersuchung war es, einen Unterschied zwischen einem CYP2C41 negativen und positiven Hund zu finden, der sich z.B. als Fehlen eines bestimmten Amplifikats beim CYP2C41 positiven Hund oder einem Größenunterschied der Amplifikate beider Tiere darstellen könnte. Mit dieser Vorgehensweise sollte die Position von CYP2C41 im Hundegenom ermittelt werden und somit die Bruchstelle, an welcher das CYP2C41-Gen bei dem Großteil aller Hunde fehlt.

Die PCRs lieferten jedoch leider kein eindeutiges Ergebnis. Sowohl der CYP2C41 positive, als auch der negative Hund zeigten die gleichen, meist unspezifischen Amplifikate.



**Abb. 4.5: Schematische Darstellung des humanen CYP2C-Clusters auf Chromosom 10 und des CYP2C-Clusters des Hundes auf Chromosom 28.**

Die möglichen Positionen und Ausrichtungen des CYP2C41-Gens zwischen CYP2C21 und HELLS oder CYP2C21 und PDLIM1 sind graphisch dargestellt.

#### 4.1.6.4 „Screening“ von > 400 Hunden auf das Vorhandensein von CYP2C41

Mit der „Exon 7-PCR“ war eine Möglichkeit geschaffen, einen Träger des CYP2C41-Gens von einem Nicht-Träger auf dem Agarosegel zu unterscheiden. Zusätzlich zur Qualitätskontrolle der DNA konnte in der PCR immer auch ein beliebiges Exon von CYP2C21, welches bei jedem Hund vorkommt, amplifiziert werden. Durch die MDR1-Diagnostik an unserem Institut haben wir die Möglichkeit, auf genomische DNA von tausenden Hunden verschiedener Rassen, beider Geschlechter und des jeweiligen MDR1-Status zurückzugreifen.

Aus diesen Hunden wurden verschiedene Gruppen gebildet, mit Augenmerk auf verschiedene Eigenschaften. Diese Gruppen setzten sich wie folgt zusammen und folgende Ergebnisse stellten sich dar:

##### **Gruppe I: Collies**

- n = 131
- Geschlecht: 63 ♀, 69 ♂
- MDR1 Status: 39 +/+, 51 -/-, 41 +/-

14 Tiere zeigten sich als Träger des CYP2C41-Gens. Dies entspricht 10,69 %. Von den 14 positiven Hunden waren 10 männlich und 4 weiblich. Es waren somit 14,5 % der männlichen Hunde positiv auf CYP2C41 und

6,35 % der weiblichen. Sieben der positiv getesteten Collies wiesen den MDR1 Status +/- auf. Dies entspricht 50 % der gesamten als Träger des CYP2C41-Gens identifizierten Hunde. Fünf Hunde wiesen den Status -/- auf (35,71 %) und zwei Hunde +/+ (14,29 %).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die männlichen Collies in dieser Testgruppe mehr als doppelt so häufig Träger des CYP2C41-Gens waren als die weiblichen Collies, und dass Tiere mit dem MDR1 Status -/- oder +/+ weitaus seltener Träger des Gens sind, als Hunde mit dem Status +/-.

### **Gruppe II: Shetland Sheepdogs**

- n=76

18 der 76 Shetland Sheepdogs zeigten sich als Träger des CYP2C41-Gens; dies entspricht 23,68 %. Somit sind mehr als doppelt so viele Shetland Sheepdogs in dieser Testgruppe Träger des CYP2C41-Gens als Collies.

### **Gruppe III: Border Collies**

- n=73

Bei den Border Collies konnte bei 5 von 73 Hunden das CYP2C41-Gen mittels der "Exon 7-PCR" nachgewiesen werden; dies entspricht 6,85 %. Ein weitaus geringerer Teil der getesteten Border Collies ist somit Träger des CYP2C41-Gens, als es bei Collies und Shetland Sheepdogs der Fall ist.

### **Gruppe IV: Verschiedene Rassen**

- n = 161
- 34 verschiedene Rassen

Insgesamt zeigten sich in dieser Testgruppe 28 der 161 Hunde positiv in der "Exon 7-PCR" auf das CYP2C41-Gen, was einem prozentualen Anteil von 17,39 entspricht (Tab. 4.13). Zur Rasseverteilung lässt sich Folgendes sagen: Es zeigten sich positiv auf CYP2C41: Vier Huskies und vier Shar Peis (jeweils 100 %), vier Mischlinge, drei Australien Shepherd, zwei Tervueren, zwei Magyar Vizsla, jeweils ein Hund der Rassen Langhaar Whippet,

deutscher Schäferhund, Greyhound, weißer Schäferhund, Shi Tzu, Harzer Fuchs und Setter (Tab. 4.13). Jeweils sechs weitere Hunde der Rassen Husky und Shar Pei wurden „nachgetestet“ und auch diese wiesen sich als Träger des CYP2C41-Gens aus.

**Tab. 4.13: Auflistung der 34 verschiedenen auf CYP2C41 getesteten Hunderassen.**  
Auffallend sind die Rassen Husky und Shar Pei, bei welchen sich alle der zehn getesteten Hunde positiv in der „Exon 7-PCR“ zeigten.

Anzahl [n]	Rasse	CYP2C41 negativ [n]	CYP2C41 positiv [n]	CYP2C41 positiv [%]
34	Australien Shepherd	31	3	8,8
19	Mischling	15	4	21,1
6	Golden Retriever	6	0	0
6	Langhaar Whippet	5	1	16,7
6	Mops	6	0	0
5	Beagle	4	1	20
5	Deutscher Schäferhund	4	1	20
5	Greyhound	4	1	20
5	Groenendael	5	0	0
4	Altdeutscher Schäferhund	4	0	0
4	Barsoi	4	0	0
4	Berger Blanc Suisse	4	0	0
4	Bobtail	4	0	0
4	Französische Bulldogge	4	0	0
<b>10</b>	<b>Husky</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>100</b>
4	Irischer Wolfshund	4	0	0
4	Magyar Vizsla	2	2	50
<b>10</b>	<b>Shar Pei</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>100</b>
4	Shi Tzu	3	1	25
4	Tervueren	2	2	50
4	Wäller	4	0	0
4	weißer Schäferhund	3	1	25
3	Briard	3	0	0
3	Jack Russel Terrier	2	1	33,3
2	Scottish Schäfer	2	0	-
1	Continental Bulldog	1	0	-
1	Croisé	1	0	-
1	Elo	1	0	-
1	Englischer Cockerspaniel	1	0	-
1	Harzer Fuchs	0	1	-
1	Labrador	1	0	-
1	Rottweiler	1	0	-
1	Setter	0	1	-
1	Silken Wind	1	0	-

**Gruppe V: Zusammenfassung aller untersuchten Rassen**

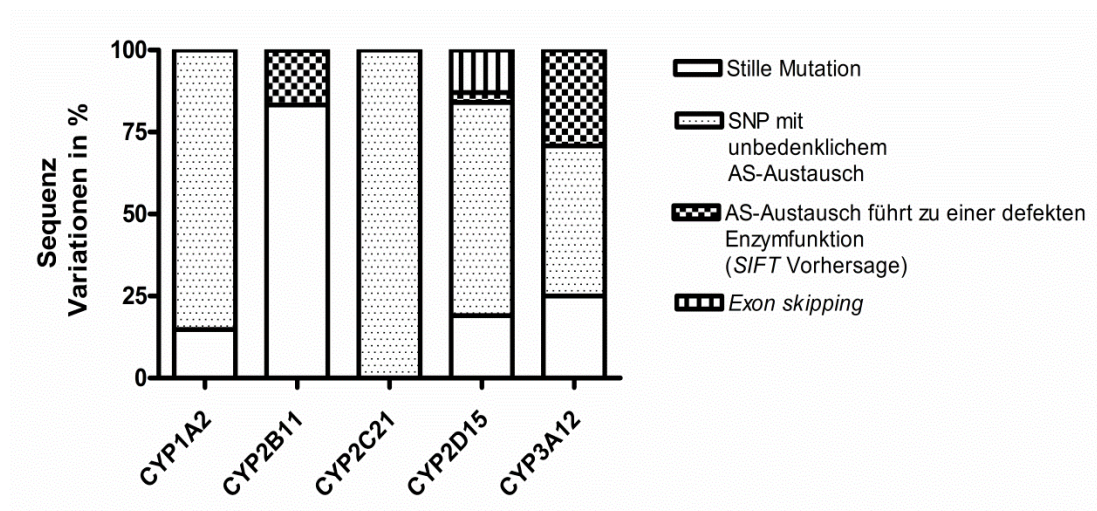
- n = 441
- Zusammenfassung aller untersuchten Hunde der verschiedenen Rassen

Bei der Gesamtheit von 441 untersuchten Hunde zeigten sich insgesamt 65 Tiere als Träger des CYP2C41-Gens; dies entspricht 14,74 %.

### 4.1.7 Zusammenfassung der Polymorphismen in den Cytochrom-P450-Enzymen des Hundes

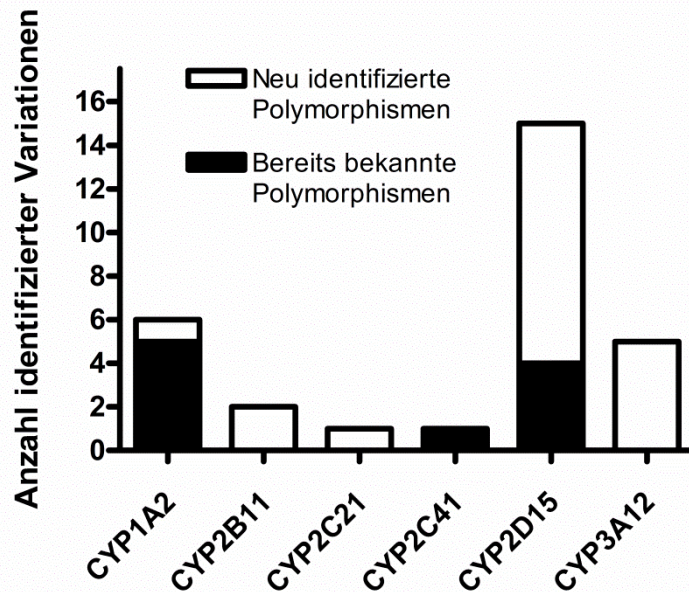
Die verschiedenen CYPs des Hundes zeigten sich in der vorliegenden Arbeit unterschiedlich polymorph. So zeigte das CYP2C21-Gen z.B. nur einen unbedeutenden Polymorphismus, wohingegen CYP2D15 diverse SNPs und einen Exon-Deletions-Polymorphismus aufwies (Abb. 4.6).

Sowohl in Anzahl als auch funktioneller Bedeutung unterschieden sich die Sequenzpolymorphismen der verschiedenen CYPs stark. Es wurden neue Polymorphismen entdeckt als auch bereits in der Literatur beschriebene wiedergefunden (Abb. 4.7).



**Abb. 4.6: Übersicht über die gefundenen Polymorphismen.**

Über 75 % der z.B. bei dem CYP2B11 gefundenen SNPs führen zu einer stillen Mutation, wohingegen über 25 % der identifizierten SNPs für CYP3A12 einen AS-Austausch mit möglicher Auswirkung auf die Enzymfunktion aufweisen.



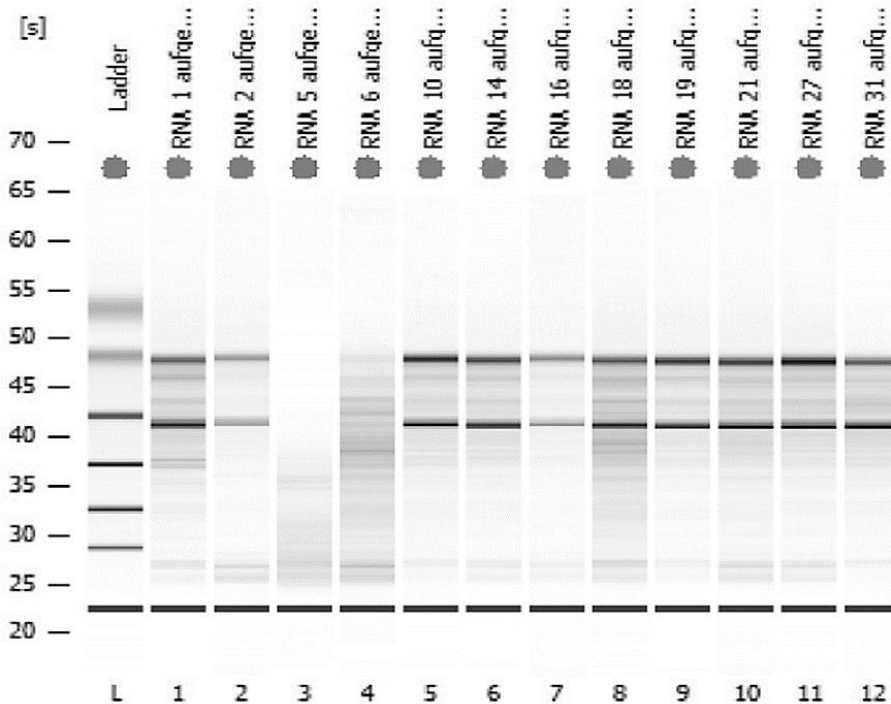
**Abb. 4.7: Verhältnis der in dieser Arbeit neu identifizierten Polymorphismen im Vergleich zu bereits bekannten Polymorphismen.**

CYP2C41 wies nur den bereits aus der Literatur bekannten Gendeletions-Polymorphismus auf. Auch bei CYP2C21 war nur ein neuer SNP zu finden. Bei dem CYP1A2 wurde ein SNP neu identifiziert. CYP2B11 wies ebenfalls zwei neue SNPs auf. Das CYP2D15-Gen zeigte sich mit 15 verschiedenen Polymorphismen sehr variabel, die Veränderungen teilten sich in elf neu identifizierte SNPs und vier bereits bekannte Polymorphismen auf, beinhaltend die Exon 3-Deletion (Blaisdell et al. 1998; Roussel et al. 1998; Paulson et al. 1999; Tenmizu et al. 2004)

## 4.2 Expressionsunterschiede in den Cytochrom-P450-Enzymen des Hundes

### 4.2.1 RNA-Quantifizierung mittels *Agilent 2100 Bioanalyzer*

Die RNAs der Hunde #1, #2, #10, #14, #16, #18, #19, #21, #27, #31 zeigten im „virtuellen“ Gelbild schöne Banden bei 18S und 28S. Die RNA von Hund #5 und #6 stellte sich mit diversen Banden und Schmier als degradiert dar und wurden somit nicht in die cDNA-Synthese für die *real-time* PCR eingesetzt (Abb. 4.8). Der RIN-Wert variierte bei den zehn qualitativ hochwertigeren RNAs zwischen 6,90 und 8,90. Für das Experiment wurde schließlich die cDNA der Hunde #1, #2, #10, #16, #18, #19, #21, #27 und #31 eingesetzt.



**Abb. 4.8: Virtuelles Gelbild nach einer Messung im Agilent 2100 Bioanalyzer.**

Neben dem *Ladder* ist RNA von 12 verschiedenen Hunden aufgetragen. Bei allen Proben, außer den Proben RNA #5 und #6, sind die 18S-ribosomale RNA und die 28S-ribosomale RNA als Banden zu erkennen. Die RNA #5 und #6 zeigen verschmierte unspezifische Banden und keine spezifischen Banden, was auf degradierte RNA hindeutet. Selbst wenn cDNA aus dieser RNA in einer PCR noch verwertbare Ergebnisse liefern würde, wären sie für den Einsatz in der *real-time* PCR ungeeignet.

## 4.2.2 Expression mit den Housekeeping-Genen B2M und ACTB

Alle fünf untersuchten CYPs 1A2, 2B11, 2C21, 2D15 und 3A12 zeigten bei den neun Hunden unterschiedliche  $C_t$ -Werte, mit verschieden großer Spannweite. Die Housekeeping-Gene wiesen hingegen eine zwischen den einzelnen Tieren sehr gut vergleichbare Expression auf (Tab. 4.14 und Abb. 4.9). In Tab. 4.14 sind alle mittels *real-time* PCR erhaltenen Rohdaten ( $n=3$   $C_t$ -Werte je Hund und CYP) aufgelistet. Je näher sich hierbei die drei  $C_t$ -Werte des CYPs eines Individuums annähern, umso genauer wurde pipettiert und umso kleiner ist die Standardabweichung. Aus den drei  $C_t$ -Werten wurde schließlich der gemittelte  $C_t$ -Wert ( $av C_t$ ) berechnet. Abb. 4.9 stellt die gemittelten  $C_t$ -Werte ( $av C_t$ ) als vertikalen Whisker-box plot dar. Diese Darstellung gibt einen schnellen Eindruck über den Bereich, in welchem sich die erhobenen Daten befinden und stellt zudem den Median,

die Quartile und die beiden Extremwerte dar. Gut zu erkennen, ist die große Streuung der unterschiedlichen  $\Delta C_t$ -Werte der einzelnen CYPs im Gegensatz zu denen der Housekeeping-Gene. Die größte interindividuelle Streuung weist CYP1A2 auf, wohingegen CYP2D15 und CYP3A12 eine vergleichsweise konstante Expression aufweisen.

In Abb. 4.10 und 4.11 ist gut die interindividuelle und individuelle Streuung der gemittelten  $\Delta C_t$ -Werte der einzelnen Tiere für jedes CYP erkennbar und somit deren relative Expression. Durch Einbezug der  $C_t$ -Werte der Housekeeping-Gene fand eine Normierung statt. Diese Normierung reduziert Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen oder experimentelle Fehler. Der  $\Delta C_t$ -Wert bezieht die Expression des Zielgens auf die Expression des konstant exprimierten Referenzgens. Abb. 4.10 zeigt durch die Gruppierung der einzelnen  $\Delta C_t$ -Werte (im Verhältnis zu B2M und ACTB) der verschiedenen untersuchten Hunde gut deren interindividuelle Varianz. Abb. 4.11 hingegen stellt nur Bezug nehmend auf ACTB die unterschiedliche Expression einzelner CYP innerhalb eines Individuums (leber-spezifisch) dar.

**Tab. 4.14: Auflistung der C<sub>t</sub>- und gemittelten C<sub>t</sub>-Werte (av C<sub>t</sub>) aller Targets und Houskeeper-Gene.**

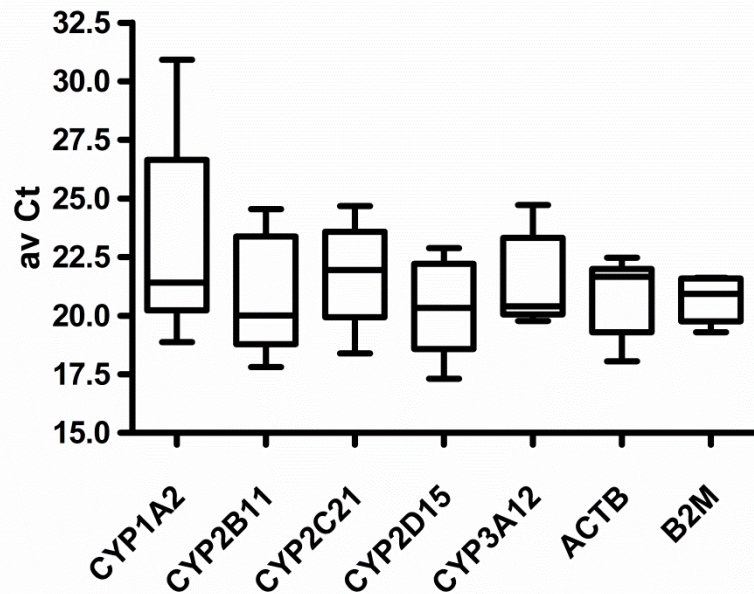
In die *real-time* PCR wurden jeweils n=3 Ansätze je Target und Hund pipettiert. Je näher sich hierbei die drei C<sub>t</sub>-Werte annähern, umso genauer wurde pipettiert und umso kleiner ist die Standardabweichung.

Hund #	CYP1A2		CYP2B11		CYP2C21		CYP2D15		CYP3A12		ACTB		B2M	
	C <sub>t</sub>	av C <sub>t</sub>	C <sub>t</sub>	av C <sub>t</sub>	C <sub>t</sub>	av C <sub>t</sub>	C <sub>t</sub>	av C <sub>t</sub>	C <sub>t</sub>	av C <sub>t</sub>	C <sub>t</sub>	av C <sub>t</sub>	C <sub>t</sub>	av C <sub>t</sub>
<b>1</b>	30,964		24,315		23,826		22,857		20,733		21,979		21,559	
	30,796	30,920	24,641	24,547	24,000	23,854	22,846	22,888	20,851	20,800	22,000	21,968	21,805	21,618
	31,000		24,685		23,735		22,962		20,817		21,925		21,491	
<b>2</b>	28,251		24,000		22,602		22,460		24,218		22,452		21,442	
	28,282	28,219	23,867	23,926	22,656	22,611	22,557	22,538	25,000	24,722	22,479	22,477	21,552	21,556
	28,123		23,911		22,574		22,597		24,948		22,500		21,674	
<b>10</b>	21,321		18,861		20,763		20,294		19,785		21,740		20,904	
	21,514	21,408	18,885	18,897	20,814	20,815	20,332	20,330	19,725	19,772	21,694	21,673	21,000	20,960
	21,390		18,946		20,869		20,364		19,805		21,586		20,977	
<b>16</b>	20,426		20,687		20,751		19,912		20,486		20,098		20,166	
	20,380	20,403	20,377	20,389	20,956	20,887	19,588	19,757	20,174	20,409	19,861	19,996	20,311	20,212
	20,403		20,102		20,953		19,772		20,568		20,029		20,158	
<b>18</b>	20,416		19,818		24,846		18,889		19,784		19,016		19,263	
	20,216	20,302	20,229	20,014	24,741	24,670	19,010	19,022	20,149	20,013	19,212	19,159	19,360	19,314
	20,275		19,994		24,423		19,166		20,106		19,250		19,320	
<b>19</b>	18,860		18,435		18,358		18,063		20,082		18,061		19,176	
	18,665	18,872	18,548	18,679	18,424	18,388	18,208	18,149	20,126	20,112	18,050	18,051	19,369	19,299
	19,090		19,053		18,382		18,177		20,129		18,041		19,352	
<b>21</b>	20,100		17,567		19,040		17,258		20,004		19,417		20,393	
	20,142	20,151	18,126	17,810	19,028	19,046	17,197	17,306	20,099	20,106	19,417	19,426	20,433	20,387
	20,210		17,736		19,071		17,463		20,216		19,443		20,334	

ERGEBNISSE

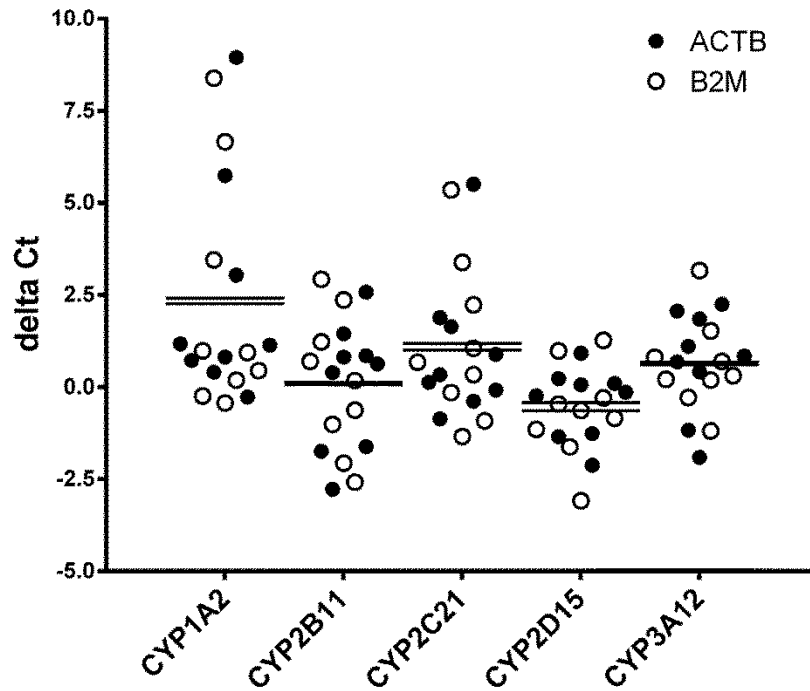
**Fortsetzung Tab. 4.14**

<b>27</b>	25,060		22,719		21,873		20,676		23,000		22,118		21,483	
	25,062	25,065	23,000	22,842	22,000	21,948	20,797	20,766	23,220	23,133	22,000	22,025	21,655	21,610
	25,074		22,806		21,970		20,824		23,179		21,957		21,691	
<b>31</b>	22,694		20,377		23,232		21,744		23,419		21,598		20,844	
	22,822	22,839	20,170	19,919	23,229	23,304	21,944	21,896	23,611	23,516	21,746	21,664	21,000	20,924
	23,000		19,209		23,450		22,000		23,519		21,648		20,928	



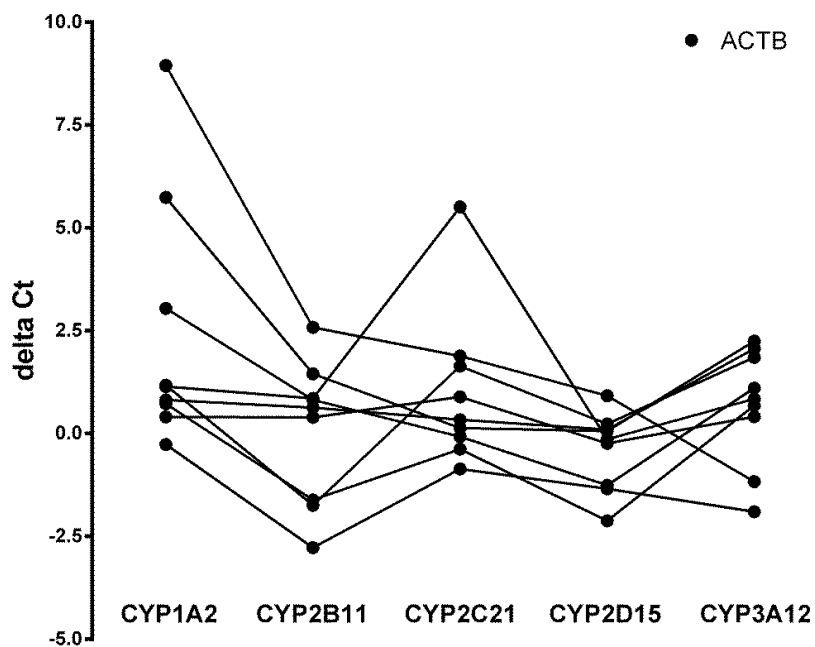
**Abb. 4.9: Graphische Darstellung der durchschnittlichen  $C_t$ -Werte (av  $C_t$ ) aller Targets und Housekeeping-Gene, dargestellt als Whisker-box plot.**

Gut erkennbar ist die geringe Spannweite der  $C_t$ -Werte der endogenen Kontrollen ACTB und B2M. CYP1A2 hingegen weist eine große Variabilität in der Expression bei den verschiedenen Hunden auf. Dargestellt ist als Linie in der Box der Median. Die Box entspricht dem Bereich, in dem die mittleren 50 % der Daten liegen. Die weiteren 50 %, aufgeteilt auf jeweils 25 %, sind als Antennen (Whiskers) über und unter der Box dargestellt, jeweils endend bei min. und max. Je niedriger der  $C_t$ -Wert ist, desto höher ist das Expressionsniveau des Zielgens.



**Abb. 4.10: Gemittelte delta C<sub>t</sub>-Werte der einzelnen Tiere jedes CYPs.**

Diese Darstellung der gemittelten delta C<sub>t</sub>-Werte aller beprobten Hunde für einzelne CYP-mRNAs gibt einen Eindruck über deren relative Expression in der Leber. Je niedriger der delta C<sub>t</sub>-Wert ist, desto höher ist das Expressionsniveau des Zielgens. Gut erkennbar ist die interindividuelle Streuung der CYP-mRNA-Expression verschiedener Hunde.



**Abb. 4.11: Gemittelte delta C<sub>t</sub>-Werte der einzelnen Tiere jedes CYPs.**

Diese Darstellung der gemittelten delta C<sub>t</sub>-Werte, nur unter Berücksichtigung von ACTB, aller beprobten Hunde einzelner CYPs gibt einen Eindruck über deren relative Expression in der Leber. Je niedriger der delta C<sub>t</sub>-Wert ist, desto höher ist das Expressionsniveau des Zielgens. Gut erkennbar ist die individuelle Varianz der Expression unterschiedlicher CYPs einzelner Tiere.

## 5 DISKUSSION

Aus der Humanmedizin ist bereits bekannt, dass Polymorphismen in den Cytochrom-P450-Enzymen (CYPs) für die klinische Pharmakologie eine wichtige Rolle spielen. Sie können den Arzneistoffmetabolismus maßgeblich beeinflussen. In den letzten Jahren wurden auch mehrere genetische Polymorphismen in den caninen Cytochromen entdeckt, welchen teilweise auch eine klinische Bedeutung zugeschrieben werden kann, wie z.B. dem Polymorphismus CYP1A2 1117C>T.

In Anbetracht der Wichtigkeit der CYP-Subfamilien des Hundes in dessen Arzneistoffmetabolismus und der damit verbundenen Konsequenzen für die Sicherheit von Arzneistoffen und deren Effektivität, ist es besonders im Hinblick auf den Hund als veterinärmedizinischem Patient und als präklinische Spezies von großer Bedeutung, die Forschung auf dem Gebiet der CYP Polymorphismen weiterzuführen. Wie in der Einleitung gezeigt, gibt es durchaus bereits Untersuchungen zu diesem Thema. Im Vergleich zur Humanmedizin steckt die Forschung auf diesem Gebiet jedoch noch in den Kinderschuhen. Forschungsschwerpunkte sollten z.B. sein (Martinez et al. 2013):

- Identifizierung weiterer Substrate, spezifisch für canine CYPs
- Identifizierung von CYP-Variationen und deren metabolische Konsequenzen
- Entwicklung von *high-throughput tools*, um das Vorhandensein von spezifischen genetischen CYP-Polymorphismen in einer Hundepopulation nachzuweisen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sechs verschiedene Cytochrom-P450-Enzyme des Hundes auf Variationen hin untersucht. Die Untersuchung schloss Sequenzanalysen und Expressionsstudien ein. Die Ergebnisse machen deutlich, dass sich die Cytochrome des Hundes, vergleichbar zum Mensch, ebenfalls als sehr polymorph darstellen. Es wurden verschiedene SNPs, eine Exon-Deletions-Variante und ein Gendeletions-Polymorphismus, sowie starke interindividuelle Unterschiede in der mRNA-Expression der entsprechenden CYPs aufgedeckt.

## 5.1 Polymorphismen in den Cytochrom-P450-Enzymen des Hundes

Die Cytochrome CYP1A2, CYP2B11, CYP2C21, CYP2C41, CYP2D15 und CYP3A12 wurden aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit zu humanen Homologen ausgewählt, welchen im menschlichen Organismus eine wichtige Rolle im Arzneistoffmetabolismus spielen (Tab. 5.1). Dieser Vergleich sollte als Anhaltspunkt dienen, um Ergebnisse mit möglicher klinischer Relevanz zu erlangen. Der Begriff „Homologie“ beschreibt hier die Verwandtschaft zweier Charaktere (Gene), welche - natürlich mit Abweichungen - von einem gemeinsamen Ahnen abstammen und aus diesem Grund eine große Aminosäureidentität (gemeinsame identische Aminosäuren) oder Homologie (gemeinsame ähnliche Aminosäuren) aufweisen (Fitch 2000). Solche Identitäten und Homologien lassen sich sehr gut mittels eines Alignments von Aminosäuresequenzen verschiedener Spezies darstellen (Abb. 5.1) und/oder prozentual ausdrücken (Tab. 5.5).

**Tab. 5.1: Gegenüberstellung der humanen Cytochrom-P450-Enzyme und deren caninen Homologe.**

Humanes Cytochrom	Canines Homolog
CYP1A2	CYP1A2
CYP2B6	CYP2B11
CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19	CYP2C21, CYP2C41
CYP2D6	CYP2D15
CYP3A4	CYP3A12

Es stellt sich die Frage, ob sich die Wichtigkeit bzw. Relevanz im Arzneistoffmetabolismus eines humanen Cytochroms tatsächlich einfach auf die des caninen Enzyms übertragen lässt. Für diese Fragestellung ist es sinnvoll die generellen Unterschiede und Ähnlichkeiten des menschlichen und caninen Genoms zusammengefasst zu betrachten (Tab. 5.2, Tab. 5.3).

**Tab. 5.2: Unterschiede zwischen dem humanen und caninen Genom.**

Tabellarische Auflistung einiger numerischer Unterschiede im humanen und caninen Genom nach Fleischer et al. 2008.

	Unterschiede	
	Hund	Mensch
Chromosomenzahl	78	46
Anzahl der Basenpaare (in Gigabasen)	2,4	2,9
Vorausgesagte Anzahl der Gene (x1000)	19,3	22,0

**Tab. 5.3: Ähnlichkeiten zwischen humanem und caninem Genom.**

Tabellarische Auflistung einiger Ähnlichkeiten im humanen und caninen Genom nach Fleischer et al. 2008.

Ähnlichkeiten
<p>94 % des Hundegenoms sind in der gleichen Reihenfolge innerhalb individueller Chromosome (Syntenie) angeordnet wie bei Mensch, Maus und Ratte. Die Mehrheit der vorhergesagten Gene im caninen Genom repräsentieren Homologe von humanen Genen.</p> <p>Das Missverhältnis zwischen der Anzahl der Gene von Hund und Mensch, könnte kleiner werden, wenn sich die Technik zur Identifikation von funktionellen Genen von den vorhergesagten Genen verbessert.</p> <p>Obwohl sich Anzahl und Frequenz von Genduplikationen spezifisch für jede Abstammung unterscheiden, kommen die Duplikationen in ähnlichen Gen-Clustern vor, beinhaltend Gene, welche für adaptive und angeborene Immunität, Sensitivität auf chemische Stimuli und Reproduktion codieren.</p>

Auch einige CYP-Substrate sind bereits zwischen Mensch und Hund verglichen worden. Es lassen sich ebenfalls Übereinstimmungen im Substrat- oder Inhibitor-Spektrum einzelner Cytochrome feststellen (Tab. 5.4).

**Tab. 5.4: Gemeinsame Substrate humaner und caniner CYPs.**

Gegenüberstellung einiger ausgewählter, gemeinsamer CYP-Substrate von Mensch und Hund nach Martinez et al. 2013.

<b>Humanes CYP1A2</b>	<b>Canines CYP1A2</b>
Substrat Theophyllin	
<b>Humanes CYP2B6</b>	<b>Canines CYP2B11</b>
Substrat Propofol	
<b>Humanes CYP2C9</b>	<b>Canines CYP2C21, CYP2C41</b>
Substrat Diclofenac	
<b>Humanes CYP2D6</b>	<b>Canines CYP2D15</b>
Substrat Bufurolol	
<b>Humanes CYP3A4</b>	<b>Canines CYP3A12</b>
Inhibitor Ketoconazol	

In vorliegender Untersuchung konnte diese Ähnlichkeit humaner und caniner CYPs durch ein kleines Puzzleteil weiter untermauert werden. So ließen sich z.B. Exon-Intron-Grenzen teils eins zu eins von humanen Homologen auf canine Sequenzen übertragen und es war im Falle von CYP2C41 möglich, diese Grenzen mittels PCR zu bestätigen und die bisher unbekannte genomische Sequenz zu bestimmen (Abb. 5.2). Sequenzähnlichkeiten ließen sich mit Hilfe von Alignments verschiedener Sequenzen aus der CYP2C-Subfamilie des Menschen und der caninen CYPs 2C41 und 2C21 graphisch darstellen und im Falle anderer Spezies, z.B. Maus und Ratte, auch prozentual berechnen (Abb. 5.1, Tab. 5.5).

Ein Versuch, welcher ebenfalls auf die Vergleichbarkeit der humanen und caninen Enzyme aufbaute und eine Bruchstelle auf dem Chromosom 28 bei CYP2C41 negativen Hunden ermitteln sollte, führte jedoch zu keinem Ergebnis. Das CYP2C41-Gen sollte sich mutmaßlich auf einem vergleichbaren Gen-Cluster wie die humane CYP2C-Subfamilie befinden, flankiert von den Genen HELLS und PDLIM1. Es war jedoch nicht möglich, mittels PCR-Amplifikation in diesen Arealen das Gen dort zu finden oder einen Unterschied zwischen einem CYP2C41 negativen und positiven Hund darzustellen. Methodisch wäre es sinnvoll, das komplette Genom eines durch die "Exon 7-PCR" als CYP2C41 positiv identifizierten Hundes zu sequenzieren, um die genaue Position des CYP2C41-Gens festzustellen.

In diesen Aufzählungen eigener Untersuchungen und der Literatur fallen sowohl Unterschiede als auch Ähnlichkeiten ins Gewicht. Es bleibt jedoch zunächst nur die Möglichkeit, sich auf Sequenzhomologien zu verlassen, da sowohl das Substratspektrum der caninen CYPs, als auch die klinische Relevanz bereits gefundener Sequenzvariationen bisher wenig untersucht sind.

Auf diesem Hintergrund zielte die vorliegende Arbeit lediglich darauf ab, in einem Patientenkollektiv von Hunden nach weiteren Sequenz-Variationen zu forschen. In Folgestudien müssen diese nun auch funktionell bewertet und die klinische Relevanz überprüft werden. Alle sechs ausgewählten Cytochrom-P450-Enzyme stellten sich als mehr oder weniger polymorph dar. Detailergebnisse werden im nachfolgenden Kapitel diskutiert.

hCYP2C8	1	MEPFVVLVLCLEMLLFLSLWRQSCRRRKLPPGPTPLPIIGNLQIDVKDICKSETNESKV
hCYP2C9	1	MDSLVVLVLCLEMLLFLSLWRQSSGRGKLPVIGNIIQIGIKDISKSLTNLSKV
hCYP2C18	1	MDPAVALVLCLEMLLFLSLWRQSSGRGLPISGPTPLPIIGNIQLDVKDMSKSLTNESKV
hCYP2C19	1	MDPFVVLVLCLEMLLFLSLWRQSSGRGKLPVIGNIIQIDIKDVKSLTNLSKI
cCYP2C21	1	MDLFTVLVLCLEMLLFLSLWRQSSGRGKLPVIGNIIQINTKNVSKSLSKLAEN
cCYP2C41	1	MDPFVVLVLCLEMLLFLSLWRQSSGRGKLPVIGNIIQID-KDINKSLTNLSKA
hCYP2C8	61	YGPVFTVYFGNPIVVFHGYEAVKEALIDNGEEFSGRGNSPISQRITKGLGILSSNGKRW
hCYP2C9	61	YGPVFTVYFGNPIVVLHGYEAVKEALIDLGEFSGRGIFPLAERANRGEFIVFSNGKRW
hCYP2C18	61	YGPVFTVYFGNPIVVLHGYEAVKEALIDLGEFSGRGIFPLAERANRGEFIVFSNGKRW
hCYP2C19	61	YGPVFTVYFGNPIVVLHGYEAVKEALIDLGEFSGRGIFPLAERANRGEFIVFSNGKRW
cCYP2C21	61	YGPVFTVYFGNPIVVLHGYEAVKEALIDRSEEFSGRGIFPLDWTIQGLGIVFSNGEKRW
cCYP2C41	60	YGPVFTVYFGNPIVVLHGYAVKETLIDLGEFSGRGIFPLAEKVSQGHGIFIVFSNGRW
hCYP2C8	121	KEIRRFSLTLRNFGMGKRSIEDRVQEEAHCILVEELRKTNASPCDPTFILGCAPCNVICS
hCYP2C9	121	KEIRRFSLTLRNFGMGKRSIEDRVQEEARCLVEELRKTNASPCDPTFILGCAPCNVICS
hCYP2C18	121	KEIRRFSLTLRNFGMGKRSIEDRVQEEARCLVEELRKTNASPCDPTFILGCAPCNVICS
hCYP2C19	121	KEIRRFSLTLRNFGMGKRSIEDRVQEEARCLVEELRKTNASPCDPTFILGCAPCNVICS
cCYP2C21	121	KQTRRFSLTLRNFGMGKKTVEDRIQEEALYLVEALRKTNASPCDPTFILGCAPCNVICS
cCYP2C41	120	KEMRRFSLTLRNFGMGKSDLESRVQEEACILVEELRKTNASPCDPTFILGCAPCNVICS
hCYP2C8	181	VVFQKRFDYKDOQFLNLMKFNENFRILNSPWIQVCCNNFPFLIDCFPGTHNKVLKNVALT
hCYP2C9	181	IIFHKRFDYKDOQFLNLMKFNENFRILNSPWIQVCCNNFSPIDYFPGTHNKLLKNVAFM
hCYP2C18	181	VIFHDFRFDYKDOQFLNLMKFNENFRILNSPWIQVCCNNFPALIDYLPGSHNKLAENFAYI
hCYP2C19	181	IIFQKRFDYKDOQFLNLMKFNENFRILNSPWIQVCCNNFPIDYFPGTHNKLLKNLAFM
cCYP2C21	181	IIFQNRFDYDDKDFELTLEFPHENLILSSISWIQLYNAFPLLIHYLPGSHVLEKNLANQ
cCYP2C41	180	IIFQNRFDYTDQTLIGFLEKLNENFRILNSPWIQAYNSFPALHYLPGSHNTLEKNEAFI
hCYP2C8	241	RSYIREKVKHEQASLDVNNPRDFIDCFLIKMEQEKDNQKSEFNENLVGTVADLEFVAGTE
hCYP2C9	241	KSYILEKVKHEQESMDVNNPQDFIDCFLIKMEQEKHNQKSEFTIESLENTAVDLFGAGTE
hCYP2C18	241	KSYVLERVKHEQESLDVNSARDFIDCFLIKMEQEKHNQKSEFTVESLITATVTDLEFGAGTE
hCYP2C19	241	ESDILEKVKHEQESMDVNNPRDFIDCFLIKMEQEKONQKSEFTIENLVITAAADLFGAGTE
cCYP2C21	241	EKFISEKVKHEEESLNFNSNPRDFIDYFLIKMEQEKHNQKSEFTMDNLIITITWDFVAGTE
cCYP2C41	240	KSYILEKVKHEQESFDVNNPRDFIDYFLIKMEQEKHNQKSEFTIENLKTITATDLEFGAGTE
hCYP2C8	301	TTSTTLRYGLLLLLKHPEVTAKVQEEIDHVIGRHRSPCMQDRSHMPYTDVAVHEIQRYSD
hCYP2C9	301	TTSTTLRYGLLLLLKHPEVTAKVQEEIERVIGRNRSPCMQDRSHMPYTDVAVHEIQRYID
hCYP2C18	301	TTSTTLRYGLLLLLKHPEVTAKVQEEIECVIGRNRSPCMQDRSHMPYTDVAVHEIQRYID
hCYP2C19	301	TTSTTLRYGLLLLLKHPEVTAKVQEEIERVIGRNRSPCMQDRSHMPYTDVAVHEIQRYID
cCYP2C21	301	TTSTTLRYGLVLLKHPVITAKVQEEIHRVIGRHRSPCMQDRSCMPYTDVAVHEIQRYID
cCYP2C41	300	TTSTTLRYGLLLLLKHPEVTAKVQEEIDRVIGRHOSPHMQDRSRMPYTNVAVHEIQRYID
hCYP2C8	361	LVPTGVPHAVTCDIKFRNYLIPKGTITILSLTSVLHDDKEFPNPNIFDPGHFLDKNGNFK
hCYP2C9	361	LLPTSLPHAVTCDIKFRNYLIPKGTITILSLTSVLHDKKEFPNPEMFDPRHFLECGGNFK
hCYP2C18	361	LLPTNLPHAVTCDVKFRNYLIPKGTITILSLTSVLHDKKEFPNPEMFDPRGHFLDKSGNFK
hCYP2C19	361	LLPTSLPHAVTCDVKFRNYLIPKGTITILSLTSVLHDKKEFPNPEMFDPRHFLECGGNFK
cCYP2C21	361	LVPNNLPHSVTQDIKFRNYLIPKGTITILSLTSVLHDKKEFPNPNQFDPGHFLDENGSEFK
cCYP2C41	360	LVPNSLPHAVTCDVKFRNYIPKGTITILSLTSVLSDEKEFPNPEIFDPAHFLLDSEGNFK
hCYP2C8	421	KSDYFMPFSAGKRICAGEGLARMELFLFLTITLQNFNLKSLDDIKNINNTAVTKGIVSIP
hCYP2C9	421	KSKYFMPFSAGKRICVGEGLACMELFLFLTITLQNFNLKSLVDPKNDITTPVANGFASVP
hCYP2C18	421	KSDYFMPFSAGKRICMGEGLARMELFLFLTITLQNFNLKSLQVDPKIDITTPANAFGRVP
hCYP2C19	421	KSNYFMPFSAGKRICVGEGLARMELFLFLTITLQNFNLKSLVDPKIDITTPVANGFASVP
cCYP2C21	421	KSDYFMAFSAGKRVCVGEGLARMELFLFLTITLQNFNLKSLVDPKIDITTPANGLCATP
cCYP2C41	420	KSDYFMAFSAGKRICVGEGLARMELFLFLTITLQKFTLKLVDPKIDITTPASGFGHVP
hCYP2C8	481	PSYQICFIPV
hCYP2C9	481	PFYQLCFIPV
hCYP2C18	481	PLYQLCFIPV
hCYP2C19	481	PFYQLCFIPV
cCYP2C21	481	PSYKLCFIPV
cCYP2C41	480	PFYQLCFIPV

**Abb. 5.1: Aminosäure-Sequenzalignment der humanen (h) und der caninen (c) CYP2C-Subfamilie.**

Das Alignment wurde mit dem *ClustalW* Algorithmus berechnet und mit BOXSHADE 3.21 visualisiert. Schwarz hinterlegt zeigen sich Aminosäureidentitäten, grau schattiert die Aminosäureähnlichkeiten. Zur Optimierung des Alignment wurde eine Lücke (-) eingefügt.

### Humanes CYP2C18



### Canines CYP2C41



**Abb. 5.2: Schematische Darstellung der Genstruktur des humanen CYP2C18 und des caninen CYP2C41.**

Dargestellt ist die Exon- / Intron-Struktur des humanen CYP2C18 und des caninen CYP2C41. Die Exon-Intron-Grenzen von CYP2C41 ließen sich bis einschließlich Exon 7 komplett vom humanen Homolog übernehmen. Exon 7 und 8 stellten sich beim Hund als ein größeres Exon 7 dar. Entsprechend gibt es beim Hund kein Exon 9. Vermutlich sind Exon 7 und 8 hier zu einem gemeinsamen Exon verschmolzen, bzw. dieses Exon hat sich beim Menschen in zwei separate Exons aufgeteilt. Mit diesem Ergebnis kann sowohl die teilweise hohe Homologie als auch die spezifische Verschiedenheit der CYP-Gene zwischen Mensch und Hund dargestellt werden.

DISKUSSION

**Tab. 5.5: Aminosäureidentitäten (in %) der verschiedenen Vertreter der CYP2C-Subfamilien verschiedener Säugetier-Spezies.**  
Die prozentuale Sequenzidentität wurde mit Hilfe des *Clustal*/Algorithmus der MEGALIGN Software berechnet.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
1		84,9	84,9	84,8	79,9	73,9	83,4	83,4	80,4	85,1	82,8	81,3	82,4	82,8	79,3	78,9	80,4	80,4	82,1	63,3	77,9	79,2	1
2			87,6	94,8	82,7	75,7	83,9	85,5	82,9	87,8	84,8	82,6	85,3	85,3	82,3	82,3	82,6	82,3	83,0	63,3	80,0	79,4	2
3				87,5	83,3	75,4	86,4	88,8	83,1	97,1	85,9	83,9	87,8	88,0	82,9	82,9	84,2	83,8	85,3	62,7	80,5	81,9	3
4					81,9	75,8	83,7	85,5	82,0	87,8	84,7	82,5	85,5	85,2	81,1	81,3	81,9	81,7	83,1	63,9	80,2	79,0	4
5						74,1	83,2	86,5	87,7	83,6	82,0	80,6	84,6	85,5	89,2	89,3	90,7	90,6	83,4	61,4	77,0	77,1	5
6							76,2	75,5	75,0	75,6	76,4	74,5	75,6	76,3	74,1	74,3	74,1	74,5	74,7	62,3	70,8	72,0	6
7								88,4	83,9	86,4	86,2	85,9	88,9	87,8	83,4	82,8	83,7	83,8	87,6	64,2	77,8	80,4	7
8									85,4	89,1	86,4	84,9	89,7	92,1	85,4	84,6	86,4	86,0	86,8	86,8	79,4	80,7	8
9										83,6	83,0	80,6	85,4	85,3	87,2	86,7	87,9	88,0	83,0	62,9	76,9	77,7	9
10											86,4	83,9	88,3	88,5	83,4	83,2	84,5	84,2	85,9	63,2	81,0	82,7	10
11												83,2	86,2	85,8	82,3	81,6	83,0	82,8	83,8	63,1	78,7	78,5	11
12													84,7	84,5	80,9	80,2	81,7	81,5	83,6	62,9	78,7	78,4	12
13														88,5	84,3	83,9	85,3	85,1	87,4	63,1	79,2	79,2	13
14															84,3	84,3	85,7	85,7	86,9	62,7	79,2	80,9	14
15																90,0	91,6	91,6	83,1	61,4	76,3	76,8	15
16																	91,3	91,6	82,9	61,6	76,0	76,7	16
17																		96,3	83,6	61,4	76,8	77,9	17
18																			83,4	61,5	77,2	77,9	18
19																				62,9	77,5	79,8	19
20																					60,5	60,4	20
21																						75,5	21
22																							22

### 5.1.1 CYP1A2

CYP1A2 wies sechs verschiedene Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) auf, wobei nur einer dieser SNPs einen Aminosäureaustausch (ASA) bedingt, welcher von *SIFT* jedoch als funktionell irrelevant eingestuft wurde. Der bereits vor den Untersuchungen bekannte Polymorphismus 1117C>T blieb in dieser Studie unentdeckt und bleibt auch nach dem Abschluss dieser Arbeit der einzig bekannte funktionell relevante Polymorphismus im caninen CYP1A2.

### 5.1.2 CYP2B11

CYP2B11 zeigte sich mit zwei verschiedenen SNPs eher hochkonserviert. Der Polymorphismus 98G>A, welcher einen ASA von Glycin zu Asparaginsäure an Position 33 des Proteins bewirkt, wird von *SIFT* als nicht tolerierbar für die Enzymfunktion bewertet. Betrachtet man sich diese beiden Aminosäuren näher, so ist dies nicht verwunderlich, da es sich bei Glycin um eine neutrale Aminosäure handelt, bei Asparaginsäure um eine saure. Die Polarität des Moleküls wird somit verändert und die Funktion des Enzyms kann dadurch beeinträchtigt sein. Dieser SNP war heterozygoten Charakters; es ist somit möglich, dass er keine Auswirkungen auf den Phänotyp des Hundes hat, da das Gen für das intakte Enzym immer noch auf einem der beiden Allele vorliegt.

### 5.1.3 CYP2C21

Im CYP2C21-Gen war nur ein einzelner SNP bei einem Hund zu finden, welcher laut *SIFT* trotz ASA keine Bedeutung für die Enzymfunktion hat. CYP2C21 kann somit beim Hund als hochkonserviert angesehen werden. Der humanen CYP2C-Subfamilie kommt eine große Bedeutung im Fremdstoffmetabolismus zu (CYP2C9, CYP2C19, CYP2C8 sind zusammen am Metabolismus von 39 % aller Arzneistoffe beteiligt, Zanger et al. 2008). Es könnte ein Erklärungsansatz für das geringe Auftreten von SNPs im caninen CYP2C21 sein, dass diesem CYP beim Hund eine ebenfalls sehr

große Bedeutung im Metabolismus zukommt. Da CYP2C21 beim Hund das einzige Gen der 2C-Familie darstellt, welches bei jedem Hund gebildet wird, könnte ein Ausfall entsprechend negative Folgen haben. Fraglich bleibt jedoch, ob bei der Untersuchung eines größeren Kollektivs nicht noch weitere Polymorphismen aufgedeckt werden könnten.

#### **5.1.4 CYP2D15**

Das CYP2D15-Gen zeigte sich sehr polymorph. Nur die Sequenz eines Hundes wies die in der GenBank-Sequenzdatenbank hinterlegte CYP2D15-Sequenz auf. Alle anderen Hunde zeigten Abweichungen. Die meisten SNPs bewirken einen ASA, werden jedoch von *SIFT* als harmlos eingestuft. Da bei vielen untersuchten Hunden aber immer ein bestimmter Haplotyp zu finden war, kann davon ausgegangen werden, dass dieser eher als die erstmals von Sakamoto et al. 1995 beschriebene Sequenz (heute Referenzsequenz in GenBank) als Referenzsequenz verwendet werden sollte.

Sechs der 20 Hunde wiesen den SNP 799C>T auf, welcher durch seinen ASA laut *SIFT* zu einer vermutlich eingeschränkten Enzymfunktion führen kann. Das in der Referenzsequenz an Position 267 des Proteins stehende Prolin ist im Gegensatz zum ausgetauschten Serin unpolar. Dieser Unterschied in den Eigenschaften der Moleküle könnte die durch den SNP vermutlich auftretenden Probleme erklären, welche sich zum Beispiel im Anstieg der Plasmakonzentration von CYP2D15-Substraten äußern könnten. Unerwünschte und toxische Arzneimittelwirkungen könnten die Folge sein. Prozentual würde dieser Defekt in dem untersuchten Patientenkollektiv 30 % der Tiere betreffen. Es erscheint jedoch unwahrscheinlich, dass tatsächlich 30 % dieser Hunde ein nicht oder nur eingeschränkt funktionierendes CYP2D15-Enzym haben, wenn man bedenkt, dass das humane Homolog CYP2D6 eine große Bedeutung im Metabolismus von Fremdstoffen übernimmt (Zanger et al. 2008). In allen Fällen lag dieser SNP nur heterozygot vor.

Wie ebenfalls aus der Literatur bekannt, wurde bei den Hunden dieser Arbeit die in *frame deletion* des Exon 3 ( $\Delta$ Exon3) festgestellt (Roussel et al. 1998; Paulson et al. 1999). Bereits auf dem PCR-Gel zeigte sich die um 153 bp

kleinere Variante entweder als Doppelbande zusätzlich zum ca. 1 500 bp großen *full-length* Amplifikat, oder als einzelne Bande. Bei manchen Hunden war nur eine ca. 1 500 bp große Bande sichtbar. Diese Methode sollte herangezogen werden, um zu unterscheiden, welcher Hund homozygot, heterozygot oder gar nicht von diesem Polymorphismus betroffen war. Eine recht hohe Anzahl von Hunden, nämlich 7 von 20 Individuen (35 %) zeigte auf dem Agarosegel nur die Exon 3 deletierte Variante. Aus der Literatur ist bekannt, dass diese Variante in Metabolismusstudien zu einer schlechteren Metabolisierungsrate von Celecoxib (selektiver Cox-2-Hemmer) führt (Paulson et al. 1999). Ausgehend von diesen Informationen müsste man bei dem hier untersuchten Patientenkollektiv in 35 % der Fälle annehmen, dass ein eingeschränkter Metabolismus für Celecoxib und anderer CYP2D15-Substrate vorliegen müsste. Dies könnte sich in erhöhten Plasmaspiegeln von CYP2D15-Substraten und in dem vermehrten Auftreten von Nebenwirkungen äußern. Im Hinblick auf das Substrat Celecoxib wären hier in Besonderen die Gefahr einer Gastritis oder eines Magen Ulkus zu nennen, welche typischerweise bei der Überdosierung oder der chronischen Einnahme von Nichtsteroidalen Antiphlogistika vorkommen (Lascelles et al. 2005). Bemerkenswert bei dieser Exon-Deletionsvariante ist, dass die Exon 3-Deletion und der dadurch bedingte Verlust von 51 AS einen beträchtlichen Teil des Moleküls beeinflusst und eine Funktionsbeeinträchtigung daher gut nachvollziehbar ist (Abb. 5.3).

In vorliegender Arbeit aufgefallen ist auch, dass die Exon 3-Deletion zusätzlich zu anderen SNPs auf einem Allel auftreten kann. Das erklärt, warum für Hund #24 mehr als zwei verschiedene CYP2D15-Transkripte identifiziert werden konnten. Daher ist davon auszugehen, dass das Fehlen der 153 bp kein absolutes Ereignis ist, sondern eventuell durch alternatives Spleißen (*Exon skipping*) auftreten kann.

Das Spleißen eines mRNA-Transkripts ist ein sehr komplexer und hoch regulierter Prozess, in welchen hunderte von Proteinen involviert sind. Die erhebliche Mehrzahl der mRNAs für Säugetier-Proteine wird gespleißt. Bei den meisten Transkripten läuft das Spleißen nicht immer identisch ab und kann sich z.B. je nach Gewebetyp oder anderen regulativen Prozessen unterscheiden. Manche Exons können bei der Generierung von mRNA in

bestimmten Geweben oder Entwicklungsstadien somit ein- oder ausgeschlossen werden. Dieses alternative Spleißen erklärt, wie eine riesige Anzahl von Transkripten aus einer relativ kleinen Anzahl von Genen entstehen kann (Cartegni et al. 2002).



**Abb. 5.3: Homologiemodell des caninen CYP2D15 auf Basis der Proteinstruktur von CYP2D6 (Wang et al. 2012).**

In rot wird die bei der Exon 3 deletierten Form fehlende Struktur angezeigt. Es ist erkennbar, dass es sich hierbei um eine komplette Domäne handelt.

### 5.1.5 CYP3A12

Einer der fünf in dieser Arbeit gefundenen SNPs im CYP3A12-Gen erwies sich nach Testung durch *SIFT* als nicht tolerierbar für die Enzymfunktion. Bei acht Hunden war dieser SNP 439C>T nachweisbar, welcher 7 x heterozygot und 1 x homozygot vorkam. Er bewirkt den AS-Austausch P147S und es ist zu erwarten, dass er bei dem Individuum mit homozygotem Vorkommen auch eine Auswirkung auf den Phänotyp haben könnte, was z.B. zu erhöhten Plasma-Konzentrationen von CYP3A12-Substraten führen könnte. Um diesen Polymorphismus besser einzuordnen und um dessen klinische Relevanz beurteilen zu können, müsste die Funktion des polymorphen Enzyms mit der des Wildtypenzym in einem geeigneten Expressionssystem getestet werden.

### 5.1.6 CYP2C41

Es ist bemerkenswert, dass nicht jeder Hund Träger des CYP2C41-Gens ist und sich dieses Gen beim Hund als Gendeletions-Polymorphismus darstellt. Bereits vor Beginn dieser Arbeit war dieser Umstand aus der Literatur bekannt (Blaisdell et al. 1998). Bisher gab es jedoch keine Informationen über eine Rassedisposition dieses Gendeletions-Polymorphismus. In vorangegangenen Studien wurden nur homogene Beagle Populationen oder Mischlinge untersucht.

In vorliegender Arbeit waren jeweils alle Hunden der Rassen Husky und Shar Pei positiv in der "Exon 7-PCR". Um dieses Ergebnis näher zu beleuchten, wurden jeweils sechs weitere Hunde dieser beiden Rassen in die "Exon 7-PCR" eingesetzt und auch hier zeigten sich alle Tiere als Träger des CYP2C41-Gens.

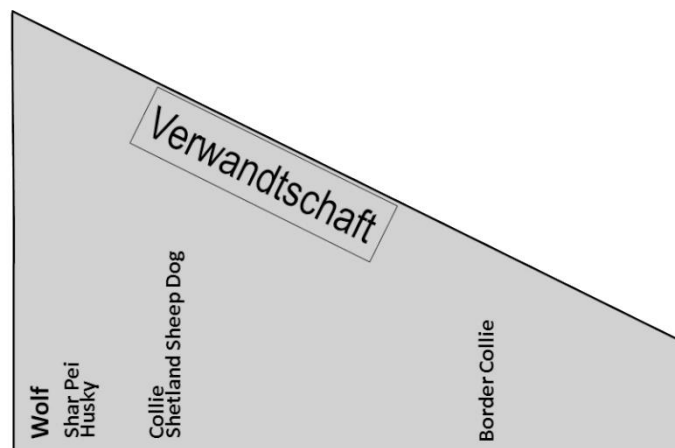
Es kann gemutmaßt werden, dass die Rassen Husky und Shar Pei generell Träger des CYP2C41-Gens sind. Evolutionsbiologisch betrachtet sind Huskys und Shar Peis auch trotz ihres verschiedenen Aussehens außerordentlich nahe verwandt. Eine Studie der Forscher des Fred Hutchinson Cancer Research Centers in Seattle unter der Leitung von Leonid Kruglyak an 441 Rassehunden 85 verschiedener Rassen zeigte, dass

auch sehr unterschiedlich erscheinende Hunderassen mitunter genetisch sehr nahe verwandt sein können. So zum Beispiel auch die Rassen Husky und Shar Pei (Parker et al. 2004). Dieser Umstand würde erklären, warum nur bei diesen beiden Rassen 100 % der untersuchten Tiere das CYP2C41-Gen aufwiesen.

In oben erwähneter Studie wird zudem klar, dass genetisch betrachtet, der Sibirische Husky und der Shar Pei wiederum sehr nahe verwandt mit dem wilden Wolf als ihren Vorfahren sind. Der Husky belegt auf dieser Rangliste Platz 7 von 85, der Shar Pei Platz 6, verglichen mit dem Wolf auf Platz 1 (Abb. 5.4).

Genetisch noch verwandter mit dem Wolf zeigen sich nur die Rassen Shiba Inu, Chow Chow, Akita, Alaskan Malamute und Basenji. Allerdings ist bisher über das Auftreten des CYP2C41-Gens bei diesen Rassen noch nichts bekannt. Auf Grundlage dieser Daten kann aber vermutet werden, dass der Urtyp eines jeden Hundes, der Wolf, das CYP2C41-Gen besaß. Die Zeitgeschichte betrachtend ist der Hund das am frühesten domestizierte Tier. Es wird angenommen, dass er bereits seit 135 000 Jahren mit dem Menschen zusammen lebt (Vilà et al. 1997; Larson et al. 2012). In diesen vielen tausend Jahren, in welchen es durch extensive Zucht und Selektion zur Etablierung der einzelnen Hunderassen kam, scheint dieses Gen dann bei den meisten Rassen verloren gegangen zu sein. Entsprechend scheint das CYP2C41-Gen für die Existenz eines Individuums entbehrlich zu sein, was allerdings eine wichtige Rolle im Fremdstoffmetabolismus nicht ausschließt. Eventuell können Funktionen des CYP2C41-Gens bei dessen Ausfall aber auch von dem nahe verwandten Gen CYP2C21 übernommen werden. Natürlich unterliegen die heutigen domestizierten und etablierten Rassen nicht mehr einer natürlichen Selektion, so dass vom Auftreten oder Fehlen des CYP2C41-Gens aktuell nicht mehr auf dessen Bedeutung geschlossen werden kann. Entsprechend könnte die Deletion des CYP2C41-Gens in der Zucht unabsichtlich fixiert worden sein (Ng & Henikoff 2006). Um diese These zu bestätigen, sollten in Zukunft Metabolismusstudien mit CYP2C21 und CYP2C41 durchgeführt werden und deren Substratspektrum verglichen werden. Außerdem wäre es interessant, den Wolf und ihm nahe Hunderassen auf das Vorhandensein von CYP2C41 zu untersuchen.

Bei den anderen untersuchten Hunderassen zeigten sich 6,85 % der Border Collies und 10,69 % der Collies positiv in der "Exon 7-PCR". Mehr als doppelt so viele Träger des Gens waren hingegen bei Shetland Sheepdogs zu finden. Dies erstaunt, wenn man sich auf obigen Erklärungsansatz über Verwandtschaftsverhältnisse von Husky, Shar Pei und Wolf bezieht, denn Collie und Shetland Sheepdog stehen im Stammbaum der Rassen sehr dicht beieinander (Abb. 5.4). Man würde also bei beiden Rassen einen höheren und vor allem vergleichbaren Anteil an positiven Hunden erwarten. Das Untersuchungsergebnis des Border Collie lässt sich eher mit der Abstammungsposition vergleichend mit dem Wolf erklären. Er befindet sich mit Platz 59 weit entfernt von Wolf, Collie und Shetland Sheepdog (Abb. 5.4). Abschließend ist zu sagen, dass zehn Einzelindividuen, hier jeweils Shar Peis und Huskies, natürlich nicht repräsentativ für eine ganze Rasse sind. Das Untersuchungsergebnis gibt aber auf jeden Fall einen Trend hinsichtlich der Rassedisposition an, auf dessen Basis weitere Testungen folgen können.



**Abb. 5.4:** Schematische Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse untersuchter Hunderassen.

Diese Grafik stellt dar, wie sich die einzelnen näher untersuchten Hunderassen genetisch ähneln und vor allem, wie genetisch nah oder fern sie ihrem Urahn, dem Wolf, sind.

## 5.2 Beurteilung der Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) mittels *SIFT*

Jeder SNP, welcher einen Aminosäureaustausch (ASA) im korrespondierenden Protein bedingt, also ein nicht synonymes SNP (*non-synonymous SNP*, nsSNP), kann potentiell die Funktion des Proteins und damit auch den Phänotyp des Wirtsorganismus beeinflussen. Nicht

synonyme SNPs stellen in der Humanmedizin 50 % aller Sequenzvariationen dar, welche verantwortlich für Erbkrankheiten gemacht werden können (Krawczak et al. 2000). Es wird geschätzt, dass es in der menschlichen Bevölkerung 67 000 – 200 000 nsSNP gibt (Cargill et al. 1999; Halushka et al. 1999; Livingston et al. 2004); jedes Individuum kann als heterozygot für bis zu 40 000 nsSNPs bezeichnet werden (Cargill et al. 1999). Für die funktionelle Bewertung dieser nsSNPs ist es natürlich wichtig, zwischen einem ASA zu unterscheiden, welcher einen Effekt auf die Proteinfunktion haben könnte und zwischen einem, welcher keinen Effekt hat. Um diesem Problem bereits auf Sequenzebene zu begegnen, haben Forscher in den letzten Jahren eine Art „Filtersystem“ entwickelt, welches mittels verschiedener Methoden und bioinformatischer Programme nsSNPs hinsichtlich ihres Einflusses auf die Proteinfunktion bewertet. Diese Bewertung kann Anhaltspunkte geben und SNPs für weiterführende experimentelle Untersuchungen ein- oder ausschließen.

### **5.2.1 Allgemeine Methodik**

Es gibt verschiedene Tools um die Auswirkungen eines ASA vorherzusagen. Diese bedienen sich unterschiedlicher Methoden (Tab. 5.6). Die Methoden, um nsSNPs zu bewerten, bedienen sich struktureller oder sequenzieller Information, um ihre ASA-Vorhersagen zu treffen. Dies ist möglich, da Mutationen, welche die Proteinfunktion beeinflussen, dazu tendieren, an evolutionär hochkonservierten Regionen eines Gens aufzutreten, oder aber sie verbergen sich in der Proteinstruktur (Ng & Henikoff 2006). Die Prämisse für diese Technik baut darauf auf, dass hochkonservierte Positionen dazu neigen, intolerant auf ASAs zu sein, wohingegen jene mit einem geringen Maß an Konservierung tolerant gegenüber den meisten Veränderungen sind (Kumar et al. 2009). Alle Methoden werden meist an zwei Typen von Datensets getestet: zum einen an Sequenzen, von denen bekannt ist, dass ihr SNP eine Auswirkung auf die Proteinfunktion hat und zum anderen an Sequenzen mit Variationen ohne Effekt. Die Programme sollten beide Variationen unterscheiden und falsch negative und positive Fehlerraten minimieren (Ng & Henikoff 2006).

Für die vorliegende Arbeit wurde das Programm *SIFT* gewählt, um ASA in den caninen Cytochrom-P450-Enzymen hinsichtlich ihrer potentiellen Auswirkung auf die Proteinfunktion einzuordnen.

**Tab. 5.6: Darstellung einiger Methoden zur Bewertung von nsSNPs, welche als *online-tools* verfügbar sind.**  
Nach Kumar et al 2009

<b>Methode</b>	<b>Faktoren des Algorithmus</b>
SIFT ( <a href="http://sift.jcvi.org/">http://sift.jcvi.org/</a> )	Sequenzhomologie
Polyphen ( <a href="http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/">http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/</a> )	Sequenzkonservierung
PMUT ( <a href="http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/">http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/</a> )	Sekundärstruktur und Sequenzkonservierung
SNPs3D ( <a href="http://www.snps3d.org/">http://www.snps3d.org/</a> )	Proteinstruktur und Sequenzkonservierung
PantherPSEC ( <a href="http://www.pantherdb.org/tools/csnpScoreForm.jsp">http://www.pantherdb.org/tools/csnpScoreForm.jsp</a> )	Sequenzhomologie
MAPP ( <a href="http://mendel.stanford.edu/sidowlab/downloads/MAPP/">http://mendel.stanford.edu/sidowlab/downloads/MAPP/</a> )	Physikalisch-chemische Eigenschaften
Align-GVGD ( <a href="http://agvgd.iarc.fr/agvgd_input.php">http://agvgd.iarc.fr/agvgd_input.php</a> )	Biophysikalische Eigenschaften und Sequenzkonservierung

## 5.2.2 Wie funktioniert *SIFT*?

*SIFT* steht für „*Sorting Intolerant From Tolerant*“, sprich die Unterscheidung von tolerierbaren nsSNPs von nicht tolerierbaren. Die Entwickler definierten eine Variation als tolerierbar, wenn deren ASA im Protein keine detektierbare Auswirkungen auf dessen Phänotyp hatte. Diese Definition schließt jedoch Mutationen aus, welche Transkription, Translation, Spleißen oder andere prätranslationale Veränderungen beeinflussen. *SIFT* bezieht sich somit nur auf ASA im Protein und involviert nicht die oben genannten Faktoren (Ng & Henikoff 2002). Obwohl *SIFT* hauptsächlich für die Anwendung humaner Polymorphismen entwickelt wurde, kann man es für jeglichen anderen Organismus anwenden, da die Basis des Programmes das Prinzip der Proteinevolution ist.

Der Algorithmus von *SIFT* bedient sich folgender Methodik (Kumar et al. 2009):

1. Eingabe der Ausgangssequenz durch Benutzer
2. Aufsuchen von funktionell verwandten Proteinen der Ausgangsproteinsequenz mittels „*PSI-BLAST algorithm*“, einem „*Protein database Such-Programm*“ (Altschul et al. 1997)
3. Alignment der homologen Sequenzen mit der Ausgangssequenz
4. Scannen jeder Position des Alignments und Kalkulation der Wahrscheinlichkeit aller 20 Aminosäuren an dieser Position. Diese Wahrscheinlichkeiten werden normiert durch die Wahrscheinlichkeit der am häufigsten auftretenden Aminosäure an dieser Position und aufgezeichnet mittels einer aufsteigenden „Wahrscheinlichkeits-Matrix“.
5. Unterscheidung zwischen hochkonservierten und nicht-konservierten Aminosäuren
6. Vorhersage, ob der ASA die Proteinfunktion beeinflusst, wenn die aufsteigende Wahrscheinlichkeit, auch *SIFT-score* genannt, unterhalb eines bestimmten Schwellenwertes liegt.

Diese Methodik basiert auf der Annahme, dass für die Funktion wichtige Aminosäuren in der Proteinfamilie konserviert werden und somit werden ASA an hochkonservierten Positionen als schädlich eingestuft. Sollte zum Beispiel beim Alignment einer Proteinfamilie an einer Position immer die Aminosäure Isoleucin auftreten, so ist anzunehmen, dass der Austausch gegen eine andere Aminosäure funktionelle Folgen mit sich ziehen würde. Würde eine Position hingegen verschiedene Aminosäuren, wie Isoleucin, Valin oder Leucin (alle hydrophob) aufweisen, so zieht *SIFT* als Schluss, dass an dieser Position das Protein eine Aminosäure mit hydrophobem Charakter benötigt, um seine Funktion wahrzunehmen. *SIFT* würde in diesem Falle Austausch mit anderen hydrophoben Aminosäuren als tolerierbar bewerten, solche mit polaren jedoch als nicht tolerierbar (Ng & Henikoff 2003).

### **5.2.3 Aussagekraft von *SIFT* und funktionelle Relevanz**

Wie bereits oben erwähnt, soll *SIFT* verwendet werden, um einen Anhaltspunkt für folgende experimentelle Versuche zu geben. Es bestätigt nicht die funktionelle Relevanz eines Polymorphismus, sondern liefert eine bioinformatische Bewertung über mögliche Auswirkungen auf den Phänotyp eines nsSNPs und kann so helfen vorzuselektieren, für welche Ergebnisse es sinnvoll wäre, sie weiteren funktionellen Testungen zu unterziehen.

Gerade bei Experimenten mit einem großen Ausmaß an Ergebnissen kann das Programm die Masse an unnötigen Experimenten verringern. Nicht zu verleugnen sind die falsch negativen und falsch positiven Ergebnisse, die bis heute leider bei allen *online-tools* noch recht hoch sind. Im Durchschnitt identifiziert *SIFT* 31 % der nsSNPs als falsch negativ und 20 % als falsch positiv (Ng & Henikoff 2006).

### 5.3 Expressionsunterschiede in den Cytochrom-P450-Enzymen des Hundes

Die Expression der caninen Cytochrom-P450-Enzyme unterliegt starken Variationen. Sie ist abhängig von vielen Faktoren und sehr inkonstant. Beeinflusst wird sie z.B. durch Arzneistoffe, Erkrankungen, Hormone oder Futtermittel. Zudem ist bereits aus der Literatur bekannt, dass es rassebedingte Unterschiede im Gehalt von Cytochrom-P450-Enzymen (CYP2B11) in der Leber von z.B. Greyhound und Beagle gibt (Zoran et al. 1993; Court et al. 1999; Hay Kraus et al. 2000). Diese Unterschiede lassen sich mit einem veränderten Metabolismus von Propofol in Verbindung bringen und zeigen somit auch klinische Relevanz.

Alle der hier untersuchten Hunde waren medikamentös in irgendeiner Weise vorbehandelt, mindestens mit einer Injektionsnarkose, welche zur Entnahme der Biopsien von Nöten war. Es handelte sich um Tiere verschiedener Rassen, unterschiedlichen Geschlechts und Alters, stammend von unterschiedlichen Besitzern und aus ungleichen Haltungsbedingungen. Diese Untersuchung stellt somit die relative Expression der CYPs auf mRNA-Ebene in caninen Patienten dar und nicht die einer einheitlichen, nicht mit Arzneistoffen vorbehandelten Testgruppe an Hunden. Es soll lediglich ein Eindruck über die Variabilität der mRNA-Expression im Patientengut einer Universitätsklinik gegeben werden. Es wird die Variabilität eines tatsächlichen Patienten und die interindividuelle Varianz von Patient zu Patient dargestellt, wie sie in der tierärztlichen Praxis oder Klinik vorgestellt werden. Innerhalb der fünf untersuchten Cytochrome und der neun beprobten Hunde lässt sich eine große Streuung in der Expression erkennen. Dies könnte einen ersten Eindruck und ein Verständnis dafür geben, warum es bei unterschiedlichen Tieren zu verschiedenen klinischen Effekten bei der Arzneitherapie kommt.

Einen weiteren *Bias* stellt in diesem Versuch natürlich die Tatsache dar, dass die Tiere, welchen Lebergewebe entnommen wurde, meist „leberkrank“ waren, das heisst., die z.B. das Bild einer Fettleber, Leberfibrose oder Leberzirrhose aufwiesen. Das bedeutet, dass auch der Einsatz dieses pathologisch veränderten Probenmaterials, die Resultate des Versuchs

beeinflusst haben könnte. Diese teils schwerkranken Tiere stellen wiederum nicht genau den Querschnitt einer normalen tierärztlichen Praxis dar, sondern eher das Patientengut einer größeren Klinik, in welche schwere Fälle zur diagnostischen Abklärung überwiesen werden. Es wäre jedoch ethisch nicht vertretbar, in einer Praxis jedem Hund eine Biopsie zu entnehmen, obwohl dies aus medizinischen Gründen nicht nötig wäre, nur um eine größere repräsentativere Test-Gruppe zu erhalten.

Um tatsächlich die Norm oder die „Basis-Expression“ von Cytochrom-P450-Enzymen und deren Variationen z.B. durch Medikamentengabe im *in vivo* Versuch zu bestimmen, müssten fast unrealistische Bedingungen erfüllt werden:

- Tiere mit gleichem/ähnlichen Gen-Status
- Gleiches Geschlecht
- Identische Haltung und Futter
- Keine Vorbehandlung
- Gleicher Gesundheits- und Hormonstatus (bei weiblichen Tieren Zyklus Schwankungen beachten)
- Gleiches Alter

Um Induktion und Hemmung der Expression einzelner CYPs durch unterschiedliche exogene und endogene Faktoren zu bestimmen, wäre hier die Wahl einer *in vitro* Methode sinnvoller.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit stellt einen aktuellen, zusammenfassenden Überblick über die Polymorphismen in den Cytochrom-P450-Enzymen des Hundes dar. Es wurde dabei nicht, wie bei vorangegangenen Studien, eine einheitliche Beagle-Population untersucht. Vielmehr stellte die Testgruppe je nach spezifischer Fragestellung ein Patientengut von mindestens 20 verschiedenen Hunden unterschiedlicher Rassen dar, welche als Patienten in der *Klinik für Kleintiere* der JLU Gießen vorgestellt wurden.

Das genetische Material dieser Hunde wurde aus Lebergewebe gewonnen und mittels verschiedener molekularbiologischer Methoden (PCR, *real-time* PCR und Sequenzierung) auf Variationen in den Sequenzen und im Expressionsniveau der Cytochrom-P450-Enzyme 1A2, 2B11, 2C21, 2C41, 2D15 und 3A12 untersucht.

Einige dabei gefundene Polymorphismen wurden bereits in der Literatur erwähnt, z.B. der Gendeletions-Polymorphismus im CYP2C41-Gen (Blaisdell et al. 1998). Es konnte festgestellt werden, dass aus einer Gruppe von 441 Hunden verschiedener Rassen nur bei 14,74 % das CYP2C41-Gen nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren wurden erstmals die Exon-Intron-Grenzen des CYP2C41-Gen des Hundes bestimmt, seine komplette genomische Sequenz ermittelt und diese in der GenBank-Sequenzdatenbank hinterlegt. Auffällig war die Tatsache, dass alle auf das Vorhandensein des CYP2C41-Gens getesteten Hunde der beiden Rassen Husky und Shar Pei das Gen tatsächlich aufwiesen, was sich durch den Umstand erklären könnte, dass beide Rassen genetisch gesehen recht urtümlich sind und eine nahe Verwandtschaft zum Wolf aufweisen. Das CYP2C41-Gen scheint dann im Laufe der Zeit in den meisten Rassen mehr oder weniger aus dem Genom verschwunden zu sein. Zur Evaluation der eventuellen klinischen Relevanz und um eine evolutionsbiologische Erklärung des Gendeletions-Polymorphismus zu erlangen, wären anschließende funktionelle Tests sinnvoll. In allen anderen fünf untersuchten CYPs konnten teils einzelne (CYP2C21), teils eine große Zahl (CYP2D15) an Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) entdeckt werden. Die meisten dieser SNPs stellten sich als stille Mutationen dar, bei denen mit keiner negativen Beeinflussung

der CYP-Enzymfunktion zu rechnen ist. Einzelne SNPs wurden bioinformatisch mittels *SIFT*, einem Programm, das unterscheidet, ob ein Aminosäureaustausch (ASA) im korrespondierenden Protein für dessen Funktion tolerierbar ist oder nicht, als „nicht-tolerierbar“ bewertet. Da diese Bewertung aber nur einen vagen Anhaltspunkt für die mögliche funktionelle Relevanz gibt, müssen auch hier weitere funktionelle Untersuchungen folgen. Diese sollen klären, ob diese SNPs tatsächlich eine Auswirkung auf die Funktion dieser CYPs im Arzneistoffmetabolismus haben. Zusätzlich zu den diversen SNPs welche im CYP2D15-Gen zu finden waren, konnte in vorliegender Arbeit auch die bereits 1998 von Roussel et al. beschriebene *in frame* Deletion von Exon 3 ( $\Delta$ Exon3) dargestellt werden. In einer *full-length*-PCR des CYP2D15 wiesen sich 35 % der getesteten Hunde als Träger des Exons 3 Polymorphismus aus. Ebenso viele Hunde waren nicht vom Polymorphismus betroffen, wohingegen 30 % der Hunde heterozygote Träger dieses Merkmales waren. Eine klinische Relevanz ist hier anzunehmen, da bereits ein Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und einer verminderten Metabolisierungsrate von Celecoxib beschrieben wurde (Paulson et al. 1999). Jedoch ist es wahrscheinlich, dass das Fehlen von Exon 3 kein absolutes Ereignis ist, sondern dass es sich um einen *Exon skipping* Polymorphismus handelt. Auch die Expression auf mRNA-Ebene wies zwischen den unterschiedlichen Cytochromen, zwischen einzelnen Tieren und auch individuell eine große Varianz auf. So variierte z.B. das Ergebnis der *real-time* PCR von CYP1A2 um bis zu 12 C<sub>t</sub>-Werte. Diese große Spannbreite könnte auf eine unterschiedliche Geninduktion der CYPs in der Leber in dem sehr heterogenen Patientengut zurückzuführen sein. Diese Resultate machen deutlich, dass veterinärmedizinische Patienten oder präklinische Versuchstiere genetisch nicht identisch sind. Aufgrund ihrer individuell sehr unterschiedlichen Ausstattung von zum Teil sehr polymorphen CYPs in der Leber, sollten sie eigentlich individuell behandelt werden. Dies ist jedoch bisher nicht etabliert. Mit den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit ist auf diesem Hintergrund ein weiterer Schritt gelungen, um das individuelle Ansprechen und die individuell sehr unterschiedliche Verträglichkeit einer Arzneitherapie auf molekularer Ebene besser erklären zu können.

## 7 SUMMARY

The thesis presents current, summarized findings about polymorphisms of cytochrome-P450-enzymes in dogs. In comparison to previous studies, it was not tested among a homogeneous collective of Beagle dogs. Instead, the test-group was a cohort of at least 20 different dogs, of different breeds, which all were patients of the JLU Gießen, "Klinik für Kleintiere".

The genetic material was extracted out from liver tissue samples and scanned by different methods of molecular biology (e.g. PCR, *real-time* PCR and sequencing) for variations in sequence and level of expression in the cytochrome-P450-enzymes 1A2, 2B11, 2C21, 2C41, 2D15, and 3A12.

Some detected polymorphisms have already been mentioned in former literature, as the gene deletion polymorphism in the CYP2C41 gene (Blaisdell et al. 1998). Results show, that in a group of 441 individual dogs of different breeds, only 14,75 % possessed the CYP2C41 gene.

Furthermore, for the first time the exon-intron-boundaries and the genome sequence of this CYP2C41 gene of the dog were identified and the complete sequence was entered in gene bank. Noticeable was the fact, that all dogs, belonging to the breeds Husky and Shar Pei, tested for the existence of the CYP2C41 gene, possessed this gene. An explanation might be, that both breeds are ethnic and phylogenetically old, with a still near relationship to the ancestor wolf. It seems that in course of time the CYP2C41 gene has disappeared of the canine genome in most of dog breeds. Further functional tests are necessary to evaluate possible clinical relevance and to get an evolutionary and biologically explanation for the gene deletion polymorphism. In all other examined CYPs, sporadic (CYP2C21), or large numbers (CYP2D15) of single nucleotide polymorphisms (SNPs) were found. Most of these SNPs represent a silent mutation, without an expected negative impact on the CYP enzyme function. Several SNPs were rated by *SIFT*, a program sorting by bioinformatics, if an amino acid change in the correlated protein is relevant for enzyme function or not, as not-tolerable. Because of the reason, that this rating is only an uncertain lead, there is a need for further functional testings. They should clear, if these SNPs really have an effect on the CYP metabolism of drugs. In addition to the diverse different SNPs in the

CYP2C15 gene, there was also found (already described by Roussel et al. 1998) the *in frame deletion* of exon 3 ( $\Delta$ exon3). In a full-length-PCR of CYP2D15, 35 % of the tested dogs were identified as an owner of the exon 3 polymorphism. An identical percentage rate of dogs was not affected by this polymorphism and 30 % of them were heterozygous owner of this attribute. A clinical relevance is suspected, because of a correlation between the polymorphism and a reduced metabolism rate of Celecoxib (Paulson et al. 1999). However it is probable, that the missing of exon 3 is not an absolute event, but an *exon skipping* polymorphism. The mRNA expression also showed a huge variation between the different cytochromes and canines: E.g. the result of the *real-time* PCR of CYP1A2 varied up to around 12 C<sub>t</sub> -values. This high range could indicate to a different gene induction of CYPs in liver of the very heterogeneous patient population.

All these results clearly show, that both, veterinary patient or preclinical laboratory animal, are genetically not identical. Because of their unequal endowment of partly very polymorphic CYPs in the liver, they rather should be medicated individually. Until now, this is not established yet. Based on the results of the presented thesis, an additional step on that background is succeeded to better interpret the individual response and the different tolerance of drug therapie on the molecular level.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:389–402.
- Aretz JS, Geyer J (2010) Detection of the CYP1A2 1117C > T polymorphism in 14 dog breeds. *J Vet Pharmacol Ther* 34:98–100.
- Baratta MT, Zaya MJ, White JA, Locuson CW, Locuson CW, Health PA (2009) Canine CYP2B11 metabolizes and is inhibited by anesthetic agents often co-administered in dogs. *J Vet Pharmacol Ther* 50–55.
- Blaisdell J, Goldstein JA, Bai SA (1998) Isolation of a new canine cytochrome P450 cDNA from the cytochrome P450 2C subfamily (CYP2C41) and evidence for polymorphic differences in its expression. *Drug Metab Dispos* 26:278–283.
- Božina N, Bradamante V, Lovrić M (2009) Genetic polymorphism of metabolic enzymes P450 (CYP) as a susceptibility factor for drug response, toxicity, and cancer risk. *Arch Ind Hyg Toxicol* 60:217–242.
- Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, Shaw N, Lane CR, Lim EP, Kalyanaraman N, Nemesh J, Ziaugra L, Friedland L, Rolfe A, Warrington J, Lipshutz R, Daley GQ, Lander ES (1999) Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet* 22:231–238.
- Cartegni L, Chew SL, Krainer AR (2002) Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 3:285–298.
- Ciaccio P, Graves P, Bourque D, Glinsmann-Gibson B, Halpert J (1991) cDNA and deduced amino acid sequences of a dog liver cytochrome P-450 of the IIIA gene subfamily. *Biochim Biophys Acta* 1088:319–322.
- Collica S (2012) Der Polymorphismus 1117C>T im Cytochrom P450 CYP1A2 beeinträchtigt die Metabolisierung von Theobromin beim Beagle Hund. VB Laufersweiler Verlag. ISBN: 978–3–8359–5916–3.
- Court MH, Hay-Kraus BL, Hill DW, Kind AJ, Greenblatt DJ (1999) Propofol hydroxylation by dog liver microsomes: assay development and dog breed differences. *Drug Metab Dispos* 27:1293–1299.
- Crespi CL, Miller VP, Penman BW (1997) Microtiter plate assays for inhibition of human, drug-metabolizing cytochromes P450. *Anal Biochem* 248:188–190.

- Cribb AE, Spielberg SP (1990) An in vitro investigation of predisposition to sulphonamide idiosyncratic toxicity in dogs. *Vet Res Commun* 14:241–252.
- Eguchi K, Nishibe Y, Baba T, Ohno K (1996) Quantitation of cytochrome P450 enzymes (CYP1A1/2, 2B11, 2C21 and 3A12) in dog liver microsomes by enzyme-linked immunosorbent assay. *Xenobiotica* 26:755–763.
- Eichelbaum M, Burk O (2001) CYP3A genetics in drug metabolism. *Nat Med* 7:285–287.
- Estabrook RW (2003) A passion for P450s (rememberances of the early history of research on cytochrome P450). *Drug Metab Dispos* 31:1461–1473.
- Estabrook RW, Cooper DY, Rosenthal O (1963) The lighth reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C21-hydroxylase system of the adrenal cortex. *Biochem Z* 338:741–755.
- Fitch WM (2000) Homology a personal view on some of the problems. *Trends Genet* 16:227–231.
- Fleischer S, Sharkey M, Mealey K, Ostrander E a, Martinez M (2008) Pharmacogenetic and metabolic differences between dog breeds: their impact on canine medicine and the use of the dog as a preclinical animal model. *AAPS J* 10:110–119.
- Fraser DJ, Feyereisen R, Harlow GR, Halpert JR (1997) Isolation, heterologous expression and functional characterization of a novel cytochrome P450 3A enzyme from a canine liver cDNA library. *J Pharmacol Exp Ther* 283:1425–11432.
- Geyer J, Döring B, Godoy JR, Leidolf R, Moritz A, Petzinger E (2005) Frequency of the nt230 (del4) MDR1 mutation in Collies and related dog breeds in Germany. *J Vet Pharmacol Ther* 28:545–551.
- Gibson UE, Heid C a, Williams PM (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 6:995–1001.
- Glinsukon T, Benjamin T, Grantham PH, Weisburger EK, Roller PP (1975) Enzymic N-acetylation of 2,4-toluenediamine by liver cytosols from various species. *Xenobiotica* 5:475–483.
- Graham MJ, Bell a R, Crewe HK, Moorcraft CL, Walker L, Whittaker EF, Lennard MS (2003) mRNA and protein expression of dog liver cytochromes P450 in relation to the metabolism of human CYP2C substrates. *Xenobiotica* 33:225–237.

- Graham RA, Tyler LO, Krol WL, Silver IS, Webster LO, Clark P, Chen L, Banks T, Lecluyse EL (2006) Temporal kinetics and concentration – response relationships for induction of CYP1A , CYP2B , and CYP3A in primary cultures of beagle dog hepatocytes. *J Biochem Mol Toxicol* 20:69–78.
- Gramer I, Leidolf R, Döring B, Klintzsch S, Krämer E-M, Yalcin E, Petzinger E, Geyer J (2011) Breed distribution of the nt230(del4) MDR1 mutation in dogs. *Vet J* 189:67–71.
- Graves PE, Elhag G a, Ciaccio PJ, Bourque DP, Halpert JR (1990) cDNA and deduced amino acid sequences of a dog hepatic cytochrome P450IIB responsible for the metabolism of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl. *Arch Biochem Biophys* 281:106–115.
- Gunes A, Dahl M-L (2008) Variation in CYP1A2 activity and its clinical implications: influence of environmental factors and genetic polymorphisms. *Pharmacogenomics* 9:625–637.
- Halushka MK, Fan JB, Bentley K, Hsie L, Shen N, Weder A, Cooper R, Lipshutz R, Chakravarti A (1999) Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. *Nat Genet* 22:239–247.
- Hay Kraus BL, Greenblatt DJ, Venkatakrisnan K, Court MH (2000) Evidence for propofol hydroxylation by cytochrome P4502B11 in canine liver microsomes: breed and gender differences. *Xenobiotica* 30:575–588.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6:986–994.
- Josephy PD, Guengerich FP, Miners JO (2005) “Phase I and Phase II” drug metabolism: terminology that we should phase out? *Drug Metab Rev* 37:575–580.
- Kamimura H (2006) Genetic polymorphism of cytochrome P450s in beagles: possible influence of CYP1A2 deficiency on toxicological evaluations. *Arch Toxicol* 80:732–738.
- Kerb R (2006) Implications of genetic polymorphisms in drug transporters for pharmacotherapy. *Cancer Lett* 234:4–33.
- Klingenberg M (1958) Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 75:376–386.
- Komura H, Iwaki M (2008) Species differences in in vitro and in vivo small intestinal metabolism of CYP3A substrates. *J Pharm Sci* 97:3–4.
- Krawczak M, Ball E V, Fenton I, Stenson PD, Abeyasinghe S, Thomas N, Cooper DN (2000) Human gene mutation database-a biomedical information and research resource. *Hum Mutat* 15:45–51.

- Kumar P, Henikoff S, Ng PC (2009) Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc* 4:1073–1081.
- Lankford SM, Bai SA, Goldstein JA, Park T, G NCJA (2000) Cloning of canine cytochrome P450 2E1 cDNA: identification and characterization of two variant alleles. *Drug Metab Dispos* 28:981–986.
- Larson G, Karlsson EK, Perri A, Webster MT, Ho SYW, Peters J, Stahl PW, Piper PJ, Lingaas F, Fredholm M, Comstock KE, Modiano JF, Schelling C, Agoulnik AI, Leegwater PA, Dobney K, Vigne J-D, Vilà C, Andersson L, et al. (2012) Rethinking dog domestication by integrating genetics, archeology, and biogeography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:8878–8883.
- Lascelles BDX, Blikslager AT, Fox SM, Reece D (2005) Gastrointestinal tract perforation in dogs treated with a selective cyclooxygenase-2 inhibitor: 29 cases (2002-2003). *J Am Vet Med Assoc* 227:1112–1117.
- Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS, Karlsson EK, Jaffe DB, Kamal M, Clamp M, Chang JL, Kulbokas EJ, Zody MC, Mauceli E, Xie X, Breen M, Wayne RK, Ostrander E a, Ponting CP, Galibert F, Smith DR, DeJong PJ, et al. (2005) Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 438:803–819.
- Livingston RJ, von Niederhausern A, Jegga AG, Crawford DC, Carlson CS, Rieder MJ, Gowrisankar S, Aronow BJ, Weiss RB, Nickerson DA (2004) Pattern of sequence variation across 213 environmental response genes. *Genome Res* 14:1821–1831.
- Locuson CW, Alfaro JF, Zaya MJ, Billen D, White JA, Jones JP (2011) A non-acidic sulfaphenazole analog demonstrating high intrinsic clearance and selectivity by canine CYP2C21. *Drug Metab Lett* 5:253–258.
- Lynch T, Price A (2007) The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *Am Fam Physician* 76:391–396.
- Ma Q, Lu AY (2011) Pharmacogenetics, pharmacogenomics, and individualized medicine. *Pharmacol Rev* 63:437–459.
- Marshall EK (1954) Acetylation of sulfonamides in the dog. *J Biol Chem* 499–503.
- Martinez MN, Antonovic L, Court M, Dacasto M, Fink-Gremmels J, Kukanich B, Locuson C, Mealey K, Myers MJ, Trepanier L (2013) Challenges in exploring the cytochrome P450 system as a source of variation in canine drug pharmacokinetics. *Drug Metab Rev* 45:218–230.

- Mealey KL, Bentjen SA, Gay JM, Cantor GH (2001) Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics* 11:727–733.
- Mealey KL, Jabbes M, Spencer E, Akey JM (2008) Differential expression of CYP3A12 and CYP3A26 mRNAs in canine liver and intestine. *Xenobiotica* 38:1305–1312.
- Mise M, Hashizume T, Komuro S (2008) Characterization of substrate specificity of dog CYP1A2 using CYP1A2-deficient and wild-type dog liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 36:1903–1908.
- Mise M, Hashizume T, Matsumoto S, Terauchi Y, Fujii T (2004a) Identification of non-functional allelic variant of CYP1A2 in dogs. *Pharmacogenetics* 14:769–773.
- Mise M, Hashizume T, Matsumoto S, Terauchi Y, Fujii T (2004b) Polymorphic expression of CYP1A2 leading to interindividual variability in metabolism of a novel benzodiazepine receptor partial inverse agonist in dogs. *Drug Metab Dispos* 6088:240–245.
- Mosher CM, Court MH (2010) Comparative and veterinary pharmacogenomics. *Handb Exp Pharmacol* 49–77.
- Nelson DR (2009) The cytochrome p450 homepage. *Hum Genomics* 4:59–65.
- Ng PC, Henikoff S (2006) Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7:61–80.
- Ng PC, Henikoff S (2002) Accounting for human polymorphisms predicted to affect protein function. *Genome Res* 436–446.
- Ng PC, Henikoff S (2003) SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res* 31:3812–3814.
- Omura T, Sato R (1962) Preliminary communications : A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem* 237:PC1375–PC1376.
- Parker HG, Kim L V, Sutter NB, Carlson S, Lorentzen TD, Malek TB, Johnson GS, DeFrance HB, Ostrander E a, Kruglyak L (2004) Genetic structure of the purebred domestic dog. *Science* 304:1160–1164.
- Parkinson A, Mudra DR, Johnson C, Dwyer A, Carroll KM (2004) The effects of gender, age, ethnicity, and liver cirrhosis on cytochrome P450 enzyme activity in human liver microsomes and inducibility in cultured human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 199:193–209.

- Paulson SK, Engel L, Reitz B, Bolten S, Burton EG, Maziasz TJ, Yan BO, Schoenhard GL (1999) Evidence for polymorphism in the canine metabolism of the cyclooxygenase 2 inhibitor, celecoxib. *Drug Metab Dispos* 27:1133–1142.
- Petzinger E, Geyer J (2006) Drug transporters in pharmacokinetics. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 372:465–475.
- Poirier LA, Miller JA, Miller EC (1963) The N - and ring-hydroxylation of 2-acetylaminofluorene and the failure to detect N -acetylation of 2-aminofluorene in the dog. *Cancer Res* 23:790–800.
- Raimundo S, Fischer J, Eichelbaum M, Griese EU, Schwab M, Zanger UM (2000) Elucidation of the genetic basis of the common “intermediate metabolizer” phenotype for drug oxidation by CYP2D6. *Pharmacogenetics* 10:577–581.
- Roses AD (2000) Pharmacogenetics and the practice of medicine. *Nature* 405:857–865.
- Roussel F, Duignan DB, Lawton MP, Obach RS, Strick CA, Tweedie DJ (1998) Expression and characterization of canine cytochrome p 450 2D15. *Arch Biochem Biophys* 357:27–36.
- Saarikoski ST, Sata F, Husgafvel-Pursiainen K, Rautalahti M, Haukka J, Impivaara O, Järvisalo J, Vainio H, Hirvonen A (2000) CYP2D6 ultrarapid metabolizer genotype as a potential modifier of smoking behaviour. *Pharmacogenetics* 10:5–10.
- Sakamoto K, Kirita S, Baba T, Nakamura Y, Yamazoe Y, Kato R, Takanaka A, Matsubara T (1995) A new cytochrome p450 form belonging to the cYP2D in dog liver microsomes: purification, cDNA cloning, and enzyme characterization. *Arch Biochem Biophys* 1;319(2):372–82.
- Scherr MC, Lourenc GJ, Albuquerque DM, Lima CSP, Lima CSP, Service CO (2010) Polymorphism of cytochrome P450 A2 ( CYP1A2 ) in pure and mixed breed dogs. *J Vet Pharmacol Ther* 2:184–186.
- Shou M, Norcross R, Sandig G, Lu P, Li Y, Lin Y, Mei Q, Rodrigues AD RT (2003) Substrate specificity and kinetic properties of seven heterologously expressed dog cytochromes p450. *Drug Metab Dispos* 31:1161–1169.
- Sim SC, Ingelman-Sundberg M (2013) Update on allele nomenclature for human cytochromes P450 and the Human Cytochrome P450 Allele (CYP-allele) Nomenclature Database. *Methods Mol Biol* 987:251–259.
- Tenmizu D, Endo Y, Noguchi K, Kamimura H (2004) Identification of the novel canine CYP1A2 1117 C > T SNP causing protein deletion. *Xenobiotica* 34:835–846.

- Tenmizu D, Noguchi K, Kamimura H, Ohtani H, Sawada Y (2006) The canine CYP1A2 deficiency polymorphism dramatically affects the pharmacokinetics of 4-cyclohexyl-1-ethyl-7-methylpyrido[2,3-D]-pyrimidine-2-(1H)-one (YM-64227), a phosphodiesterase type 4 inhibitor. *Drug Metab Dispos* 34:800–806.
- Trepanier L a, Ray K, Winand NJ, Spielberg SP, Cribb a E (1997) Cytosolic arylamine N-acetyltransferase (NAT) deficiency in the dog and other canids due to an absence of NAT genes. *Biochem Pharmacol* 54:73–80.
- Uchida T, Komori M, Kitada M, Kamataki T (1990) Isolation of cDNAs coding for three different forms of liver microsomal cytochrome P-450 from polychlorinated biphenyl-treated beagle dogs. *Mol Pharmacol* 38:644–651.
- Vilà C, Savolainen P, Maldonado JE, Amorim IR, Rice JE, Honeycutt RL, Crandall KA, Lundeberg J, Wayne RK (1997) Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science* (80- ) 276:1687–1689.
- Wang A, Savas U, Hsu M-H, Stout CD, Johnson EF (2012) Crystal structure of human cytochrome P450 2D6 with prinomastat bound. *J Biol Chem* 287:10834–10843.
- Werck-Reichhart D, Feyereisen R (2000) Protein family review Cytochromes P450 : a success story. *Genome Biol* 124:1–9.
- Whiterock VJ, Delmonte TA, Hui LE, Orcutt TL, Sinz MW (2007) Frequency of CYP1A2 polymorphism in beagle dogs. *Drug Metab Lett* 1:163–165.
- Wijnen PAHM, Op den Buijsch RAM, Drent M, Kuijpers PMJC, Kuipers PMJC, Neef C, Bast A, Bekers O, Koek GH (2007) Review article: The prevalence and clinical relevance of cytochrome P450 polymorphisms. *Aliment Pharmacol Ther* 26 Suppl 2:211–219.
- Williams RT (1959) *Detoxication Mechanisms: The Metabolism and Detoxication of Drugs, Toxic Substances, and Other Organic Compounds*. 2nd ed. London Chapman Hall
- Zanger UM, Turpeinen M, Klein K, Schwab M (2008) Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal Bioanal Chem* 392:1093–1108.
- Zoran DL, Riedesel DH, Dyer DC (1993) Pharmacokinetics of propofol in mixed-breed dogs and greyhounds. *Am J Vet Res* 54:755–760.

## 9 ANHANG

**Übersicht über die sequenzierten und in die GenBank des *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* eingestellten Sequenzen**

<b>Titel</b>	<b>Accession no.</b>	<b>Autor</b>
<b>CYP1A2</b>		
Canis lupus familiaris mRNA for Cytochrome-P450-1A2 (CYP1A2 gene), breed Beagle	HG974425	Prinzinger, C.G. and Geyer, J.
Canis lupus familiaris mRNA for Cytochrome-P450-1A2 (CYP1A2 gene), breed Crossbreed	HG965165	Prinzinger, C.G. and Geyer, J.
Canis lupus familiaris mRNA for Cytochrome-P450-1A2 (CYP1A2 gene), breed Crossbreed	HG965166	Prinzinger, C.G. and Geyer, J.
Canis lupus familiaris mRNA for Cytochrome-P450-1A2 (CYP1A2 gene), breed Australian shepherd	HG965167	Prinzinger, C.G. and Geyer, J.
<b>CYP2B11</b>		
Canis lupus familiaris mRNA for Cytochrome-P450-2B11 (CYP2B11 gene), breed Dachshund	HG974426	Prinzinger, C.G. and Geyer, J.
Canis lupus familiaris mRNA for Cytochrome-P450-2B11 (CYP2B11 gene), breed miniature pinscher	HG965163	Prinzinger, C.G. and Geyer, J.
<b>CYP2C21</b>		
Canis lupus familiaris mRNA for Cytochrome-P450-2C21 (CYP2C21 gene), breed Crossbreed	HG965164	Prinzinger, C.G. and Geyer, J.
<b>CYP2D15</b>		
Canis lupus familiaris mRNA for CYP2D15 (Cytochrome-P450-2D15 gene), breed English Cocker Spaniel	HG965175	Prinzinger, C.G. and Geyer, J.
Canis lupus familiaris mRNA for CYP2D15 (Cytochrome-P450-2D15 gene), breed Border Collie	HG965176	Prinzinger, C.G. and Geyer, J.
Canis lupus familiaris mRNA for CYP2D15 (Cytochrome-P450-2D15 gene), breed Golden Retriever	HG965177	Prinzinger, C.G. and Geyer, J.
Canis lupus familiaris mRNA for CYP2D15 (Cytochrome-P450-2D15 gene), breed Labrador Retriever	HG965178	Prinzinger, C.G. and Geyer, J.
Canis lupus familiaris mRNA for CYP2D15 (Cytochrome-P450-2D15 gene), breed Miniature Pinscher	HG965179	Prinzinger, C.G. and Geyer, J.
Canis lupus familiaris mRNA for CYP2D15 (Cytochrome-P450-2D15 gene), breed Crossbreed	HG965180	Prinzinger, C.G. and Geyer, J.

Canis lupus familiaris mRNA for CYP2D15 (Cytochrome-P450-2D15 gene), breed Large Munsterlander	HG965181	Prinzinger, C.G. and Geyer, J
Canis lupus familiaris mRNA for CYP2D15 (Cytochrome-P450-2D15 gene), breed Crossbreed	HG965182	Prinzinger, C.G. and Geyer, J
Canis lupus familiaris mRNA for CYP2D15 (Cytochrome-P450-2D15 gene), breed Australian shepherd	HG965183	Prinzinger, C.G. and Geyer, J
Canis lupus familiaris mRNA for Cytochrome-P450-2D15 (CYP2D15 gene), breed Crossbreed	HG965184	Prinzinger, C.G. and Geyer, J
Canis lupus familiaris mRNA for Cytochrome-P450-2D15 (CYP2D15 gene), breed Large Munsterlander	HG965185	Prinzinger, C.G. and Geyer, J
Canis lupus familiaris mRNA for Cytochrome-P450-2D15 (CYP2D15 gene), breed Golden Retriever	HG965186	Prinzinger, C.G. and Geyer, J
<b>CYP3A12</b>		
Canis lupus familiaris mRNA for Cytochrome-P450-3A12 (CYP3A12 gene), breed English Cocker Spaniel	HG965168	Prinzinger, C.G. and Geyer, J
Canis lupus familiaris mRNA for Cytochrome-P450-3A12 (CYP3A12 gene), breed Border Collie	HG965169	Prinzinger, C.G. and Geyer, J
Canis lupus familiaris mRNA for Cytochrome-P450-3A12 (CYP3A12 gene), breed West Highland White Terrier	HG965170	Prinzinger, C.G. and Geyer, J
Canis lupus familiaris mRNA for Cytochrome-P450-3A12 (CYP3A12 gene), breed Jack Russel Terrier	HG965171	Prinzinger, C.G. and Geyer, J
Canis lupus familiaris mRNA for Cytochrome-P450-3A12 (CYP3A12 gene), breed Dachshund	HG965172	Prinzinger, C.G. and Geyer, J
Canis lupus familiaris mRNA for Cytochrome-P450-3A12 (CYP3A12 gene), breed Labrador Retriever	HG965173	Prinzinger, C.G. and Geyer, J
Canis lupus familiaris mRNA for Cytochrome-P450-3A12 (CYP3A12 gene), breed Crossbreed	HG965174	Prinzinger, C.G. and Geyer, J
Canis lupus familiaris mRNA for Cytochrome-P450-3A12 (CYP3A12 gene), breed West Highland White Terrier	HG974427	Prinzinger, C.G. and Geyer, J
<b>CYP2C41</b>		
Canis lupus familiaris cyp2C41 gene for cytochrome P450 2C41, exons 1-8	HF677515	Prinzinger, C.G. and Geyer,
Canis lupus familiaris mRNA for cytochrome P450 2C41 (CYP2C41 gene)	HF679527	Prinzinger, C.G. and Geyer,

## Primer

Die verwendeten Primer wurden mit dem Programm *Oligo 4.0* ausgewählt und in einer Verdünnung von 10 pmol/μL eingesetzt.

Die Primer wurden von der Firma *Metabion international AG* (Martinsried) und von der Firma *MWG Biotech* (Ebersberg) synthetisiert.

<b>Full-length-PCR</b>	<b>Sequenz (5'→3')</b>	<b>T<sub>m</sub> [°C]</b>
<b>Canines Cytochrom P450 2C41</b>		
cfCYP2C41-F	catggatccagttgtggttc	60
cfCYP2C41-R	aatagcacaacagcaggcag	60
cfCYP2C41-R1	gaatgataccccagaggaagag	66
<b>Full-length-PCR</b>		
<b>Canines Cytochrom P450 2D15</b>		
cfCYP2D15-F	ggcactgagacagctatgg	60
cfCYP2D15-F1	ggcactgagacagctatggg	64
cfCYP2D15-R	caaactggttttattgtacctcgg	66
cfCYP2D15-R1	caaactggttttattgtacctcgggc	64
cfCYP2D15-R1	tggttttattgtacctcgggc	58
<b>Full-length-PCR</b>		
<b>Canines Cytochrom P450 3A12</b>		
cfCYP3A12-F	gaattcacagaggacgagtgg	64
cfCYP3A12-R	tggtgttctgggatagtttcttg	60
<b>Full-length-PCR</b>		
<b>Canines Cytochrom P450 2C19</b>		
cfCYP2C19-F	aaagcacagcaatggatctcttc	60
cfCYP2C19-R	tttgcaatctggcggcctg	60
cfCYP2C19-R1	gtggccttgcaatctggc	62
<b>Full-length-PCR</b>		
<b>Canines Cytochrom P450 2B11</b>		
cfCYP2B11-F	caaaccatggagctcagagt	62
cfCYP2B11-R	aatcctttgaccccccttc	62
<b>Full-length-PCR</b>		
<b>Canines Cytochrom P450 3A26</b>		
cfCYP3A26-F	cagagaattcacagaggacg	60
cfCYP3A26-R	gtctctggattctctgggatc	60
<b>Full-length-PCR</b>		
<b>Canines Cytochrom P450 1A2</b>		
cfCYP1A2-F	actgatctcaagctcctgc	62
cfCYP1A2-F1	accagcctccacaatcctac	62
cfCYP1A2-F2	ctacagttgatacagatggc	58
cfCYP1A2-R	atccttccccctccctctg	58

---

**Sequenzierprimer Introns  
Canines Cytochrom P450 2C41**


---

cfCYP2C41-Ex1-Ex2-F1	ttctctcctttgcctatgc	58
cfCYP2C41-Ex2-Ex1-R1	tcaggatcacccgtaaagc	57
cfCYP2C41-Ex3-Ex4-F1	atccttttctgtcccaagtg	56
cfCYP2C41-Ex4-Ex3-R1	tagcaatcccctttatcagc	56
cfCYP2C41-Ex4-Ex5-F1	gatcctctcttttctctgac	56
cfCYP2C41-Ex5-Ex4-R1	tagagaacctgaggggaaac	58
cfCYP2C41-Ex5-Ex6-F1	cctggatttcaattggactg	56
cfCYP2C41-Ex6-Ex5-R1	ggtggctcagtcagttaag	57
cfCYP2C41-Ex8-Ex9-F1	agggtcctgggattaagtc	57
cfCYP2C41-Ex9-Ex8-R1	cattggagggaggactaag	57
cfCYP2C41-Ex4-Ex3-R2	atcaagtcccacgtcagac	57
cfCYP2C41-Ex3-Ex4-F2	ctctgagccaaagggttac	57
cfCYP2C41-Ex6-Ex5-R2	cctttcctccccactttc	56
cfCYP2C41-Ex8-Ex9-F2	ttgagcatctgccttcacg	57
cfCYP2C41-Ex9-Ex8-R2	gactcgatctcaggtctc	56
cfCYP2C41-Ex5-Ex4-R2	atgtgatcctggagacctg	57
cfCYP2C41-Ex5-Ex6-F2	ccactgattctaggctaag	55
cfCYP2C41-Ex4-Ex5-F2	gaagtgaatgaaaactgggc	56
cfCYP2C41-Ex5-Ex6-F3	ggcaaggttagaaaagtgtg	56
cfCYP2C41-Ex5-Ex6-F4	ctcactctccttcatccac	57
cfCYP2C41-Ex8-Ex9-F3	aaacagcattctaacagcag	54
cfCYP2C41-Ex4-Ex3-R3	ctctctctctctctgtgtg	57
cfCYP2C41-Ex8-Ex9-F4	tgtgatcctggagacctg	56
cfCYP2C41-Ex9-Ex8-R3	ttccactttatgcctcactg	56
cfCYP2C41-Ex8-Ex9-F5	ttatgccaaggtagaaag	53
cfCYP2C41-Ex4-Ex5-F3	tgtggtaactgtggaaatg	53
cfCYP2C41-Ex5-Ex4-R3	gaaagagagagagaggca	54
cfCYP2C41-Ex3-Ex4-F3	agagacacaggcagaag	52
cfCYP2C41-Ex5-Ex6-F5	agagaggatatcatgttgag	54
cfCYP2C41-Intron4-R	tttcaactatccttcccag	53
cfCYP2C41-Intron4-R1	ggcaaatgaataatccacag	54
cfCYP2C41-Intron4-R2	attcgccctatagtgagtc	55
cfCYP2C41-Intron3-R	aataaggatccctgggtg	54
cfCYP2C41-Ex7-F1	aggaagagattgaccgtg	54
cfCYP2C41-Ex8-R1	gaagttgccgctatcatc	54
cfCYP2C41-Intron3-R1	atgagagacacagaaagag	53
cfCYP2C41-Intron3-F	gaagctacctcatcacac	54
cfCYP2C41-Intron3-F1	ctaaaattccctctccttc	54
cfCYP2C41-Intron3-F2	ctatctactgagccagag	54
cfCYP2C41-Intron3-F3	tacacagagagagacagag	55

---

2C41-Intron3-Ampli-R	tgcctctctctctctctctgtg	60
2C41-Intron3-Ampli-F	tacacagagagagacagagag	59
CYP2C41-Int3-900bp-F	tagagacacaggcagaaggag	61
CYP2C41-Int3-900bp-R	ctgtttctccctctgcttgtg	61
<b>Exon PCR</b>		
<b>Canines Cytochrom P450 2C21</b>		
cfCYP2C21-Ex1-F	tggatctcttcatagttctgg	57
cfCYP2C21-Ex1-R	cttagggatttgctgacattc	57
cfCYP2C21-Ex2-F	ttatggccctgtgttctactg	58
cfCYP2C21-Ex2-R	acaatgggaaatggcctctg	58
cfCYP2C21-Ex3-F	aatggaagcaaaccggc	57
cfCYP2C21-Ex3-R	gcttccactagatacaaggc	58
cfCYP2C21-Ex4-F	tccctgtgatcctactttc	55
cfCYP2C21-Ex4-R	caggaggtgcttgaaattag	56
cfCYP2C21-Ex5-F	ctctacaatgctttccctc	55
cfCYP2C21-Ex5-R	agtagtcaataaagtcccag	57
cfCYP2C21-Ex6-F	cagtctgaatttaccatggac	57
cfCYP2C21-Ex6-R	gcaccaatagtcctgtatctc	58
cfCYP2C21-Ex7-F	tcatcgtgtagttggcagac	58
cfCYP2C21-Ex7-R	ctctaaacttgatgtcctgag	57
cfCYP2C21-Ex8-F	catctctgacttctgtcctg	58
cfCYP2C21-Ex8-R	ctgagaaggccatgaagtag	58
cfCYP2C21-Ex9-F	agagagtttgtgttggaag	57
cfCYP2C21-Ex9-R	ataggaaggtggtgtagcac	58
<b>Exon PCR</b>		
<b>Canines Cytochrom-P450 2C41</b>		
cfCYP2C21-Ex1-R	gatgtccttatctaactgtagg	58
cfCYP2C21-Ex2-F	ctatggccctgtattcactc	58
cfCYP2C21-Ex2-R	cctccactaactttttcggc	58
cfCYP2C21-Ex3-F	cagtggaaacagatggaagg	58
cfCYP2C21-Ex3-R	ctcaactcttctacaaggtag	57
cfCYP2C21-Ex4-F	taccatgtgatcccacttttg	57
cfCYP2C21-Ex4-R	tccatggggagctcaaaatc	58
cfCYP2C21-Ex5-F	tacaatagtttccctgctctc	57
cfCYP2C21-Ex5-R	tcaatgaaatcccaggattg	57
cfCYP2C21-Ex6-F	aaagcacaagccattgg	58
cfCYP2C21-Ex6-R	ctgtgacttctggatgtttc	56
cfCYP2C21-Ex7-F	tccaggaagagattgacc	54
cfCYP2C21-Ex7-R	cttggggatgacatagtttc	56
cfCYP2C21-Ex8-F	tgtcttctgtgctatctgatg	57
cfCYP2C21-Ex8-R	gagaaagccatgaagtagtc	56
cfCYP2C21-Ex9-F	acgaatttgtgtgggagaag	56

---

cfCYP2C21-Ex1-nest-F	ttgtctctcctggtgccttc	58
cfCYP2C21-Ex1-nest-R	caataaaagggagaggtgtgg	59
cfCYP2C21-Ex2-nest-F	gtatthttggcatgaaaccac	57
cfCYP2C21-Ex2-nest-R	cgtcctcttgagaaaaactc	58
cfCYP2C21-Ex3-nest-F	aatttggggatggggaagag	58
cfCYP2C21-Ex3-nest-R	cctcttgaactcggctctc	59
cfCYP2C21-Ex4-nest-F	tcttgggctgtgcttctg	59
cfCYP2C21-Ex4-nest-R	ggaaaataatggagcagatcac	58
cfCYP2C21-Ex5-nest-F	tcccaggaagccataacac	57
cfCYP2C21-Ex5-nest-R	atcgaaggattcttgggtgttc	57
cfCYP2C21-Ex6-nest-F	cactgatttggttggagctg	56
cfCYP2C21-Ex6-nest-R	ttgtgcttgttgtctctgtc	56
cfCYP2C21-Ex7-nest-F	gcggtactgcatgagattc	57
cfCYP2C21-Ex7-nest-R	atttaacgtcacaggtcactg	57
cfCYP2C21-Ex8-nest-F	ccagaccagagatatttgac	56
cfCYP2C21-Ex8-nest-R	agttgccgctatcatccag	57
cfCYP2C21-Ex9-nest-F	gacattgataccaccccac	57
cfCYP2C21-Ex9-nest-R	acacgggaatgaagcagag	57

---

**Primer 2C Cluster  
CYP2C21 – PDLIM1**

---

cfCYP2C21-PDLIM1-F1	ccttcagctgtataccac	57
cfCYP2C21-PDLIM1-R1	tgctcctcctttctgtc	56
cfCYP2C21-PDLIM1-F2	gcagaagaaagaagcactc	55
cfCYP2C21-PDLIM1-R2	ctctctctgtgtgtctttc	55
cfCYP2C21-PDLIM1-F3	acagtattactctcaggagc	56
cfCYP2C21-PDLIM1-R3	gttctctatacctcttggac	56
cfCYP2C21-PDLIM1-F4	ccataaagcacaatagtagc	54
cfCYP2C21-PDLIM1-R4	gagacacagagagagagag	57
cfCYP2C21-PDLIM1-F5	agttctgcttcttcccctg	57
cfCYP2C21-PDLIM1-R5	gttgctggattgttgagtag	56
cfCYP2C21-PDLIM1-F6	acactgttggtggaatgc	55
cfCYP2C21-PDLIM1-R6	tgtccttgaaactcctgtc	55
cfCYP2C21-PDLIM1-F7	gcagaaagacattgggaaac	56
cfCYP2C21-PDLIM1-R7	tttacagtctcctttgggc	55
cfCYP2C21-PDLIM1-F8	catatggagagagaacgag	55
cfCYP2C21-PDLIM1-R8	gaaactgtcagctctgtaac	56
cfCYP2C21-PDLIM1-F9	accatgtatcttgcaatctg	54
cfCYP2C21-PDLIM1-R9	ggatactgtagggttaagatg	56
cfCYP2C21-PDLIM1-F10	acagtcatgtcgggtccac	56
cfCYP2C21-PDLIM1-R10	cagtcagaggcaggatag	56
cfCYP2C21-PDLIM1-F11	gaactgatgcactggctc	56
cfCYP2C21-PDLIM1-R11	ctctgcctctctaagtgtc	57

---

---

cfCYP2C21-PDLIM1-F12	aaacagctccccactacag	57
cfCYP2C21-PDLIM1-R12	ttggctcaagtcgatctc	56
cfCYP2C21-PDLIM1-F13	agagagagcatgagccag	56
cfCYP2C21-PDLIM1-R13	tgagagacacagagacatag	56
cfCYP2C21-PDLIM1-F14	caaatcccataatcaggctc	55
cfCYP2C21-PDLIM1-R14	ttgttcagattgcctggtg	55
cfCYP2C21-PDLIM1-F15	ctctgccectccagttttc	56
cfCYP2C21-PDLIM1-R15	taacactgggtgaaatggag	56
cfCYP2C21-PDLIM1-F16	gactctatccatttagggctc	56
cfCYP2C21-PDLIM1-R16	gtttagcgccactttcagc	57
cfCYP2C21-PDLIM1-F17	aacctgacgtgggacttg	56
cfCYP2C21-PDLIM1-R17	tttctgggtgtcattgaggtg	56
cfCYP2C21-PDLIM1-F18	agtgtaagtccctgcacg	56
cfCYP2C21-PDLIM1-R18	actgatcccaggacgttg	56
cfCYP2C21-PDLIM1-F19	acagaaagaatagacggagc	56
cfCYP2C21-PDLIM1-R19	tcatgctttaaacgggtgac	56
cfCYP2C21-PDLIM1-F20	gagtacacatcctcttcaag	56
cfCYP2C21-PDLIM1-R20	ctgtttcctgtggtgtgtg	57
cfCYP2C21-PDLIM1-F21	accaacagaatcccaccac	57
cfCYP2C21-PDLIM1-R21	gatggteccctatactgatg	56
cfCYP2C21-PDLIM1-F22	cacccatgaaatcgcttg	56
cfCYP2C21-PDLIM1-R22	acacctgctgcatcactc	56
cfCYP2C21-PDLIM1-F23	gtccttgggttctgagatg	57
cfCYP2C21-PDLIM1-R23	gtgggtgtctctgtcatttc	55

---

**Primer 2C Cluster  
PDLIM1 - Hells**

---

cfHELLS-CYP2C21-F1	aatgaatgcctcaggaccg	57
cfHELLS-CYP2C21-R1	gagacaaagaacctacacag	56
cfHELLS-CYP2C21-F2	acaagaaagaagagaccctg	56
cfHELLS-CYP2C21-R2	agagccaacattcactgaag	56
cfHELLS-CYP2C21-F3	gatcccttcacatgcttttc	56
cfHELLS-CYP2C21-R3	attgactctcaggggatgc	57
cfHELLS-CYP2C21-F4	caaaggcagacgctcaac	56
cfHELLS-CYP2C21-R4	ctacatggagcctgcttc	56
cfHELLS-CYP2C21-F5	catacaactgagcactgaag	56
cfHELLS-CYP2C21-R5	acaccactgctaccagatg	57
cfHELLS-CYP2C21-F6	accacataacacctagacag	56
cfHELLS-CYP2C21-R6	tcacatgaatgaccaaccac	56
cfHELLS-CYP2C21-F7	atccaggttatagaccactg	56
cfHELLS-CYP2C21-R7	gatgctagcaacagtagatc	56
cfHELLS-CYP2C21-F8	cttcagtgtcagttgtatg	56
cfHELLS-CYP2C21-R8	tgagaatcacacagagagag	56

---

cfHELLS-CYP2C21-F9	tccaggattgagtcccac	56
cfHELLS-CYP2C21-R9	gagcctgacctgggaatc	58
cfHELLS-CYP2C21-F10	tggctcagcagtttggcg	58
cfHELLS-CYP2C21-R10	ataggcagaggcagagaag	57
cfHELLS-CYP2C21-F11	gttgagcacctcccttcg	58
cfHELLS-CYP2C21-R11	ctcccaaaccaaggcagc	58
cfHELLS-CYP2C21-F12	agccagaataggatcatag	56
cfHELLS-CYP2C21-R12	ttctctgtccctctctctc	57
cfHELLS-CYP2C21-F13	ggatccccatctacacac	56
cfHELLS-CYP2C21-R13	ctctgtctctcctcacctc	58
cfHELLS-CYP2C21-F14	gtgaagcctataccctgag	57
cfHELLS-CYP2C21-R14	agtttgggctaggaattaag	54
cfHELLS-CYP2C21-F15	ctggggattagaacatagac	57
cfHELLS-CYP2C21-R15	tctccctctgcctgtgtc	58
cfHELLS-CYP2C21-F16	gatagtcgcacagagagag	57
cfHELLS-CYP2C21-R16	gaactgatgttacagcctag	56
cfHELLS-CYP2C21-F17	ggaggattgccatgaagac	57
cfHELLS-CYP2C21-R17	atacaagcaggccaggtc	56
cfHELLS-CYP2C21-F18	gacttacatcctgagtgaag	57
cfHELLS-CYP2C21-R18	cttatctctctgacaaaggc	56
cfHELLS-CYP2C21-F19	tgctacagagtgttttagc	56
cfHELLS-CYP2C21-R19	caaaggcaggcgctaaac	56
cfHELLS-CYP2C21-F20	ggaactttctttaggagttg	54
cfHELLS-CYP2C21-R20	ttccgtctatcaatagcatc	54
cfHELLS-CYP2C21-F21	gcttctctgtgtctttcaa	56
cfHELLS-CYP2C21-R21	ctctctctctctctctctc	57
cfHELLS-CYP2C21-F22	aatgaagctatctggctctg	56
cfHELLS-CYP2C21-R22	ctatgtctgtgtctccttc	55
cfHELLS-CYP2C21-F23	attgccttcccatgctgac	57
cfHELLS-CYP2C21-R23	ctctctgtgtgtgtgtctc	57
<b>pCR 4- TOPO Vektor</b>		
<b>Sequenzier-Primer</b>		
T3	attaaccctcactaaaggga	54
T7	taatagactcactataggg	54
<b>Housekeeping-Primer G3PDH</b>		
<b>Qualitätskontrolle cDNA</b>		
G3PDH-F2	catcaagaaggtgggtgaagcag	62
G3PDH-R4	ccaccaccctgttgctgtag	62

## 10 DANKSAGUNGEN

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Der erste und besondere Dank geht an Prof. Dr. Joachim Geyer, welcher mich während meiner Zeit am Institut stets unterstützte und mit seinen Ideen und seiner Motivation maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat. Er hatte stets ein offenes Ohr, als Fragen oder Probleme auftraten und nahm sich immer Zeit, diese zu lösen.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer und Prof. Dr. Sabine Tacke und allen beteiligten Mitarbeitern der Klinik für Kleintiere der JLU Gießen für die Bereitstellung der Leberbiopsien.

Ich danke auch der Bayer Animal Health GmbH für die finanzielle Unterstützung der Studie.

An der Einarbeitung in alle Labortätigkeiten zu Beginn meiner Arbeit am Institut waren in besonderem Umfang Regina Leidolf, Dr. Barbara Döring und Katharina Bakhaus beteiligt. Dank ihnen konnte ich sehr schnell selbstständig arbeiten, und ich bin ihnen daher besonders dankbar. Regina Leidolf trug zudem wesentlich zum Erfolg an der Etablierung der CYP2C41 „Exon 7-PCR“ bei. Jasmin Kranz hatte immer eine Antwort, sollte ich Fragen bezüglich der *real-time* PCR gehabt haben.

Dr. Jörg Alber danke ich für die vielen, netten gemeinsamen Mittagspausen in der Kantine mit aufbauenden Gesprächen, es hatte immer ein offenes Ohr und wusste zudem jede meiner Fragen hinsichtlich der PCR fachmännisch zu beantworten und mir bei der Einstellung der Sequenzen in die GenBank NCBI zu helfen.

Meinen Kolleginnen Sabrina Elmshäuser und Helene Schweigmann kommt besonderer Dank zu, da sie diese Arbeit gegengelesen haben. Helene

Schweigmann bewies sich als treue Hilfe und beantwortete mir jede meiner vielen Fragen bezüglich Layout und Formatierungen.

Meiner Kollegin Stephanie Schmidt danke ich für eine schöne gemeinsame Zeit als Bürogenossinnen. Stephanie Schmidt und Henrik Möhle haben zusammen einen wichtigen, wenn nicht den entscheidenden Beitrag zur „Findung“ dieser Arbeit geleistet.

Bei Jana Bartholomeyzik bedanke ich mich, für die künstlerische Gestaltung des Deckblattes.

Allen weiteren Mitarbeitern des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie, welche ich nicht namentlich genannt habe, danke ich für die tolle Zeit. Das Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft untereinander sind bemerkenswert. Vielen Dank an jeden, der mir das ein oder andere Mal eine Platte o.ä. aus dem Inkubator geholt hat.

Ich danke besonders meinen Freundinnen Dr. Kira Böhmer, Dr. Aline Henriquez-Santana und ausserdem Simon Saad. Alle drei haben mir in vielen Telefongesprächen und persönlichen Diskussionen mentale Unterstützung und Motivation vermittelt.

Ein großer und herzlicher Dank geht an meine Eltern und meine Oma. Diese drei Menschen lieferten sowohl zum erfolgreichen Abschließen meines Studiums als auch zum Gelingen der Promotion den größten finanziellen und zwischenmenschlichen Beitrag. Sie gaben mir Halt, Verständnis und Sicherheit.

## Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation

# Polymorphismen in den Cytochrom-P450-Enzymen des Hundes

selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

Clarissa Prinzinger



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6283-5



9 783835 1962835

Photo cover front: © molekuul.be - Fotolia.de  
Photo cover back: Author