

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Patienten

An der von April 1998 bis September 2000 durchgeführten prospektiven Studie nahmen 270 Patienten teil (116 Männer, 154 Frauen, Alter 18-83 Jahre, mittleres Alter 53,7 Jahre), die ambulant (n=157) oder stationär (n=113) in der Hämatologisch-Onkologischen Klinik der Charité sowie im Städtischen Krankenhaus Moabit behandelt wurden. Die Studie fand nach Zustimmung der Ethikkommission des Universitätsklinikums Charite der Humboldt-Universität zu Berlin statt. Alle Patienten gaben ihre schriftliche Einwilligung zur Genotypisierung.

##### 3.1.1 Einschlusskriterien

In die Untersuchung eingeschlossen wurden männliche und weibliche Patienten über 18 Jahren mit manifestem Tumorleiden am ersten Tag einer Chemotherapie mit hoch oder mäßig emetogenen Zytostatika. Bei 205 Patienten war es die erste Chemotherapiebehandlung, bei 57 Patienten die erste Rezidivbehandlung und bei 6 Patienten die Behandlung des zweiten Rezidivs.

##### 3.1.1.1 Tumorentitäten

Die Art der Tumoren und deren Verteilung in der Patientengruppe sind in Tab. 1 aufgeführt.

Tab. 1: Tumorarten aller Patienten

<b>Tumorart</b>	<b>Prozent</b>
Mamma-Karzinom	32,5
Bronchial-Karzinom	15,4
Non-Hodgkin-Lymphom	14,2
Multiples Myelom	4,9
Hodgkin-Lymphom	4,9
verschiedene Tumoren	28,1

### 3.1.1.2 Zytostatische Therapie

98 Patienten erhielten Cyclophosphamid (mittlere Dosis 1524 mg) allein oder in Kombination mit verschiedenen anderen Zytostatika. Cis-Platin (mittlere Dosis 90 mg) wurde 27 Patienten, Carboplatin (mittlere Dosis 448 mg) 29 Patienten verabreicht. Alle anderen Patienten (n=116) erhielten unterschiedliche chemotherapeutische Kombinationstherapien.

Glukokortikoide wurden an 151 Patienten als Bestandteil der Chemotherapie oder als zusätzliche antiemetische Behandlung verabreicht.

### 3.1.1.3 Emetogene Potenz

Die Emetogenität der verabreichten Zytostatika wurde nach dem von Hesketh et al. 1997 entwickelten Schema bestimmt (Tab. 2).

Tab. 2: Emetogene Potenz der Zytostikatherapie (nach Hesketh et al., 1997)

Emetogene Potenz					
	Grad 1	Grad 2	Grad 3	Grad 4	Grad 5
<b>Anzahl der Patienten</b>	2	55	22	95	96

### 3.1.1.4 Antiemetische Therapie

Die untersuchten Patienten wurden mit den 5HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten Tropisetron (Navoban<sup>®</sup>, Novartis, Basel, Schweiz) oder Ondansetron (Zofran<sup>®</sup>, GlaxoSmithKline, Brentford, Großbritannien) behandelt. Patientenverteilung und Dosierungen sind in Tab. 3 aufgeführt.

Tab. 3: Anzahl der mit Tropisetron und Ondansetron behandelten Patienten und Dosierung der 5HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten

5HT <sub>3</sub> -Rezeptor-antagonist	Anzahl der Patienten	Prozent	Dosierung
<b>Tropisetron</b>	96	35,6	5 mg, 1x täglich i.v.
<b>Ondansetron</b>	174	64,4	8 mg, 2x täglich i.v.

Die erste antiemetische Behandlung erfolgte jeweils vor, die weiteren während der Verabreichung des Chemotherapeutikums.

### 3.1.1.5 Dokumentation von Übelkeit und Erbrechen

Die Wirksamkeit der antiemetischen Behandlung wurde von den Patienten zu 3 verschiedenen Zeitpunkten innerhalb der ersten 24 Stunden des ersten Tages der Chemotherapie bewertet:

1. vor Beginn der zytostatischen Therapie
2. 4 Stunden nach Verabreichung des Zytostatikums
3. innerhalb der nächsten 20 Stunden (5.-24. Stunde)

Der Zeitpunkt der Beurteilung und die Zahl der Würgereiz- und Erbrechensepisoden wurden von den Patienten auf einheitlichen Dokumentationsbögen registriert. Zwischen den einzelnen Episoden mußte ein mindestens 1minütiges freies Intervall liegen, um sie als getrennte Episoden zu werten (Italian Group for Antiemetic Research, 1998).

Die Beurteilung des Grades der Übelkeit erfolgte mit Hilfe einer 100 mm langen visuellen Analogskala (VAS). Das völlige Ausbleiben von Übelkeit wurde bei 0 mm, eine extrem starke Übelkeit bei 100 mm festgelegt. Ein 20%iger Anstieg der Übelkeit gegenüber dem Ausgangswert vor Chemotherapiegabe wurde als Auftreten von Übelkeit gewertet. Jegliches Vorhandensein von Übelkeit oder Erbrechen unabhängig von der Stärke wurde als inkompletter Schutz beurteilt.

### 3.1.2 Ausschlusskriterien

Für die Studie galten folgende Ausschlusskriterien:

- Bestrahlung innerhalb der letzten 24 Stunden vor Chemotherapiebeginn
- Einnahme anderer Antiemetika als 5HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten innerhalb der letzten 24 Stunden vor Chemotherapie
- Übelkeit und/ oder Erbrechen innerhalb der letzten 24 Stunden vor Therapiebeginn
- Schwangerschaft
- Erkrankungen, die Übelkeit und Erbrechen hervorrufen können, wie schwere Herzinsuffizienz, obstruktive Darmerkrankungen, schwere Leber- und Nierendysfunktion, Ulcera im Gastrointestinaltrakt wie Ulcus ventriculi oder duodeni, ZNS Tumore oder ZNS Metastasen
- Einnahme von Neuroleptika oder Benzodiazepinen vor Chemotherapie
- Einnahme von Opioiden während der letzten 2 Wochen vor Beginn der Studie

- Einnahme von Enzyminduktoren oder -inhibitoren für CYP2D6 (Rifampicin bzw. Quinidine, Fluoxetin oder Haloperidol).

Von den 286 ursprünglich in die Studie eingeschlossenen Patienten mussten 9 Patienten aufgrund der beschriebenen Kriterien ausgeschlossen werden. Von 7 Patienten konnten nicht alle Daten erhoben werden.

### 3.2 Geräte

In der Studie wurden die in Tab. 4 aufgeführten Geräte verwendet.

Tab. 4: Übersicht über verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Thermocycler: <i>GeneAmp PCR System 9600 und 9700</i>	Perkin Elmer/Applied Biosystems, Foster City, USA
Videosystem <i>Eagleeye</i>	Stratagene
Zentrifugen	Eppendorf, Beckmann, Sigma, Deutschland
UV-VIS-Spektrophotometer	Shimadzu, Japan
Inkubationsschränke/Hybridisierungsöfen	Biometra, Deutschland
Diverse halbautomatische Schüttler	Hofer, Heidolph, Janke & Kunkel, Deutschland
Diverse Flachbett-Elektrophoresekammern und Elektrophorese-Spannungsgeräte	Pharmacia, Biorad, Hofer, Deutschland

Verbrauchsmaterialien (Einmal-Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße unterschiedlicher Größe, PCR-Gefäße, sterile Einmal-Pipettenspitzen usw.) wurden von den Firmen Eppendorf, Biozym und Falcon bezogen.

### 3.3 DNS-Isolierung

#### 3.3.1 Gewinnung des Blutes zur DNS-Isolierung

Die Entnahme von 10 ml EDTA-Vollblut erfolgte peripher am nicht für die Applikation der übrigen Medikamente genutzten Arm. Wenn das nicht möglich war, wurde das Blut über den zentralen Venenkatheter, über Braunüle oder Port gewonnen, wobei die ersten 5-10 ml verworfen wurden.

#### 3.3.2 Chemikalien

Für die Isolierung der DNS wurden die in Tab. 2 aufgeführten Chemikalien verwendet.

Tab. 5: Übersicht über die für die DNS-Isolierung verwendeten Chemikalien

Lösung	Zusammensetzung
10x Erythrozyten-Lyse-Puffer	61,5 g $\text{NH}_4\text{Cl}$ (1,15 mM) 10 g $\text{KHCO}_3$ (0,1 M) 2 ml 0,5 M EDTA (1 mM) mit Aqua bidest. ad 1 l Gebrauchslösung 1:10 mit Aqua bidest.verdünnt
10x TEN Puffer	2,4 g Tris/HCl pH 7,5 (0,2 M) 400 $\mu\text{l}$ 0,5 M EDTA (0,02 M) 17,5 g NaCl (0,3 M) mit Aqua bidest. ad 1l. Gebrauchslösung 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt
Proteinase K-Lösung	je Probe 2 mg Proteinase K in 100 $\mu\text{l}$ 1x TEN-Puffer gelöst
Phenol	500 g Phenol zur Äquilibrierung pH >7,8 zweimal mit je 200 ml Tris/HCl pH 8,0 unter 0,5 M Tris/HCl pH 8,0 gelagert, Zusatz von 1 ml $\beta$ -Mercaptoethanol und 500 mg $\beta$ -Hydroxychinolin
Chloroform-Lösung	Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 49:1 (v/v) gemischt
Natriumacetat	40,8 g $\text{CH}_3\text{COONa}$ (3 M) ad 100 ml Aqua bidest. - mit Eisessig auf pH 5,5 eingestellt
TE-Puffer	121 mg Tris-HCl (10 mM) 200 $\mu\text{l}$ 0,5 M EDTA, pH 8,0 (1 mM) ad 100 ml Aqua bidest. (Lösung autoklaviert)

### 3.3.3 Methodenbeschreibung

Das bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagerte EDTA-Vollblut wurde aufgetaut und mit vier Volumenteilen 1x Erythrozyten-Lyse-Puffer versetzt, 30 min auf Eis inkubiert und dann 10 min bei 2000 U/min zentrifugiert. Am Boden des Gefäßes bildete sich ein Sediment aus Leukozyten. Der Überstand (hämolytierte Erythrozyten) wurde vorsichtig dekantiert und verworfen. Das Sediment wurde in 2-4 ml 1x Erythrozyten-Lyse-Puffer resuspendiert, 5 -10 min auf Eis inkubiert und danach erneut 10 min bei 2000 U/min zentrifugiert. Nach wiederholtem Dekantieren wurde das Zellsediment in 2 ml Nuclei-Lyse-Puffer aufgenommen. Die Proben wurden danach bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert oder sofort weiter verarbeitet.

Pro Probe wurden 1,5 mg Proteinase K in 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  gelöst dazugegeben und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  (oder für 3 Stunden bei  $60^{\circ}\text{C}$ ) im Brutschrank unter leichtem Schütteln verdaut. Anschließend wurde mit 1,5 ml eines Phenol/ Chloroform-Gemisches 2 Stunden im Überkopfschüttler extrahiert. Nach Phasentrennung und Überführung der wässrigen Phase in ein neues Gefäß wurden Lipidbestandteile durch 1-stündige Extraktion mit 1,5 ml eines Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (96:4) eliminiert. Nach Phasentrennung wurde die obere wässrige Phase in einem neuen Gefäß mit jeweils 6 ml 95 % Ethanol und 100  $\mu\text{l}$  3 M Natriumacetat pH 5,5 präzipitiert. Nach Waschen mit 70%igem Ethanol wurde die DNS in 750  $\mu\text{l}$  TE-Puffer aufgenommen und bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Für die Konzentrationsbestimmung der extrahierten genomischen DNS wurden 5  $\mu\text{l}$  DNS mit  $\text{H}_2\text{O}$  im Verhältnis 1:100 verdünnt und die Absorption spektrophotometrisch bei  $\lambda_1 = 260 \text{ nm}$  und  $\lambda_2 = 280 \text{ nm}$  bestimmt. Der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  als Maß der Vollständigkeit der Eliminierung von Proteinen sollte oberhalb 1,6 und optimal zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

### 3.4 Genotypisierung von CYP2D6

Die Genotypisierung wurde in Anlehnung an Sachse durchgeführt (Sachse et al., 1997).

Chemikalien, die für die Genotypisierung benötigt wurden, sind in Tab. 6 aufgelistet.

Tab. 6: Übersicht über die für die Genotypisierung verwendeten Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
dNTPs	MBI Fermentas, Litauen
DNS-Polymerasen AmpliTaq™, Expand™ Expand Long PCR System	Roche, Deutschland
Restriktionsendonukleasen: BsaAI, BstNI	New England Biolabs, USA
Diverse DNS-Oligonukleotide (PCR-Primer)	TIB MOLBIOL, Deutschland
100 bp und 1 kb DNS Marker	MBI Fermentas, Litauen
10 x Perkin Elmer Puffer	Perkin Elmer, USA
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	Perkin Elmer, USA
Agarose ultrapure	Gibco BRL, England
Puffer: NEB blau, NEB rot	
Bromphenolblaupuffer	
Ethanol, Chloroform, Phenol	Merck, Deutschland

#### 3.4.1 Prinzipielles Vorgehen

Um die Spezifität der Reaktionen zu erhöhen, das heißt um Interferenzen durch Koamplifikation der dem CYP2D6 sequenzhomologen Pseudogene CYP2D7 und CYP2D8 zu vermeiden, wurde eine nested PCR-Technik angewendet.

Zur Erfassung der CYP2D6-Allele \*3, \*4 und \*6 wurden PCR-Methoden basierend auf der Long Amplifikations-Technik genutzt. Bei diesen Reaktionen wurde das Expand™ Long PCR System (Fa. Roche) eingesetzt, das mit einem Gemisch der DNS-Polymerasen *Taq* und *Pwo* arbeitet und zur Amplifikation von Fragmenten bis zu 20 kb Länge geeignet ist. Für die Detektion der Punktmutationen wurden PCR-RFLP-Tests verwendet, die zur Minimierung des Aufwands mehrere Punktmutationen mit einer PCR nachweisen (Sachse, 1998).

In einer ersten PCR wurde mit CYP2D6-bindenden Primern spezifisch das gesamte CYP2D6-Gen amplifiziert (PCR Nr.1, Tab. 3). Proben mit dem Fragment 4681bp sind positiv für diese PCR. Sie werden 1:5 mit PCR-Wasser verdünnt und sind Ausgangsmaterial für die nachfolgenden PCR-RFLP-Tests. In den *nested* PCR-RFLP-Tests (PCR Nr. 2 und 3, Tab. 3) wird ein Amplifikat der Genregion um die interessierenden Mutationsstellen hergestellt und dann durch Restriktionsendonukleasen entsprechend dem Genotyp geschnitten.

Zum Nachweis der Allele \*5 (CYP2D6-Deletion) und \*MxN (Gen-Duplikation) wurden PCR-Methoden genutzt, die von Sachse (1998) beschrieben wurden. Bei beiden PCRs wird durch Zusatz eines Standardprimers ein internes Standardfragment unabhängig vom Vorliegen des zu untersuchenden Allels amplifiziert, so dass falsch negative Ergebnisse ausgeschlossen werden. Aus genomischer DNS wird ein Standardfragment und bei Vorliegen des gesuchten Allels ein zweites Fragment amplifiziert.

In Tab.7 sind alle angewendeten PCRs und PCR-RFLP-Tests zur molekular-genetischen Typisierung der Allele \*3, \*4, \*5, \*6 und der CYP2D6-Genduplikation zusammenfassend dargestellt.

Tab. 7: PCR-RFLP-Tests für CYP2D6

CYP-2D6 Allel	PCR-RFLP-Bedingungen				Fragmentgrößen(bp)	
	Detektierte Mutation	PCR Primer	Fragmentlänge (bp)	Restriktionsenzym	Wildtyp-Allel	Mutiertes Allel
*1	Gesamtes CYP2D6	P100/P200	4681	-	4681	kein Fragment bei *5/*5
*4, *6	Del T <sub>1795</sub>	P*3/P2	353	<i>Bst</i> NI	190/163	190/139/23
	G <sub>1934</sub> A			<i>Bst</i> NI	190/163	353
*3	Del A <sub>2637</sub>	P51/D2	201	<i>Bsa</i> AI	201	180/20
*5	*5	P13/P24/P81	3500	-	4500	3500
*MxN	CYP2D6*MxN	Cyp 17/32	3600	-	5200	5200/3600

In Tab. 8 sind die Sequenzen und Positionen der verwendeten CYP2D6-Primer zusammengefasst.

Tab. 8: Sequenzen und Positionen der für die CYP2D6-Genotypisierung verwendeten Oligonukleotidprimer, f: forward Primer, r: reverse Primer

Primer	Sequenz	Richtung	Position <sup>a</sup>	
P100	5' GGCCTACCCTGGGTAAGGGCCTGGAGCAGGA	f	-180	--150
P200	5' CTCAGCCTCAACGTACCCCTGTCTCAAATGCG	r	+92	++123
P*3	5' CCTGGGCAAGAAGTCGCTGGACCAG	f	1770	-1794
P2	5' GAGACTCCTCGGTCTCTCG	r	2104	-2122
P51	5' GCTGGGGCCTGAGACTT	f	2457	-2473
D2	5' GGCTGGGTCCCAGGTCATAC	r	2638	-2657
P13	5' ACCGGGCACCTGTACTCCTCA	f(2D7)	+1619	++1639
P24	5' GCATGAGCTAAGGCACCCAGAC	r	+3444	++3465
P81	5' CGTCTAGTGGGGAGACAAAC	f	3621	-3640
Cyp17	5' TCCCCCACTGACCCAACTCT	f(2D7)	+155	++174
Cyp32	5' CACGTGCAGGGCACCTAGAT	r(2D7)	+5470	+5489

<sup>a</sup> Positionsnumerierung nach Kimura S, Umeno M, Skoda RC, Meyer UA, Gonzalez FJ. The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and isolation of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene, and a pseudogene. Am J Hum Genet, 1989.

### 3.4.2 Reaktionsbedingungen

Die beschriebenen Reaktionsansätze verstehen sich als Ansätze für eine Probe. Für eine entsprechend höhere Probenzahl  $n$  wurde ein  $n$ -facher Ansatz berechnet. Die bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagerten Lösungen wurden aufgetaut, auf Eis gestellt und der sogenannte Mastermix pipettiert. Nach Mischen und Zentrifugieren wurde der Mastermix auf die PCR-Gefäße verteilt, die jeweils angegebene Menge an genomischer DNS bzw. verdünntem PCR-Voramplifikat der Reaktion 1 zupipettiert

und die PCR-Gefäße verschlossen. Nach Start des PCR-Programms wurden die Proben erst bei etwa 85°C in den Zykler gestellt (Thermocycler *GeneAmp*™ 9600 bzw. 9700, Fa. ABI).

### PCR Nr. 1: Amplifikation des gesamten CYP2D6

---

PCR-Mastermix (25 µl je Probe)	10x buffer 1 (Expand-Kit)	2,5 µl
	dNTPs (2 mM)	4,5 µl
	H <sub>2</sub> O (steril, bidest.)	16,75 µl
	Primer P100 (10 µM)	0,5 µl
	Primer P200 (10 µM)	0,5 µl
	Polymerase (Expand-Kit)	0,25 µl



25 µl Mastermix mit je 1,8 µl genomischer DNA versetzt



im Thermocycler: 2 min 94°C

35x (10 s 96°C – 20 s 57°C – 5 min 68°C)

7 min 68°C – 4°C

Die Amplifikationsprodukte des gesamten CYP2D6-Gens haben eine Fragmentlänge von 4681 bp. Sie wurden 1:5 mit Aqua bidest. verdünnt. Das verdünnte PCR-Produkt ist Ausgangsmaterial für die folgenden *nested* PCR-RFLPs (Nr. 2 und 3).

## PCR Nr. 2: Nested PCR-RFLP zum Nachweis der Allele \*4 und \*6

---

PCR-Mastermix : (25 µl je Probe)	10 x Perkin Elmer Puffer	2,5 µl
	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,25 µl
	dNTPs (2 mM)	2,5 µl
	H <sub>2</sub> O (steril, bidest.)	17,5 µl
	Primer P*3 (10 µM)	0,5 µl
	Primer P2 (10 µM)	0,5 µl
	AmpliTaq Polymerase	0,25 µl



25 µl Mastermix mit je 1 µl verdünntem PCR-Produkt von PCR Nr.1 versetzt



im Thermocycler: 2 min 94°C  
 25 x (10 s 95°C – 10 s 60°C – 1 min 72°C)  
 7 min 72°C – 4°C

Die PCR-Produkte werden entsprechend der Vorschrift des Herstellers mit Restriktionsendonukleasen verdaut:

BstNI-Restriktion zum Nachweis der Allele \*4 und \*6:



20 µl PCR-Produkt mit 10 µl Enzymmastermix versetzt  
 Enzymmastermix: 6 µl A. bidest.  
 3 µl Puffer NEB blau  
 1 µl *Bst*NI



über Nacht bei 60°C unter Schütteln inkubiert

### PCR Nr. 3: Nested PCR-RFLP zum Nachweis des Allels \*3

---

PCR-Mastermix : (25 µl je Probe)	10 x Perkin Elmer Puffer	2,5 µl
	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,25 µl
	dNTPs (2 mM)	2,5 µl
	H <sub>2</sub> O (steril, bidest.)	17,5 µl
	Primer (10 µM)	0,5 µl
	Primer (10 µM)	0,5 µl
	AmpliTaq Polymerase	0,25 µl



25 µl Mastermix mit je 1 µl verdünntem PCR-Produkt versetzt



im Thermocycler: 2 min 94°C  
 25 x (30 s 95°C – 10 s 60°C – 1 min 72°C)  
 7 min 72°C – 4°C

Die PCR-Produkte wurden entsprechend der Vorschrift des Herstellers mit Restriktionsendonukleasen verdaut:

20 µl PCR-Produkt mit 10 µl Enzymmastermix versetzt  
 BstNI-Restriktion zum Nachweis des Allels \*3

Enzymmastermix: 5 µl Aqua bidest.  
 3 µl Puffer NEB rot  
 2 µl BsaAI



über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert

**PCR Nr. 4: Nachweis der CYP2D6-Deletion (Allel \*5)**


---

PCR-Mastermix: (25 µl je Probe)	10 x buffer 1 (Expand-Kit)	2,5 µl
	dNTPs(2 mM)	4,5 µl
	H <sub>2</sub> O (steril, bidest.)	16,25 µl
	Primer P13 (10 µM)	0,5 µl
	Primer P24 (10 µM)	0,5 µl
	Primer P81 (10 µM)	0,5 µl
	Polymerase (Expand-Kit)	0,25 µl



25 µl Mastermix werden mit je 1,8 µl genomischer DNS versetzt



im Thermocycler: 2 min 94°C  
 35 x (10 s 96°C – 20 s 57°C – 5 min 68°C)  
 7 min 68°C – 4°C

**PCR Nr. 5: Nachweis der CYP2D6-Duplikation (Allel \*MxN)**


---

PCR-Mastermix: (25 µl je Probe)	10 x buffer (Expand- Kit)	2,5 µl
	dNTPs (2 mM)	4,5 µl
	H <sub>2</sub> O (steril, bidest)	16,75 µl
	Primer CYP 17 (10 µM)	0,5 µl
	Primer CYP 32 (10 µM)	0,5 µl
	Polymerase (Expand-Kit)	0,25 µl



25 µl Mastermix werden mit je 1,8 µl genomischer DNS versetzt



im Thermocycler: 2 min 94°C  
 35 x (10 s 96°C – 20 s 57°C – 5 min 68°C)  
 7 min 68°C – 4°C

Die Auswertung erfolgte anhand des Fragmentmusters der Gelelektrophorese.

### 3.5 Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Analyse wurden nach beendeter PCR jeweils 5 µl des Produktes mit 10 µl Probenauftragspuffer gemischt und auf ein 1%iges bzw. 3%iges Agarosegel aufgetragen.

Für die Gelherstellung wurden 1 g Agarose (1 % Agarosegel) bzw. 3 g Agarose (3%iges Agarosegel) (Ultrapure, Fa. Gibco) mit 100 ml 1 x TBE versetzt, zweimal in der Mikrowelle aufgeköcht und unter Rühren mittels Magnetrührer auf ca. 45°C abgekühlt. Vor dem Gießen wurden 10 µl Ethidiumbromidlösung je 100 ml zugesetzt.

In einer Elektrophoresekammer wurden die Proben in die Gelkammern eingebracht. Vor Probenauftrag wurden 5 µl je Probe auf einer Mikrotiterplatte zu 10 µl Bromphenolblaupuffer pipettiert. Der Probenauftragspuffer wurde wie folgt hergestellt: 15 g Ficoll-400 wurden mit 0,25 g Bromphenolblau versetzt, mit Aqua bidest. auf 100 ml aufgefüllt und mit einem Magnetrührer gelöst (Lagerung bei 4°C).

Nach den nested PCR-RFLPs zum Nachweis der Allele \*3, \*4 und \*6 erfolgte zunächst eine PCR-Kontrolle durch Auftragen auf ein 1%iges Agarosegel und nach Restriktionsverdau die Elektrophorese auf einem 3%igen Gel. Die Proben der long PCR-Technik zum Nachweis der Allele \*1, \*5, \*MxN wurden auf ein 1%iges Gel aufgetragen.

Parallel erfolgte das Auftragen von 4 µl eines DNS-Standards als Marker zur Beurteilung der Fragmentlängen. Für die Allele \*3, \*4 und \*6 wurde ein 100bp-DNS-Marker (MBI-Fermentas) und für die Allele \*1, \*5, \*MxN ein 1kb-DNS-Marker (MBI-Fermentas) verwendet.

Die Elektrophorese auf 1%igem Gel wurde 45 min, die auf 3%igem Gel 60 min bei 8V/cm durchgeführt.

Die aufgetrennten Fragmente wurden abschließend mittels UV-Fluoreszenz mit einem digitalen Videosystem (Eageleye TM, Fa. Stratagene) dokumentiert.

In der folgenden Abbildung 1 wird die CYP2D6-Genotypisierung zusammenfassend dargestellt.

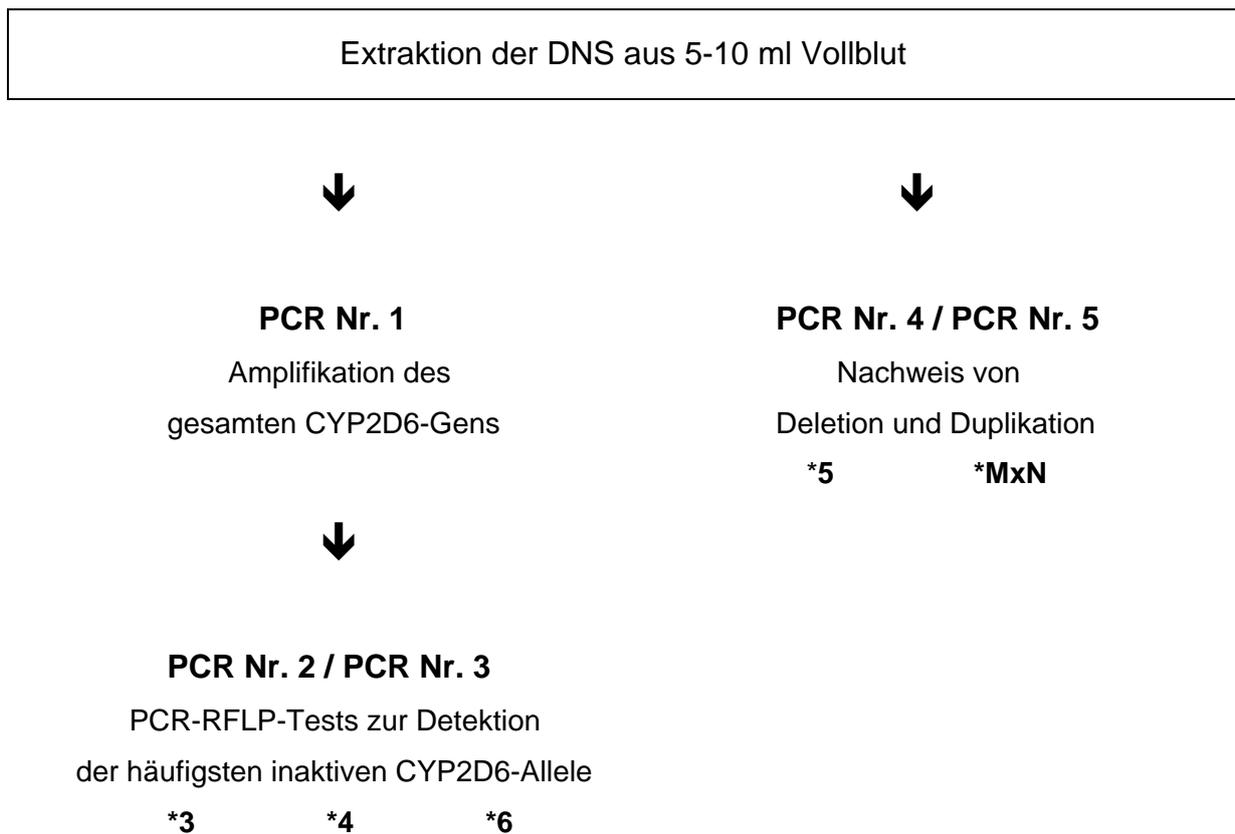


Abb. 1: Flussdiagramm der CYP2D6-Genotypisierung

### 3.6 Statistik

Die mittlere Zahl der Erbrechenepisoden und die mittleren Prozentzahlen für die Übelkeit wurden mittels Kruskal-Wallis- oder Mann-Whitney-U-Test auf statistische Signifikanz geprüft. Der paarweise Vergleich zwischen den Gruppen erfolgte mit dem Wilcoxon-Rang-Summen Test.

Für die statistische Auswertung wurde die SPSS Version 8.01 (SPSS, Inc, Chicago IL) verwendet.

Als Signifikanzgrenze wurde 0,05 festgelegt.