

Aus dem Institut für Pharmakologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Bedeutung genetischer Polymorphismen im  
Enzym Cytochrom P450C9 für die Pharmakokinetik des  
Antikoagulanz Phenprocoumon

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ev-Charlott Walter

aus Berlin

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

2.: Prof. Dr. med. J. Kirchheiner

3.: Priv.-Doz. Dr. med. C. Meisel

Datum der Promotion: 07.12.2007

Abbildungsverzeichnis .....	V
Tabellenverzeichnis .....	VI
Abkürzungsverzeichnis .....	VII
1. Einleitung .....	1
1.1. Cumarine .....	1
1.2. Phenprocoumon .....	3
1.3. Das Cytochrom P450-System .....	5
1.3.1. Die Subfamilie 2C .....	6
1.3.1.1. Das Enzym CYP2C9 .....	7
1.3.1.2. Das Enzym CYP2C19 .....	10
1.3.2. Das Enzym CYP2D6 .....	11
1.4. Fragestellung .....	12
2. Material und Methoden .....	13
2.1. Studiendesign .....	13
2.2. DNA-Gewinnung .....	18
2.3. Genotypisierung wichtiger CYP2C8-, CYP2C9-, CYP2C19- und CYP2D6-Allele .....	19
2.3.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	22
2.3.2. Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) .....	23
2.3.3. PCR-RFLP-Tests .....	23
2.3.4. PCR-RFLP-Test zur CYP2C9-Allelbestimmung .....	24
2.4. HPLC-Bestimmung zur Messung der Medikamentenspiegel .....	27
2.5. Urinproben .....	28
2.6. Qualitätskontrolle der Analyseergebnisse .....	28
2.7. Statistik .....	29
3. Ergebnisse .....	30
3.1. Studiendurchführung .....	30
3.2. Pharmakokinetik von S- und R-Phenprocoumon im Plasma .....	30
3.3. Pharmakokinetik von 7'-OH-, 6'-OH- und 4'-OH-Phenprocoumonmetabolite im Plasma und im Urin .....	37
4. Diskussion .....	41
4.1. Einfluss des CYP2C9-Genotyps auf die Pharmakokinetik von Phenprocoumon in vivo .....	41
4.2. Vorteile einer routinemäßigen Genotypisierung vor Phenprocoumontherapie .....	55

5. Zusammenfassung .....	57
Literaturverzeichnis .....	58
Lebenslauf .....	71
Danksagung .....	72
Eidesstattliche Erklärung .....	73

---

**Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Strukturformel Cumarin .....	1
Abb. 2: Strukturformel Warfarin .....	2
Abb. 3: Strukturformel Phenprocoumon .....	2
Abb. 4: Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC).....	33
Abb. 5: Plasma- (Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve) AUC von R- und S-Phenprocoumon.....	34
Abb. 6: Plasma- (Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve) AUCs von 7'-OH-Phenprocoumon.....	35
Abb. 7: Ausscheidung von 6'-OH-Phenprocoumon im Urin und dessen Abhängigkeit vom CYP2C9-Genotyp.....	39

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Allelfrequenz der Allele des CYP2C9 in der afroamerikanischen und asiatischen Bevölkerung.....	9
Tab. 2: Allelkombinationsmöglichkeiten der CYP2C9-Allele und ihre vorhersehbare Aktivität.....	10
Tab. 3: Studien-Probanden und deren Genotyp.....	13
Tab. 4: Reagenzien und Funktion zur DNA-Extraktion.....	19
Tab. 5: CYP2C9*2-Lightcycler.....	20
Tab. 6: CYP2C9*3-Lightcycler.....	20
Tab. 7: CYP2C19*2-Lightcycler.....	20
Tab. 8: CYP2D6*3-Lightcycler.....	20
Tab. 9: CYP2D6*4-Lightcycler.....	21
Tab. 10: CYP2D6*6-Lightcycler.....	21
Tab. 11: Primer und spezifische (hervorgehobene Grossbuchstaben) MGB-TaqMan Proben für die Diskriminierung von *1- und *3-Allelen.....	21
Tab. 12: Chemikalien für die PCR-RFLP-Verfahren.....	25
Tab. 13: Geräte für die PCR-RFLP-Verfahren.....	25
Tab. 14: PCR-RFLP-Tests für CYP2C9*2 und CYP2C9*3.....	26
Tab. 15: Ergebnisse der Gelelektrophoreseanalyse für CYP2C9*2 (Arg <sub>144</sub> Cys).....	27
Tab. 16: Ergebnisse der Gelelektrophoreseanalyse für CYP2C9*3 (Ile <sub>359</sub> Leu).....	27
Tab. 17: Darstellung pharmakokinetischer Parameter (Ergebnisse und Mittelwert) von R- und S-Phenprocoumon versus CYP2C9-Genotyp.....	31
Tab. 18: Darstellung pharmakokinetischer Parameter (Ergebnisse und Mittelwerte) von 7'-OH-, 6'-OH-, und 4'-OH-Phenprocoumonmetaboliten im Plasma und Urin versus CYP2C9-Genotyp.....	37

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ANOVA</b>	engl: analysis of variance
<b>AUC</b>	engl: area under the curve
<b>BMI</b>	engl: body mass index
<b>CO</b>	Kohlenmonoxyd
<b>CRF</b>	engl: case report files
<b>CRP</b>	C-reaktives Protein
<b>CYP</b>	Cytochrom P
<b>DNA</b>	engl: desoxyribonucleid acid
<b>EDTA</b>	engl: ethylene diamine tetraacetic acid
<b>EKG</b>	Elektrokardiogramm
<b>EM</b>	engl: extensive metabolizer; Schnellmetabolisierer
<b>FDA</b>	engl: food and drug administration
<b>GCP</b>	engl: good clinical practice (Deklaration von Helsinki, 1964, zur Durchführung von klinischen Studien)
<b>GOT</b>	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
<b>GPT</b>	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
<b>γGT</b>	Gammaglytamytransferase
<b>HBsAg</b>	Hepatitis-B-surface-Antigen
<b>HCV</b>	Hepatitis-C Virus
<b>HIV</b>	engl: human immunodeficiency virus
<b>HMG-CoA</b>	β-Hydroxy-β-Methylglutaryl-Coenzym-A
<b>HPLC</b>	engl: high-performance-liquid-chromatography
<b>IM</b>	engl: intermediate metabolizer; Intermediärmetabolisierer
<b>INR</b>	engl: international normalised ratio
<b>K<sub>m</sub></b>	Michaelis-Konstante
<b>MG</b>	Molekulargewicht
<b>MGP</b>	engl: magnetic glass particles
<b>KDa</b>	Kilo Dalton
<b>NADPH/NADH</b>	reduziertes Nicotinsäureamidadenindinucleotid
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid

<b>NSAID</b>	engl: nonsteroidal antiinflammatory drugs
<b>PCR</b>	engl: polymerase chain reaction
<b>PIVKA</b>	engl: protein induced by vitamin k absence
<b>PPSB</b>	Prothrombin + Prokonvertin + Stuart-Power-Faktor + antihämophiles Globulin (Prothrombinkomplex)
<b>PTT</b>	Partielle Thromboplastinzeit
<b>RFLP</b>	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
<b>R-H</b>	zu oxidierendes Substrat
<b>R-OH</b>	oxidiertes Substrat
<b>rpm</b>	engl: rounds per minute
<b>SD</b>	Standardabweichung
<b>SM</b>	engl: slow metabolizer; Langsammetabolisierer
<b>SNP</b>	engl: single nucleotide polymorphism
<b>SRS</b>	engl: substrat recognition site
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TT</b>	Thrombinzeit
<b>UAW</b>	unerwünschte Arzneimittelwirkungen
<b>UM</b>	engl: ultrarapid metabolizer; Ultraschnellmetabolisierer
<b>VKORC1</b>	engl: vitamin k epoxide reductase complex 1, Untereinheit 1 des Vitamin K-Epoxidreduktasekomplexes

## Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

## **Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ivar Roots für die Ermöglichung der Arbeit und die Überlassung des Themas.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Julia Kirchheiner für die kontinuierliche Betreuung sowie für die kompetente Hilfe und ihr großes Engagement während der gesamten Studienphase und lange darüber hinaus. Ihre Motivation und aufmunternden Worte haben mir in vielen schwierigen Phasen geholfen!

Weiter möchte ich den Mitarbeitern des Labors unter der Leitung von Dr. Steffen Bauer für die gute Kooperation und Unterstützung danken. Ohne ihre Kooperation und Hilfe hätte diese Studie nicht so komplikationslos durchgeführt werden können.

Ferner möchte ich Mike Ufer und seinen Mitarbeitern vom Karolinska Institut in Stockholm für die gute Zusammenarbeit danken.

Mein großer Dank gilt Dirk, Henning, Nadine und Tosh.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht haben.

## **Eidesstattliche Erklärung**

**Ev-Charlott Walter**

**Berlin, den .....**

### **Betreff: Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Ev-Charlott Walter, an Eides statt, dass die Dissertation mit dem Titel

**„Die Bedeutung genetischer Polymorphismen im Enzym Cytochrom P4502C9 für die Pharmakokinetik des Antikoagulanz Phenprocoumon“**

von mir selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzen Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.