

2. Material und Methoden

2.1. Studiendesign

Probandenauswahl:

Die Probandenauswahl erfolgte aus einem Probandenpool für klinische Studien, die ihr schriftliches Einverständnis zur Genotypisierung arzneimittelmetabolisierender Enzyme gegeben haben. Die Probanden dieser Studie wurden nach ihrem CYP2C9-Genotyp ausgewählt, so dass pro Genotyp-Gruppe n=3 (homozygot) bzw. mindestens n=4 (heterozygot und Wildtyp) vorhanden waren.

Tabelle 3 stellt die Genotypen der an der Studie teilnehmenden Probanden dar:

Anzahl der Probanden	CYP2C9	CYP2D6	CYP2C19	CYP2C8
7 Probanden	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1/*1
4 Probanden	*1/*2	*1/*1	*1/*1	*1/*3
2 Probanden	*2/*2	*1/*1	*1/*1	*3/*3
1 Proband	*2/*2	*1/*4	*1/*1	*1/*3
2 Probanden	*2/*3	*1/*1	*1/*1	*1/*3
1 Proband	*2/*3	*1/*1	*1/*1	*1/*1
1 Proband	*2/*3	*1/*4	*1/*1	*1/*3
5 Probanden	*1/*3	*1/*1	*1/*1	*1/*1
3 Probanden	*3/*3	*1/*1	*1/*1	*1/*1
2 Probanden	*1/*1	*4/*4	*1/*1	*1/*1

Tab. 3: Studien-Probanden und deren Genotyp

Zur Beurteilung des Einflusses von CYP2D6 auf die Biotransformation von Phenprocoumon wurde die Studie um 2 Probanden des CYP2D6-Genotyps erweitert. Wie aus Tabelle 3 ersichtlich waren die zwei Probanden poor metabolizer für das CYP2D6-Enzym (*4/*4), ansonsten *1/*1-Träger der CYP2C9-, CYP2C19- und CYP2C8-Genotypen.

Die sich somit ergebende Gesamtstudienzahl von 28 Probanden bestand aus 24 männlichen und 4 weiblichen Probanden.

Die Studie wurde durch die Ethikkommission des Universitätsklinikums der Charité bewilligt.

Einschlusskriterien:

In die klinisch kontrollierte Studie wurden freiwillige, gesunde Männer und Frauen im Alter von 18-68 Jahren eingeschlossen, die ein Normalgewicht gemäß der Broca-Tabelle mit einer maximalen Abweichung von 15% aufwiesen.

Die Probanden mussten Nichtraucher sein und durften keine pathologischen Befunde bei den durchgeführten Laboruntersuchungen sowie beim EKG oder der Blutdruckmessung aufweisen.

Das Verhältnis zwischen weiblichen und männlichen Probanden wurde a priori nicht festgelegt, da keine geschlechtsspezifischen Unterschiede im Hinblick auf den CYP2C9-Stoffwechsel bekannt sind. Aufgrund hormoneller Einflüsse von Östrogenen auf den Leberstoffwechsel wurden jedoch nur postmenopausale Frauen in die Studie aufgenommen.

Um Risiken im Hinblick auf ethnische Unterschiede der CYP-Enzyme zu vermeiden, wurden die Probanden aus einer einheitlich europäisch-kaukasischen Population gewählt.

Ausschlusskriterien:

Ausgeschlossen wurden Probanden, die folgende Kriterien aufwiesen:

- regelmäßige Medikamenteneinnahme
- Nikotin- bzw. Alkoholabusus
- schwere Leber- und Nierenschäden
- bekannte Blutgerinnungsstörungen
- neurologische bzw. psychische Erkrankungen
- Infektionskrankheiten, wie z.B. akute Hepatitis B, -C; HIV
- Magen-Darm-Ulzera
- Bekannte Tumorleiden
- Blutspende innerhalb der letzten zwei Wochen
- BMI > 29
- bekannte Arzneimittelunverträglichkeit bzw. -allergie in der Eigenanamnese

Probanden konnten aus der bereits laufenden Studie ausgeschlossen werden, wenn folgende Probleme auftraten:

- unerwünschte, nicht tolerierbare Arzneimittelnebenwirkungen
- mangelnde Probandencompliance
- Einschlusskriterien, die sich im Laufe der Studie als nicht erfüllt ergaben
- der Proband aufgrund einer Krankheit zur zusätzlichen Medikamenteneinnahme gezwungen war
- auf Wunsch des Probanden

Bei Eintritt eines dieser Kriterien mit der Folge des Ausscheidens des Probanden, wäre dieser durch einen neuen vom Genotyp identischen Probanden ersetzt worden. Jedoch trat dieses Problem während der Studie nicht auf.

Laborparametrische und körperliche Untersuchung:

Die körperliche und laborparametrische Untersuchung des Probanden erfolgte eine Woche bis spätestens 2 Tage vor Studienbeginn.

Nach Vorliegen der schriftlichen Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie und der persönlich ausgefüllten Eigenanamneseerhebung, erfolgte eine laborparametrische Anamnese. Diese galt neben der Erhebung der regulären Laborparameter wie Blutbild (Hämatokrit, Hämoglobin, Erythrozyten-, Thrombozyten- und Leukozytenzahl), Elektrolyte, Harnstoff, Kreatinin, GOT, GPT, γ -GT, alkalische Phosphatase, CRP, Gesamt-Bilirubin und der serologische Erhebung (HBsAg, anti-HCV und HIV-Test), besonders der Erhebung der Gerinnungsparameter (TPZ, PTT und INR).

Zur körperlichen Untersuchung gehörte ferner die Temperatur-, Blutdruck- und Puls-messung sowie die Aufzeichnung eines EKG.

Dosierung und Darreichungsform der Testsubstanzen:

Das Phenprocoumon (Marcumar ®, Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) wurde dem Probanden als orale Einmaldosis in der Dosierung von 4 Tabletten à 3 mg, einer Gesamtdosis von 12 mg, verabreicht.

Um die Wirkung des Phenprocoumons zu unterdrücken und Blutungskomplikationen auszuschließen, aber auch um das Thromboserisiko, das bei Therapiebeginn von Phenprocoumon in der Literatur beschrieben wird (Einwirkung auf die antithrombotisch

wirkenden Faktoren Protein C und S) zu antagonisieren, erhielten die Probanden zusätzlich als orale Einmaldosis 10 mg Phytomenadion (Konakion ®, Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland). Die Halbwertszeit von Konakion im Plasma beträgt ungefähr 14 +/-6 Stunden.

Beide Medikamente wurden mit Mineralwasser eingenommen.

Diätische Maßnahmen vor und während der Studienteilnahme:

Vor Beginn der Studienteilnahme sollte von den Probanden der Genuss von Alkohol, Grapefruits bzw. Grapefruitsaft eine Woche lang eingeschränkt und 1-2 Tage vor bis zur Beendigung der Studie vollständig unterlassen werden, da diese Nahrungsmittel das zu untersuchende Enzymsystem beeinflussen können.

Der Genuss xanthinhaltiger Speisen und Getränke (Schokolade, Kakao und schwarzer Tee) wurde während des zwölfstündigen Studientages sowie 3 Tage vor und 1 Tag nach Einnahme der Studienmedikation untersagt, da auch hier eine Beeinflussung des CYP2C9-Systems vermieden werden sollte.

Obwohl nach bisherigen Kenntnissen Koffein lediglich über das CYP1A2-Enzym metabolisiert wird (Spigset et al, 1999; Rostami-Hodjegan et al, 1996), sollte auch der Genuss von Kaffee im erwähnten Zeitraum unterlassen werden, um eine Beeinflussung des CYP2C9-Systems zu vermeiden.

Die letzte Nahrungsaufnahme vor dem Studientag sollte um 22 Uhr des Vorabends erfolgen. Am Studientag durfte der Proband bis zur 5. Blutentnahme, 12 Uhr mittags, nur Mineralwasser zu sich nehmen, erhielt aber ein festes Mittag- und Abendessen.

Überprüfung der Compliance:

Vor Einnahme der Testsubstanz wurde eine Kurzanamnese durchgeführt, bei der der Proband nach seinem derzeitigen Gesundheitszustand sowie nach eventuellen Medikamenteneinnahmen und nach Alkohol-, Nikotin- und Drogenkonsum befragt wurde. Gegebenfalls wäre dem Probanden die Studie versagt und auf einen möglichen späteren Termin verschoben worden.

Bei Verdacht auf Nichteinhalten der Compliance konnten kurzfristige Urin- und Blutkontrollen, auf die der Proband im Anamnesegespräch hingewiesen wurde, durchgeführt werden, was ggf. zu einem sofortigen Studienausschluss geführt hätte.

Studienablauf:

Die Kinetikmessung des Phenprocoumons erstreckte sich über eine Woche mit insgesamt 13 Blutentnahmen.

Am Morgen des Studientages wurde, wenn keine Einwände gegen die Studienteilnahme bestanden, dem Probanden eine Verweilkanüle gelegt, die bis zum Abend in der Vene verblieb und nach der letzten Blutentnahme gezogen wurde.

Vor Testsubstanzgabe erfolgte eine Nüchternblutentnahme, der die Einnahme der Testsubstanz im Beisein des Studienarztes/der Studienärztin folgte.

Über die Verweilkanüle erfolgten mit jeweils zwei 9ml EDTA-Röhrchen die Medikamentenbestimmung nach 0,5h; 1h; 2h; 4h; 6h; 9h; 12h; 24h; 36h; 48h; 96h und 144h nach Einnahme der Testsubstanz.

Ferner wurde über den zwölfstündigen Studientag Urin des Probanden gesammelt, der am Abend nach Beendigung des Studientages in zwei 9ml-Röhrchen gefüllt und verwahrt wurde.

Nach Beendigung des ersten Studientages erfolgte die Einbestellung des Probanden am 2., 3., 5. und 7.Tag zur Medikamentenspiegelbestimmung, die mittels Punktion der Armvene erfolgte.

Dokumentation der Studie:

Die erhobenen Daten der Studie sind in case-report-forms (CRF's) dokumentiert worden, die für die nächsten 15 Jahre im Institut für Klinische Pharmakologie der Charité verwahrt sind.

Alle Probandendaten wurden in anonymisierter Form erhoben und mit einem für jeden Probanden individuellen Code versehen. Diese probandenbezogenen Daten wurden computergesteuert gespeichert und verwaltet. Die Zuordnung zu den Probandendaten und der Zugriff auf den Probandenpool waren nur den an der Studie beteiligten Mitarbeitern möglich. Probandendaten und –informationen wurden, mit Ausnahme bei ausdrücklicher Genehmigung durch den Probanden selbst, nicht an Dritte weitergeleitet.

Die Studie wurde nach den GCP-Leitlinien (Good clinical practice; Deklaration von Helsinki 1964) durchgeführt. Die Probanden waren durch eine Probandenversicherung versichert.

Aufgetretene Beschwerden wurden am 1. Studientag mit genauer Beschreibung der Beschwerden sowie der Uhrzeit schriftlich dokumentiert. Am 2. und am 7. Tag wurde

der Proband durch offene Fragebögen auf eventuell aufgetretene Beschwerden angesprochen, die wiederum schriftlich dokumentiert wurden.

Weiterverarbeitung und Aufbewahrung der Blut- und Urinproben:

Die Blutproben wurden direkt nach der Entnahme 5 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Das daraus gewonnene Plasma wurde in Falconröhrchen überführt und bis zur Medikamentenbestimmung bei -20° Celsius gelagert.

2.2. DNA-Gewinnung

Die DNA-Gewinnung erfolgte mit Hilfe des vollautomatisierten Geräts MagNaPure (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) aus ca. 5 ml EDTA-Blut, welches den Probanden zur freiwilligen Genotypisierung abgenommen wurde. Der MagNaPure ist nach ca. 90 Minuten abgeschlossen.

Zur kompletten Zellauflösung kommt es durch Zugabe von Lysis/Binding Buffer.

Die Proteine werden durch den Buffer denaturiert, so dass die DNA als freies Molekül vorliegt. Um die zellulären Proteine zu verdauen wird Proteinase K hinzugegeben.

Die DNA kann sich wegen der chaotropischen Salze (hohe ionische Stärke) der Lysis/Binding Buffer an die Siliziumdioxidschicht der MGP's-Oberfläche binden.

Durch den Wash Buffer I werden ungebundene Substanzen (z.B. Proteine und Zellmembranen) sowie PCR-Inhibitoren (z.B. Hämoglobin) entfernt.

Durch den Wash Buffer II werden Verunreinigungen entfernt. Zuletzt wird die pure DNA bei erhöhter Temperatur im Elutions Buffer gelöst.

Die fertige DNA ist nach ca. 1,5 h in 100 μ l Elutions Buffer gelöst. Die Endkonzentration der DNA, die zwischen 30-100 ng/ μ l liegt, wird in Eppendorfgefäße überführt.

Die zur DNA-Gewinnung notwendigen Reagenzien und resultierende Funktionen sind Tabelle 4 zu entnehmen.

Reagenz	Funktion
Wash Buffer I	Entfernung der PCR-Inhibitoren
Wash Buffer II	Entfernung von Proteinen und Salzen
Lysis/Binding Buffer	Zur Zellauflösung sowie Bindung der DNA
Proteinase K	Proteinverdauung
Magnetic Glass Particles (MGP's)	Bindung der DNA-Suspension
Elutions Buffer	Lösungsmittel für die pure DNA

Tab. 4: Reagenzien und Funktion zur DNA-Extraktion

2.3. Genotypisierung wichtiger CYP2C8-, CYP2C9-, CYP2C19- und CYP2D6-Allele

Mittels spezifischer PCR-RFLP wurden wichtige CYP2C8-, CYP2C9-, CYP2C19- und CYP2D6-Allele aus Vollblut gewonnen und genotypisiert.

Die Analyse der CYP2D6*3-, *4-, *5-, *6-Allele sowie der CYP2C8*3- und CYP2C19*2-Allele wurden mit Hilfe des LightCyclers® der Firma Roche durchgeführt (Tab. 5-10). Dabei handelt es sich um ein automatisiertes Verfahren, das neben der klassischen PCR-Methode (siehe 2.3.1) auch Fluoreszenzmessungen durchführt. So können mit Hilfe von Hybridisierungssonden, die mit einem interkalierenden Farbstoff versehen sind, genetische Polymorphismen detektiert werden.

Mit Hilfe des LightCyclers® wird die Akkumulation der PCR-Produkte während der zyklisch ablaufenden Amplifikation (real-time) in Glaskapillaren über Fluoreszenzmessungen verfolgt, wozu ein Fluorophor (SYBR-GreenI) genutzt wird. Die Fluoreszenzintensität ist hierbei proportional zur amplifizierten Menge an Ausgangs-DNA.

Tabellen 5-10 zeigen die verschiedenen Sonden und Primer sowie die DNA-Sequenzen, die bei der Lightcycler-PCR verwendet wurden. Die verwendeten Sonden und Primer werden von der Firma TIB MOLBIOL, Berlin hergestellt.

Funktion	DNA-Sequenz
2CL1 (Primer)	5'- cactggctgaaagagctaacagag
2CR1 (Primer)	5'- gtgatatggagtagggtcacccac
Cyp 2C9*2 ANC (Sonde)	5'-LC Red640- cctctccccatcccaaaattccgca ph
Cyp 2C9*2 mt (Sonde)	5'- cctctgaacacagtcctcaatgc x

Tab. 5: CYP2C9*2-Lightcycler

Funktion	DNA-Sequenz
2CL-5 (Primer)	5'- aggaagagattgaacgtgtga
2C9ex7 R (Primer)	5'- cctgggaatgagatagtttctga
Cyp 2C9*3[CC]* (Sonde)	5'- cagagataccttgacctc x
Cyp 2C9*3 an* (Sonde)	5'- LC Red640-gcccaccagcctgccccat p

Tab. 6: CYP2C9*3-Lightcycler

Funktion	DNA-Sequenz
mep f (Primer)	5'- aattacaaccagagcttggc
mep r (Primer)	5'- tatcacttccataaaagcaag
Cyp 2C19ex5 [A] (Sonde)	5'- LC Red640-cccaggaaccataacaaattac p
Cyp 2C19ex5 [ANC] (Sonde)	5'- tgcaataatttcccactatcattgatt x

Tab. 7: CYP2C19*2-Lightcycler

Funktion	DNA-Sequenz
2D6in5S (Primer)	5'- tccccgtcctcctgcat
2D6*3as (Primer)	5'- ggcagccactctcaccttct
2D6*3 Sen delA (Sonde)	5'- ccaggtcatcc gtgctca x
2D6*3 ANCHOR (Sonde)	5'- LC Red640-ttagcagctcatccagctgggtcag p

Tab. 8: CYP2D6*3-Lightcycler

Funktion	DNA-Sequenz
2D6in2F (Primer)	5'- ttggagtgggtggtggatg
2D6R1 (Primer)	5'- tatgcaaatacctgctctccga
2D6*4 ANCHOR (Sonde)	5'- cgacccttaccgcacatctccc x
2D6*4 [A] (Sonde)	5'- LC Red640-cccccaagacgccccttt p

Tab. 9: CYP2D6*4-Lightcycler

Funktion	DNA-Sequenz
2D6in2F (Primer)	5'- ttggagtgggtggtggatg
2D6R1 (Primer)	5'- tatgcaaatacctgctctccga
2D6*6 Sen delT (Sonde)	5'-tcggtcaccc ctgctccagc x
2D6*6 ANCHOR (Sonde)	5'- LC Red640-cttcttgcccaggcccaagtgc p

Tab. 10: CYP2D6*6-Lightcycler

Um andere ggf. am Arzneimittelabbau beteiligte polymorphe Enzyme auszuschließen, erfolgte ferner die Genotypisierung von CYP2C19, CYP2C8 und CYP2D6 nach den in der Literatur beschriebenen Methoden von Yasar et al, 2002, DeMoraes et al, 1999 und Sachse et al, 1997 (Tab. 11).

Funktion	DNA-Sequenz
Foreward Primer	atgtccactacttctcctcacttctg
Reverse Primer	aaagtggccagggtcaaaga
Diskriminierungsproben für *1	atgatgaca A agaattt
Diskriminierungsproben für *3	tgatgaca G agaattt

Tab. 11: Primer und spezifische (hervorgehobene Grossbuchstaben) MGB-TaqMan Proben für die Diskriminierung von *1- und *3-Allelen (Yasar et al, 2002)

2.3.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch die relativ einfache in vitro Methode der Polymerase Kettenreaktion (PCR) können mittels DNA-Polymerasen spezifische DNA-Segmente vermehrt (amplifiziert) werden. Für diese Vervielfältigung ist jedoch eine wichtige Voraussetzung, dass die Sequenz des nachzuweisenden DNA-Abschnittes weitgehend bekannt ist.

Pro PCR werden 1 µl genomische DNA, eine wärmebeständige DNA-Polymerase (Taq-Polymerase), die vier zur DNA-Synthese benötigten Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dTTP und dGPT) sowie zwei geeignete Oligonucleotide (Primer) in einem Reaktionspuffer inkubiert.

Die Wahl der Primer muss so erfolgen, dass sie zum 5'- bzw. 3'-terminalen Ende des zu amplifizierenden DNA-Segments komplementär (ergänzend) sind.

Jeder Zyklus der PCR, der in temperaturgesteuerten Reaktionszyklen verläuft, besteht aus folgenden 3 Schritten:

- 1. Denaturierung:** Trennung der Matrizen-DNA-Doppelstränge durch kurzfristiges Erhitzen auf 94-95° Celsius in Einzelstränge.
- 2. Primer-Annealing:** Nach einer Temperaturerniedrigung auf 58-60° C kommt es zu einer Primer-Anlagerung an die beiden Enden der ihnen komplementären Segmente. Die Annealingtemperatur ist so gewählt, dass sich die Primer spezifisch an das zu vervielfältigende DNA-Segment binden. Die Primer dienen als Startpunkte für die Elongation.
- 3. Elongation:** Nach einer Temperaturerhöhung auf 72° C erfolgt die Synthese der komplementären DNA-Stränge durch die DNA-Polymerase, welche die Primer in 5'-3'-Richtung verlängert. Von jedem Primer ausgehend liegen am Ende der Elongation neu synthetisierte DNA-Doppelstränge vor. Diese DNA-Doppelstränge dienen als Matrize für weitere Zyklen.

Die Amplifikation der DNA-Sequenz erfolgt exponentiell. So kommt es nach ca. 25-30 Reaktionszyklen der PCR theoretisch zu einer Vermehrung der gewünschten Sequenz um den Faktor 2^{25-30} .

Da die Ausbeute pro Zyklus jedoch nur 85% beträgt, ist die tatsächliche Amplifikation niedriger. Aufgrund des Nukleotiden- und Primer-Verbrauchs und einer zunehmenden Hitzeinaktivierung der DNA-Polymerase ist die Zahl der Zyklen auf etwa 30 begrenzt. Das zyklische Erhitzen und Abkühlen übernehmen computergesteuerte Thermostate.

2.3.2. Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme bakterieller Herkunft, die DNA-Doppelstränge sequenzspezifisch spalten. Es entstehen Restriktionsfragmente unterschiedlicher Länge, mittels deren Hilfe hochmolekulare DNA reproduzierbar in definierte Restriktionsfragmente zerlegt und durch Gelelektrophorese aufgetrennt werden kann. Befindet sich im Bereich der Erkennungssequenz einer Restriktionsenzym- Schnittstelle ein genetischer Polymorphismus, kommt es zu einem veränderten Schnittmuster. Durch Basensubstitution, Insertion oder Deletion eines oder mehrerer Nukleotide resultiert ein Neuauftreten oder ein Verlust von Schnittstellen und somit eine Verkürzung bzw. eine Verlängerung der Restriktionsfragmente. Dieses Phänomen, das dem Nachweis von Punktmutationen dient, wird als Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) bezeichnet.

2.3.3. PCR-RFLP-Tests

Die Genotypisierung wichtiger CYP2C8-, CYP2C9-, CYP2C19- und CYP2D6-Allele erfolgt aus der aus Vollblut gewonnenen, genomischen DNA mittels optimierter PCR-RFLP-Tests (s. 2.3.1 und 2.3.2).

In einer PCR wurde zunächst jeweils ein DNA-Abschnitt mit der zu untersuchenden Mutationsstelle amplifiziert und die PCR-Produkte daraufhin nach dem Verdau mit Restriktionsenzymen in einer Gelelektrophorese analysiert.

2.3.4. PCR-RFLP-Test zur CYP2C9-Allelbestimmung

Zur Cytochrom P2C9-Bestimmung der Allelvarianten CYP2C9*2 und CYP2C9*3 wurden zu 1 ml genomischer DNA 25 µl des in Tabelle 12 aufgeführten Mastermixes hinzugefügt.

Die Geräte, Chemikalien und Substanzen sind in den Tabellen 12-13 aufgeführt.

Die Amplifikation der DNA wurde in 35 Zyklen im Thermocycler durchgeführt.

Um den Erfolg der PCR zu prüfen wurden je Probe anschließend 5 µl PCR-Produkt zu 10 µl Bromphenolblaupuffer in eine Mikrotiterplatte pipettiert und vermischt. Das gemischte Produkt wurde auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und in einer Gelelektrophorese analysiert (Elektrophorese: 30 Minuten bei 120 Volt).

CYP2C9*2-Proben mit einer 372 bp-Bande waren positiv und wurden mit Sau 961 vermischt. CYP2C9*3-Proben waren mit einer 137 bp-Bande positiv und wurden mit dem Enzym Sty I über Nacht verdaut. Die Ergebnisse wurden fotografisch festgehalten.

Ferner wurden zu jeweils 10 µl PCR-Produkt 10 µl Enzymmastermix gegeben und die Proben anschließend bei 37° Celsius über Nacht schüttelnd inkubiert. Abschließend erfolgte die Versetzung mit 10 µl Bromphenolblaupuffer.

Nach Auftragen auf ein 3,5%iges Agarosegel folgte die Analyse der Proben in einer Gelelektrophorese, deren Ergebnisse mittels digitalem Videosystem dokumentiert wurden.

Um die Validität zu überprüfen, wurden alle Genotypisierungsanalysen zweimal durchgeführt. Die Übereinstimmung beider Analysenvorgänge betrug 100%.

Chemikalien und Geräte für PCR-RFLP-Test:

In den Tabellen 12 bis 14 sind Chemikalien und Geräte sowie deren Hersteller für die PCR-RFLP-Tests dargestellt.

Chemikalien	Hersteller
PCR-Puffer	Firma Perkin Elmer
dNTPs/-Mischung	Firma MBI Fermentas
PCR-Primer (2CL1, 2CR1, C5, 2C9-6A, mep f, mep r)	Firma TIB MOLBIOL Berlin
Ampli Taq Polymerase	Perkin Elmer
Mg ₂ Cl ₂ -Lösung	Firma Perkin Elmer/Roche
Perkin Elmer Puffer	Firma Perkin Elmer
Bromphenolblaupuffer	Bromphenolblaupuffer Firma Merck
Ethidiumbromid	Firma Merck
Restriktionsendonukleasen Sty I und Sau 961	Firma MBI Fermentas, Firma New England Biolabs
Agarosegel (1% u. 3%)	Firma Gibco ultrapure/Firma Biometra
DNA-Standard: 4,5 µl 100 bp DNA-Leiter	Firma MBI Fermentas

Tab. 12: Chemikalien für die PCR-RFLP-Verfahren

Geräte	Hersteller
Thermocycler	Firma Perkin Elmer/Firma Applied
Gene Amp PCR System 9600, 9700	Biosystems
Videosystem: Eagleeye II	Firma Stratagene
Zentrifugen	Firma Eppendorf; Firma Sigma; Firma Beckmann
Inkubationsschränke	Firma Biometra
Halbautomatischer Schüttler	Firma Hofer; Firma Heidolph
Elektrophoresekammern	Firma Protrans
Elektrophorese-Spannungsgeräte	Firma Protrans

Tab. 13: Geräte für die PCR-RFLP-Verfahren

	CYP2C9*2 (Arg₁₄₄Cys)	CYP2C9*3 (Ile₃₅₉Leu)
PCR-Mastermix	10 x Perkin Elmer-Puffer 25 mM MgCl ₂ 2 mM dNTPs H2O (steril, bidest.) 10 µM Primer 2CL1 10 µM Primer 2CR1 0,15 µl AmpliTaq Polymerase	10 x Perkin Elmer-Puffer 25 mM MgCl ₂ 2 mM dNTPs H2O (steril, bidest.) 10 µM Primer 2C5 10 µM Primer 2C9-6° 0,15 µl AmpliTaq Polymerase
Cycler	<ul style="list-style-type: none"> • Initiale Denaturierung 2 min 94° Celsius • 35 Zyklen (30 sek bei 94° C, 10 sek bei 60° C und 1 min bei 72° C) • Elongationsphase (7 min bei 72° C) 	<ul style="list-style-type: none"> • Initiale Denaturierung 2 min 94° Celsius • 35 Zyklen (30 sek bei 94° C, 10 sek bei 57° C und 40 sek bei 72° C) • Beendigungsphase (7 min bei 72° C)
Enzymmastermix	1 µl Sau-961+ Puffer + aqua bidest	1 µl Sty I+ Puffer+ aqua bidest
Restriktionsenzym	Sau 961	Sty I

Tab. 14: PCR-RFLP-Tests für CYP2C9*2 und CYP2C9*3

Die Tabellen 15 und 16 geben die Ergebnisse der Gelelektrophoreseanalyse für CYP2C9*2 und *3 wieder.

Genotyp	*1/*1	*1/*2	*2/*2
Codierung	0	1	2
Muster (bp)	-	253	253
	179	179	-
	119	119	119
	74	74	-

Tab. 15: Ergebnisse der Gelelektrophoreseanalyse für CYP2C9*2 (Arg₁₄₄Cys)

Genotyp	*1/*1	*1/*3	*3/*3
Codierung	0	1	2
Muster (bp)	137	137	-
	-	104	104
	-	33	33

Tab. 16: Ergebnisse der Gelelektrophoreseanalyse für CYP2C9*3 (Ile₃₅₉Leu)

2.4. HPLC-Bestimmung zur Messung der Medikamentenspiegel

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High performance liquid chromatography, früher: High pressure liquid chromatography) ist ein chromatographisches Verfahren, das Stoffgemische entsprechend seiner hydrophilen und polaren Eigenschaften trennt.

Die HPLC-Bestimmung von S- und R-Phenprocoumon bei dieser Studie erfolgte durch die Klinische Pharmakologie des Karolinska Institutes des Huddinge Universitätsklinikums in Stockholm, Schweden sowie durch das Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Klinischen Pharmakologie des Universitätsklinikums Tübingen, Deutschland.

2.5. Urinproben

Da die Ausscheidung von Metaboliten im Urin im Allgemeinen sowohl vom Geschlecht, als auch vom Alter, Körpergewicht und körperlicher Aktivität abhängt, wurde in dieser Studie eine 12 Stundensammelurinuntersuchung durchgeführt.

Die Messung der Metabolite im Urin erfolgte nach Aufarbeitung der Urinproben mit Beta-Glukuronidase (9000 U/ml). Die Konzentrationsverhältnisse von 7'-, 6'- und 4'-Hydroxyphenprocoumon im Urin wurden anhand der 12 Stundensammelurinproben nach Phenprocoumoneinnahme am Ende des Studientages gemessen.

Sowohl die heterozygoten, als auch die homozygoten *2- und *3-Allelträgergruppen wurden mit der Wildtyp-Referenzgruppe CYP2C9*1 mittels Jonckheere-Terpstra Trend Test verglichen.

Die metabolische Ratio des Urins wurde wie folgt berechnet: Hydroxyphenprocoumon/Phenprocoumon.

2.6. Qualitätskontrolle der Analyseergebnisse

Spezifität:

Wenn das HPLC-System ohne Verfälschung die zu bestimmenden Substanzen erfasst, kann man die Arbeit des HPLC-Systems als spezifisch bezeichnen.

Um die Verfälschungsgefahr zu reduzieren, wurden die HPLC-Systeme täglich durch die verantwortlichen Analytiker geprüft. Ferner wurden verschiedene humane Leerplasma Proben vor den eigentlich durchgeführten Phenprocoumonanalysen geprüft. In dieser Studie konnten keine signifikanten Interferenzen nach Reinigung des Leerplasmas festgestellt werden.

2.7. Statistik

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe parametrischer und nichtparametrischer Tests durchgeführt.

Die Berechnung der statistischen Analysen sowie die Darstellung der graphischen Abbildungen der Mehrgruppentests erfolgte mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (Analysis of Variance, ANOVA; SPSS Version 10 Software, SPSS Inc. Chicago, IL, USA).

Unter der Annahme, dass Langsammetabolisierer etwa eine halb so große Clearance wie Schnellmetabolisierer aufweisen, erfolgte die Fallzahlabeschätzung (n).

Die aus Kinetikstudien mit der Messgröße AUC (hier als primärer Parameter definiert) und dessen Standardabweichung genommenen Daten, dienten zur Fallzahlabeschätzung.

Der nichtparametrische Kruskal-Wallis-Test wurde für den Vergleich zwischen den sechs CYP2C9-Genotypgruppen herangezogen.

Zuzüglich wurde der nichtparametrische Jonckheere-Terpstra Trend Test zur Bestimmung der genabhängigen Trends in der SPSS software Version verwendet. Der Jonckheere-Terpstra Trend Test wurde mit einem a priori definierten Trend für die CYP2C9-Genotypen festgelegt und hatte für die Enzymaktivität die Reihenfolge: CYP2C9*1/*1 > *1/*2 > *2/*2 > *1/*3 > *2/*3 > *3/*3.

Zur Berechnung und Analyse der Halbwertszeit $t_{1/2}$ wurde die WinNonlin (Version 1.5 Software, 1997 Scientific Consulting Inc., NC, USA) hinzugezogen.