

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

## **Dissertation**

# **Genetische Polymorphismen des $\mu$ -Opioidrezeptor-Gens und ihre prakti- sche Bedeutung in der Schmerztherapie**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

von  
Nikolai Stahr  
aus Görlitz

Dekan: Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich

Gutachter:      1. Prof. Dr. med. I. Roots  
                         2. Prof. Dr. med. C. Spies  
                         3. Prof. Dr. med. J. Kirchheiner

Datum der Promotion:      08.04.2011

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>6</b>
1.1	Neurophysiologische Grundlagen des Schmerzes .....	6
1.2	Opioide .....	7
1.2.1	Wirkungsweise und Wirkungen .....	7
1.2.1.1	Interindividuelle Unterschiede der Opioidwirkung .....	8
1.3	$\mu$ -Opioidrezeptor (MOR) .....	8
1.3.1	Charakterisierung der Opioidrezeptoren .....	8
1.4	Humanes $\mu$ -Opioidrezeptor-Gen (hMOR-Gen) .....	10
1.4.1	Genetische Varianten des hMOR-Gens .....	10
1.4.1.1	Codierender Abschnitt des hMOR-Gens .....	10
1.4.1.2	Nichtcodierende Abschnitte des hMOR-Gens .....	11
1.4.1.3	Die 5'-untranslatierte Region (5'-UTR) des hMOR-Gens .....	13
1.5	Zielsetzung .....	15
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>16</b>
2.1	Klinische Studie .....	16
2.1.1	Ablauf der klinischen Studie .....	16
2.1.2	Eingeschlossene Patienten .....	16
2.1.3	Befragung der Patienten.....	17
2.1.3.1	Auswertung der Fragebögen .....	18
2.1.4	Patientenauswahl für die genetische Analyse .....	19
2.1.5	Kontrollgruppe .....	19
2.2	Material.....	20
2.2.1	Untersuchungsmaterial.....	20
2.2.2	Allgemeines Labormaterial .....	20
2.3	Angewendete Methodik .....	20
2.3.1	DNA-Extraktion.....	20
2.3.2	Die Polymerase-Kettenreaktion .....	21
2.3.2.1	Die Primerauswahl .....	21
2.3.3	Gelelektrophorese .....	21
2.3.4	Sanger-Sequenzierung.....	22
2.3.5	PCR-Restriktionslängenpolymorphismen (PCR-RFLP).....	23
2.4	Durchgeführte genetische Analysen.....	23

2.4.1	Verwendete Agarosegele.....	23
2.4.2	Amplifikation der $\mu$ -Opioidrezeptor-Promotors mittels PCR.....	24
2.4.3	Amplifikation von 8 Einzelfragmenten durch Anwendung der Nested-PCR-Methodik .....	26
2.4.4	Durchführung der Sequenzierreaktion .....	27
2.4.5	Genotypisierung identifizierter Varianten im $\mu$ -Opioidrezeptor-Gen mithilfe spezifischer PCR-RFLP-Methoden.....	29
2.4.5.1	Auswertung der PCR-RFLP-Analysen.....	31
2.4.5.1.1	OPV I .....	31
2.4.5.1.2	OPV II .....	32
2.4.5.1.3	OPV III .....	33
2.5	Datenbankrecherche.....	33
2.6	Statistische Auswertung.....	34
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>35</b>
3.1	Ausgewähltes Patientenkollektiv.....	35
3.2	Das Kontrollkollektiv.....	36
3.3	Sequenzierung und Genotypisierung der Promotorregion des $\mu$ -Opioidrezeptor-Gens .....	36
3.3.1	Variante -172 G>T (rs6912029) .....	38
3.3.2	Variante -1748 G>A .....	38
3.3.3	Genetische Kopplung der Varianten -172 G>T und -1748 G>A .....	39
3.3.4	OPV III -2044 C>A .....	39
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>41</b>
4.1	Klinische Studie .....	41
4.2	Häufigkeit der identifizierten Varianten im Kontrollkollektiv im Vergleich mit Datenbank- und Studienkollektiven .....	42
4.2.1	Variante -172 G>T .....	42
4.2.2	Variante -1748 G>A .....	45
4.2.3	Variante -2044 C>A .....	46
4.3	Assoziation der untersuchten genetischen Varianten mit dem Auftreten opioidbedingter Nebenwirkungen .....	46
4.3.1	Gekoppelte Varianten -172G>T und -1748G>A.....	46
4.3.2	-2044 C>A.....	49
4.3.3	Bedeutung genetischer Varianten des $\mu$ -Opioidrezeptors für die Ausprägung opioidbedingter Wirkungen und Nebenwirkungen .....	50

4.4	Andere genetische Varianten mit Einfluss auf Morphinwirkungen und -nebenwirkungen .....	51
4.4.1	Catechol-O-Methyltransferase-Gen .....	52
4.4.2	MDR1-Gen .....	52
4.4.3	Melanocortin-1-Rezeptor-Gen .....	53
4.4.4	Cytochrom-P450 2D6-Gen .....	53
4.5	Ausblick .....	54
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>Curriculum vitae</b> .....	<b>64</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>65</b>
<b>9</b>	<b>Selbstständigkeitserklärung</b> .....	<b>66</b>

# 1 Einleitung

Schmerzen und ihre Therapie sind in Deutschland bei 6 Millionen chronischen Schmerztherapiepatienten ein bedeutender Faktor im Gesundheitswesen. Opioide und Morphin als deren wichtigster Vertreter sind heute in der Schmerztherapie die bedeutendsten Analgetika. Mit diesen Medikamenten sind allerdings 10 - 12 % der 6 Millionen chronischen Schmerztherapiepatienten nur unbefriedigend zu analgesieren [1, 2]. In der Klinik werden große interindividuelle Unterschiede im Ansprechen auf Opioide festgestellt. Die beträchtliche Variabilität der Opioidwirkung betrifft sowohl erwünschte wie unerwünschte Wirkungen, wodurch die Schmerztherapie mit Opioiden stark limitiert wird [3, 4, 5, 6].

Opioide entfalten ihre Wirkung über Rezeptoren, Veränderungen des Opioidrezeptors können dessen Funktion und damit die Opioidwirkung beeinflussen. Der  $\mu$ -Opioidrezeptor (MOR) ist der Hauptangriffspunkt für klinisch verwendete Opioide wie Morphin, Fentanyl, Heroin und Methadon [7]. Das hMOR-Gen steht deshalb im Mittelpunkt des Interesses wenn es gilt, einen genetischen Ansatz für die große Variationsbreite in der Reaktion auf Opioide zu untersuchen.

## 1.1 Neurophysiologische Grundlagen des Schmerzes

Bei Zellzerstörung als Folge einer Gewebsverletzung werden Gewebshormone wie Prostaglandine, Histamin oder Bradykinin freigesetzt. Meistens wirken diese nicht direkt, sondern fungieren als Mediatoren. Wichtige Mediatoren in der Schmerzkaskade sind die Neurotransmitter Histamin, Acetylcholin, Serotonin und Bradykinin, die in unterschiedlichem Ausmaß im Beisein von Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) am Nozizeptor des afferenten Neurons eine Schmerzempfindung auslösen können.

Schmerz wird von den Nozizeptoren über Nervenfasern Typ A- $\delta$  oder Typ C zum Hinterhorn des Rückenmarks und über den Tractus spinothalamicus entweder direkt zum Thalamus oder zuerst zum Hirnstamm und von dort zur Großhirnrinde weitergeleitet. Die Schmerzwahrnehmung findet im Thalamus, Hypothalamus, limbischen System und im Neokortex statt.

## 1.2 Opioide

In den Ablauf Rezeptorstimulation – Erregungsweiterleitung – Schmerzwahrnehmung kann pharmakologisch an mehreren Stellen eingegriffen werden. Abhängig vom Schweregrad der Schmerzen werden zu Beginn der Therapie peripher wirksame Analgetika eingesetzt. Wenn damit keine adäquate Analgesie erreicht werden kann, kommen sukzessiv zuerst zentral schwach wirksame und später zentral stark wirksame Opioide zur Anwendung. Morphin ist bei schweren Schmerzzuständen immer noch der Goldstandard. Je nach Grunderkrankung, Schmerzqualität und Nebenwirkung werden die Analgetika mit Koanalgetika und Adjuvantien kombiniert.

Der Begriff Opioide umfasst natürliche Wirkstoffe, wie Morphin und synthetisch bzw. halbsynthetisch hergestellte Derivate, die das Wirkspektrum von Morphin besitzen. Dazu gehören auch die schwach wirksamen Opioide Tramadol und Tilidin.

### 1.2.1 Wirkungsweise und Wirkungen

Sowohl exogene als auch endogene Opioide greifen an Opioidrezeptoren an; man unterscheidet die Rezeptortypen  $\mu$ ,  $\delta$  und  $\kappa$ . Diese transmembranären Rezeptoren sind an inhibitorische G-Proteine gekoppelt. Sie hemmen demzufolge die Adenylatcyclase und sekundär die cAMP-aktivierte Proteinkinase A, was wiederum zur Hemmung von Phosphorylierungsreaktionen führt. Andere Effekte, wie die Öffnung von Kaliumkanälen oder die Schließung von Calciumkanälen, werden ebenfalls durch das G-Protein vermittelt. Die daraus resultierenden Änderungen der Ionenströme vermindern die Erregbarkeit von Neuronen und die Transmitterfreisetzung aus Nervenendigungen. Lokalisiert sind sie in der Membran von Nervenzellen zentral im Gehirn und Rückenmark, peripher um Magen-Darm-Trakt und Blase.

Morphin wirkt auf verschiedenen Ebenen analgetisch. Spinal wird die synaptische Übertragung von primärafferenten Fasern zu spinothalamischen Neuronen gehemmt. Supraspinal bewirkt Morphin über eine Aktivierung deszendierender Bahnen eine Hemmung der Erregungsübertragung in der ersten Synapse des nozizeptiven Systems. Außerdem hemmt es die neuronale Aktivität thalamischer Kerne und deren Verbindung zu kortikalen Arealen. Durch Dopaminfreisetzung im Nucleus accumbens wird Euphorie ausgelöst, wobei diese Wirkung bei chronischen Schmerzpatienten ausbleibt. Durch eine Hemmung im vorderen Teil der Formatio reticularis entsteht ein sedativ-hypnotischer Effekt. Muskelrigidität tritt durch Dopaminfreisetzung im Striatum auf. Durch Hemmung

der Neuronen im Locus coeruleus wirkt es anxiolytisch. Krämpfe treten selten auf und werden über eine Aktivierung des Hypocampus verursacht. Der morphinvermittelte Temperaturabfall wird im Hypothalamus hervorgerufen. Hypophysäre Freisetzungshormone wie GRH oder CRH werden ebenfalls im Hypothalamus morphinvermittelt ausgeschüttet. Die für Morphin typische Miosis wird im Edinger-Westphal-Kern ausgelöst. Die therapeutisch wichtige Atemdepression wird einerseits durch eine verminderte CO<sub>2</sub>-Empfindlichkeit des medullären Atemzentrums hervorgerufen und andererseits durch eine Hemmung des pontinen Atemzentrums. In der schmerztherapeutischen Anwendung von Morphin wird die Atemdepression durch den Schmerz antagonisiert, der eine Stimulation der Atmung hervorruft. Durch eine Dämpfung der reflektorischen Erregbarkeit des Hustenzentrums entfaltet Morphin seine antitussive Wirkung. Bedeutende Nebenwirkungen von Morphin sind Nausea und Emesis, die transitorisch auftreten durch Stimulation der Chemorezeptoren-Triggerzone in der Medulla oblongata. Neben diesem früh einsetzenden Effekt kann Morphin aber auch eine antiemetische Wirkung aufweisen, die am medullären Brechzentrum selbst entsteht. Auf den Kreislauf wirkt sich Morphin in Form einer Orthostase und Bradykardie aus.

Peripher führt Morphin zu unerwünschten Wirkungen im Bereich von Magen-Darm-Trakt, Blase und Haut. So führt eine Tonussteigerung und Verminderung der Motilität zu einer verzögerten Magenentleerung und zu spastischer Obstipation. Durch gesteigerte Sphinkterkontraktion kommt es zu Gallenstau und Harnverhalt. Die Histaminfreisetzung aus Mastzellen führt an der Haut zu Rötung und Pruritus, in der Lunge zu Bronchokonstriktion sowie zu einem Blutdruckabfall.

### **1.2.1.1 Interindividuelle Unterschiede der Opioidwirkung**

In der klinischen Schmerztherapie mit Morphin und anderen Opioiden werden große individuelle Unterschiede bei der analgetischen Wirkung und den Nebenwirkungen beobachtet. Als mögliche Ursachen werden neben pharmakokinetischen Faktoren die genetische Variabilität des Opioidrezeptors diskutiert [3].

## **1.3 $\mu$ -Opioidrezeptor (MOR)**

### **1.3.1 Charakterisierung der Opioidrezeptoren**

Sowohl exogene als auch endogene Opioide entfalten ihre Wirkung über verschiedene Opioidrezeptoren ( $\mu$ ,  $\kappa$ ,  $\delta$ ), die mit 7 transmembranären Domänen alle zur Familie der



G-Protein-Neuropeptid-Rezeptoren gehören [8]. Sie befinden sich auf Nervenzellen und sind zentral im Gehirn und Rückenmark, peripher im Magen-Darm-Trakt und der Blase zu finden. Über eine G-Protein-gekoppelte Hemmung der Adenylatcyclase werden  $K^+$ -Kanäle geöffnet und  $Ca^{2+}$ -Kanäle geschlossen, wodurch die Freisetzung erregender Überträgerstoffe und die synaptische Übertragung beeinträchtigt wird [9]. Die geladenen transmembranären Domänen scheinen für Rezeptorfunktionen, wie Ligandenbindung oder Affinität von größerer Bedeutung zu sein, als die N- oder C-terminalen Rezeptordomänen [9].

Hauptangriffspunkt der Opiode ist jedoch der  $\mu$ -Opioidrezeptor [10, 11]. Auch die meisten Nebenwirkungen der Opiode, wie Atemdepression, Obstipation, Harnverhalt und Miosis, sind nach heutigem Wissensstand  $\mu$ -Rezeptor-vermittelt [11].

**Tabelle 1: An den einzelnen Opioidrezeptoren vermittelte Wirkung [12]**

Rezeptor-Typ	Agonisten	Antagonisten	Wirkungen
$\mu$	$\beta$ -Endorphin Morphin Pethidin Methadon Fentanyl Buprenorphin	Naloxon Naltrexon Pentazocin Nalbuphin	Analgesie Euphorie Miosis Atemdepression Erbrechen Bradykardie Obstipation
$\delta$	Leu-Enkephalin $\beta$ -Endorphin	Naloxon Naltrexon	Analgesie Verhaltensänderungen
$\kappa$	Dynorphin Pentazocin Nalbuphin	Naloxon Naltrexon	Analgesie Sedation Dysphorie

$\mu$ -Opioidrezeptoren lassen sich schon an der ersten Schaltstelle der Schmerzleitung, der Substantia gelatinosa des Rückenmarks, finden [13]. Eine dichte Anreicherung von Opioidrezeptoren findet man weiterhin im zentralen Höhlengrau, Thalamuskern, Pallidum und Teilen des limbischen Systems und Nucleus amygdalae, außerdem u. a. in der Area postrema, im Corpus striatum, im Locus coeruleus und im Nucleus dorsalis nervi vagi. Bindungsstudien in Post-mortem-Hirngewebe und In-vivo-Positronen-Emissions-Tomographien haben eine interindividuelle, um 30 – 50 % schwankende  $\mu$ -Opioidrezeptordichte beschrieben [14, 15, 16].

## 1.4 Humanes $\mu$ -Opioidrezeptor-Gen (hMOR-Gen)

Das den  $\mu$ -Opioidrezeptor (MOR) codierende Gen des Menschen liegt auf Chromosom 6q24-q25 [8, 17]. Es besteht insgesamt aus 6968 bp mit 4 Exons und 3 Introns. Die 5-regulatorische Region weist eine Haupt- und 3 Nebentranskriptionsinitiationsstellen auf, zeigt jedoch keine klassischen TATA-Boxen, sondern GRE (glucocorticoid response elements), AP-1 (activator protein 1), SP 1, Yin-Yang-1-Boxen und CRE (cAMP response elements) [17].

### 1.4.1 Genetische Varianten des hMOR-Gens

Innerhalb des hMOR-Gens wurden eine Reihe von SNPs (Single Nucleotid Polymorphisms, Einzelbasenaustausche) identifiziert. Diese könnten interindividuelle Unterschiede in der Opioidwirkung erklären [18, 19, 20].

#### 1.4.1.1 Codierender Abschnitt des hMOR-Gens

Im codierenden Abschnitt des hMOR-Gens sind bisher nur 17 SNPs bekannt. Dies ist vermutlich mit einer evolutionären Selektion der veränderten Varianten zu erklären, da hier genotypische Veränderungen erhebliche phänotypische Auswirkungen haben können. Für mehrere dieser Varianten liegen In-vitro-Untersuchungen vor [21]. Diese Studien kommen jedoch zu keinem einheitlichen Ergebnis.

So zeigte Bond *et al.* für den MOR-Rezeptor mit der Variante rs1799971 an transfizierten AV-12-Zellen eine dreimal stärkere Bindungsaffinität von  $\beta$ -Endorphin [19]. Dieses Ergebnis konnte allerdings an transfizierten HEK-293-Zellen in Studien von Befort *et al.* und Beyer *et al.* nicht reproduziert werden [22, 23]. Für die Variante im Exon 3, 802 T>C, die zu einem Aminosäureaustausch in Position 268 von Serin gegen Prolin führt, konnte Koch *et al.* in einer Zellkultur mit transfizierten HEK-293-Zellen sowohl eine verminderte Aktivierung des  $K^+$ -Kanals als auch der G-Protein-gekoppelten Adenylatcyclase zeigen [24]. In zwei Studien von Befort *et al.* und Wang *et al.* konnte dieses Ergebnis ebenfalls mit transfizierten HEK-293-Zellen bestätigt werden [22, 25]. In den zitierten Untersuchungen beobachteten Befort *et al.* auch bei MOR-Rezeptoren mit der Variante 794 G>A und Wang *et al.* bei Rezeptoren mit den Varianten 779 G>A und 794 G>A eine verminderte Signaltransduktion.

**Tabelle 2: Polymorphismen in codierenden Gensequenzen des  $\mu$ -Opioidrezeptor-Gens [26]**

Nukleotid-position	Nukleotid-austausch	Heterozygot	rs-Nummer	Aminosäure-position	Aminosäuren-austausch
58515358	G> T	0,079	rs6912029		
58515472	A >G	0,010	rs9282814		
58515492	A >C	0,029	rs9282815		
58515499	G> T	0,010	rs9282816		
58515546	T >C	0,101	rs1799972	6	Val > Ala
58515553	A >G	Nicht bestimmt	rs1799973	8	Thr > Thr
58515647	G>A	0,272	rs1799971	40	Asp >Asn
58515680	A >G	Nicht bestimmt	rs1042753	51	Asn >Asp
58515717	T >G	0,010	rs9282817	63	Val > Gly
58515726	T >C	0,010	rs9282819	66	Phe >Ser
58566164– 58566936 58515820–		verschieden	131 SNPs		
58565810		verschieden	2 SNPs		
58567072	A >G	Nicht bestimmt	rs1799974	260	His >Arg
	G>A	< 0,02		265	Arg >His
	T >C	< 0,02		268	Ser > Pro
58567170	A >G	Nicht bestimmt	rs11575856	293	Ile >Val
58567235	A >G	Nicht bestimmt	rs1799975	314	Thr > Thr
58567458– 58594666 58594714	C> T	verschieden	119 SNPs		
		Nicht bestimmt	rs11575858		

Die häufigste Variante im codierenden Bereich, 118 A>G, welche zu einem Aminosäureaustausch von Asparagin gegen Asparaginsäure in Position 40 führt, ist in verschiedenen Studien in mehreren Ethnien mit unterschiedlicher Häufigkeit nachgewiesen worden. Eine Reihe von Arbeiten untersuchte diese Variante auf eine Korrelation mit der Opioidwirkung sowie mit Opioid- und Alkoholmissbrauch [20, 27, 28, 29]. Eine eindeutige Korrelation konnte in keiner Studie nachgewiesen werden. Die weiteren genetischen Polymorphismen im codierenden Bereich des hMOR-Gens wurden bisher, aufgrund ihres selten Auftretens, nicht phänotypisch charakterisiert [26].

#### 1.4.1.2 Nichtcodierende Abschnitte des hMOR-Gens

Innerhalb der Gruppe der Intronvarianten wurde die Variante IVS2+31 mehrfach untersucht. Diese Variante unterbricht einen (A/T)GGG-Repeat im Intron 2, der eine alternative Splicingregion reguliert. In einem Kollektiv von 232 heroinabhängigen Han-Chinesen zeigten die heterozygoten Träger der Variante IVS2+31 einen signifikant hö-

heren täglichen Heroinbedarf [30]. Hingegen konnte an einem Kollektiv von 207 kaukasischen Tumorpatienten mit Morphintherapie kein Zusammenhang zwischen der Variante IVS2+31 und der Qualität der Schmerztherapie, Morphindosis und Morphinserkonzentration nachgewiesen werden [27]. Ein Vergleich von Haplotypen des  $\mu$ -Opioidrezeptor-Gens bei 137 afroamerikanischen Heroin- und Kokainabhängigen und einem 35 Afrikaner amerikanischer Herkunft umfassenden Kontrollkollektiv zeigte kein Ergebnis für die Variante IVS2+31 [20]. Eine weitere Studie untersuchte ebenfalls an heroinabhängigen Han-Chinesen die Intronvariante IVS2+691. Diese konnte im Vergleich zwischen der 200 Individuen umfassenden Studiengruppe und der 97 Individuen großen Kontrollgruppe einen signifikanten Unterschied im Auftreten des G-Allels (30,8 % versus 21,1 %) zeigen [29].

**Tabelle 3: Polymorphismen in Introns und anderen nicht codierenden Sequenzabschnitten des  $\mu$ -Opioidrezeptor-Gens [31]**

Nukleotidposition	Mutation	Referenz	Frequenz	Ethnie	Lokalisation
IVS2+31	G → A	[20]	14 %	AA	Intron 2
IVS2+106	T → C	[20]	1 %	AA	Intron 2
IVS2+397	T → A	[20]	1 %	AA	Intron 2
IVS2+438	G → A	[20]	4 %	AA	Intron 2
IVS2+480	T → C	[20]	< 1 %	AA	Intron 2
VS2+534	C → T	[20]	< 1 %	AA	Intron 2
IVS2+691	C → G	[18]	43 %	Verschieden <sup>1</sup>	Intron 2
		[20]	43-50 %	AA	
IVS3+37	A → C	[20]	< 1 %	AA	Intron 3
24	G → A	[19]	2 %	Verschieden <sup>2</sup>	Silent SNP
942	G → A	[19]	< 1 %	Verschieden <sup>2</sup>	Silent SNP
1401	G → C	[20]	3 %	AA	3'-untranslated region

AA : Amerikaner kaukasischer Abstammung

1 : 100 Amerikaner kaukasischer Abstammung, 324 Europäer kaukasischer Abstammung und 367 Nachfahren amerikanischer Ureinwohner  
 2 : 52 Amerikaner kaukasischer Abstammung, 67 Amerikaner lateinamerikanischer bzw. spanischer Abstammung, 31 Amerikaner afrikanischer Abstammung, 1 Nachfahre amerikanischer Ureinwohner, 1 anderer

Weitere Assoziationen von SNPs in intronischen und nichttranslatierten Sequenzen wurden nicht publiziert [26].

### 1.4.1.3 Die 5'-untranslatierte Region (5'-UTR) des hMOR-Gens

Die 5'-UTR des hMOR-Gens wurde erstmals 1997 vollständig analysiert. In dieser Untersuchung konnten mehrere Regionen innerhalb der 5'-UTR identifiziert werden, die für die Transkriptionsregulation des hMOR-Gens von Bedeutung zu sein scheinen. Es wurden eine Haupt- und drei Nebentranskriptionsinitiationsstellen 216, 285, 358 und 373bp oberhalb des Transkriptionsstartes gefunden sowie mehrere potentielle Bindungsstellen von Transkriptionsregulationsfaktoren, wie GRE, Aktivator-Protein 1 und cAMP sowie eine Ying-Yang-Box [17]. An humanen T-Zellen konnte weiterhin gezeigt werden, dass Interleukin 4 die Regulation der Transkription über eine STAT6-Bindungsstelle in Nukleotidposition -997 beeinflusst [32]. In weiteren Untersuchungen der 5'-UTR sind bislang mit 37 Varianten die meisten Polymorphismen entdeckt worden. Dabei handelt es sich - bis auf die 3bp-Deletion in Position -665 - um SNPs.

Diese zeigen zumeist eine niedrige Allelfrequenz, wobei die Variante -172 G>T mit 11 % am häufigsten auftritt.

Nahe der Bindungsstelle von STAT 6 (siehe oben) konnte der SNP 995 C>A (siehe Tabelle 4) identifiziert werden, der möglicherweise die Funktion der Transkriptionsfaktorbindungsstelle beeinträchtigt [26]. Bislang fehlen dazu allerdings noch Untersuchungen.

In sechs klinischen Studien wurden bisher Assoziationen zu den Varianten der 5'-Promotorregion des hMOR-Gens untersucht [21]. In zwei dieser Studien wurde an afroamerikanischen bzw. kaukasischen Kollektiven von Drogenabhängigen eine Haplotypenanalyse des hMOR-Promotors durchgeführt. Diese Studien kommen allerdings zu keinem übereinstimmenden Ergebnis. So wurde eine Assoziation zwischen Drogenabhängigkeit bei 250 Heroin- und Kokainsüchtigen zu Haplotypen des Promotors, welche die Varianten -1793 T>A, -1699insT, -1320 A>G und -111 C>T tragen, hergestellt [20]. Eine weitere Studie zu Opioid-, Kokain- und Alkoholabhängigkeit an einem 248 afroamerikanische Individuen umfassenden Patientenkollektiv konnte diese Assoziation nicht bestätigen, zeigt allerdings für ein kaukasisches Kollektiv von 309 Drogenabhängigen eine Korrelation zwischen Alkohol- und Opioidabhängigkeit und dem SNP -2044 C>A allein sowie zu Haplotypen, die diesen SNP tragen [33].

**Tabelle 4: Polymorphismen in der 5'-UTR des  $\mu$ -Opioidrezeptor-Gens [31]**

Nukleotidposition	RS-Nummer	Frequenz	Ethnie	Referenz
-2413 A>G		< 1 %	AA	[20]
-2358 G>A		< 1 %	AA	[20]
-2312 C>A		< 1 %	AA	[20]
-2217 C>T	rs12205356			
-2078 A>G	rs17174628	< 1 %	AA	[20]
-2044 C>A	rs17180961	< 1 %	AA	[20]
-1793 A>T	rs17180968	1 %	AA	[20]
-1748 G>A	rs12205732	3 %	AA	[20]
-1699 Ins T	rs17180982	1 %	AA	[20]
-1595 T>C		< 1 %	AA	[20]
-1565 T>C		< 1 %	AA	[20]
-1469 T>C		4 %	AA	[20]
-1320 A>G	rs17174629	1 %	AA	[20]
-1255 A>T		< 1 %	AA	[20]
-1236 A>G		< 1 %	AA	[20]
-1171 A>G	rs17174630	< 1 %	AA	[20]
-1081 C>T	rs17174632			
-1045 A>G		1 %	AA	[20]
-995 C>G		< 1 %	AA	[20]
-905 A>G	rs17174634			
-692 C>G	rs17180989	4 %	AA	[20]
-665 Deletion 3bp		< 1 %	AA	[20]
-554 G>A		< 1 %	AA	[20]
-523 A>G	rs17180996			
-502 A>C	rs9384173			
-488 G>T		< 1 %	AA	[20]
-254 A>C		< 1 %	AA	[20]
-236 A>G	rs17181003	< 1 %	AA	[20]
-172 G>T	rs6912029	11 %	AA	[20]
-162 C>G	rs17174636			
-133 C>T		< 1 %	AA	[20]
-111 C>T	rs17174638	1 %	AA	[20]
-58 A>G	rs9282814			
-38 A>C	rs9282815	1 %	AA	[20]
- 31 G>T	rs9282816			

AA: Amerikaner kaukasischer Abstammung

Zwei Studien untersuchten an Kaukasiern einzelne SNPs und deren Assoziation zu Alkoholabhängigkeit und Morphinwirksamkeit. Dabei konnte bei 327 Alkoholabhängigen für die in der 5'-UTR gelegenen SNPs -172 G>T, -111 C>T und -38 C>A keine Korrelation gefunden werden [28]. Einen Zusammenhang zwischen Qualität der Schmerztherapie, Morphindosis und Morphinserumkonzentration zu der Promotorvariante -172 G>T

konnte eine Studie an 206 kaukasischen Schmerztherapiepatienten nicht nachweisen [34]. Ergebnisse aus klinischen Studien, die eindeutige Zusammenhänge zwischen den genetischen Varianten im Promotor des hMOR-Gens und den erwünschten sowie den häufigen unerwünschten Wirkungen der Opiode zeigen, fehlen bisher jedoch weitgehend. Eine Ausnahme bildet eine Arbeit, die für den SNP –2044 C>A einen möglichen Zusammenhang mit Alkohol- und Opioidabhängigkeit beschreibt [33]. Jedoch ist der Promotor des hMOR-Gens gerade aufgrund seiner gut erforschten, für die Transkription so wichtigen Funktion und der hohen genetischen Varianz ein Genabschnitt, der eine deutliche phänotypische Ausprägung der einzelnen Varianten verspricht und somit als Ziel dieser pharmakogenetischen Studie ausgewählt wurde.

### **1.5 Zielsetzung**

Opioidwirkungen, erwünschte wie unerwünschte, weisen interindividuell eine große Variabilität auf. Sie werden über Rezeptoren vermittelt, deren wichtigster der  $\mu$ -Opioidrezeptor ist. Das hMOR-Gen spielt deshalb als Kandidatengen bei der Untersuchung genetisch bedingter Reaktionsunterschiede eine herausragende Rolle. Im hMOR-Gen sind eine Reihe von Varianten bekannt, von denen einige möglicherweise funktionelle Bedeutung haben.

Diese Arbeit untersucht, inwieweit sich ein Zusammenhang herstellen lässt zwischen genetischen Varianten im hMOR-Promotor und dem Auftreten unerwünschter Opioidwirkungen. Zu diesem Zweck wurde bei Patienten mit ausgeprägten Nebenwirkungen (Übelkeit, Erbrechen, Obstipation) die Nukleotid-Sequenz der 5'-UTR des hMOR-Gens mittels Sangersequenzierung vollständig analysiert. Anschließend wurden die identifizierten genetischen Varianten in einem größeren Kontrollkollektiv untersucht. Hierzu war es erforderlich, PCR-RFLP-Assays zur Einzelgenotypisierung der gefundenen Varianten zu entwickeln, um eine größere Anzahl von Individuen untersuchen zu können.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Klinische Studie**

Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen genetischen Varianten im Promotorbereich des hMOR-Gens und dem Auftreten von opioidabhängigen Nebenwirkungen wurde eine prospektive klinische Studie durch das Institut für Klinische Pharmakologie der Charité konzipiert. Die Durchführung erfolgte nach der Zustimmung der lokalen Ethikkommission unter der Leitung von Dr. R. Kaiser in Zusammenarbeit mit der Klinik für Anästhesiologie. Die Untersuchung wurde in Übereinstimmung mit den Richtlinien der *Good Clinical Practice* durchgeführt. In die Studie wurden nur Patienten eingeschlossen, die in schmerztherapeutischer Behandlung mit Opioiden waren. Aus diesem Kollektiv wurden durch eine standardisierte Befragung die Patienten ausgewählt, welche ein auffällig schweres Nebenwirkungsprofil aufwiesen. Die genetischen Varianten im Promotorbereich des hMOR-Gens wurden in dieser Untergruppe mittels DNA-Sequenzierung nach Sanger analysiert. Die Frequenz der so identifizierten Varianten wurde im Anschluss durch PCR-RFLP in einer populationsgenetischen Stichprobe kaukasischer Individuen ermittelt. Diese Allelfrequenzen dienten, zusammen mit weiteren populationsgenetischen Datensätzen aus öffentlichen Datenbanken, als Vergleichs- und Kontrollgruppe.

#### **2.1.1 Ablauf der klinischen Studie**

Die beschriebene prospektive, klinische Studie wurde vom Mai 1999 bis Februar 2000 in der Schmerzambulanz der Universitätsklinik Charité durchgeführt. Für die genetische Analyse erfolgte die einmalige Abnahme von 10 ml venösem Vollblut zur Gewinnung genomischer DNA aus peripheren Leukozyten. Durch eine standardisierte Patientenbefragung wurden gezielt die Nebenwirkungen der Opioidtherapie erfasst. Die Schwere der Nebenwirkungen wurde in zwei Befragungen (Erst- und Folgebefragung) vor und nach einer Erhöhung der Opioiddosis dokumentiert. Zwischen den Befragungen lag ein Zeitraum von einer Woche.

#### **2.1.2 Eingeschlossene Patienten**

Es wurden 99 Patienten eingeschlossen, die aufgrund einer Schmerzsymptomatik unterschiedlicher Genese mit oralen Opioidanalgetika behandelt wurden. Die Patienten wurden stationär und ambulant in der Klinik für Anästhesiologie der Charité betreut. Alle



Patienten wurden schriftlich und mündlich aufgeklärt und gaben schriftlich ihr Einverständnis zur Teilnahme an dieser Studie. Bei der Auswahl der Patienten kamen folgende Ein- und Ausschlusskriterien zur Anwendung:

**Einschlusskriterien:**

Alter > 18 Jahre

Erstmalige Behandlung mit oralen Opioiden bzw. Erhöhung der Opioiddosis bei unzureichendem Therapieerfolg

**Ausschlusskriterien:**

Schwangere und Stillende

Obstruktive und entzündliche Darmerkrankungen

Anus praeter

Nieren- und Leberinsuffizienz

Prostatahyperplasie und Harninkontinenz

ZNS-Tumoren und -Metastasen

Psychiatrische Erkrankungen

Patienten mit Opioidpumpen.

**2.1.3 Befragung der Patienten**

Die Befragung der Patienten wurde zu zwei verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Diese wurden so gewählt, dass in der dazwischen liegenden Zeitspanne sowohl die Schmerzmittelwirkung als auch das Auftreten von Nebenwirkungen erfasst werden konnten. Die Daten der Patienten wurden zum ersten Mal am Tag der Neueinstellung bzw. der Dosiserhöhung der bisher verabreichten Opioide mit einem standardisierten Fragebogen (Erstbefragung) erhoben. Zusätzlich wurden unter Einhaltung des Datenschutzes mit einem Erhebungsfragebogen Daten zur Person, Sozialstatus, Grunderkrankung und Schmerzqualität sowie bisherige Therapien erfasst. Eine Woche später fand mit dem standardisierten Fragebogen der Erstbefragung die Folgebefragung statt.

Die Befragung wurde in Form eines standardisierten Einzelinterviews in mündlicher und schriftlicher Form durchgeführt und durch Informationen aus der Patientenakte (z. B. Tumorstaging) ergänzt. Der Fragebogen wurde nach dem bisherigen Standard der Schmerztherapie entworfen und enthielt qualitative und quantitative Fragen [35].

Der schriftliche Teil der Erst- und Folgebefragung gliederte sich in zwei Abschnitte plus eine offene Einleitungs- bzw. Kontaktfrage zur Selbsteinschätzung der Lebensqualität der Patienten [36]. Im ersten Abschnitt wurden mittels der visuellen Analogskala (VAS) fünf Fragen zur Schmerzanamnese gestellt. Die VAS ist eine graphische Rating-Skala, die sehr sensitiv und valide ist und in der Beurteilung von Schmerzen in der Schmerztherapie am häufigsten als Standard eingesetzt wird [35, 37, 38, 39, 40, 41, 42]. Im zweiten Abschnitt wurden die Nebenwirkungen der Schmerztherapie mittels qualitativer und quantitativer Fragen erfasst. Diese boten als Antwortmöglichkeit entweder die VAS, eine Ja/Nein-Alternative oder eine quantitative Angabe. Die letzte Frage war wieder eine offen gestellte Frage zur allgemeinen Erhebung der Gegebenheiten, die dem Patienten im Zusammenhang mit der Schmerztherapie wichtig erschienen.

### **2.1.3.1 Auswertung der Fragebögen**

Die Patienten gaben auf der VAS eine Beurteilung ihrer Schmerzen an. Die VAS war 17cm lang und ansteigend von rechts außen „kein Schmerz“ bis links außen „extrem starker Schmerz“ eingeteilt. Die Patienten machten nach ihrer Einschätzung der Schmerzen eine Markierung auf dieser Skala, deren Abstand vom Nullpunkt links in Zentimetern in eine Prozentangabe konvertiert wurde ( $X \text{ cm} \times 100/17 \text{ cm}$ ). Zur Einschätzung der Schmerzen wurden aus den ermittelten Prozentangaben drei Schmerzkategorien je Befragungszeitpunkt und Ruhe- bzw. Bewegungsschmerz gebildet : mild (0-30 % der VAS), moderat (31-69 % der VAS) und schwer (70-100 % der VAS) [43].

Um den analgetische Effekt von Morphin zu ermitteln, wurde aus den VAS-Angaben der Patienten (in Prozent) der Erst- (E) und Folgebefragung (F) eine Differenz (E-F) gebildet, wobei die Angaben aus der Erstbefragung als Ausgangswert dienten.

Morphininduzierte Nebenwirkungen wurden nach Neuauftreten oder Verschlechterung beurteilt.

Die Patienten konnten auf einer Global-Impression-Skala (GIS) ihre subjektive Einschätzung der Besserung angeben [42, 44].

Zur Analyse einer klinisch relevanten Besserung diente eine Einschätzung nach der GIS [44]. Dafür wurde die Angabe der Folgebefragung als Prozentangabe der Angabe der Erstbefragung wiedergegeben (Angabe Folgebefragung x 100/Angabe Erstbefragung). Werte von 0-70 % wurden als klinisch relevante Besserung eingestuft. Damit wurde eine 30 %ige Besserung als Grenzwert angesehen. Anhand dieser Berechnung wurden die Patienten in zwei Gruppen aufgeteilt:

klinisch relevante Besserung = 0 – 70 % des Ausgangswertes der Erstbefragung

keine klinisch relevante Besserung = über 70 % des Ausgangswertes der Erstbefragung.

#### **2.1.4 Patientenauswahl für die genetische Analyse**

Basierend auf den Daten aus der standardisierten Patientenbefragung erfolgte die Auswahl der Studienteilnehmer für die genetische Analyse. Alle in diese Subgruppe eingeschlossenen Patienten zeigten im Verlauf ihrer Schmerztherapie schwere unerwünschte Opioidwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen und Verstopfung. Diese wurden entweder bereits in der Erstbefragung angegeben oder traten während der Therapieanpassung auf und wurden dann durch die Folgebefragung dokumentiert.

Insgesamt wurden 29 Individuen aufgenommen. Dabei handelte es sich um 12 Frauen und 17 Männer kaukasischer Abstammung. Das Alter der eingeschlossenen Patienten lag zwischen 28 und 80 Jahren. Die DNA-Proben dieser selektierten Patienten wurden auf genetische Varianten im hMOR-Promotor untersucht.

#### **2.1.5 Kontrollgruppe**

Als Vergleich zu den ausgewählten klinischen Fällen wurde durch das Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Charité eine populationsgenetische Stichprobe als Kontrollgruppe zusammengestellt. Die Teilnehmer wurden aus der Probandendatenbank des Institutes ausgewählt und gaben nach schriftlicher und mündlicher Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis zur Durchführung pharmakogenetischer Untersuchungen. Es handelt sich um 103 weibliche und 103 männliche Individuen kaukasischer Abstammung. Die Kontrollgruppe diente zur Ermittlung der Allelfrequenz der analysierten genetischen Varianten des hMOR-Promotors in der kaukasischen Ethnie.

## **2.2 Material**

### **2.2.1 Untersuchungsmaterial**

Zur Gewinnung der für die genetischen Analysen benötigten DNA-Proben wurde den eingeschlossenen Patienten einmalig 10 ml venöses Blut abgenommen. Die Abnahme erfolgte in EDTA-Monovetten (Sarstedt). Das Probenmaterial wurde umgehend bei - 20°C eingelagert und bis zur späteren Extraktion der DNA aufbewahrt.

### **2.2.2 Allgemeines Labormaterial**

Die Standard-Laborgefäße sowie Plastikröhrchen verschiedener Größe stammen von Fa. Sarstedt (Nürmbrecht) und Fa. Greiner (Nürtingen). Die bei der PCR eingesetzten Gefäße mit einem Volumen von 0,2 ml stammen von der Fa. Abgene (Hamburg).

Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) und Fluka (Taufkirchen), sofern im Methodenteil nicht anders vermerkt, bezogen.

Spezielle Geräte, die für die Durchführung von Versuchen von Bedeutung sind, werden bei der Beschreibung der Methoden im Text vermerkt. Im Übrigen wurde die Standardausstattung eines molekulargenetischen Labors genutzt.

## **2.3 Angewendete Methodik**

Neben der DNA-Extraktion kamen vier molekularbiologische Methoden zur Sequenzierung und Genotypisierung zum Einsatz:

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Gelelektrophorese

Sanger-Sequenzierung

Analyse mittels Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP).

### **2.3.1 DNA-Extraktion**

Mit Hilfe der Phenol-/Chloroform-Methode wurde aus je 5 ml des gewonnenen Vollblutes die DNA der kernhaltigen Leukozyten extrahiert [45]. Alle DNA-Proben wurden einer photometrischen (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg) Qualitätskontrolle und Quantifizierung unterzogen und auf einen einheitlichen Gehalt von 30 µg/ml DNA eingestellt. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei 4°C.

### 2.3.2 Die Polymerase-Kettenreaktion

Alle in dieser Arbeit angewendeten Methoden basieren auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die PCR erlaubt die selektive und spezifische Amplifikation eines ausgewählten Sequenzabschnittes. Der zu amplifizierende Sequenzabschnitt wird durch kurze, einzelsträngige Oligonukleotide (Primer) begrenzt. Diese binden an komplementäre Abschnitte einzelsträngiger DNA-Fragmente. Ausgehend vom 3'-Ende der hybridisierten Primer erfolgt die Synthese eines zum vorliegenden DNA-Fragment revers-komplementären Einzelstranges. Die Polymerisationsreaktion erfolgt als zellfreies Verfahren mithilfe rekombinanter DNA-Polymerasen. Der gesamte Vorgang wird über ein zyklisch ablaufendes Inkubationsprofil gesteuert, welches sich aus drei Arbeitsschritten zusammensetzt. Einer initialen Denaturierung folgt die *Annealing*-Phase, in der die Primer auf einzelsträngigen DNA-Fragmenten hybridisieren. Während der Elongation erfolgt Polymerisationsreaktion unter Verbrauch der dem Reaktionsansatz zugesetzten Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTP). Durch die zyklische Wiederholung des Ablaufs wächst die Anzahl der synthetisierten Sequenzfragmente exponentiell. Entscheidend für die Spezifität einer PCR-Reaktion sind: 1. die ausgewählten Primer, 2. die Temperaturführung und 3. die Konzentration der Zusatzstoffe und Reagenzien.

#### 2.3.2.1 Die Primerauswahl

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden entweder unverändert der zugrunde liegenden Literatur entnommen oder nach den gegebenen Anforderungen im Rahmen dieser Arbeit entwickelt. Um die fehlerhafte Amplifikation zusätzlicher homologer DNA-Abschnitten in den durchgeführten Reaktionsansätzen zu vermeiden, wurden die verwendeten Primer auf ihre Gen- bzw. Locuspezifität untersucht. Die Überprüfung von Sequenzhomologien der amplifizierten DNA-Abschnitte mit weiteren Sequenzregionen im humanen Genom erfolgte mittels BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, frei verfügbar unter [www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST)). Nur gen- bzw. locuspezifische Primer kamen in den durchgeführten PCR-Reaktionen zum Einsatz. Sämtliche in der Arbeit verwendeten Primer wurden von TiB-Molbiol (Berlin, Germany) bezogen.

### 2.3.3 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist ein elektrochemisches Verfahren zur Auftrennung von Substraten nach Molekülgröße. Die zu trennenden Moleküle (in diesem Fall PCR-Produkte) werden in einer Matrix einem elektrischen Feld ausgesetzt. Entsprechend ihrer Ladung

wandern DNA-Fragmente in Richtung Kathode. Die Geschwindigkeit der Migration ist umgekehrt proportional zur Molekülgröße. Der Größenausschluss erfolgt durch Poren in der verwendeten Matrix.

Die Analyse erfolgt optisch durch spezifische Anfärbung der untersuchten Substratmoleküle. Für die Anfärbung von PCR-Fragmenten kommen Farbstoffe zum Einsatz, die eingelagert in DNA-Molekülen, einen Fluoreszenzeffekt aufweisen. Durch Anregung mit Licht mit geeigneter Wellenlänge erscheinen die Bereiche des Gels mit hohen Konzentrationen von DNA und Farbstoff als helle Flächen. Die Gebiete des Gels, welche keine hohen DNA-Konzentrationen aufweisen, zeigen kaum Fluoreszenz. Die so erkennbaren *Banden* werden mit Videodokumentationssystemen aufgezeichnet. Zur Abschätzung der Molekülgröße werden in jeder Elektrophorese so genannte *DNA-Längenstandards* mit Fragmenten definierter Länge mitgeführt.

#### **2.3.4 Sanger-Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierung nach Sanger ist eine Methode zur Bestimmung der Nukleotidsequenz eines ausgewählten DNA-Abschnitts. Sie ist in ihrem Ablauf ähnlich der PCR, unterscheidet sich jedoch in wesentlichen Punkten. Da nur ein Primer eingesetzt wird, kommt es nicht zur exponentiellen Amplifikation eines Sequenzabschnittes. Auch entstehen deshalb nur einzelsträngige DNA-Fragmente. Dem Reaktionsansatz werden, neben den ebenfalls in der PCR verwendeten dNTPs, auch Didesoxynucleosidtriphosphate (ddNTP) zugesetzt. DdNTP besitzen keine 3'-Hydroxy-Gruppe. Wird ein derartiger Nukleotidbaustein in ein Fragment eingebaut, kann kein weiterer Nukleotidbaustein ergänzt werden. Es kommt an dieser Stelle zu einem definierten Abbruch der Polymerisationsreaktion. Die eingesetzten ddNTPs sind darüber hinaus mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt. Bei dem eingesetzten Verfahren werden ddNTPs für alle vier Nucleotidbasen einem Reaktionsansatz beigegeben. Die Unterscheidung erfolgt durch die jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe. Diese weisen vier unterschiedliche Emissionswellenlängen auf. Die Auftrennung nach Fragmentlängen erfolgt wieder nach dem bereits beschriebenen Prinzipien der Elektrophorese (siehe 2.3.3). Die elektrophoretische Auftrennung, Fluoreszenzdetektion und Datenanalyse wurde in automatischen Sequenziergeräten, *ABI Prism 310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Darmstadt), durchgeführt.

### **2.3.5 PCR-Restriktionslängenpolymorphismen (PCR-RFLP)**

Die PCR-RFLP-Methodik dient zur Analyse einzelner genetischer Varianten. Mit ihrer Hilfe können z. B. SNPs, aber auch Deletionen und Insertionen nachgewiesen werden. Zunächst erfolgt die PCR-Amplifikation (siehe 2.3.2) eines DNA-Abschnittes, der die zu untersuchende Position beinhaltet.

Diese PCR-Produkte werden im Anschluss mit geeigneten DNA-Endonukleasen versetzt. Die genutzte Endonuklease wird für den jeweiligen Assay so ausgewählt, dass nur eines der vorliegenden Allele die komplette Erkennungssequenz enthält. Somit kommt es zur spezifischen Fragmentierung der PCR-Replifikate eines der zu detektierenden Allele.

Die resultierenden PCR- bzw. RFLP-Fragmente werden mithilfe der Gelelektrophorese (siehe 2.3.3 Gelelektrophorese) analysiert.

## **2.4 Durchgeführte genetische Analysen**

Um die Varianten im Promotorbereich des  $\mu$ -Opioidrezeptors möglichst vollständig zu erfassen, wurde die Sequenzanalyse nach Sanger als Analysenmethode gewählt (siehe 2.3.4). Im Anschluss an die DNA-Extraktion aus peripheren Leukozyten erfolgte zunächst die Amplifikation eines PCR-Fragmentes, das den gesamten Sequenzbereich des  $\mu$ -Opioidrezeptors beinhaltet. Dieses PCR-Produkt diente als Template für die Amplifikation von acht kürzeren Fragmenten (nested-PCR). Im Anschluss erfolgte die bidirektionale Sequenzierung dieser PCR-Fragmente. Zur Analyse der identifizierten genetischen Varianten wurden PCR-RFLP-Assays entwickelt. Diese dienten zur Validierung der Ergebnisse aus der Sangersequenzierung und zur Analyse der Kontrollgruppe.

### **2.4.1 Verwendete Agarosegele**

In dieser Arbeit kamen ausschließlich Agarosegele für die elektrophoretische Analyse zum Einsatz. Zur Präparation wurde der ebenfalls als Laufpuffer eingesetzte TBE-Puffer (siehe Tabelle 5) genutzt. Nach Zugabe der verwendeten Agarose, *Agarose Molecular Biology Grade* (Eurogentec, Köln bzw. Qualex Gold® Agarose, Hybaid, Egelsbach) wurde der Ansatz solange erhitzt, bis keine Blasenbildung mehr erkennbar war. Im Anschluss wurde der Ansatz in einen geeigneten Gießstand (z. B.: Protranz GE-D3-16) eingebracht und abgekühlt. Die eingesetzte Agarosekonzentration ist in den betreffenden Reaktionsbeschreibungen gesondert aufgeführt. Das Untersuchungsmaterial wurde

nach vorheriger Mischung mit *Bromphenolblau-Laufpuffer* (siehe Tabelle 5) in die vorgesehene Geltasche eingebracht.

**Tabelle 5: Gelelektrophorese, verwendete Puffer und Lösungen**

TBE-Puffer	90 mM	Tris
	90 mM	Borsäure
	2,5 mM	EDTA
Bromphenolblau-Laufpuffer	0,25 %	Bromphenolblau
	15 %	Ficoll
		in TBE-Puffer

Alle Auftrennungen erfolgten in einem elektrischen Feld von 120 V. Zur Anfärbung wurde ausschließlich *GelStar® Nucleic Acid Stain* (Cambrex Bio Science, Rockland, USA) genutzt. Die eingesetzten *DNA-Längenstandards* werden ebenfalls in den betreffenden Reaktionsbeschreibungen gesondert aufgeführt. Die Geldokumentation erfolgte mithilfe eines Videodokumentationssystems vom Typ Eagle Eye II (Stratagene, Germany).

#### 2.4.2 Amplifikation der $\mu$ -Opioidrezeptor-Promotors mittels PCR

Für die Durchführung der Sequenzanalyse erfolgte zunächst die Amplifikation eines 3718 Basenpaar langen PCR-Fragmentes, das die komplette Promotorsequenz des  $\mu$ -Opioidrezeptor-Gens beinhaltet (Tabelle 6).

**Tabelle 6: Oligonukleotidprimer zur Amplifikation der  $\mu$ -Opioidrezeptor-Regulationssequenz**

Reaktion	sense		antisense	
	Primer	Oligonukleotid	Primer	Oligonukleotid
Long-Term PCR	OP-1-1	5'- CCC TTA ggA ACC TTA TTA C	OP-1-2	5'- gCC CTC TTT gCT CAg TAT AAg

Bei der Amplifikation von PCR-Fragmenten mit einer Länge > 850 bp ist die hohe Fehler-rate (1 pro 500 bp) der Taq-DNA-Polymerase zu beachten. Für die Amplifikation von PCR-Fragmenten > 850 bp ist der Zusatz einer DNA-Polymerase mit Korrekturlesefunktion (prove-reading activity) erforderlich. Deshalb kam hier ein Gemisch aus Taq-Polymerase (Rapidozym Berlin, Deutschland) und Pwo-Polymerase zum Einsatz (siehe Tabelle 7). Die Pwo-Polymerase verfügt im Gegensatz zu Taq-Polymerase über eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität und ist in der Lage, fehlerhaft eingebaute Basen auszutauschen [46].



**Tabelle 7: PCR-Ansatz für die Amplifikation von langen Fragmenten >850 bp mittel eines Gemisches aus Taq- und Pwo-Polymerase**

PCR-Ansatz für lange Fragmente (25 µl Gesamtvolumen)	
2,7µl	Expand-long PCR-Puffer 1 (Roche, Penzberg)
6,25µl	dNTPs
0,75µl	Sense-Primer OP-1-1
0,75µl	Antisense-Primer OP-1-2
5 µl	genomische DNA
0,35µl	Biotherm Taq-Polymerase (Rapidozym, Berlin)
1,5 µl	Pwo-Polymerase (Rapidozym, Berlin)

In den ersten 10 Inkubationszyklen der PCR wurde die Annealingtemperatur jeweils um 1° C gesenkt. In den sich anschließenden Inkubationszyklen bleibt die Annealingtemperatur konstant (siehe Tabelle 8). Dieses 'Touchdown'-Protokoll ermöglicht durch die hohe Anfangstemperatur eine spezifische Primeranlagerung zu Beginn und im weiteren Verlauf eine effiziente Synthese der gewünschten PCR-Produkte.

**Tabelle 8: 'Touchdown'-PCR zur Amplifikation der 3718 bp langen Promotorsequenz des µ-Opioidrezeptor-Gens**

Temperatur (°C)	Zeit (sek)		Zyklenanzahl
94	120	Denaturierung	1
59 (-1°C pro Zyklus)	30	Annealing	
68	360	Elongation	10
96	15	Denaturierung	
49	30	Annealing	
68	360	Elongation	25
96	15	Denaturierung	
68	360	terminale Elongation	1

Die Inkubation dieses und aller folgenden PCR- und Sequenzieransätze erfolgte in einem PCR-Cycler vom Typ GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). Die Qualitätskontrolle der amplifizierten PCR-Fragmente erfolgte durch eine Gelelektrophorese in einem 1,0 % Agarosegel für 1 ¾ h (siehe 2.3.3).

### 2.4.3 Amplifikation von 8 Einzelfragmenten durch Anwendung der Nested-PCR-Methodik

Die für diese Untersuchung zur Verfügung stehende Sequenziertechnologien ermöglichte lediglich die Analyse von Einzelfragmenten bis zu einer Länge von 400 bp. Daher und um die Spezifität sowie die Signalintensität der Sequenzanalyse zu erhöhen, kam die Nested-PCR-Methodik zum Einsatz. Als DNA-Matrize diente das zuvor amplifizierte PCR-Produkt, welches die gesamte Promotorregion des untersuchten Gens beinhaltet (siehe 2.4.1). Durch den Einsatz von 16 PCR-Primern wurden insgesamt acht sich überlappende Fragmente mit einer Größe von 545 – 762 Basenpaaren (siehe Tabelle 9) amplifiziert.

**Tabelle 9: Primer für die Amplifikation von Einzelfragmenten durch Nested-PCR-Methodik**

Reaktion	sense		Antisense	
	Primer	Oligonukleotid	Primer	Oligonukleotid
1	OP-P1-1	5'- Agg AAC CTT ATT ACg	OP-P1-4.1	5'- CCT TAC CAC TAT ATT TCA TAT
2	OP-P1-5	5'- AAA ggA CTC AgA ACT	OP-P1-8	5'- CCA TAA ACA TTg AAA ATA CA
3	OP-P1-7	5'- ACA TC CAg gCA gAC AgA TTT	OP-P1-10	5'- ggC ATC CAg TAA AgT CAA C
4	OP-P1-9	5'- CCT CCC TgC TCC CTg	OP-P1-12	5'- ggg ggA CAC ACA ATT TTC TT
5	OP-P1-	5'- ATC gAg gAA gTC TTC	OP-P1-14	5'- TCC CAC CTT AgT AgT TCA C
6	OP-P1-	5'- ATT ggA gAA ACA TTA	OP-P1-16	5'- ggg gCT ggg TgC Tgg ggA g
7	OP-P1-	5'- gCC CAC gCT CCC CTC	OP-P1-18	5'- CTC CCC TCT TTC ATC CTC CC
8	OP-P1-	5'- Tgg CgT ACT CAA gTT	OP-P1-20	5'- CgC TCC Aag TCT ATg CTA

Die Amplifikation erfolgte in einem Standardansatz mit einer nativen Taq-DNA-Polymerase (siehe Tabelle 10).

**Tabelle 10: PCR-Ansatz zur Amplifikation von Fragmenten <850 bp**

PCR-Ansatz (22 µl Gesamtvolumen)	
2,0 µl	10*GeneCraft-Puffer
X mM	Mg <sup>2+</sup> (reaktionsspezifisch, siehe Tabelle 11)
2,0 µl	dNTP
0,5 µl	Sense-Primer
0,5 µl	Antisense-Primer
1,0 µl	Voramplifikat
0,2 µl	Biotherm Taq-Polymerase (Rapidozym, Berlin)

Für jede Einzelreaktion wurde ein optimales Inkubationsprofil und die spezifische Mg<sup>2+</sup>-Konzentration ermittelt (siehe Tabelle 11 und 12).

**Tabelle 11: Reaktionsspezifische Magnesiumkonzentration und Annealingtemperaturen**

Reaktion	Mg <sup>2+</sup> (50 mM) in $\mu$ l	Annealingtemperatur (°C)
1	0,8	60
2	0,6	56
3	0,6	65
4	0,5	65
5	0,8	60
6	0,8	65
7	0,6	72
8	0,5	65

**Tabelle 12: PCR zur Amplifikation von Nested-PCR-Fragmenten**

Temperatur (°C)	Zeit (sek)		Zyklenanzahl
94	120	Denaturierung	1
96	15	Denaturierung	
siehe Tabelle 11	40	Annealing	20
72	120	Elongation	
72	420	terminale Elonga-	1

Die Qualitätskontrolle der PCR-Produkte erfolgte durch eine Gelelektrophorese in einem 2 %igen Agarosegel für 1 ½ h (siehe 2.3.3).

Vor der Durchführung der Sequenzierreaktion ist die Entfernung überschüssiger Nucleotide (NTPs) nötig, da durch den Eintrag phosphorylierter Nucleotidmonomere das Verhältnis zwischen Nucleotiden und Didesoxynucleotiden im Sequenzieransatz verschoben werden könnte. Ebenso müssen überschüssige Primer aus den für die Sequenzierung eingesetzten PCR-Produkten entfernt werden. Der Gehalt an verbleibenden PCR-Primern in der Sequenzierreaktion sollte einen Anteil von 1 % am Gesamt-Primergehalt nicht übersteigen, da sonst Nebenprodukte entstehen, die das Signal-Rauschverhältnis verschlechtern. Die Reinigung der Amplifikate erfolgte mithilfe des MultiScreen-PCR96-Systems (Millipore, Molsheim) entsprechend den Angaben des Herstellers.

#### 2.4.4 Durchführung der Sequenzierreaktion

Für die Sequenzierung von DNA wurde die basenspezifische Kettenabbruch-Methode nach Sanger verwendet. Als DNA-Matrize kamen die gereinigten PCR-Fragmente aus den Nested-PCR-Reaktionen zum Einsatz (siehe 2.4.3). In der Sequenzierreaktion wurden die gleichen Primer wie für die PCR-Amplifikation eingesetzt (siehe Tabelle 9).

Es wurde ein einheitlicher Reaktionsansatz für alle Einzelanalysen entwickelt. Es kam der Big Dye Terminator v.2 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) zum Einsatz (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Reaktionsansatz für die Sequenzierung

PCR-Ansatz (10 µl Gesamtvolumen)	
1,0 µl	800 mM TrisHCl
0,4 µl	50 mM Mg <sup>2+</sup>
0,4 µl	Sequenzierprimer
2,0 µl	Gereinigtes PCR-Produkt
0,5 µl	Big Dye Terminator v.2

Alle Sequenzierreaktionen wurden mit einem einheitlichen Inkubationsprotokoll durchgeführt (siehe Tabelle 14), wobei die Temperaturerhöhung zwischen Annealing und Elongation mit 0,3°/s erfolgte.

**Tabelle 14: Inkubationsprotokoll der Sequenzierreaktion**

Temperatur (°C)	Zeit (sek)		Zyklenanzahl
94	120	Denaturierung	1
96	15	Denaturierung	
50 Rampe 10 %	15	Annealing	25
60	240	Elongation	

Nach Beendigung der Reaktion erfolgte die Reinigung des Sequenzier-ansatzes. Dabei entfernte der GeneMAG-Sequence Dye-Terminator Removal Kit (Chemicell, Berlin) ungebundene fluoreszenzmarkierte Didesoxy-Nukleotide, die die Analyse der Sequenz stören können, aus dem Ansatz.

Zur Analyse der Sequenzierreaktionen wurden Sequenzierautomaten vom Typ ABI Prism 310 Genetic Analyzer und ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (ABI, Darmstadt) eingesetzt.

### 2.4.5 Genotypisierung identifizierter Varianten im $\mu$ -Opioidrezeptor-Gen mithilfe spezifischer PCR-RFLP-Methoden

Für alle im Promotorbereich des  $\mu$ -Opioidrezeptor-Gens identifizierten genetischen Varianten wurde ein PCR-RFLP-Assay entwickelt. Ein Einzelbasenaustausch in der DNA-Sequenz kann zum Entstehen bzw. zum Verlust einer Restriktionsschnittstelle führen. Dieses Phänomen macht man sich bei der Genotypisierung mittels PCR-Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (PCR-RFLP) zunutze. Dazu wird der betreffende Sequenzbereich zunächst durch eine PCR-Reaktion amplifiziert, das Produkt mit einem geeigneten Restriktionsenzym verdaut und die resultierenden Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Es wurden insgesamt drei PCR-Reaktionen mit sechs PCR-Primern (siehe Tabelle 15) etabliert.

**Tabelle 15: PCR-Primer für die PCR-RFLP-Analyse**

Reaktion	Primer	Primerlänge	Sequenz	Annealingtemperatur (°C)
OP V I	OPV I_F02	-145 - -120	5'-AgA AAC Cag TCC Tgg CTg	67
Bpu 112 I	sense		AgA Cag Ag	
	OPV I_R01 anti-	-370 - -350	5'- gAA gAg TgC CCA gTg AA	
	sense		AgA C	
OP V II	OPV II_F02	-1627 - -1609	5'- gCT gAA ATC TgT CTg CCT	61
Afl III	sense		g	
	OPV II_R01 anti-	-1839 - -1818	5'- CTg CTA ACA gAC ATA TgA	
	sense		ggT g	
OP V III	OPV III_F01	-1841 - -1820	5'- CCT CAT ATg TCT GTT Ag	58
Mbo II	sense			
	OPV III_R02 antisense	-2223 - -2203	5'- gAg AgT CAA gAg AAC AAC gTg	

Für jede Einzelreaktion wurde die optimale Annealingtemperatur (siehe Tabelle 15) ermittelt. Alle Reagenzien wurden in den durchgeführten PCR-RFLP-Reaktionen in gleicher Menge zugesetzt (siehe Tabelle 16).

**Tabelle 16: PCR-Ansatz für RFLP**

PCR-Ansatz (40 µl Gesamtvolumen)	
4,0 µl	10*GeneCraft-Puffer
2,0 µl	Mg <sup>2+</sup>
1,5 µl	dNTP
0,5 µl	Sense-Primer
0,5 µl	Antisense-Primer
2,0 µl	genomische DNA
0,2 µl	Biotherm Taq-Polymerase (Rapidozym, Berlin)
31,3 µl	H <sub>2</sub> O

Die Amplifikation der PCR-Fragmente für die PCR-RFLP-Analysen erfolgte (mit Ausnahme der spezifisch gewählten Annealingtemperaturen) mit einem einheitlichen Inkubationsprotokoll (siehe Tabelle 17).

**Tabelle 17: Inkubationsbedingungen für die Amplifikation der PCR-RFLP-Assays**

Temperatur (°C)	Zeit (sek)		Zyklusanzahl
94	120	Denaturierung	1
94	40	Denaturierung	
siehe Tabelle 15	40	Annealing	35
72	60	Elongation	
72	180	terminale Elongation	1

Nach erfolgreicher PCR-Amplifikation erfolgte die allelspezifische Restriktionsreaktion. Hierfür kamen die für jeden einzelnen Assay ausgewählten Restriktionsendonukleasen zum Einsatz (siehe Tabelle 15). Der Reaktionsansatz für die Restriktionsreaktion wurde für alle durchgeführten PCR-RFLP-Assays einheitlich durchgeführt (siehe Tabelle 18).

**Tabelle 18: Reaktionsansatz für den allelspezifischen Restriktionsverdau**

Restriktionsverdau-Ansatz (20 µl Gesamtvolumen)	
10,0 µl	PCR-Produkt
0,50 µl	Restriktionsendonukleasen (siehe Tabelle 15)
2,00 µl	Puffer (siehe Herstellerangaben)
7,5 µl	H <sub>2</sub> O

Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-RFLP-Fragmente erfolgte mithilfe der Gel-Elektrophorese. Diese wurde analog dem in Kapitel 2.3.5 beschriebenen Arbeitsablauf

durchgeführt. Es kamen hierfür 2,5 %ige Agarosegele zum Einsatz. Die Laufzeit der Elektrophorese betrug 30 min.

Die korrekte Amplifikation der eingesetzten PCR-Produkte wurde durch Sequenzierung der eingesetzten PCR-Fragmente überprüft. Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben. Die Sequenzreaktion wurde analog dem im vorangegangenen Kapitel vorgestellten Arbeitsablauf durchgeführt. In jedem Genotypisierungsansatz wurden Kontrollproben mitgeführt.

Die neu etablierten PCR-RFLP-Assays dienen zunächst zur Validierung der Ergebnisse aus der Sequenzanalyse.

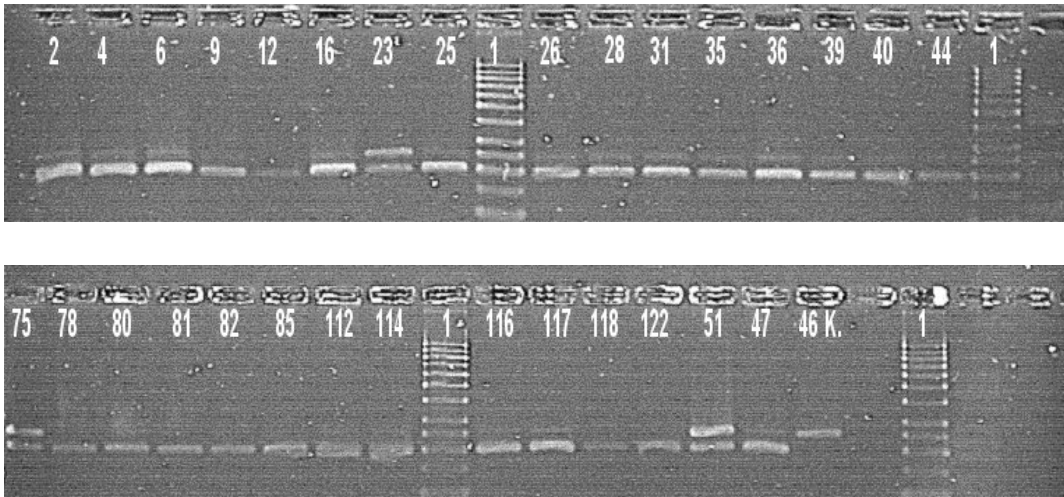
Im Anschluss wurde diese Methodik genutzt, um die Allelfrequenz der untersuchten genetischen Varianten im Kontrollkollektiv zu ermitteln.

### **2.4.5.1 Auswertung der PCR-RFLP-Analysen**

#### **2.4.5.1.1 OPV I**

In der PCR für die Variante OPV I wurde ein 250 bp langes Fragment amplifiziert. Das Amplifikat OPV I des Wildtyps weist für die Nuklease Bpu 112 I in Position 54 und 196 je eine Erkennungssequenz auf. Es entstehen zwei Fragmente mit 54 bp und 196 bp (siehe Abbildung 1).

Diese für das Enzym spezifische Schnittstelle verschwindet bei der Nukleotidtransition von Cytosin gegen Thymin in Position –172. Demzufolge entstehen bei heterozygoter Mutation drei Fragmente mit 54 bp, 196 bp und 250 bp und bei homozygoter Mutation nur ein ungeschnittenes Fragment mit 250 bp.

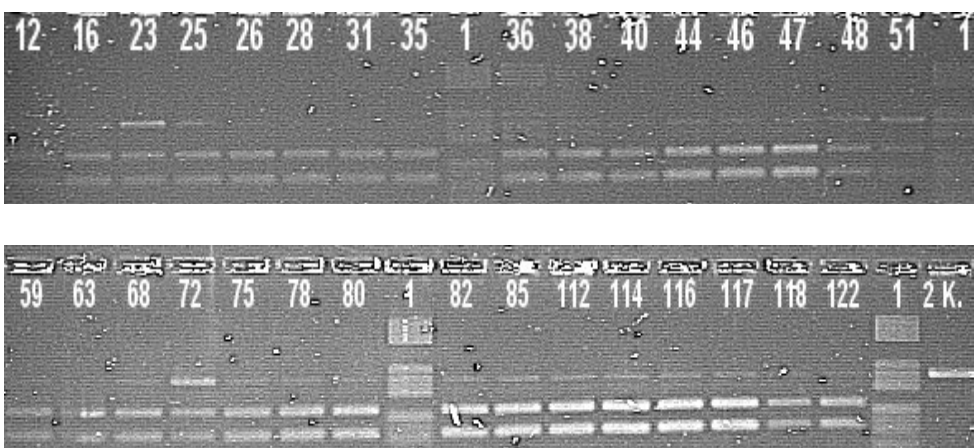


**Abbildung 1:** Spaltung des Fragmentes OPV I mit Bpu112 (Die Proben mit den Nummern 116, 117, 118 und 122 mussten aufgrund der Ein- und Ausschlusskriterien (siehe 2.1.2) von der Studie ausgeschlossen werden.)

#### 2.4.5.1.2 OPV II

Das Amplifikat zur Detektion der Variante OPV II besitzt eine Länge von 230 bp. Afl III schneidet das aus dem Wildtyp gewonnene Amplifikat OPV II in ein 84 bp und 146 bp langes Fragment (siehe Abbildung 2).

Diese Schnittstelle wird wiederum durch den Austausch von Cytosin gegen Thymin in Position –1748 aufgehoben, so dass beim Heterozygoten drei Fragmente mit 84 bp, 146 bp und 230 bp entstehen und beim homozygot Mutierten das gesamte PCR-Produkt mit 230 bp erhalten bleibt.



**Abbildung 2:** Spaltung des Fragmentes OPV II mit Afl III (Die Proben mit den Nummern 116, 117, 118 und 122 mussten aufgrund der Ein- und Ausschlusskriterien (siehe 2.1.2) von der Studie ausgeschlossen werden)



### 2.4.5.1.3 OPV III

Für den Nachweis der Variante an –2044 wurde ein Fragment OPV III von 403 bp hergestellt. In diesem Fall wird der nicht mutierte Wildtyp nicht geschnitten, sondern es entsteht durch den Austausch von Guanin gegen Thymin eine für Mbo II spezifische Schnittstelle.

Bei DNA von heterozygot mutierten Patienten kommt es durch den Verdau zu drei Fragmenten von 178 bp, 225 bp und 403 bp, DNA von homozygoten Patienten weist nur zwei Fragmente von 178 bp und 225 bp auf (siehe Abbildung 3).

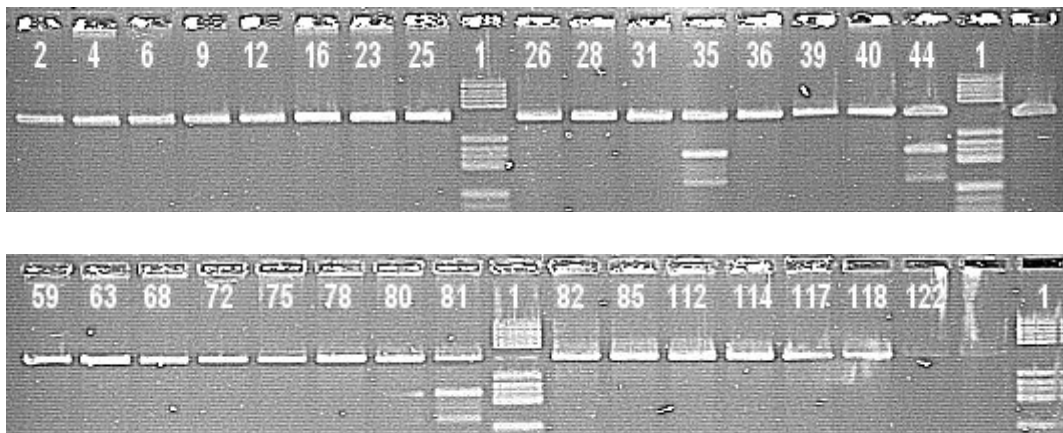


Abbildung 3: Spaltung des Fragments OPV III mit Mbo II (Die Proben mit den Nummern 116, 117, 118 und 122 mussten aufgrund der Ein- und Ausschlusskriterien (siehe 2.1.2) von der Studie ausgeschlossen werden)

## 2.5 Datenbankrecherche

Zur Überprüfung der Ergebnisse aus der Sequenzanalyse auf Vollständigkeit wurde die öffentlich verfügbare Datenbank dbSNP build 126 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) der NCBI (United States National Library of Medicine) genutzt. Dabei wurden alle aktuell im Promotorbereich des hMOR-Gens bekannten Varianten für die Auswertung erfasst und verglichen.

Darüber hinaus dienten populationsgenetische Datensätze aus dieser Datenbank zum Vergleich mit den in der Kontrollgruppe beobachteten Allelfrequenzen der identifizierten genetischen Varianten.

## 2.6 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde für das Patienten- und Kontrollkollektiv sowie für die recherchierten Datenbank- und Studienkollektive das zentrale Konfidenzintervall berechnet.

Das Konfidenzintervall wurde mit 95 % festgelegt, die Berechnung der oberen und unteren Grenze ( $p_o$  /  $p_u$ ) erfolgte nach der Formel:

$$p_o = \hat{p} + c \sqrt{\frac{\hat{p} * (1 - \hat{p})}{n}} \quad \text{und} \quad p_u = \hat{p} - c \sqrt{\frac{\hat{p} * (1 - \hat{p})}{n}}.$$

Zum Vergleich der Häufigkeit der gefundenen Varianten wurde der Chi-Quadrat-Test nach Pearson genutzt. Das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  festgelegt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Ausgewähltes Patientenkollektiv

Aus einer klinischen Studie mit 99 Patienten wurde ein Kollektiv von 29 Patienten für eine weiterführende pharmakogenetische Untersuchung ausgewählt (siehe 2.1). Diese Patienten hatten in der Erst- und/oder Folgebefragung die Opioidnebenwirkungen Übelkeit, Erbrechen oder Verstopfung angegeben.

**Tabelle 19: Patientendaten**

	Patientenzahl
Insgesamt	29
<i>Geschlecht</i>	
Weiblich	12
Männlich	17
<i>Nicht Tumorerkrankungen</i>	
Bewegungsapparat	7
neurologisch	1
Herz-Kreislaufsystem bzw. hämatopoetisches System	3
Verdauungstrakt	1
Haut	1
<i>Tumorerkrankungen</i>	
Verdauungstrakt	4
Nieren und ableitende Harnwege	2
Geschlechtsorgane	3
Haut	2
Bewegungsapparat	1
HNO	2
Andere	2
<i>Angaben zum Therapieerfolg</i>	
Starke Schmerzen vor Dosiserhöhung	28
Klinisch relevante Besserung nach Dosiserhöhung	8
<i>Nebenwirkungen vor Dosiserhöhung</i>	
Übelkeit	14
Erbrechen	10
Verstopfung	18
<i>Nebenwirkungen nach Dosiserhöhung</i>	
Übelkeit neu aufgetreten	10
Erbrechen neu aufgetreten	7
Verstopfung neu aufgetreten	6

Diese Gruppe umfasste 12 weibliche und 17 männliche Patienten mit einem Alter von 28 bis 80 Jahren (Median 57 Jahre). 16 Patienten waren aufgrund einer malignen Erkrankung in schmerztherapeutischer Behandlung, 13 aufgrund einer nicht-malignen Erkrankung.

### **3.2 Das Kontrollkollektiv**

Das Kontrollkollektiv bestand aus 206 Kaukasiern. Die Geschlechterverteilung war mit je 103 weiblichen und 103 männlichen Probanden ausgeglichen. Der Altersmedian lag bei 46 Jahren, bei einer Range von 23 - 64 Jahren.

### **3.3 Sequenzierung und Genotypisierung der Promotorregion des $\mu$ -Opioidrezeptor-Gens**

Mittels DNA-Sequenzierung wurde in dem ausgewählten Patientenkollektiv nach Varianten in der Promotorregion des hMOR-Gens gesucht und mittels RFLP eine einfach durchführbare Screeningmethode etabliert. Um alle Varianten der Promotorregion in die Sequenzanalyse einzubeziehen, wurde ein 3718 bp langes Fragment des 6968 bp langen hMOR-Gens (GenBank-Referenznummern: AJ 000341-000375; L25119) untersucht. Davon wurden 2464 bp sequenziert, darin enthalten war die komplette Promotorregion beginnend bei -2624 bis in die 5'-UTR [17].

Die Sequenzierung des Promotorbereiches ermöglichte es, das Patientenkollektiv auf 29 der bisher beschriebenen Varianten der Promotorregion und 5' UTR zu untersuchen [20], ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?locusId=4988&chooseRs=all](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=4988&chooseRs=all)). Die in Tab. 20 angegebenen Nukleotidpositionen beziehen sich auf die NCBI-Referenzsequenz NC\_000006 und das A des ATG-Codons des hMOR-Gens. Die Sequenzanalyse erfasst dabei 29 der in der 5' UTR bisher beobachteten Varianten. Von den untersuchten 29 Varianten wurden bisher 15 in verschiedenen ethnischen Kollektiven populationsgenetisch untersucht.

**Tabelle 20: Beobachtete Häufigkeit der im Promotor des hMOR-Gens bekannten Varianten bei Patienten und Kontrollen**

Nukleotidposition	RS-Nummer	Allelfrequenz bei Patienten	Allelfrequenz bei Kontrollen	
-2413 A>G		0%	n= 58 E	
-2358 G>A		0 %	n= 58 E	
-2312 C>A		0 %	n= 58 E	
-2217 C>T	rs12205356	0 %	n= 58 E	
-2078 A>G	rs17174628	0 %	n= 58 E	
-2044 C>A	rs17180961	5,2 %	n= 58 E	1,7 % n=206 E
-1793 A>T	rs17180968	0 %	n= 58 E	
-1748 G>A	rs12205732	5,2 %	n= 58 E	8,3 % n=206 E
-1699 Ins T	rs17180982	0 %	n= 58 E	
-1595 T>C		0 %	n= 58 E	
-1565 T>C		0 %	n= 58 E	
-1469 T>C		0 %	n= 58 E	
-1320 A>G	rs17174629	0 %	n= 58 E	
-1255 A>T		0 %	n= 58 E	
-1236 A>G		0 %	n= 58 E	
-1171 A>G	rs17174630	0 %	n= 58 E	
-1081 C>T	rs17174632	0 %	n= 58 E	
-1045 A>G		0 %	n= 58 E	
-995 C>G		0 %	n= 58 E	
-905 A>G	rs17174634	0 %	n= 58 E	
-692 C>G	rs17180989	0 %	n= 58 E	
-665 Deletion 3bp		0 %	n= 58 E	
-554 G>A		0 %	n = 54 E	
-523 A>G	rs17180996	0 %	n = 54 E	
-502 A>C	rs9384173	0 %	n = 54 E	
-488 G>T		0 %	n = 54 E	
-254 A>C		0 %	n = 54 E	
-236 A>G	rs17181003	0 %	n = 54 E	
-172 G>T	rs6912029	5,2 %	n= 58 E	8,3 % n=206 E

Von den 29 im Promotor des hMOR-Gens bekannten Varianten konnten drei Varianten bei den untersuchten Individuen identifiziert werden (siehe Tabelle 20 grau hinterlegt). Es handelt sich um: OPV I (- 172 G>T, rs6912029), OPV II (-1748 G>A, rs12205732) und OPV III (-2044 C>A, rs17180961). Diese drei Varianten sind sowohl in einer veröffentlichten Studie als auch beim National Center for Biotechnology Information ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?locusId=4988&chooseRs=all](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=4988&chooseRs=all)) beschrieben [20].

### 3.3.1 Variante -172 G>T (rs6912029)

Bei der Variante -172 G>T handelt es sich um eine Transition im proximalen Bereich des Promoters des hMOR-Gens. In dem untersuchten Kollektiv von 29 Individuen wurde die Variante insgesamt dreimal heterozygot beobachtet. Dies entspricht einer Häufigkeit von 5,2 %. Das zentrale Konfidenzintervall wurde mit 1,8 – 14,2 % berechnet (siehe 2.6). Im Vergleich zur Kontrollgruppe, in der das -172T-Allel bei 34 der 206 Individuen heterozygot gefunden wurde, ist es damit in der Patientengruppe leicht unterrepräsentiert; dieser Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant.

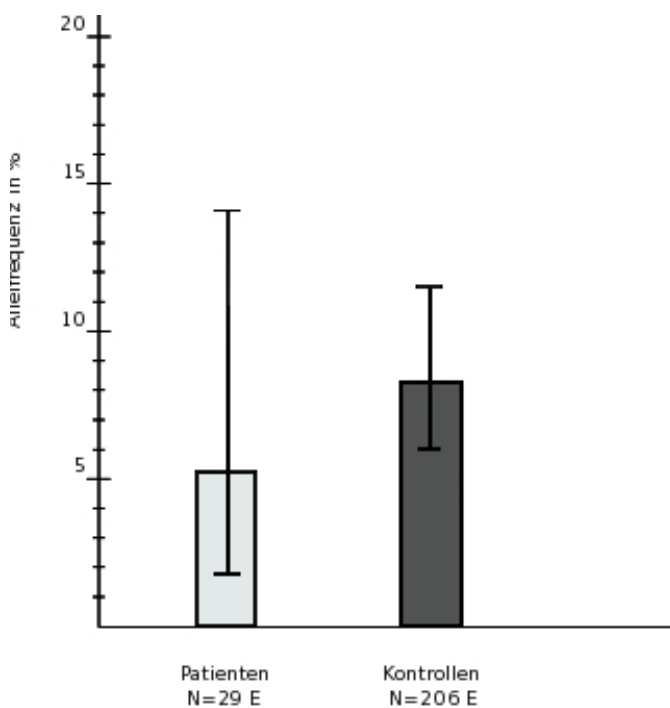
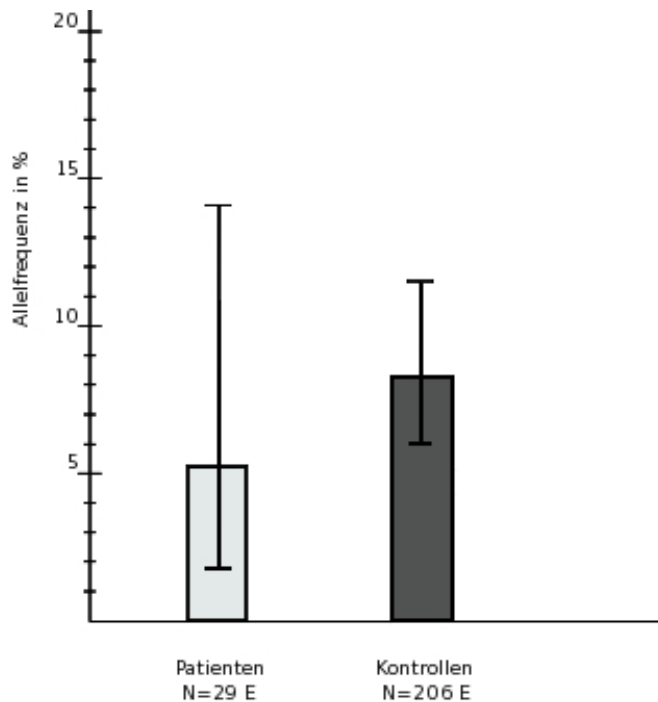


Abbildung 4: Häufigkeit des -172T-Allels in Patienten- und Kontrollkollektiv

### 3.3.2 Variante -1748 G>A

Die Variante -1748 G>A ist eine Transition im distalen Promotor des hMOR-Gens. Sie trat in dem untersuchten Kollektiv von 29 Patienten insgesamt dreimal heterozygot auf. Dies entspricht ebenfalls einer Häufigkeit von 5,2 %. Das zentrale Konfidenzintervall wurde mit 1,8 – 14,2 % berechnet (siehe 2.6). Der Vergleich mit der Kontrollgruppe, in der das -1748A-Allel bei 34 von 206 Individuen heterozygot auftrat, zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied.



**Abbildung 5: Häufigkeit des -1748A-Allels in Patienten- und Kontrollkollektiv**

### **3.3.3 Genetische Kopplung der Varianten –172 G>T und –1748 G>A**

Die Varianten –172 G>T und –1748 G>A traten sowohl bei allen drei Individuen der Patientengruppe als auch bei den 34 Individuen der Kontrollgruppe gemeinsam und in heterozygoter Form auf. Damit ist es hochwahrscheinlich, dass diese beiden genetischen Varianten der gleichen Kopplungsgruppe (Allel/Haplotyp) angehören.

### **3.3.4 OPV III –2044 C>A**

Bei der Variante -2044 C>A handelt es sich im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Varianten um eine Transversion im distalen Promoter des hMOR-Gens. Diese Variante fand sich im untersuchten Patientenkollektiv dreimal heterozygot mit einer Häufigkeit von 5,2 %. Das zentrale Konfidenzintervall wurde mit 1,8 – 14,2 % berechnet (siehe 2.6). In der Kontrollgruppe konnte das -2044A-Allel bei sieben von 206 Individuen heterozygot identifiziert werden. In diesem Fall war die Variante in der Patientengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich überrepräsentiert. Der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant.

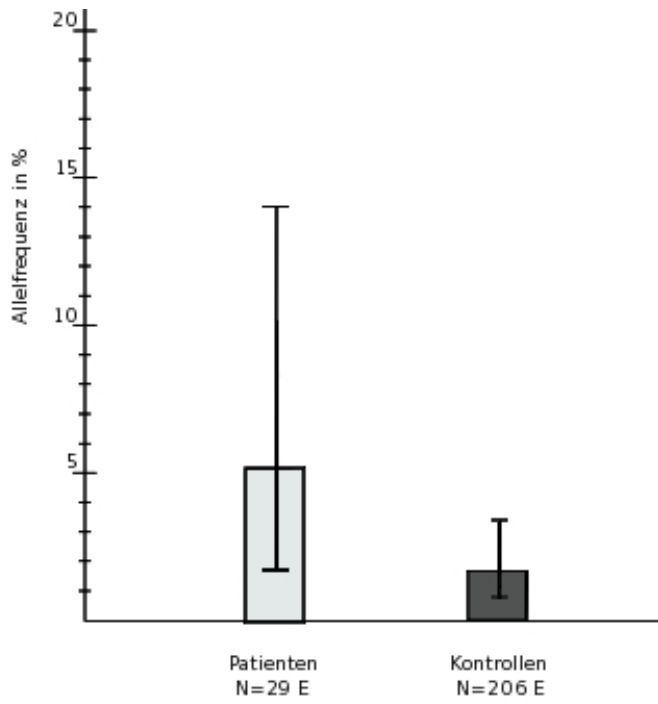


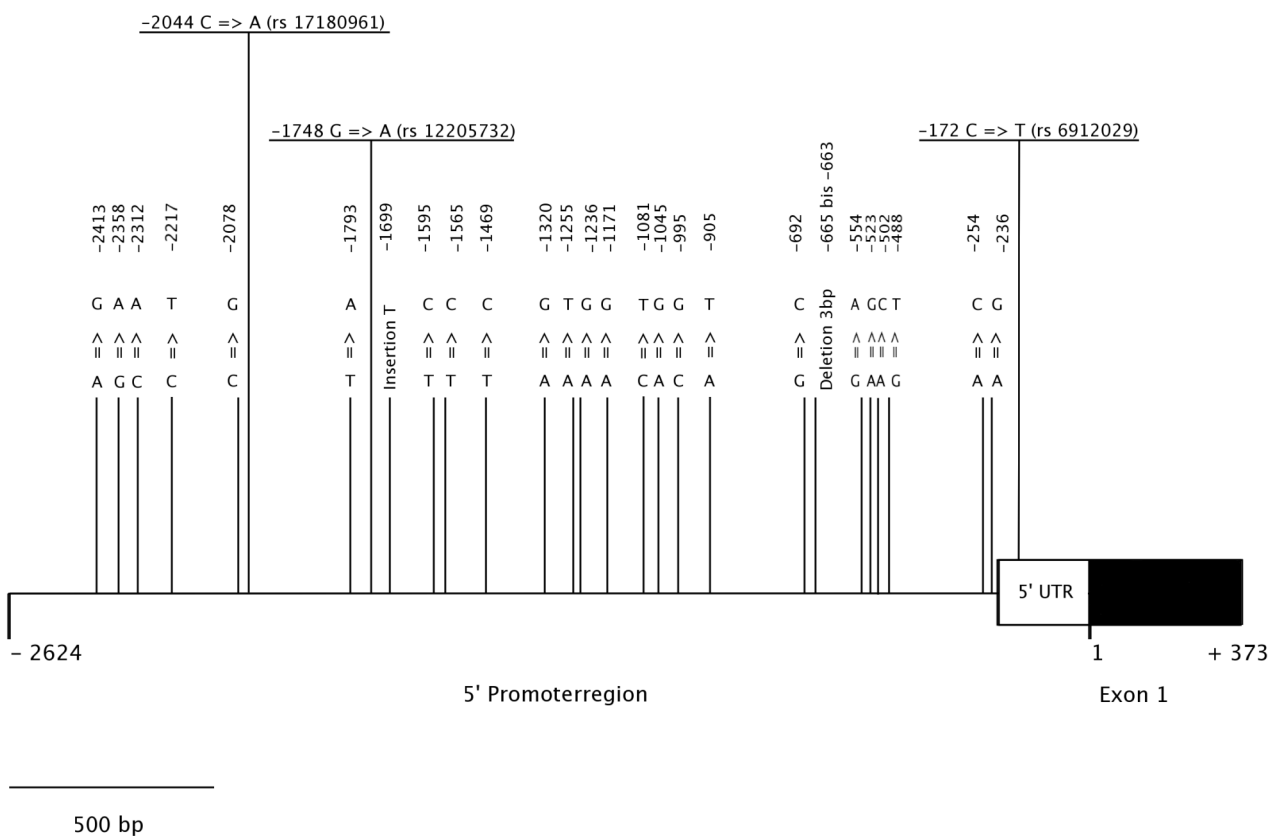
Abbildung 6: Häufigkeit des -2044A-Allels in Patienten- und Kontrollkollektiv



## 4 Diskussion

### 4.1 Klinische Studie

Die hier vorgestellte Untersuchung wurde als retrospektive klinische Studie mit Beginn im Jahr 2000 geplant. Im Verlauf dieser Studie wurden 29 Patienten aus einem Schmerztherapiekollektiv aufgrund der bei ihnen auftretenden opioidtypischen Nebenwirkungen - Obstipation, Erbrechen und Übelkeit - ausgewählt. Diese selektionierte Patientengruppe wurde auf 29 Varianten (siehe Abbildung 7) im 5'-UTR des hMOR-Gens mit Hilfe der Sanger-Sequenzierung untersucht. Die dabei identifizierten genetischen Varianten wurden mit veröffentlichten Studienergebnissen und öffentlich verfügbaren populationsgenetischen Datenbanken verglichen.



**Abbildung 7: Bisher bekannte Varianten im Bereich der sequenzierten Promotorregion**

Das Fehlen aussagekräftiger populationsgenetischer Daten zum Promotorbereich des hMOR-Gens zu Beginn dieser Arbeit im Jahr 2000 machte es allerdings erforderlich, diesen Sequenzbereich vollständig zu sequenzieren. Durch diese Herangehensweise konnte das Patientenkollektiv sehr sensitiv und spezifisch untersucht werden. Allerdings

ist die Sanger-Sequenzierung eine zu aufwendige Methode, wenn viele Proben anfallen. Um eine kostengünstige und schnelle Analyse der identifizierten genetischen Varianten bei größeren Fallzahlen zu ermöglichen, wurden für die drei gefundenen Varianten PCR-RFLP-Verfahren (siehe 2.3.5) entwickelt. Damit war die Voraussetzung für die Untersuchung einer größeren Stichprobe geschaffen. Diese Methodik wurde eingesetzt, um die Häufigkeiten der drei Varianten in einer Kontrollgruppe von 206 kaukasischen Probanden zu bestimmen.

Die hier vorgestellte Studie untersuchte die Häufigkeit genetischer Varianten im Promotor des hMOR-Gens bei Patienten mit ausgeprägten Opioidnebenwirkungen und vergleicht sie mit der von gesunden kaukasischen Probanden. Die zufällige Auswahl von freiwilligen Teilnehmern bietet den Vorteil, dass eine Verzerrung der Ergebnisse durch einen systematischen Selektionsbias weitgehend auszuschließen ist.

## **4.2 Häufigkeit der identifizierten Varianten im Kontrollkollektiv im Vergleich mit Datenbank- und Studienkollektiven**

### **4.2.1 Variante -172 G>T**

Die Variante -172 G>T liegt in der nicht translatierten 5'-Region von Exon 1 des hMOR-Gens (siehe Abbildung 7). In der Kontrollgruppe betrug die Allelfrequenz für -172T 8,3 %, die Variante trat nur in heterozygoter Form auf (siehe Tabelle 21). Zum Vergleich liegen Daten aus drei publizierten Studien mit kaukasischen Teilnehmern vor.

In einer dieser Studien untersuchte die Gruppe von Rommelspacher *et al.*, ob genetische Varianten des  $\mu$ -Opioidrezeptor-Gens dessen Empfindlichkeit für endogene Opiode beeinflussen und somit einen Risikofaktor für Alkoholabhängigkeit bilden. Die Kontrollgruppe bestand aus 340 gesunden Probanden. Die Variante -172 G>T trat mit einer Häufigkeit von 4,5 % (3,2 – 6,4 %) auf [28].

In einer Studie, die den Einfluss von Varianten des  $\mu$ -Opioidrezeptor-Gens auf die Inzidenz der ideopathischen generalisierten Epilepsie (IGE) untersuchte, wurde für das -172T-Allel eine Frequenz von 3,6 % (2,2 – 5,8 %) in der 220 gesunde Probanden umfassenden Kontrollgruppe bestimmt [47, 48]. Eine weitere Studie an Epilepsiepatienten fand im Kontrollkollektiv (n=247) für -172T eine Allelfrequenz von 4,3 % (2,8 - 6,4 %) [49].

Weiterhin stehen für den Vergleich das Datenbankkollektiv Euro 96 aus dem Institut für Humangenetik der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn und aus dem HapMap-Projekt das HapMap-CEU-Kollektiv zur Verfügung. Die Variante -172 G>T wurde im Euro-96-Kollektiv bei 73 Individuen mit einer Häufigkeit von 4,1 % (1,9 – 8,6 %) und bei den 90 Individuen des HapMap-CEU-Kollektivs mit einer Allelfrequenz von 5,5 % (3,1 – 9,9 %) ermittelt.

Somit bleibt festzuhalten, dass die in unserer Kontrollgruppe für die Variante - 172T bestimmte Allelhäufigkeit von 8,3 % deutlich von den in anderen Untersuchungen bei Kaukasiern beobachteten Werten abweicht (siehe Tabelle 21).

Im Rahmen des HapMap-Projekts wurde die Häufigkeit von -172T bei unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen ermittelt: bei Japanern (n=45) mit einer Allelfrequenz von 5,5 %, bei Han-Chinesen (n=45) mit einer Allelfrequenz von 12,2 % und bei Angehörigen des Volksstammes der Yoruba in Westafrika (n=90) mit einer Häufigkeit von 15,6 %. Hoehe *et al.* untersuchten eine Reihe von genetischen Varianten im  $\mu$ -Opioidrezeptor-Gen bei Afroamerikanern im Zusammenhang mit Heroin- und Kokainabhängigkeit [20]. In der Kontrollgruppe betrug die Frequenz des -172T-Allels 11,4 % [20]. Der Vergleich mit nichtkaukasischen Studienkollektiven deutet somit auf eine hohe interethnische Variabilität im Auftreten dieser Variante hin.

Das National Human Genome Research Institute (USA) hat eine Sammlung aus 90 DNA-Proben (polymorphism discovery resource panel, PDR) von US-Bürgern speziell zu dem Zwecke zusammengestellt, die Variabilität des menschlichen Genoms zu erforschen (Collins *et al.* 1998). Die DNA-Spender sind 23 Amerikaner kaukasischer Abstammung, 23 Amerikaner afrikanischer Herkunft, 22 Amerikaner asiatischer Abstammung, 11 Amerikaner mexikanischer Herkunft, 11 Nachfahren amerikanischer Ureinwohner. In dieser Probensammlung wurde für das -172T-Allel eine Häufigkeit von 7,2 % gemessen.

**Tabelle 21: Häufigkeit der Minorallele von -172 G>T und -1748 G>A in den Datenbank- und Studienkollektiven**

Referenz	Anzahl der Individuen	Ethnie	Allelfrequenz (%)	
			- 172 G>T	-1748 G>A
Eigene Werte	206	E	8,3	8,3
Rommelspacher 2000 [28]	340	E	4,5	
Wilkie 2002 [47, 48]	220	E	3,6	
Barett 2006 [49]	247	E	4,3	
Euro 96	73	E	4,1	
Hap-Map CEU	90	E	5,5	5,6
Hap-Map JPT	45	JPT	5,5	5,5
Hap-Map HCB	45	HCB	12,2	13,3
Hap-Map YRI	90	YRI	15,6	15,6
Hoehe 2000 [20]	35	AA	11,4	2,9
PDR 90	90	Global	7,2	6,6

E = Europäer, JPT = Japaner, HCB = Han-Chinesen, YRI = Yoruba, AA = Afrikaner amerikanischer Herkunft, Global = 23 Amerikaner kaukasischer Abstammung, 23 Amerikaner afrikanischer Herkunft, 22 Amerikaner asiatischer Abstammung, 11 Amerikaner mexikanischer Herkunft, 11 Nachfahren amerikanischer Ureinwohner

Tab. 21 zeigt, dass die in unserem Kontrollkollektiv gefundene Häufigkeit für das -172T-Allel deutlich von der abweicht, die in anderen Studien mit kaukasischen Teilnehmern beobachtet wurde. Für diese Diskrepanz kann es verschiedene Ursachen geben, wie z. B. eine fehlerhafte Bestimmung. Ein analytischer Fehler unsererseits wurde allerdings durch mehrmalige Wiederholung der Analysen und die Verwendung verschiedener Verfahren weitestgehend ausgeschlossen. Darüber hinaus bestand auch eine 100 %ige Übereinstimmung zwischen den Analyseergebnissen der Varianten -172 G>T und -1748 G>A, die – wie unten geschildert – strikt miteinander gelinkt sind und unabhängig voneinander nachgewiesen wurden. Wir sind deshalb der Ansicht, dass die höhere Frequenz des -172T-Allels in unserer Kontrollgruppe nicht auf einer fehlerhaften Genotypisierung beruht.

Die Kontrollgruppe bestand aus kaukasischen Probanden, die im Raum Berlin rekrutiert worden waren. Diese Personen hatten sich freiwillig für die Teilnahme an klinischen Studien gemeldet. Ein Selektionseffekt bezüglich der untersuchten Polymorphismen

durch die für die Probandengruppe geltenden Ein- und Ausschlusskriterien (z. B. offensichtliche Alkohol-, Medikamenten- oder Rauschmittelabhängigkeit) ist relativ unwahrscheinlich. Auch haben andere Bevölkerungsstudien gezeigt, dass innerhalb der kaukasischen Ethnie einzelne Allelfrequenzen beträchtlich vom kaukasischen Durchschnitt abweichen können. Der Grund für die Abweichung der ermittelten Häufigkeit der Variante -172 G>T in dieser Studie im Vergleich zu anderen kaukasischen Kollektiven bleibt jedoch letztlich unklar.

#### **4.2.2 Variante -1748 G>A**

Die Variante -172 G>T wurde bei 34 der 206 untersuchten Kontrollen heterozygot ermittelt. Alle Träger des -172T-Allels waren auch heterozygote Träger von -1748A. Bei keinem Individuum wurde lediglich eine dieser Varianten alleine identifiziert. Damit sind die für beide Allele gemessenen Frequenzen in unserer Kontrollgruppe gleich und die im vorangegangenen Abschnitt für -172T angestellten Betrachtungen gelten auch für -1748A.

Die Beobachtung, dass beide Varianten miteinander gelinkt sind, wird durch Daten des HapMap-Projektes bestätigt. So wurden in der kaukasischen Stichprobe beide Allele bei zehn von insgesamt 90 Individuen gefunden, in der chinesischen Stichprobe bei elf von insgesamt 45 Studienteilnehmern, in der japanischen Stichprobe bei fünf Individuen (Gesamtzahl n=45) und in einer Yoruba-Population bei 26 von den insgesamt 90 untersuchten Individuen. Abweichend davon trat jedoch in der oben beschriebenen US-amerikanischen DNA-Probensammlung PDR (n=90) das -172T-Allel bei einem von 13 Individuen alleine auf.

Zu einem völlig anderen Befund kamen Hoehe und Mitarbeiter in einer Studie, die bei US-Amerikanern afrikanischer Abstammung den Zusammenhang zwischen Variationen im  $\mu$ -Opioidrezeptor-Gen und der Rauschmittelabhängigkeit untersuchte [19]. In dem Kontrollkollektiv (n=35) betrug die Frequenz für das -172T-Allel 11,4 %, für das -1748A-Allel aber 2,9 %. Beide Allele traten einzeln oder zusammen auf, eine strikte Kopplung beider Allele konnte in dieser Studienpopulation weder bei den Kontrollen noch bei den rauschmittelabhängigen Studienteilnehmern beobachtet werden. Somit scheinen unter afrikanischstämmigen Amerikanern hMOR-Gene verbreitet zu sein, die nur eine der beiden Varianten tragen. Dies ist auch eine mögliche Erklärung für die fehlende Kopplung bei einem Individuum der PDR-90-Stichprobe, die zu 25 % aus Afro-

amerikanern besteht (siehe 2.5). Bei Kaukasiern scheint lediglich das Gen, in dem die beiden Varianten gekoppelt auftreten, verbreitet zu sein.

#### **4.2.3 Variante -2044 C>A**

Die Variante -2044 C>A befindet sich in der distalen Promotorregion des hMOR-Gens (siehe Abbildung 7). Sie konnte in der Kontrollgruppe bei 1,7 % der Individuen nachgewiesen werden. Vergleichbare Daten zeigt eine veröffentlichte Studie in einer Stichprobe von 179 weißen US-Amerikanern [33]. Hier wurde das -2044A-Allel bei 0,8 % der Individuen gefunden. Eine ähnliche Häufigkeit (1,1 %) wurde in der PDR-90-Probensammlung sowie in einer Kontrollgruppe von 55 Afroamerikanern (0,9 %) ermittelt [33]. Damit übereinstimmend beobachteten Hoehe *et al.* bei 35 gesunden Probanden afroamerikanischer Herkunft eine Häufigkeit von < 1 % [20]. Die von uns in unserer Kontrollgruppe ermittelte Allelfrequenz für -2044/A ist somit mit publizierten Daten vergleichbar.

Die vorliegenden Daten sprechen dafür, dass die Allelfrequenzen der Variante -2044 C>A sich zwischen den Ethnien nicht sehr stark unterscheiden. Das lässt vermuten, dass diese im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Varianten auf einem entwicklungsgeschichtlich deutlich älteren Allel lokalisiert ist.

### **4.3 Assoziation der untersuchten genetischen Varianten mit dem Auftreten opioidbedingter Nebenwirkungen**

#### **4.3.1 Gekoppelte Varianten -172G>T und -1748G>A**

Auch im Patientenkollektiv wurde das -172T-Allel immer zusammen mit dem -1748A-Allel beobachtet. Beide Varianten traten in der Patientengruppe mit einer Häufigkeit von 5,2 % (1,8 % – 14,1 %) auf. Die Abweichung vom Kontrollkollektiv war nicht signifikant (siehe 3.3.1 und 3.3.2). Auch liegen die in der Patientengruppe gefundenen Allelfrequenzen von -172T und -1748A im Bereich publizierter populationsgenetischer Daten. Eine Assoziation mit dem Nebenwirkungsprofil der Opioide ist somit aus den Daten dieser Studie für diese beiden SNPs nicht feststellbar, wobei jedoch einschränkend festzustellen ist, dass die Zahl der untersuchten Patienten mit n=29 klein war. Eine statistisch fundierte Aussage zum Einfluss der Allele -172T und -1748A auf die Inzidenz opioidbedingter Nebenwirkungen ist auf dieser Grundlage nicht möglich.

Publizierte Studien zum Zusammenhang zwischen den Varianten -172 G>T und -1748 G>A und Opioidnebenwirkungen liegen bisher nicht vor. Die beiden SNPs wurden bislang nur selten untersucht. Unter den wenigen Studien sind drei, die sich mit der klinischen Opioidwirkung bzw. dem Risiko für die Entwicklung einer Opioid- oder Alkoholabhängigkeit befassen. Keine dieser Studien konnte eine Assoziation nachweisen.

Die Gruppe um Klepstad analysierte 207 Tumorpatienten, welche eine orale Morphintherapie erhielten. Von den vier auf einen Zusammenhang zwischen Qualität der Schmerztherapie, Morphindosis und Morphinserumkonzentration untersuchten Varianten des  $\mu$ -Opioidrezeptor-Gens, - 172G>T, 118A>G, IVS2+31 G>A und IVS2-691C>G, fanden die Autoren nur bezüglich 118A>G einen signifikanten Effekt: homozygote Träger der Variante 118 G hatten einen höheren Bedarf an Morphin. Für die Variante -172 G>T ließ sich kein Zusammenhang zu den Untersuchungsparametern oder zu den mit erfassten Nebenwirkungen Übelkeit, Obstipation, Appetitlosigkeit, Luftnot und Abgeschlagenheit ermitteln [27].

Rommelspacher *et al.* untersuchten, ob genetische Varianten des  $\mu$ -Opioidrezeptor-Gens dessen Empfindlichkeit für endogene Opioide beeinflussen und somit einen Risikofaktor für eine, die endogene Opioidausschüttung modulierende Alkoholabhängigkeit bilden. Im Rahmen dieser Studie wurden die Häufigkeiten von fünf Varianten des  $\mu$ -Opioidrezeptor-Gens, 118 A>G, 17 C>T, -38 C>A, -111 C>T und - 172 G>T, bei 327 Alkoholabhängigen und einer Kontrollgruppe von 340 gesunden Probanden verglichen. Bezüglich der Variante - 172 G>T fanden die Autoren keinen signifikanten Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen [28].

Beide Varianten wurden auch in der aufwendigen Studie von Hoehe *et al.* [19] untersucht. Diese Arbeitsgruppe hatte dem  $\mu$ -Opioidrezeptor-Gen eine Schlüsselrolle in der Erklärung von Rauschmittelabhängigkeit zugesprochen und wollte den tierexperimentell schon gezeigten Zusammenhang zwischen  $\mu$ -Opioidrezeptor und Rauschmittelmissbrauch an Variationen des humanen  $\mu$ -Opioidrezeptor-Gens überprüfen. Studienteilnehmer waren Opioid- oder Kokain-abhängige US-Amerikaner, der überwiegende Teil afrikanischer Herkunft (n=158). In diesem Falle wurden nicht gezielt einzelne Varianten bestimmt, sondern die funktionell relevanten Teile des Gens systematisch auf Mutationen analysiert. Auf diese Weise wurden insgesamt 43 Varianten identifiziert und in die statistische Auswertung einbezogen, deren wichtigster Bestandteil eine detaillierte

Haplotypenanalyse war. Als Ergebnis dieser vielschichtigen, komplexen Studie stellen die Autoren fest, dass sie zumindest eine Haplotypengruppe gefunden haben, die mit Rauschmittelabhängigkeit assoziiert zu sein scheint und die sich u. a. durch fünf Varianten charakterisieren lässt. Unter diesen herausgestellten Varianten ist keine der in dieser Arbeit untersuchten.

Zwei weitere Studien, welche die Variante -172G>T in einem anderen Zusammenhang untersuchten, seien hier der Vollständigkeit halber erwähnt: Wilkie *et al.* analysierten im  $\mu$ -Opioidrezeptor-Gen die drei Varianten - 172 G>T, 118 A>G und IVS2-691 C>G mit der Frage, ob sie einen Einfluss auf die Inzidenz der ideopathischen generalisierten Epilepsie (IGE) haben. Studienteilnehmer waren 205 IGE-Patienten und 220 gesunde Individuen. Ein Zusammenhang zwischen diesen SNPs und dem Auftreten von IGE fand sich nicht [47, 48]. Zu dem gleichen Ergebnis kam dieselbe Arbeitsgruppe bezüglich der Varianten - 172 G>T, 118 A>G, 290<sup>+1284</sup> A>G, 290<sup>+3470</sup> A>G und 290<sup>+11467</sup> C>T einige Jahre später noch einmal mit einem etwas größeren Patientenkollektiv (222 IGE-Patienten und 104 Patienten mit ideopathischer Absenceepilepsie) [49].

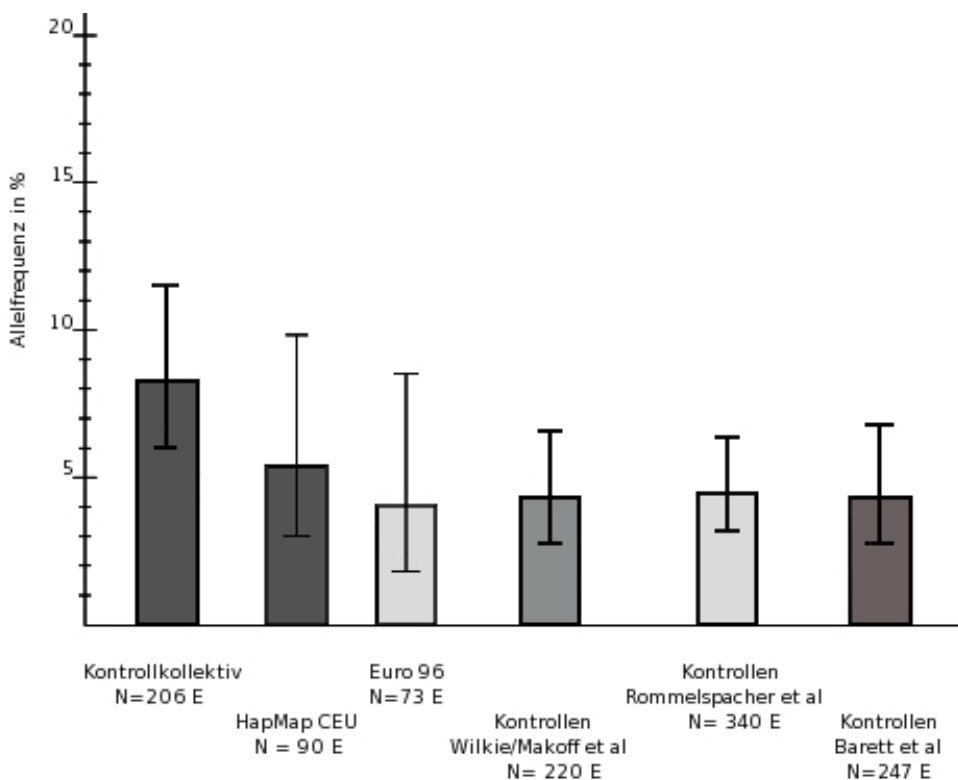


Abbildung 8: Häufigkeit der Allele - 172T und -1748A in 6 ethnischen Stichproben



#### 4.3.2 -2044 C>A

Das Allel -2044A kam bei den Patienten mit 5,2 % deutlich häufiger als bei den Kontrollen vor (1,7 %). Die Allelfrequenz in der Kontrollgruppe stimmt gut mit Befunden aus vergleichbaren Untersuchungen überein, in denen für gesunde kaukasische Probanden eine Häufigkeit zwischen 0,8 % und 1,1 % ermittelt worden war.

Trotz des deutlichen Unterschiedes in der Allelfrequenz zwischen der Fall- und Kontrollgruppe erwies sich das Ergebnis im Chi-Quadrat-Test als statistisch nicht signifikant (siehe 3.3.4), was vermutlich auf die zu kleine Patientenzahl zurückzuführen ist. Die Kontrollgruppe ist mit 412 Allelen ausreichend groß, um bei den gegebenen Allelfrequenzen einen statistischen Unterschied zu erkennen. Das beobachtete häufigere Auftreten des -2044A-Allels in der Patientengruppe kann deshalb nur als Hinweis für den möglichen Einfluss dieser Variante auf das Auftreten von opioidbedingten Nebenwirkungen gewertet werden.

Dieser Befund wird durch eine 2003 publizierte Untersuchung von Lou *et al.*, die eine Assoziation des Auftretens der Variante -2044 C>A bei opioid- und alkoholabhängigen Patienten zeigte, unterstützt [32]. Ziel dieser Studie war, herauszufinden, ob es eine Assoziation zwischen Varianten des  $\mu$ -Opioidrezeptors und Drogenabhängigkeit bei Amerikanern europäischer und afrikanischer Abstammung gibt. Dafür wurde die Häufigkeit von Varianten und deren Haplotypen im Promotorbereich (-2044 C>A, -1793 T>A, -1699 insT, -1469 T>C und -1320 A>G, in der 5'-UTR, -111 C>T) und im Exon1 (+17 C>T und +118 A>G) bei Patienten und Kontrollen ermittelt und verglichen. Das -2044A-Allel hatte in der 179 Individuen umfassenden Kontrollgruppe eine Frequenz von 0,8 %. In der opioid- und alkoholabhängigen kaukasischen Studiengruppe (n=318) war das -2044A-Allel mit 2,8 % zwar überrepräsentiert, jedoch war der Unterschied zwischen Studien- und Kontrollgruppe nach Bonferroni-Korrektur für multiples Testen nicht mehr statistisch signifikant. Bei den US-Amerikanern afrikanischer Abstammung wurde kein Unterschied zwischen der Studien- und der Kontrollgruppe beobachtet. Die Allelfrequenz von -2044A betrug hier bei den Kontrollen 0,9 % (n=55) und bei den Alkohol- und Opioidabhängigen 0,4 % (n=124). Die Variante -2044 C>A war von den in der Studie von Lou *et al.* untersuchten die einzige, für die die Autoren einen Zusammenhang mit der Drogenabhängigkeit für möglich halten [33]. Eine Bestätigung dieser Beobachtung steht bislang noch aus.

### **4.3.3 Bedeutung genetischer Varianten des $\mu$ -Opioidrezeptors für die Ausprägung opioidbedingter Wirkungen und Nebenwirkungen**

Die interindividuelle Variabilität im Ansprechen sowie das häufige Auftreten unerwünschter Arzneimittelwirkungen sind ein großes Problem bei der medikamentösen Behandlung schwerer Schmerzzustände mit Opioiden. Darauf zurückzuführende mangelnde analgetische Wirkeffekte oder Therapieabbrüche haben oft schwerwiegende Folgen für die Patienten, da Therapieoptionen mit vergleichbarer Wirksamkeit kaum zur Verfügung stehen.

Als Ursache für diese Variabilität werden physiologische Faktoren und vor allem genetische Varianten diskutiert. Diese können einerseits die Pharmakokinetik von Wirkstoffen dieser Arzneistoffklasse beeinflussen, aber auch direkten Einfluss auf die Signaltransduktion und die dadurch vermittelten erwünschten und unerwünschten Arzneistoffwirkungen ausüben. Der  $\mu$ -Opioidrezeptor ist hier von besonderem Interesse.

Die am häufigsten untersuchte hMOR-Variante ist der Nukleotidaustausch A>G in Position 118 im Exon 1. Die Untersuchungen von Zhang et al. an menschlichem Hirngewebe und transfizierten Hamsterovarzellen lassen darauf schließen, dass das 118G-Allel zu einer geringeren Expression von Rezeptorprotein führt [50]. Daraus kann die Hypothese abgeleitet werden, dass Opioide bei Trägern des 118G-Allels eine schlechtere Wirksamkeit zeigen. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse klinischer Studien unterstützt [21, 51].

So untersuchte die Arbeitsgruppe um Klepstad 207 kaukasische Tumorpatienten, die als Schmerztherapie Morphin oral erhielten. Bei den Patienten wurden die vier hMOR-Varianten -172 G>T, 118 A>G, IVS2+31 G>A und IVS2-691 C>G bestimmt, und es wurde analysiert, ob sich ein Zusammenhang zwischen dem Genotyp und der Qualität der Schmerztherapie, der Morphindosis und der Morphinserumkonzentration herstellen lässt. Unter den männlichen Patienten (n=96) fanden sich vier Träger des Genotyp 118 GG. Diese zeigten im Vergleich zu homozygoten Trägern des Wildtypallels (Genotyp 118 AA) bzw. zu heterozygoten Patienten einen signifikant höheren Morphinbedarf und eine signifikant höhere Morphinserumkonzentration. Hinsichtlich der Opioidnebenwirkungen Übelkeit, Obstipation, Appetitlosigkeit, Luftnot und Abgeschlagenheit bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Genotypen [27].

Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Campa *et al.*, die in ihrer Studie die Auswirkungen der Polymorphismen hMOR 118 A>G und MDR1 3435 C>T auf die Effektivität einer Schmerztherapie mit Morphin bei 137 kaukasischen Tumorpatienten untersuchten. Auch in dieser Studie zeigten Patienten mit 118GG-Genotyp ein signifikant schlechteres Ansprechen auf die Schmerztherapie. Die im Verlauf dieser Studie aufgetretenen Morphin-Nebenwirkungen - Erbrechen, Obstipation, Durchfall, Schwindel, Juckreiz und Angstgefühle - konnten mit keiner der untersuchten Varianten assoziiert werden [52].

Die klinische Relevanz von hMOR 118 A>G wurde auch bei nichtkaukasischen Patienten nachgewiesen. Sia *et al.* führten eine Studie durch, an der 588 han-chinesische Frauen teilnahmen, die sich einer Sectio caesarea unterzogen hatten. Die Patientinnen führten sich Morphin mittels intravenöser Schmerzpumpen selbst zu. Morphinmenge und Ausmaß der Schmerzstillung wurden dokumentiert. Die Studienteilnehmerinnen wurden bezüglich hMOR 118 A>G genotypisiert. Auch in dieser Studie wurde beobachtet, dass heterozygote, noch deutlicher aber homozygote Trägerinnen der Variante 118 GG eine höhere Morphindosis benötigen als homozygote Trägerinnen des Wildtypallels. Zudem war der Therapieerfolg bei Patientinnen mit 118GG-Genotyp signifikant schlechter als bei Frauen mit einem anderen 118A>G-Genotyp. Die beobachteten Nebenwirkungen (Übelkeit, Erbrechen und Juckreiz) konnten mit keiner der untersuchten Varianten assoziiert werden [53].

Ebenfalls im Exon 1 befindet sich die Variante 17 C>T. Die bisher veröffentlichten Ergebnisse von klinischen Studien, die den Effekt dieser Variante auf die Pharmakodynamik von Opioiden untersucht haben, sind allerdings sehr uneinheitlich [21]. Neben den genetischen Polymorphismen im Exon 1 konnte auch für drei Varianten im Exon 2 ein Zusammenhang mit der  $\mu$ -Opioidrezeptor vermittelten Signaltransduktion beobachtet werden. Es handelt sich um die drei Nukleotidaustausche 779 G>A, 794 G>A und 802 T>C. Für diese konnte *in vitro* eine Änderung der Opioidwirkung am Rezeptor gezeigt werden [24, 25]. Aufgrund ihres seltenen Auftretens konnten diese Ergebnisse bis dato nicht durch klinischen Studien bestätigt werden [21].

#### **4.4 Andere genetische Varianten mit Einfluss auf Morphinwirkungen und -nebenwirkungen**

Neben dem  $\mu$ -Opioidrezeptor-Gen gibt es noch weitere polymorphe Kandidatengene, deren genetische Variabilität die großen interindividuellen Unterschiede der Opioidwir-

kung mit verursachen könnte. So gibt die Arbeitsgruppe von Lötsch *et al.* einen Überblick zu verschiedenen genetischen Varianten von Enzymen im Arzneimittelstoffwechsel, wie Cytochrom P450 2D6 (CYP 2D6) oder Catechol-O-Methyltransferase (COMT), Arzneimitteltransportern (z.B. P-Glykoprotein) und anderen, in ihrer Auswirkung auf die Opioidwirkung noch nicht ganz verstandene Rezeptoren, wie dem Melanocortin-1-Rezeptor (MC1R), welche Einfluss auf die Pharmakodynamik und Pharmakokinetik der Opioide haben [51].

#### **4.4.1 Catechol-O-Methyltransferase-Gen**

Die COMT ist ein Enzym, das durch O-Methylierung verschiedene Neurotransmitter, wie Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin, deaktiviert. Der Einfluss ihrer genetischen Varianten auf die Verarbeitung und Therapie von Schmerzen liegt in einer Modulation der dopaminergen und adrenergen Signalübertragung begründet. Derzeit steht der SNP COMT 472 G>A im Fokus des wissenschaftlichen Interesses. Er führt zu einem Aminosäureaustausch von Valin gegen Methionin in Position 158. Träger dieser Variante haben eine geringere COMT-Aktivität, was eine Verlangsamung des Dopaminabbaus nach sich zieht. Die verstärkte Aktivität der Dopamin-Rezeptoren führt über einen vermehrten Verbrauch an Enkephalinen zu gesteigerter Expression des  $\mu$ -Opioidrezeptor-Gens, was wiederum die Zahl der  $\mu$ -Opioidrezeptoren erhöht [54]. Eine aktuelle Studie der Arbeitsgruppe um Reyes-Gibby untersuchte den Einfluss von 472 G>A auf den Morphinbedarf und den Erfolg der Schmerztherapie bei 207 kaukasischen Tumorpatienten. Sie konnte bei besserer Analgesie einen signifikant geringeren Morphinbedarf bei Trägern des Genotyps COMT 472 AA zeigen. Eine Aussage zu Auswirkungen des SNP 472 G>A auf die Morphin-assoziierten Nebenwirkungen wird im Rahmen der Studie nicht gemacht [55].

#### **4.4.2 MDR1-Gen**

Der Effluxtransporter P-Glykoprotein (ABCB1) ist ein Produkt des Multi-Drug-Resistance (MDR1)-Gens. P-Glykoprotein ist ein aktiver Transporter, der unter Energieverbrauch Stoffe, so auch verschiedene Opioide, aus Zellen hinaus pumpt [56]. Er ist unter anderem in der Membran von Nervenzellen zu finden und eine wichtige Komponente der Blut-Hirn-Schranke [57]. Im Bereich des Gastrointestinaltrakts beeinflusst er die Absorption oral verabreichter Medikamente [58]. Unter seinen verschiedenen genetischen Varianten ist insbesondere der SNP 3435 C>T von Interesse, der Einfluss auf die Expres-

sion des MDR1-Gens zu haben scheint. So wurde in verschiedenen Studien eine verminderte P-Glykoprotein-Expression bei homozygoten Trägern des 3435T-Allels gefunden [59]. Die oben bereits geschilderte Untersuchung der Arbeitsgruppe Campa *et al.* untersuchte – neben hMOR 118 A>G – auch den Einfluss von MDR1 3435 C>T auf den Erfolg einer Schmerztherapie mit Morphin. Unter den 137 Studienteilnehmern fanden sich 38 Träger des Genotyps MDR1 3435 TT. Im Vergleich zu heterozygoten bzw. homozygoten Trägern des Wildtypallels bewerteten sie den Erfolg der Schmerztherapie auf einer numerischen Rating-Skala signifikant besser. Eine Assoziation zu den im Verlauf der Studie aufgetretenen morphintypischen Nebenwirkungen Erbrechen, Obstipation, Durchfall, Schwindel, Juckreiz und Angstgefühle ließ sich mit keiner der Varianten von MDR1 3435 C>T herstellen [52].

#### **4.4.3 Melanocortin-1-Rezeptor-Gen**

Der Melanocortin-1-Rezeptor gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und ist in der Membran von Melanozyten lokalisiert. Er hat Auswirkungen auf die Pigmentation von Haut und Haaren sowie immunmodulierende Effekte [60, 61]. Noch nicht vollständig verstanden ist der in einer Studie von Mogli *et al.* gezeigte Einfluss von genetischen Varianten des MC1R auf die Schmerzempfindlichkeit und die Wirkung von Morphin-6-Glucoronid (M6G). In dieser Studie wurden 47 kaukasische Probanden unter anderem auf die MC1R-Varianten 29insA, 451 C>T, 478 C>T und 880 G>C untersucht, die zu einem Funktionsverlust von MC1R führen. Bei 22 Probanden, die mindestens zwei dieser Varianten trugen, konnte eine signifikant höhere Schmerztoleranz sowie eine effektivere Analgesie durch M6G im Vergleich zu den übrigen 25 Probanden, deren MC1R-Gen eine oder keine dieser Varianten aufwies, beobachtet werden [62].

#### **4.4.4 Cytochrom-P450 2D6-Gen**

Das Enzym CYP2D6 spielt eine bedeutende Rolle in der Metabolisierung von Fremdstoffen im Körper. Darunter fallen Arzneistoffe, wie z. B.  $\beta$ -Blocker und Antidepressiva, aber auch  $\mu$ -Opioidrezeptor-Agonisten wie Tramadol. Tramadol wird durch CYP2D6 in O-Desmethyltramadol umgewandelt, das eine 200fach höhere Affinität zum  $\mu$ -Opioidrezeptor hat als die Muttersubstanz [63]. Bei ca. 7 % der Kaukasier fehlt genetisch bedingt die CYP2D6-Enzymaktivität. Ursache sind Varianten des CYP2D6-Gens, die zur Bildung eines nicht funktionstüchtigen CYP2D6 führen. Treten diese Varianten auf beiden Allelen auf, besitzt deren Träger kein aktives CYP2D6 und wird als

„poor metabolizer“ (PM) bezeichnet. In einer klinischen Studie durch die Arbeitsgruppe um Stamer wurde ein Kollektiv von 300 kaukasischen Patienten hinsichtlich der Auswirkungen der CYP2D6-Aktivität auf die postoperative Schmerztherapie untersucht. Alle Patienten erhielten nach abdominalen Eingriffen neben einer Basismedikation eine patienten-kontrollierte Schmerztherapie, die hauptsächlich aus Tramadol bestand und bei Bedarf durch zusätzliche Schmerzmittel ergänzt werden konnte. Der Erfolg der Analgesie wurde mit Hilfe einer numerischen Ratingskala bestimmt. Alle Patienten wurden bezüglich CYP2D6 genotypisiert, 30 Patienten wurden auf dieser Grundlage als PMs eingestuft. Bei diesen Patienten wurde im Vergleich zu Patienten mit vorhandener CYP2D6-Aktivität ein signifikant höherer Bedarf an Tramadol und an zusätzlichen Schmerzmitteln festgestellt. Die Häufigkeit der opioidtypischen Nebenwirkungen Übelkeit und Erbrechen war nicht vom CYP2D6-Genotyp abhängig [64].

Die hier vorgestellten, durch klinische Studien belegten genetischen Einflüsse auf die Morphinwirkung sind lediglich Beispiele und erheben keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Lötsch *et al.* messen allerdings den Varianten hMOR 118 A>G, COMT 472 G>A und den nicht funktionellen Varianten von MC1R eine so große Bedeutung bei, dass sie diese zur Grundlage von Dosierungsempfehlungen gemacht haben [51].

#### **4.5 Ausblick**

Die positiven und negativen Wirkungen der Opiode können von Mensch zu Mensch große Unterschiede aufweisen. Ein Teil dieser Variabilität ist genetischen Ursprungs. In den letzten Jahren ist es gelungen, wichtige Kandidatengene für die Opioidwirkung zu identifizieren. Dabei handelt es sich um Gene für Opioidrezeptoren, Schlüsselenzyme im Opioidstoffwechsel, Arzneimitteltransporter und andere Gene, deren Produkte die Opioidwirkung modifizieren. Da diese Kandidatengene alle polymorph sind, ist der Beitrag der genetischen Komponente zur Variabilität der Opioidwirkung sehr komplex.

Die Varianten einzelner Gene haben sich in entsprechenden Studien bereits als klinisch relevant erwiesen, bei der überwiegenden Mehrzahl steht der Nachweis einer funktionellen Bedeutung jedoch noch aus. Auch die vorliegende Untersuchung wurde mit dem Ziel unternommen, genetische Merkmale mit klinischen Effekten zu korrelieren, um herauszufinden, ob sich aus dem Vorhandensein dieser Merkmale Konsequenzen für die Schmerztherapie ableiten lassen. Studien wie diese sind notwendig, um in der Fülle polymorpher Allele, die für den Erfolg einer Opioidtherapie wesentlichen zu bestimmen.

Diese könnten dann – mit einem geeigneten genetischen Testsystem – vor Beginn der Therapie bestimmt werden. Damit wäre die Möglichkeit gegeben, die Schmerztherapie durch individuelle Anpassung an die genetische Ausstattung des Patienten effektiver und nebenwirkungsärmer zu gestalten. Die vorliegende Arbeit will dazu beitragen, diesem Ziel näherzukommen.

## 5 Zusammenfassung

Es gibt in Deutschland ca. 6 Millionen Patienten, die unter chronischen Schmerzen leiden. Diese werden vornehmlich mit Opioiden behandelt. Mit diesen Medikamenten können allerdings 10 - 12 % der Patienten nur unbefriedigend analgesiert werden. Ein häufiger Grund für das Versagen der Schmerztherapie mit Opioiden sind deren Nebenwirkungen. Diese werden, wie die analgetische Wirkung, über den  $\mu$ -Opioidrezeptor vermittelt. In der vorliegenden Arbeit wurden genetische Varianten des hMOR-Gens, welche im die Transkription regulierenden Promotor liegen, analysiert und ihre Auswirkung auf opioidvermittelte Nebenwirkungen untersucht.

Im Rahmen einer prospektiven klinischen Studie wurden 99 kaukasische Schmerztherapiepatienten hinsichtlich der opioidvermittelten Nebenwirkungen Obstipation, Übelkeit und Erbrechen befragt. 29 Patienten wurden aufgrund der Schwere der von ihnen angegebenen Nebenwirkungen ausgewählt.

Bei diesen Patienten wurde mittels Sanger-Sequenzierung der gesamte Promotorbereich des hMOR-Gens bis in die 5'-UTR auf genetische Varianten untersucht. Dabei konnten drei Varianten von den insgesamt 29 Varianten gefunden werden, die zum Zeitpunkt der Untersuchung in diesem Genabschnitt bereits bekannt waren. Es handelt sich um -172 G>T (rs6912029), -1748 G>A (rs12205732) und -2044C>A (rs17180961). Für diese wurden PCR-RFLP-basierte Genotypisierungsverfahren entwickelt, die die Bestimmung bei einer größeren Zahl von Proben erlauben. Anschließend wurden die drei Varianten bei einer Kontrollgruppe von 206 gesunden Kaukasiern bestimmt.

Der Vergleich zwischen der Patienten- und der Kontrollgruppe zeigte für die Varianten -172 G>T und -1748 G>A keinen signifikanten Unterschied in der Häufigkeit des Auftretens. Die dritte Variante, -2044C>A, war in der Patientengruppe mit einer Allelfrequenz von 5,2 % häufiger als bei den Kontrollen (1,7 %) vertreten, jedoch wurde aufgrund der kleinen Patientengruppe hier mit  $p = 0,12$  das gewünschte Signifikanzniveau von  $p = 0,05$  nicht erreicht.

Damit deutet sich die Möglichkeit an, dass das Allel -2044A mit einer stärkeren Ausprägung von Nebenwirkungen verbunden sein könnte. Erkenntnisse über die funktionelle Konsequenz dieses Basenaustauschs, die eine solche Vermutung mit einem



physiologischen Fundament versehen könnten, liegen nicht vor. Allerdings kann diese Studie nur als eine erste orientierende Untersuchung angesehen werden, da die Patientengruppe mit einer Größe von  $n=29$  zu klein war, um zu statistisch tragfähigen Ergebnissen zu kommen.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Verhaak, P. F.; Kerssens, J. J.; Dekker, J.; Sorbi, M. J. und Bensing, J. M. (1998): Prevalence of chronic benign pain disorder among adults: a review of the literature, *Pain* (Band 77), Nr. 3, Seite 231-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9808348](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9808348)
- [2] Nickel, R. und Raspe, H. H. (2001): [Chronic pain: epidemiology and health care utilization], *Nervenarzt* (Band 72), Nr. 12, Seite 897-906. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11789433](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11789433)
- [3] Galer, B. S.; Coyle, N.; Pasternak, G. W. und Portenoy, R. K. (1992): Individual variability in the response to different opioids: report of five cases, *Pain* (Band 49), Nr. 1, Seite 87-91. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1375728](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1375728)
- [4] Lasagna, L. und Beecher, H. K. (1954): The optimal dose of morphine, *J Am Med Assoc* (Band 156), Nr. 3, Seite 230-4. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=13191954](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13191954)
- [5] Beecher, H. K. (1946): Pain in Men Wounded in Battle, *Ann Surg* (Band 123), Nr. 1, Seite 96-105. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17858731](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17858731)
- [6] Beecher, H. K. (1959): Generalization from pain of various types and diverse origins, *Science* (Band 130), Nr. 3370, Seite 267-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=13668556](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13668556)
- [7] Pasternak, G. W. (1993): Pharmacological mechanisms of opioid analgesics, *Clin Neuropharmacol* (Band 16), Nr. 1, Seite 1-18. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8093680](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8093680)
- [8] Wang, J. B.; Imai, Y.; Eppler, C. M.; Gregor, P.; Spivak, C. E. und Uhl, G. R. (1993): mu opiate receptor: cDNA cloning and expression, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 90), Nr. 21, Seite 10230-4. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8234282](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8234282)
- [9] Surratt, C. K.; Johnson, P. S.; Moriwaki, A.; Seidleck, B. K.; Blaschak, C. J.; Wang, J. B. und Uhl, G. R. (1994): -mu opiate receptor. Charged transmembrane domain amino acids are critical for agonist recognition and intrinsic activity, *J Biol Chem* (Band 269), Nr. 32, Seite 20548-53. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8051154](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8051154)
- [10] Reisine, T. und Bell, G. I. (1993): Molecular biology of opioid receptors, *Trends Neurosci* (Band 16), Nr. 12, Seite 506-10. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7509520](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7509520)
- [11] Matthes, H. W.; Maldonado, R.; Simonin, F.; Valverde, O.; Slowe, S.; Kitchen, I.; Beffert, K.; Dierich, A.; Le Meur, M.; Dolle, P.; Tzavara, E.; Hanoune, J.; Roques, B. P. und Kieffer, B. L. (1996): Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene, *Nature* (Band 383), Nr. 6603, Seite 819-23. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8893006](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8893006)

- [12] Forth W, Henschler D (1996): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 7. Auflage. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, ISBN: 3-8274-0088-0.
- [13] Kuhar, M. J.; Pert, C. B. und Snyder, S. H. (1973): Regional distribution of opiate receptor binding in monkey and human brain, *Nature* (Band 245), Nr. 5426, Seite 447-50. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=4127185](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4127185)
- [14] Pfeiffer, A.; Pasi, A.; Mehraein, P. und Herz, A. (1982): Opiate receptor binding sites in human brain, *Brain Res* (Band 248), Nr. 1, Seite 87-96. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6289997](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6289997)
- [15] Frost, J. J. (1989): Imaging mu-opiate receptors in epilepsy by positron emission tomography, *Semin Neurol* (Band 9), Nr. 4, Seite 317-22. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2561930](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2561930)
- [16] Frost, J. J. (1988): Receptor localization and quantification with PET, *Radiology* (Band 169), Nr. 1, Seite 273-4. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3262227](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3262227)
- [17] Wendel, B. und Hoehe, M. R. (1998): The human mu opioid receptor gene: 5' regulatory and intronic sequences, *J Mol Med* (Band 76), Nr. 7, Seite 525-32. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9660170](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9660170)
- [18] Bergen, A. W.; Kokoszka, J.; Peterson, R.; Long, J. C.; Virkkunen, M.; Linnoila, M. und Goldman, D. (1997): Mu opioid receptor gene variants: lack of association with alcohol dependence, *Mol Psychiatry* (Band 2), Nr. 6, Seite 490-4. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9399694](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9399694)
- [19] Bond, C.; LaForge, K. S.; Tian, M.; Melia, D.; Zhang, S.; Borg, L.; Gong, J.; Schluger, J.; Strong, J. A.; Leal, S. M.; Tischfield, J. A.; Kreek, M. J. und Yu, L. (1998): Single-nucleotide polymorphism in the human mu opioid receptor gene alters beta-endorphin binding and activity: possible implications for opiate addiction, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 95), Nr. 16, Seite 9608-13. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9689128](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9689128)
- [20] Hoehe, M. R.; Kopke, K.; Wendel, B.; Rohde, K.; Flachmeier, C.; Kidd, K. K.; Berrettini, W. H. und Church, G. M. (2000): Sequence variability and candidate gene analysis in complex disease: association of mu opioid receptor gene variation with substance dependence, *Hum Mol Genet* (Band 9), Nr. 19, Seite 2895-908. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11092766](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11092766)
- [21] Lotsch, J. und Geisslinger, G. (2005): Are mu-opioid receptor polymorphisms important for clinical opioid therapy?, *Trends Mol Med* (Band 11), Nr. 2, Seite 82-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15694871](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15694871)
- [22] Befort, K.; Filliol, D.; Decaillet, F. M.; Gaveriaux-Ruff, C.; Hoehe, M. R. und Kieffer, B. L. (2001): A single nucleotide polymorphic mutation in the human mu-opioid receptor severely impairs receptor signaling, *J Biol Chem* (Band 276), Nr. 5, Seite 3130-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11067846](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11067846)
- [23] Beyer, A.; Koch, T.; Schroder, H.; Schulz, S. und Holtt, V. (2004): Effect of the A118G polymorphism on binding affinity, potency and agonist-mediated endocytosis, desensitization, and resensitization of the human mu-opioid receptor, *J Neurochem* (Band 89), Nr. 3, Seite 553-60. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15086512](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15086512)
- [24] Koch, T.; Krosiak, T.; Averbeck, M.; Mayer, P.; Schroder, H.; Raulf, E. und Holtt, V. (2000): Allelic variation S268P of the human mu-opioid receptor affects both desensitization and G protein coupling, *Mol Pharmacol* (Band 58), Nr. 2, Seite 328-34. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10908300](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10908300)
- [25] Wang, D.; Quillan, J. M.; Winans, K.; Lucas, J. L. und Sadee, W. (2001): Single nucleotide polymorphisms in the human mu opioid receptor gene alter basal G protein coupling and calmodulin binding, *J Biol Chem* (Band 276), Nr. 37, Seite 34624-30. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11457836](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11457836)
- [26] Mayer, P. und Holtt, V. (2006): Pharmacogenetics of opioid receptors and addiction, *Pharmacogenet Genomics* (Band 16), Nr. 1, Seite 1-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16344716](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16344716)
- [27] Klepstad, P.; Rakvag, T. T.; Kaasa, S.; Holthe, M.; Dale, O.; Borchgrevink, P. C.; Baar, C.; Vikan, T.; Krokan, H. E. und Skorpen, F. (2004): The 118 A > G polymorphism in the human micro-opioid receptor gene may increase morphine requirements in patients with pain caused by malignant disease, *Acta Anaesthesiol Scand* (Band 48), Nr. 10, Seite 1232-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15504181](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15504181)
- [28] Rommelspacher, H.; Smolka, M.; Schmidt, L. G.; Samochowiec, J. und Hoehe, M. R. (2001): Genetic analysis of the mu-opioid receptor in alcohol-dependent individuals, *Alcohol* (Band 24), Nr. 2, Seite 129-35. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11522434](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11522434)
- [29] Szeto, C. Y.; Tang, N. L.; Lee, D. T. und Stadlin, A. (2001): Association between mu opioid receptor gene polymorphisms and Chinese heroin addicts, *Neuroreport* (Band 12), Nr. 6, Seite 1103-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11338173](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11338173)
- [30] Shi, J.; Hui, L.; Xu, Y.; Wang, F.; Huang, W. und Hu, G. (2002): Sequence variations in the mu-opioid receptor gene (OPRM1) associated with human addiction to heroin, *Hum Mutat* (Band 19), Nr. 4, Seite 459-60. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11933204](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11933204)
- [31] Mayer, P. und Holtt, V. (2001): Allelic and somatic variations in the endogenous opioid system of humans, *Pharmacol Ther* (Band 91), Nr. 3, Seite 167-77. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11744066](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11744066)
- [32] Kraus, J.; Borner, C.; Giannini, E.; Hickfang, K.; Braun, H.; Mayer, P.; Hoehe, M. R.; Ambrosch, A.; Konig, W. und Holtt, V. (2001): Regulation of mu-opioid receptor gene transcription by interleukin-4 and influence of an allelic variation within a STAT6 transcription factor binding site, *J Biol Chem* (Band 276), Nr. 47, Seite 43901-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11572871](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11572871)
- [33] Luo, X.; Kranzler, H. R.; Zhao, H. und Gelernter, J. (2003): Haplotypes at the OPRM1 locus are associated with susceptibility to substance dependence in European-Americans, *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* (Band 120), Nr. 1, Seite 97-108. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12815747](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12815747)

- [34] Klepstad, P.; Dale, O.; Skorpen, F.; Borchgrevink, P. C. und Kaasa, S. (2005): Genetic variability and clinical efficacy of morphine, *Acta Anaesthesiol Scand* (Band 49), Nr. 7, Seite 902-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16045647](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16045647)
- [35] Caraceni, A.; Cherny, N.; Fainsinger, R.; Kaasa, S.; Poulain, P.; Radbruch, L. und De Conno, F. (2002): Pain measurement tools and methods in clinical research in palliative care: recommendations of an Expert Working Group of the European Association of Palliative Care, *J Pain Symptom Manage* (Band 23), Nr. 3, Seite 239-55. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11888722](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11888722)
- [36] Katz, N. (2002): The impact of pain management on quality of life, *J Pain Symptom Manage* (Band 24), Nr. 1 Suppl, Seite S38-47. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12204486](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12204486)
- [37] Huskisson, E. C. (1974): Measurement of pain, *Lancet* (Band 2), Nr. 7889, Seite 1127-31. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=4139420](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4139420)
- [38] Huskisson, E. C.; Jones, J. und Scott, P. J. (1976): Application of visual-analogue scales to the measurement of functional capacity, *Rheumatol Rehabil* (Band 15), Nr. 3, Seite 185-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=968347](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=968347)
- [39] Jensen, M. P.; Karoly, P. und Braver, S. (1986): The measurement of clinical pain intensity: a comparison of six methods, *Pain* (Band 27), Nr. 1, Seite 117-26. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3785962](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3785962)
- [40] Price, S. (1994): Assessing children's pain, *Br J Nurs* (Band 3), Nr. 20, Seite 1046-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7827451](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7827451)
- [41] Sorge, J.; Luders, B.; Werry, C. und Pichlmayr, I. (1996): [Supply of opioid analgesics to outpatients with cancer pain], *Schmerz* (Band 10), Nr. 6, Seite 283-91. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12799838](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12799838)
- [42] Collins, J.; Shimoyama, N.; Bruera, E.; Takeda, F.; Kakizoe, T. und Sugimura, T. (2001): Report of the Fourteenth International Symposium of the Foundation for Promotion of Cancer Research: Pain Control, Palliative Medicine and Psycho-oncology, *Jpn J Clin Oncol* (Band 31), Nr. 9, Seite 459-68. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11689603](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11689603)
- [43] Serlin, R. C.; Mendoza, T. R.; Nakamura, Y.; Edwards, K. R. und Cleeland, C. S. (1995): When is cancer pain mild, moderate or severe? Grading pain severity by its interference with function, *Pain* (Band 61), Nr. 2, Seite 277-84. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7659438](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7659438)
- [44] Farrar, J. T.; Young, J. P., Jr.; LaMoreaux, L.; Werth, J. L. und Poole, R. M. (2001): Clinical importance of changes in chronic pain intensity measured on an 11-point numerical pain rating scale, *Pain* (Band 94), Nr. 2, Seite 149-58. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11690728](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11690728)
- [45] Marsh, A.; Spurdle, A. B.; Turner, B. C.; Fereday, S.; Thorne, H.; Pupo, G. M.; Mann, G. J.; Hopper, J. L.; Sambrook, J. F. und Chenevix-Trench, G. (2001): The intronic G13964C variant in p53 is not a high-risk mutation in familial breast cancer in Austra-

- lia, *Breast Cancer Res* (Band 3), Nr. 5, Seite 346-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11597326](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11597326)
- [46] Barnes, W. M. (1994): PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 91), Nr. 6, Seite 2216-20. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8134376](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8134376)
- [47] Wilkie, H.; Osei-Lah, A.; Chioza, B.; Nashef, L.; McCormick, D.; Asherson, P. und Makoff, A. J. (2002): Association of mu-opioid receptor subunit gene and idiopathic generalized epilepsy, *Neurology* (Band 59), Nr. 5, Seite 724-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12221164](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12221164)
- [48] Makoff, A.; Asherson, P. und Nashef, L. (2005): Authors' voluntary retraction: H. Wilkie, A. Osei-Lah, B. Chioza, L. Nashef, D. McCormick, P. Asherson, and A.J. Makoff: Association of the mu-opioid receptor subunit gene and idiopathic generalized epilepsy. *Neurology* 2002;59:724-728, *Neurology* (Band 64), Nr. 3, Seite 579. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15699410](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15699410)
- [49] Barratt, C.; Lai, T.; Nashef, L.; Valentin, A.; Fisniku, L.; Moran, N.; Asherson, P. und Makoff, A. (2006): No association of single nucleotide polymorphisms in the mu-opioid receptor subunit gene with idiopathic generalized epilepsy, *Epilepsia* (Band 47), Nr. 10, Seite 1728-31. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17054695](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17054695)
- [50] Zhang, Y.; Wang, D.; Johnson, A. D.; Papp, A. C. und Sadee, W. (2005): Allelic expression imbalance of human mu opioid receptor (OPRM1) caused by variant A118G, *J Biol Chem* (Band 280), Nr. 38, Seite 32618-24. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16046395](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16046395)
- [51] Lotsch, J. und Geisslinger, G. (2006): Current evidence for a genetic modulation of the response to analgesics, *Pain* (Band 121), Nr. 1-2, Seite 1-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16472919](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16472919)
- [52] Campa, D.; Gioia, A.; Tomei, A.; Poli, P. und Barale, R. (2008): Association of ABCB1/MDR1 and OPRM1 gene polymorphisms with morphine pain relief, *Clin Pharmacol Ther* (Band 83), Nr. 4, Seite 559-66. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17898703](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17898703)
- [53] Sia, A. T.; Lim, Y.; Lim, E. C.; Goh, R. W.; Law, H. Y.; Landau, R.; Teo, Y. Y. und Tan, E. C. (2008): A118G single nucleotide polymorphism of human mu-opioid receptor gene influences pain perception and patient-controlled intravenous morphine consumption after intrathecal morphine for postcesarean analgesia, *Anesthesiology* (Band 109), Nr. 3, Seite 520-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18719451](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18719451)
- [54] Zubieta, J. K.; Heitzeg, M. M.; Smith, Y. R.; Bueller, J. A.; Xu, K.; Xu, Y.; Koeppe, R. A.; Stohler, C. S. und Goldman, D. (2003): COMT val158met genotype affects mu-opioid neurotransmitter responses to a pain stressor, *Science* (Band 299), Nr. 5610, Seite 1240-3. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12595695](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12595695)
- [55] Reyes-Gibby, C. C.; Shete, S.; Rakvag, T.; Bhat, S. V.; Skorpen, F.; Bruera, E.; Kaasa, S. und Klepstad, P. (2007): Exploring joint effects of genes and the clinical ef-



- ficacy of morphine for cancer pain: OPRM1 and COMT gene, *Pain* (Band 130), Nr. 1-2, Seite 25-30. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17156920](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17156920)
- [56] Thompson, S. J.; Koszdin, K. und Bernards, C. M. (2000): Opiate-induced analgesia is increased and prolonged in mice lacking P-glycoprotein, *Anesthesiology* (Band 92), Nr. 5, Seite 1392-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10781286](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10781286)
- [57] Wandel, C.; Kim, R.; Wood, M. und Wood, A. (2002): Interaction of morphine, fentanyl, sufentanil, alfentanil, and loperamide with the efflux drug transporter P-glycoprotein, *Anesthesiology* (Band 96), Nr. 4, Seite 913-20. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11964599](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11964599)
- [58] John, A.; Kopke, K.; Gerloff, T.; Mai, I.; Rietbrock, S.; Meisel, C.; Hoffmeyer, S.; Kerb, R.; Fromm, M. F.; Brinkmann, U.; Eichelbaum, M.; Brockmoller, J.; Cascorbi, I. und Roots, I. (2002): Modulation of steady-state kinetics of digoxin by haplotypes of the P-glycoprotein MDR1 gene, *Clin Pharmacol Ther* (Band 72), Nr. 5, Seite 584-94. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12426522](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12426522)
- [59] Sakaeda, T. (2005): MDR1 genotype-related pharmacokinetics: fact or fiction?, *Drug Metab Pharmacokinet* (Band 20), Nr. 6, Seite 391-414. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16415525](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16415525)
- [60] Schaffer, J. V. und Bolognia, J. L. (2001): The melanocortin-1 receptor: red hair and beyond, *Arch Dermatol* (Band 137), Nr. 11, Seite 1477-85. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11708951](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11708951)
- [61] Tatro, J. B. (1996): Receptor biology of the melanocortins, a family of neuroimmunomodulatory peptides, *Neuroimmunomodulation* (Band 3), Nr. 5, Seite 259-84. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9218248](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9218248)
- [62] Mogil, J. S.; Ritchie, J.; Smith, S. B.; Strasburg, K.; Kaplan, L.; Wallace, M. R.; Romberg, R. R.; Bijl, H.; Sartor, E. Y.; Fillingim, R. B. und Dahan, A. (2005): Melanocortin-1 receptor gene variants affect pain and mu-opioid analgesia in mice and humans, *J Med Genet* (Band 42), Nr. 7, Seite 583-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15994880](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15994880)
- [63] Poulsen, L.; Broesen, K.; Arendt-Nielsen, L.; Gram, L. F.; Elbaek, K. und Sindrup, S. H. (1996): Codeine and morphine in extensive and poor metabolizers of sparteine: pharmacokinetics, analgesic effect and side effects, *Eur J Clin Pharmacol* (Band 51), Nr. 3-4, Seite 289-95. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9010701](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9010701)
- [64] Stamer, U. M.; Lehnen, K.; Hothker, F.; Bayerer, B.; Wolf, S.; Hoefft, A. und Stuber, F. (2003): Impact of CYP2D6 genotype on postoperative tramadol analgesia, *Pain* (Band 105), Nr. 1-2, Seite 231-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14499440](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14499440)

## **7 Curriculum vitae**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

---



## 8 Danksagung

Herrn Prof. Ivar Roots möchte ich für die Überlassung des Themas sowie für die Unterstützung während dieser Arbeit danken.

Herrn Dr. Rolf Kaiser danke ich für die Idee zu dieser Arbeit und für seine Hilfe und Anregung insbesondere in den ersten Monaten.

Frau Dr. Gabriele Laschinski danke ich herzlich für die Hilfe, wissenschaftliche Beratung, konstruktive Kritik und die abschliessende Durchsicht dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank geht an Dr. Mark Goldammer dessen freundschaftliche Hilfe in praktischen wie theoretischen Fragen dieser Arbeit erst zu einem Abschluss verholfen hat.

Ein grosses Dankeschön geht an die Mitarbeiter des Instituts für klinische Pharmakologie, insbesondere Frau Anja Alfandega, für die freundschaftliche Aufnahme in das Institut sowie die Anleitung und Hilfe während der praktisch experimentellen Arbeiten.

Frau Irene Jureczko danke ich für ihre schnelle orthografische und formale Korrektur dieser Arbeit.

Herzlich danke ich meinen Eltern und Freunden für die langjährige Motivation und die Geduld, die sie während dieser Zeit mit mir hatten.

## 9 Selbstständigkeitserklärung

„Ich, Nikolai Stahr, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Genetische Polymorphismen des  $\mu$ -Opioidrezeptor-Gens und ihre praktische Bedeutung in der Schmerztherapie“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift