

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

DISSERTATION

Untersuchung des Konzeptes der semiquantitativen
CYP2D6-Genosis bei Ultraschnellmetabolisierern im Vergleich zu
Schnellmetabolisierern anhand der Pharmakokinetik
von S- und R-Metoprolol

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Angela Seeringer

aus Osterode am Harz

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. J. Kirchheiner

2. Prof. Dr. med. U. Fuhr

3. Prof. Dr. med. I. Roots

Datum der Promotion: 07.12.2007

Für Leo & Kai

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	III
ABKÜRZUNGEN	VI
1. EINLEITUNG	1
1.1 Pharmakogenetik	1
1.2 Genetisch polymorpher Arzneistoffmetabolismus – das Cytochrom P450 Enzymsystem	2
1.3 Cytochrom P450 2D6	6
1.3.1 Langsammetabolisierer (PM – poor metabolizer)	8
1.3.2 Intermediate Metabolizer (IM)	11
1.3.3 Schnellmetabolisierer (EM – extensive metabolizer)	12
1.3.4 Ultraschnellmetabolisierer (UM – ultrarapid metabolizer)	13
1.4 CYP2D6 – semiquantitative Genodis	15
1.5 Phänotypisierung: Metoprolol als Probesubstanz für die CYP2D6-Aktivität	17
1.5.1 Metabolismus von Metoprolol	18
1.5.2. Auswirkungen des CYP2D6-Polymorphismus auf die β -Adrenorezeptorblockade von Metoprolol	19
1.5.3 Enantioselektivität von CYP2D6 bezüglich Metoprolol	20
1.5.4 Auswirkungen der Enantioselektivität von Metoprolol auf die β -Adrenorezeptorblockade	21
2. ZIEL DIESER ARBEIT	22
3. MATERIAL UND METHODEN	23
3.1 Probandenauswahl	23
3.2 Erweiterte CYP2D6-Typisierung der Probanden der klinischen Studie	24
3.3 HPLC-Analyse	42
3.4 Statistische Datenauswertung	44

4. ERGEBNISSE	45
4.1 Ergebnisse der Genotypisierung der Studienteilnehmer	45
4.2 Semiquantitative Gendosis (SGD) für CYP2D6	48
4.3 Auswirkungen der SGD auf die Pharmakokinetik von Metoprolol	51
4.4 Unterschiede in der Pharmakokinetik von R- und S-Metoprolol sowie deren Metabolite in Abhängigkeit von Phänotyp und SGD	53
4.4.1 Pharmakokinetische Auswertung nach CYP2D6-Phänotyp UM und EM	53
4.4.2 Pharmakokinetische Analyse im Hinblick auf Unterschiede in der SGD	54
5. DISKUSSION	56
5.1 CYP2D6 – semiquantitative Gendosis (SGD)	56
5.2 Metoprolol als Probesubstanz	57
5.3 Enantioselektivität des CYP2D6-Metabolismus von Metoprolol	59
5.3.1 Einfluss von CYP2D6 auf Enantiomere der Muttersubstanz	59
5.3.2 Einfluss von CYP2D6 auf Enantiomere der α -Hydroxy-Metabolite	59
6. ZUSAMMENFASSUNG	61
LITERATURVERZEICHNIS	62
PUBLIKATIONEN	72
LEBENS LAUF	73

Abkürzungen

AUC	Area under the concentration time curve (Fläche unter der Konzentration-Zeit-Kurve)
BMI	Body-Mass-Index
bp	Base pair (Basenpaar)
°C	Grad Celsius
Cl	Orale Clearance
C _{max}	Maximale Plasmakonzentration
CYP	Cytochrom P450
DDD	Defined Daily Doses (definierte Tagesdosen)
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dup	Duplikation
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Extensive Metabolizer (Schnellmetabolisierer)
h	Stunde
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie (Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie)
IM	Intermediär Metabolizer (Mittelschneller Metabolisierer)
kb	Kilobasen
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Mio.	Millionen
MR	Metabolic Ratio (Metabolisierungsquotient)
min	Minute
mM	Millimolar
n.	nach
n.b.	nicht benötigt
n.d.	nicht determiniert
Nr.	Nummer
n.s.	nicht signifikant
PM	Poor Metabolizer (Langsammetabolisierer)

PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PWO	Pyrococcus woesei
RFLP	Restriction Fragment Lengths Polymorphism (Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus)
resp.	respektive
s	Sekunde
SD	Standard Deviation (Standard-Abweichung)
SGD	Semiquantitative Gendosis
SNP	Single Nucleotid Polymorphism (Einzel-Nucleotid-Polymorphismus)
sog.	sogenannt
Taq	Thermus aquaticus
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tris	Tris-(Hydroxymethyl-)Aminomethan
U	Unit (Einheit)
u.a.	unter anderem
UM	Ultrarapid Metabolizer (Ultraschnellmetabolisierer)
μ M	Mikromolar
V	Volt
vs.	versus

1. Einleitung

1.1 Pharmakogenetik

Die Wirkung eines Arzneimittels kann in verschiedenen Personen trotz gleicher Dosierung erheblich variieren. Dies liegt zum einen an der unterschiedlichen Ausprägung persönlicher Merkmale wie Konstitution, Alter, Geschlecht oder Krankheitsstatus, die oftmals schon bei der Dosierung berücksichtigt werden (z.B. durch eine geringere Dosierung eines Medikamentes bei Patienten mit Niereninsuffizienz). Zum anderen können individuelle Variationen in genetischen Eigenschaften, z.B. genetische Polymorphismen, die Wirkung eines Medikamentes stark beeinflussen. Als Polymorphismen werden zum einen Änderungen in der Aminosäuresequenz der jeweiligen Gene bezeichnet, die Auswirkungen auf die Enzymexprimierung und -funktion haben, zum anderen der Austausch, der Verlust (Deletion) oder das Hinzufügen (Insertion) einzelner oder mehrere Basen (Meyer 1990). Mit der Erforschung dieser die Arzneimittelwirkung beeinflussenden genetischen Varianten beschäftigt sich die Pharmakogenetik, die als Teildisziplin der Pharmakologie zunehmend an Bedeutung gewinnt.

Die untersuchten genetischen Polymorphismen findet man u.a. in Genen, die für Arzneimittel metabolisierende und –transportierende Enzyme kodieren. In der Folge kann die Aktivität dieser Enzyme und Transporter herauf- oder herabgesetzt werden, wodurch die Wirkung eines verabreichten Medikamentes beeinflusst werden kann. Bei Herabsetzung der Metabolisierungsfähigkeit oder dem vollständigen Verlust der Enzymfunktion besteht die Gefahr der Kumulation des Medikamentes und seiner Metabolite mit dem Risiko des Auftretens schwerer Arzneimittelnebenwirkungen bei den betroffenen Patienten. Andererseits kann z.B. durch eine erhöhte Metabolisierungskapazität des Enzyms mit konsekutiv rascher Verstoffwechslung des gegebenen Medikamentes die Arzneimitteltherapie unwirksam werden, da das Medikament aufgrund des schnellen Metabolismus nicht mehr ausreichend konzentriert am Wirkort vorliegt (Kirchheiner et al. 2006).

Die genetischen Polymorphismen spielen somit für die Pharmakokinetik (Absorption, Distribution, Metabolismus und Elimination) eines Medikamentes eine bedeutende Rolle, indem die Biotransformation des Arzneimittels zu unwirksamen, wirksamen oder toxischen Metabo-

liten beeinflusst wird, woraus entsprechend eine unwirksame, wirksame oder toxische Arzneimitteltherapie resultieren kann.

Genetische Varianten finden sich aber auch in den Genen, die für Zielmoleküle eines Arzneimittels kodieren (z.B. Rezeptoren, Ionenkanäle, etc.). So können z.B. Polymorphismen in β -Adrenorezeptoren die Wirksamkeit einer Therapie mit β -Sympathomimetika beeinflussen. Somit sind auch auf der Ebene der Pharmakodynamik genetische Polymorphismen von Bedeutung (Kirchheiner et al. 2006).

Zum heutigen Zeitpunkt sind eine Vielzahl genetischer Polymorphismen bekannt, die einen Einfluss auf die Arzneimitteltherapie haben können. Eine standardisierte Testung aller Patienten auf einen bestimmten Genotyp ist jedoch noch nicht sinnvoll, da bislang keine konkreten therapeutisch verwertbaren Schlussfolgerungen und Therapieempfehlungen erstellt wurden (Kirchheiner et al. 2006).

Mit dieser Arbeit soll versucht werden, durch genaue Analyse eines polymorphen Gens und der hieraus resultierenden Auswirkungen auf die Pharmakokinetik eines bestimmten Arzneimittels weitere Informationen für eine individuelle Pharmakotherapie zu sammeln.

1.2 Genetisch polymorpher Arzneistoffmetabolismus – das Cytochrom P450 Enzymsystem

Das für diese Arbeit untersuchte polymorphe Gen ist CYP2D6, welches für das Arzneimittel metabolisierende Enzym gleichen Namens kodiert. Die Gruppe der Cytochrom P450-Enzyme, zu der CYP2D6 gehört, metabolisiert 70 - 80 % der in Kliniken gebräuchlichen Arzneimittel sowie eine Vielzahl von Xenobiotika und endogenen Substraten (wie Steroide, Gallensäuren, Fettsäuren, Leukotriene, biogene Amine, Prostaglandine und Retinoide) (Ingelman-Sundberg 2004). Diese Vielzahl der Substrate wird durch eine zweiphasig ablaufende Biotransformation mittels dieser Enzyme hydrophiler und somit leichter ausscheidbar gemacht. Die Klassifizierung der Cytochrom P450-Enzyme erfolgt durch eine einheitliche Nomenklatur auf Grund von Unterschieden in der Aminosäuresequenz der für das jeweilige CYP-Enzym (Cytochrom P450) kodierenden Gene. So bilden Cytochrome, deren Aminosäuresequenz zu mehr als 40 % identisch ist, eine Familie, die durch arabische Ziffern kenntlich gemacht wird (CYP2). Cy-

tochrome der gleichen Subfamilie sind in ihrer Aminosäuresequenz zu mehr als 55 % identisch und mittels nachgestelltem Großbuchstaben gekennzeichnet (CYP2D). Eine weitere angefügte Zahl definiert das jeweilige Gen (CYP2D6) (Nelson et al. 1996).

Zur Zeit sind ca. 107 humane Cytochrom P450-Gene identifiziert, die für 57 aktive Cytochrom P450-Enzyme kodieren (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromP450.html>). Die in ähnlich großer Zahl vorliegenden Pseudogene (59) können durch vorzeitigen Abbruch des Leserahmens (reading-frame) keine aktiven Enzyme exprimieren und erhalten zur Kennzeichnung den Buchstaben „P“ hinter dem CYP-Namen. Man vermutet, dass Pseudogene als Folge von Genduplikationen entstanden sind, die im Laufe der Evolution degenerierten und ihre Funktion verloren haben.

Mehr als 18 Familien von Cytochrom P450-Genen und 43 Subfamilien sind beim Menschen bekannt. Sie sind in folgender Tabelle aufgelistet (aus Nebert & Russell 2002):

Familie	Subfamilien	Gene	Pseudogene	Substrate & Funktion
CYP1	3	3	1	Xenobiotika, Arachidonsäure, Eikosa-noide
CYP2	13	16	16	Xenobiotika, Arachidonsäure, Eikosa-noide
CYP3	1	4	2	Xenobiotika, Arachidonsäure, Eikosa-noide
CYP4	5	12	10	Arachidonsäure, Fettsäuren, Eikosa-noide
CYP5	1	1	0	Thromboxan A2 Synthase
CYP7	2	2		Cholesterol, Gallensäurebiosynthese
CYP8	2	2		Prostacyclin-Synthase, Gallensäure-synthese
CYP11	2	3		Steroidbiosynthese
CYP17	1	1		Steroid-17- α -Hydroxylase
CYP19	1	1		Steroidbiosynthese (Aromatase für Östrogensynthese)
CYP20	1	1		unbekannt
CYP21	1	1	1	Steroid-21-Hydroxylase
CYP24	1	1		Vitamin D3-24-Hydroxylase
CYP26	3	3		Retinoidsäurehydroxylierung
CYP27	3	3		Gallensäurebiosynthese, Vitamin D3-Hydroxylierung
CYP39	1	1		7- α -Hydroxylierung von 24-Hydroxy-Cholesterol
CYP46	1	1		Cholsterol 24-Hydroxylase
CYP51	1	1	3	Cholesterolbiosynthese (Lanosterol – 14- α -Demethylase)

Tabelle 1

Für den Metabolismus von Xenobiotika sind vor allem die Cytochrom P450-Familien 1-3 verantwortlich, die durch polymorphe Gene kodiert werden (Ingelman-Sundberg 2004). Unter

ihnen sind die polymorphen Enzyme CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19 und CYP2D6 für ca. 40 % des Arzneistoffmetabolismus verantwortlich (Ingelman-Sundberg 2004). Das Auftreten der Polymorphismen sowie deren Häufigkeit und Verteilung unterscheidet sich in den verschiedenen ethnischen Gruppen (Ingelman-Sundberg 1999). Tabelle 2 gibt hierzu einen Überblick (Ingelman-Sundberg 1999):

Enzym	Allele	Mutation	Konsequenz	Allelhäufigkeiten (%)			
				Kaukasier	Asiaten	Schwarz- Afrikaner	Äthiopier & Saudi-Arabier
CYP2A6	CYP2A6*2	Leu160His	Inaktives Enzym	1-3	0	n.d.	n.d.
	CYP2A6del	Gendeletion	Kein Enzym	1	15	n.d.	n.d.
CYP2C9	CYP2C9*2	Arg144Cys	Reduzierte Affinität für P450	8-13	0	n.d.	n.d.
	CYP2D9*3	Ile359Leu	geänderte Substrat-Spezifität	6-9	2-3	n.d.	n.d.
CYP2C19	CYP2C19*2	abweichende Splice-Seite	Inaktives Enzym	13	23-32	13	14-15
	CYP2C19*3	verfrühtes Stopp-Codon	Inaktives Enzym	0	6-10	n.d.	0-2
CYP2D6	CYP2D6*2xN	Genduplikation	Erhöhte Enzym-Aktivität	1-5	0-2	2	10-16
	CYP2D6*4	Defektes Splicing	Inaktives Enzym	12-21	1	2	1-4
	CYP2D6*5	Gendeletion	Kein Enzym	2-7	6	4	1-3
	CYP2D6*10	P34S;S486T	Instabiles Enzym	1-2	51	6	3-9
	CYP2D6*17	T107I;A296;S486T	Verminderte Substrataffinität	0	n.d.	34	3-9

Tabelle 2

Eine aktuelle Auflistung aller vorhandenen CYP-Allele findet sich auf der Nomenklatur-Webseite für die CYP-Allele (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles.html>).

1.3 Cytochrom P450 2D6

Eines der wichtigsten Arzneimittel metabolisierenden Enzyme ist CYP2D6. Obwohl es nur einen geringen Prozentsatz (ca. 3 %) aller in der Leber vorhandenen CYP450-Enzyme ausmacht (Zanger 2004), ist es am Metabolismus von mehr als 48 verschiedenen Arzneimitteln beteiligt und katalysiert 20 – 25 % der Metabolisierungen von klinisch gebräuchlichen Arzneimitteln (Ingelman-Sundberg 2005).

Nachfolgende Tabelle stellt einen kleinen Auszug der über CYP2D6 metabolisierten Arzneimittel dar (aus: <http://medicine.iupui.edu/flockhart/table.htm>):

<u>Beta-Blocker</u>	<u>Antidepressiva</u>	<u>Antipsychotika</u>	<u>Sonstige Arzneimittel</u>
Carvedilol	Amitryptilin	Haloperidol	Tramadol
S-Metoprolol	Clomipramin	Perphenazin	Tamoxifen
Propafenon	Desipramin	Thioridazin	Ondansetron
Timolol	Imipramin	Aripiprazol	Dextrometorphan
	Paroxetin	Atomoxetin	Lidocain
	Fluvoxamin		Amphetamin
	Fluoxetin		

Tabelle 3

Ebenso bedeutsam ist die große Anzahl an Polymorphismen, die Expression und Funktion von CYP2D6 beeinflussen. Ursprünglich als (autosomal rezessiv vererbter) Metabolisierungsweg von Debrisoquin (Antihypertensivum) und Spartein (Antiarrhythmikum) in den 70er Jahren entdeckt (Mahgoub 1977, Eichelbaum 1975, 1979), sind mittlerweile über 80 Allele und Allelvarianten von CYP2D6 beschrieben worden, deren Funktion untereinander stark differiert. In den letzten zwanzig Jahren konnten mittels Allel-spezifischer PCR-Tests immer mehr Allele identifiziert werden, die für gesteigerten, defizienten oder verminderten Metabolismus verantwortlich sind (Heim und Meyer 1990, Meyer und Zanger 1997, Ingelman-Sundberg 1999, Daly 2003). Diese Methoden der Genotypisierung zur Identifikation der häufigsten Allelvarianten ergänzen die aufwendigen (für den Menschen belastenderen) Phänotypisierungen, mittels derer bisher eine Einteilung in langsame (PM = poor metabolizer), verminderte (IM = intermediate metabolizer), schnelle (EM = extensive metabolizer) oder ultraschnelle (UM = ultrarapid metabolizer) Metabolisierer für CYP2D6 erfolgte. Nach der einmaligen

Einnahme einer von CYP2D6 metabolisierten Probesubstanz (z.B. Debrisoquin) wird bei der Phänotypisierung dessen Menge sowie die Menge seiner Metabolite in Serum oder Urin bestimmt. Mittels dieser sog. metabolic ratio (MR), die das Verhältnis der Menge des eingenommenen Medikamentes zu der Menge seiner Metabolite im Urin nach einer definierten Zeiteinheit bestimmt, erfolgt die Einordnung in die verschiedenen Metabolisierungstypen und somit eine Aussage über die Metabolisierungskapazität des Enzyms.

Der Genort von CYP2D liegt auf Chromosom 22 an Position 13.1. und umfasst ein 45 kb großes Gencluster. Neben dem aus 497 Aminosäuren bestehenden CYP2D6-Gen mit seinen 9 Exons und 8 Introns, weist er am 5'-Ende des CYP2D6-Gens zwei weitere hochhomologe Pseudogene auf (CYP2D7 und CYP2D8), deren Nukleotidfolge zu 92 - 97 % mit CYP2D6 identisch ist (Kimura et al. 1989). Bereits vor 18 Mio. Jahren scheint aus einer Genduplikation von CYP2D6 das Pseudogen CYP2D8P hervorgegangen zu sein, welches möglicherweise zunächst einige Millionen Jahre ein funktionierendes Gen war bevor es seine Funktion verlor. Während 2D8P ein echtes Pseudogen mit multiplen Deletionen und Insertionen ist und keinen offenen Leserahmen aufweist, findet sich im 2. Pseudogen CYP2D7P lediglich im ersten Exon eine Insertion (T138), die zu einem Abbruch des Leserahmens führt (Kimura et al. 1989). CYP2D7P entstand vermutlich vor 9 Mio. Jahren aus einer weiteren Duplikation von CYP2D6 und konnte zunächst ebenfalls Proteine generieren bevor es seine Funktion verlor (<http://drnelson.utmem.edu/cytochromeP450.html>; Heim und Meyer 1992). Die Anwesenheit der hochhomologen Pseudogene in unmittelbarer Nachbarschaft zu CYP2D6 scheint ein Grund für die Vielzahl von CYP2D6-Allelen zu sein, die durch ungleiche cross-over-Reaktionen entstanden sein können und für fehlerhafte Genprodukte kodieren. Man vermutet, dass z.B. das defiziente CYP2D6*4-Allel durch Genkonversionen aus CYP2D7P vor ca. 1-2 Mio. Jahren hervorgegangen ist. Das ebenfalls den PM-Genotyp charakterisierende Allel CYP2D6*3 hingegen scheint das Ergebnis einer erst kürzlich stattgefundenen Punktmutation innerhalb des CYP2D6-Gens zu sein (<http://drnelson.utmem.edu/cytochromeP450.html>; Heim und Meyer 1992). Umgekehrt können durch Genkonversionen und alternatives Splicing auch Pseudogene wieder zu funktionsfähigen Genen „re“mutieren. Zu diesen Pseudogenen, die nur über kleine Mutationen verfügen, gehört CYP2D7AP, das sich nur durch einen frameshift im Exon 1 und eine abweichende (aberrante) GT donor splice site an der Exon 2/Intron 2 Grenze von CYP2D6 unterscheidet (Nelson et al. 2004).

Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz (in %) von CYP2D6 und seinen Pseudogenen (aus Heim und Meyer 1992):

	2D6*4	2D7P	2D7AP	2D7BP	2D8P
2D6	99 %	94,2 %	93,3 %	93,8 %	87,9 %

Tabelle 4

Die Metabolisationskapazität von CYP2D6 unterscheidet sich je nach vorliegendem Polymorphismus voneinander. Durch Zuordnen der Allele in die vier Metabolisationsgruppen PM, IM, EM und UM können die Träger dieser genetischen Varianten im Hinblick auf ihre CYP2D6-Aktivität eingeteilt werden. Im Folgenden wird auf die vier unterschiedlichen Gruppen näher eingegangen und die für diese Arbeit bestimmten Allele vorgestellt.

1.3.1 Langsammetabolisierer (PM – poor metabolizer)

Bei Entdeckung des Debrisoquin-/Sparteïn-Metabolismus (das hierfür zuständige Enzym wurde später in CYP2D6 umbenannt) in den 70er Jahren des vorherigen Jahrhunderts litten einige Studienteilnehmer nach Einnahme der Arzneimittel an unerwünschten Nebenwirkungen wie Schwindel oder Übelkeit. Der Grund lag in einer erhöhten Arzneimittelkonzentration im Körper, die durch eine Defizienz des Arzneimittel metabolisierenden Enzyms CYP2D6 bedingt war (Mahgoub et al. 1977; Eichelbaum et al. 1975; Eichelbaum et al. 1979). Ungefähr 7 % der kaukasischen Bevölkerung sind Träger defizienter Allele und nicht in der Lage, CYP2D6-Substrate effizient zu metabolisieren (Sachse et al. 1997). Diese als Langsammetabolisierer bezeichneten Probanden sind dem Risiko der Entwicklung unerwünschter Arzneimittelwirkungen ausgesetzt, sobald sie ein CYP2D6-spezifisches Medikament einnehmen (Eichelbaum et al. 1982).

Neben dem vollständigen Fehlen des CYP2D6-Gens (CYP2D6*5) (Gaedigk et al. 1991; Steen et al. 1995), sind eine Reihe weiterer defizienter Allele bekannt. In der dieser Doktorarbeit zugrunde liegenden Studienpopulation wurden neben CYP2D6*5 auch CYP2D6*3, CYP2D6*4 und CYP2D6*6 bestimmt. Nahezu 100 % der Langsammetabolisierer in der kaukasischen Bevölkerung können anhand dieser genetischen Polymorphismen identifiziert werden (Zanger et al. 2004; Gaedigk et al. 1999).

Mit einer Allelhäufigkeit von ca. 20 % ist CYP2D6*4 das häufigste in der kaukasischen Bevölkerung vertretene Nullallel (s. Tabelle 5). Die Schlüsselmutation ist ein G>A-Basenaustausch im 4. Exon, wodurch es zu einem verfrühten Stopp-Codon kommt und somit zu einem Abbruch des Leserahmens (Kagimoto et al. 1990). In anderen ethnischen Gruppen ist diese Mutation sehr selten (Allelfrequenz in der afrikanischen Bevölkerung: 6 - 7 %, Leathart et al. 1998; Griese et al. 1999. Allelfrequenz in der asiatischen Bevölkerung < 1 %; Wang et al. 1993; Johansson et al. 1994; Dahl et al. 1995).

CYP2D6*3 wie auch CYP2D6*6 weisen einzelne Basendeletionen auf, die zu einem Abbruch des Leserahmens führen. Im CYP2D6*3-Allel ist Adenin an Position 2549 im Exon 5 deletiert (Kagimoto et al. 1990), bei CYP2D6*6 ist es Thymin an Position 1707 in Exon 3 (Saxena et al. 1994). Die Allelhäufigkeit unter Kaukasiern liegt für beide Allele bei ca. 2 %.

In Tabelle 5 sind die Allelhäufigkeiten für die kaukasische Bevölkerung aufgeführt:

Häufigkeit der genotypisierten Allele in der kaukasischen Bevölkerung

	Marez '97	Griese'98	Sachse '97	Gaedigk '99	Total
CYP2D6 Allel	n: 672	n: 195	n: 589	n: 208	n: 1664
CYP2D6*1	0,334	0,356	0,364	0,370	0,36
CYP2D6*2	0,329	0,285	0,324	0,337	0,33
Gesamt	0,663	0,641	0,688	0,707	0,69
CYP2D6*3	0,018	0,010	0,020	0,010	0,02
CYP2D6*4	0,189	0,195	0,207	0,175	0,20
CYP2D6*5	0,073	0,041	0,020	0,038	0,05
CYP2D6*6	0,014	0,013	0,009	0,010	0,01
Gesamt	0,294	0,259	0,256	0,223	0,28
CYP2D6*9	0,026	0,02	0,018	0,029	0,02
CYP2D6*10	0,014	0,02	0,015	0,019	0,02
CYP2D6*17	0,001	0	n.d.	0,002	0,001
Gesamt	0,041	0,04	0,033	0,05	0,041
CYP2D6*1x2	n.d.	0	0,005	0,002	0,002
CYP2D6*2x2	n.d.	0,016	0,013	0,007	0,007
CYP2D6*4x2	n.d.	0	0,001	0,002	0,002
Gesamt	n.d.	0,016	0,021	0,011	0,011

Tabelle 5

1.3.2 Intermediate Metabolizer (IM)

Ungefähr 10 – 15 % der Kaukasier sind Träger von Mutationen auf dem CYP2D6-Gen, die zu einem verlangsamten Metabolismus von CYP2D6-abhängigen Medikamenten führen (Raimundo et al. 2000). Diese als Intermediate Metabolizer bezeichneten Individuen verfügen im Gegensatz zu Langsammetabolisierern noch über eine Restaktivität von CYP2D6 (Zanger et al. 2004). Zu den Allelen, die den IM-Phänotyp charakterisieren und die im Rahmen dieser Doktorarbeit bestimmt wurden, gehören CYP2D6*9, CYP2D6*10 und CYP2D6*41 (Raimundo et al. 2000; Zanger et al. 2001; Zanger et al. 2004; Raimundo et al. 2004). Das ebenfalls vermindert aktive Allel CYP2D6*17 (Masimirembwa et al. 1996) ist unter Kaukasiern nur sehr selten zu finden (Allelfrequenz: 0,001; s. Tabelle 5) und wurde daher im Rahmen dieser Arbeit nicht charakterisiert.

CYP2D6*10

Ungefähr 2 % der Kaukasier sind Träger dieses genetischen Polymorphismus (Sachse et al. 1997; Griese et al. 1998), der durch einen Aminosäureaustausch an Position 34 charakterisiert wird (P34S; rs1065852) (Yokota et al. 1993; Johansson et al. 1994). Als Folge wird ein instabiles Enzym generiert, wodurch sich der IM-Status erklärt. Interessant ist, dass trotz des geringen Auftretens dieses genetischen Polymorphismus unter Kaukasieren (Allelfrequenz: 0,02; s. Tabelle), CYP2D6*10 in Asien das häufigste Allel (Allelhäufigkeit > 50 %) ist und demnach wohl als weltweit häufigster Polymorphismus von CYP2D6 angesehen werden kann (Johansson et al. 1994).

CYP2D6*41

CYP2D6*41 ist eine Variante des den Schnellmetabolisierer kennzeichnenden CYP2D6*2-Allels. Der Unterschied zu diesem besteht lediglich in einem Basenaustausch an Position -1584 (CYP2D6*41: -1584C; CYP2D6*2: -1584C>G) (Zanger et al. 2004; Raimundo et al. 2000). Kürzlich konnten Toscano et al. (2006) einen weiteren CYP2D6*41-charakterisierenden Polymorphismus identifizieren. Dieser intronische Basenaustausch 2988G>A scheint zu einer geringeren Expression von CYP2D6*41 zu führen. Die Allelfrequenz von CYP2D6*41 in der kaukasischen Bevölkerung liegt bei ca. 8,5 % (Toscano et al. 2006). Damit ist CYP2D6*41 nach CYP2D6*4 der zweithäufigste Polymorphismus unter Kaukasiern, der für einen verlangsamten Metabolismus über CYP2D6 verantwortlich ist.

CYP2D6*9

Ähnlich wie CYP2D6*10 kommt auch CYP2D6*9 nur in geringem Ausmaß bei Kaukasiern vor (Allelhäufigkeit: 0,018 – 0,029; s. Tabelle 5). Es wurde erstmalig von Broly und Meyer 1993 in einer Familie mit IM-Phänotyp beschrieben und wird durch die Deletion eines Basentriplets mit konsekutivem Verlust einer Aminosäure charakterisiert (AGAdel→K281del; rs28371720). Gemeinsam mit *10 definiert es ca. 20 % der IMs in der kaukasischen Bevölkerung (Sachse et al. 1997; Leathart et al. 1998; Griese et al. 1998).

1.3.3 Schnellmetabolisierer (EM – extensive metabolizer)

Schnellmetabolisierer verfügen über eine normale Funktion von CYP2D6, d.h. die CYP2D6-Aktivität ist weder herabgesetzt noch erhöht. Das CYP2D6-Allel, welches Schnellmetabolisierer kennzeichnet, ist das Wildtypallel (CYP2D6*1), in dem keinerlei Polymorphismen im Gen vorliegen. Aus diesem Grund kann die Festlegung auf den Genotyp CYP2D6*1 nur eine reine Ausschlussdiagnose sein, die nach Bestimmung der häufigsten Varianten für CYP2D6 getroffen wird (in dieser Arbeit nach Genotypisierung von CYP2D6*2, CYP2D6*3, CYP2D6*4, CYP2D6*5, CYP2D6*6, CYP2D6*9, CYP2D6*10, CYP2D6*35, CYP2D6*41 sowie der Duplikation CYP2D6*NxM). Nicht auszuschließen ist daher, dass seltenere im Rahmen der Studie nicht untersuchte Varianten in Wildtypträgern vorliegen können, die einen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms haben und einen Ausschluss aus der EM-Gruppe bewirken könnten. Dies sollte bei Festlegung auf den Genotyp CYP2D6*1 immer bedacht werden.

Ebenfalls Schnellmetabolisierer sind Träger des CYP2D6*2-Allels (Allelfrequenz unter Kaukasiern: 0,285 – 0,337; s. Tabelle 5). Bei dieser Variante liegt ein Austausch einzelner Basen an verschiedenen Position des CYP2D6-Gens vor (-1584C>G, 2850C>T, 4180G>C), die allerdings nicht zu einer Verminderung oder Erhöhung der Enzymaktivität von CYP2D6 führen (Johansson et al. 1993; Marez et al. 1997; Raimundo et al. 2000).

1.3.4 Ultraschnellmetabolisierer (UM – ultrarapid metabolizer)

Die Ursache des ultraschnellen Metabolismus von CYP2D6-Substraten ist eine Duplikation oder Multiduplikation des CYP2D6-Gens auf einem Allel (CYP2D6*NxM). Bertilsson et al. berichteten 1985 von einer depressiven Patientin, die eine abnorm hohe Dosis von Nortriptylin benötigte, um einen ausreichenden Plasmaspiegel zu erreichen. Als Ursache wurde eine Duplikation des CYP2D6-Gens identifiziert, wodurch die Patientin über drei aktive CYP2D6-Gene verfügte (Dalén et al. 1998). Johansson et al. (1993) konnten in einer schwedischen Familie eine Multiduplikation des CYP2D6-Gens nachweisen. Bei drei Mitgliedern dieser Familie lag CYP2D6 13x auf einem Allel vor. Mittlerweile sind Allele mit 2, 3, 4, 5 und 13 Kopien des CYP2D6-Gens bekannt (Ingelman-Sundberg 1999; Aklillu et al. 1996), die vermutlich durch ungleiches (unequal) cross over entstanden sind (Johansson et al. 1993; Lundqvist et al. 1999). Bislang bekannt sind Duplikationen für Allele mit normaler (CYP2D6*1xN, CYP2D6*2xN und CYP2D6*35xN), reduzierter (CYP2D6*10xN, CYP2D6*17xN und CYP2D6*41xN) sowie nicht vorhandener Funktion (CYP2D6*4xN, CYP2D6*36xN) (Cai et al. 2006; Chida et al. 2002; Dahl et al. 1995; Griese et al. 1998; Johansson et al. 1993). In der kaukasischen Bevölkerung liegt überwiegend eine Duplikation des CYP2D6*2-Allels vor. Die Ursache hierfür ist unklar. In einer Studie von Gaedigk wurden 262 Probanden auf das Vorkommen duplizierter Allele untersucht. In drei Probanden lag CYP2D6*2 dupliziert vor, wohingegen eine Duplikation des Wildtypallels (CYP2D6*1xN) nicht nachgewiesen werden konnte (Gaedigk et al. 2007).

CYP2D6*35

Nur 20 % der phänotypisch als Ultraschnellmetabolisierer klassifizierten Probanden sind Träger einer Duplikation aktiver Allele. Die Ursache des UM-Phänotyps in den übrigen Probanden ist unklar. Lovlie et al. (2001) konnten einen Polymorphismus (31G>A: rs769258) im 1.Exon des CYP2D6-Gens identifizieren, der einen Aminosäureaustausch bedingt (Val11Met). Dieser als CYP2D6*35 bezeichnete Polymorphismus kam in duplikationsnegativen UMs signifikant häufiger vor. Gemutmaßt wurde daher, dass CYP2D6*35 einen ultraschnellen Metabolismus bedingt (Lovlie et al. 2001). Allorge et al. (2001) konnten jedoch keine erhöhte Metabolisationsaktivität in Trägern dieses Allels nachweisen. Eine Erklärung für den ultraschnellen Metabolismus in duplikationsnegativen Individuen konnte folglich nicht gefunden werden. Träger von CYP2D6*35 weisen somit eine normal schnelle Aktivität

des Enzyms auf und werden phänotypisch als EMs klassifiziert. Die Allelfrequenz unter Kaukasiern liegt bei 0,036 (nach HapMap-CEU).

In der kaukasischen Bevölkerung sind ca. 5,5 % Ultraschnellmetabolisierer, wobei ein starkes Nord-Süd-Gefälle beschrieben wird (Ingelman-Sundberg 2004). Während in Nordeuropa nur 1 - 2 % der Bevölkerung Ultraschnellmetabolisierer für CYP2D6 sind (Dahl et al. 1995; Sachse et al. 1997; Bathum et al. 1998; Griese et al. 1998), findet man in Spanien bereits einen Anteil von 7 – 10 % an der Gesamtbevölkerung. Hierfür ist vermutlich die Einwanderung muslimischer Bevölkerung um 700 n. Chr. verantwortlich, unter denen sich ca. 10 % UMs befanden, was der UM-Häufigkeit in der Türkei entspricht (Ingelman-Sundberg et al. 1999). In Äthiopien und Saudi-Arabien wurde ein weitaus höherer Anteil der Ultraschnellmetabolisierer an der Gesamtbevölkerung festgestellt. Bis zu 30 % der Bevölkerung weisen hier eine Duplikation von CYP2D6 auf (Aklillu et al. 1996; McLellan et al. 1997). Da CYP2D6 eine bedeutende Rolle im Metabolismus von Nahrungsbestandteilen, v.a. von Alkaloiden spielt, ist der Grund für die hohe Anzahl Ultraschnellmetabolisierer in der Bevölkerung Nord-Ost-Afrikas vermutlich durch ernährungsbedingte Unterschiede zu erklären. So könnte es sein, dass hier zur Verstoffwechslung der Nahrungsmittel ein höheres Detoxifikationspotential benötigt wurde als für die Nahrungsmittel der kaukasischen Bevölkerung, woraus entwicklungs geschichtlich die Duplikation von CYP2D6 begünstigt wurde (Ingelman-Sundberg 2004).

Einen Überblick über die im Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchten Polymorphismen und dem daraus resultierenden Genotyp gibt Tabelle 6. Ergänzend wurde für jedes Allel die semi-quantitative Gendosis (Steimer et al. 2004) angegeben, die im nachfolgenden Kapitel näher erläutert wird.

Übersicht über die mittels PCR-RFLP detektierten Polymorphismen in den jeweiligen CYP2D6-Varianten mit Angabe der semiquantitativen Gendosis für jedes CYP2D6-Allel

Position alt	-1584	31	100	1707	1846	2549	2613-2615	2850	4180	
Position	-1496	31	188	1795	1934	2637	2701-2703	2938	4268	
AS-Austausch	C>G	G>A	C>T	T del	G>A	A del	AGA del	C>T	G>C	
CYP2D6-Allel	*41	*35	*10	*6	*4	*3	*9	*2938	*2	
Genotyp	Semiquantitative Gendosis (SGD)									
*1	1	C	G	C	T	G	A	AGA	C	G
*2	1	G	G	C	T	G	A	AGA	T	C
*9	0,5	C	G	C	T	G	A	del	C	G
*10	0,5	C	G	T	T	G	A	AGA	C	C
*35	1	G	A	C	T	G	A	AGA	T	C
*41	0,5	C	G	C	T	G	A	AGA	T	C

Tabelle 6

1.4 CYP2D6 – semiquantitative Gendosis

Die Aktivität des CYP2D6-Enzyms und damit die Geschwindigkeit, mit der CYP2D6-Substrate metabolisiert werden können, ist u.a. abhängig von den CYP2D6-Allelen und dem aus diesen definierten CYP2D6-Genotyp. Es sind ca. 60 CYP2D6-Allele beschrieben, die teilweise eine herabgesetzte, teilweise eine erhöhte Enzymaktivität zur Folge haben. Die sich hieraus ableitende Vielzahl der möglichen Allel-Kombinationen bedingt zahlreiche verschiedene Genotypen, wodurch eine Einordnung in die vier bekannten Phänotypen PM, IM, EM und UM erschwert wird. Steimer et al. (2004) versuchten durch die Betrachtung der Aktivität jedes einzelnen Allels den Einfluss auf die Metabolisationsgeschwindigkeit des Enzyms vorherzusagen. Hierzu wurde die steady-state-Konzentration eines Medikamentes in Trägern der verschiedenen Genotypen miteinander verglichen. Als Konsequenz dieser Ergebnisse wurde der Begriff der semiquantitativen Gendosis (SGD) eingeführt, womit eine genauere Einteilung hinsichtlich der Aktivität der einzelnen Allele erreicht wird. Eine SGD von 1 wurde für voll funktionsfähige Allele vergeben, 0 charakterisiert inaktive Allele und eine SGD von 0,5 bezeichnet Allele mit verminderter Aktivität (*10 und *41). Kirchheiner et al. (2004) ergänzten diese Einteilung durch Betrachtung der Duplikation einzelner Allele sowie Beurteilung des

ebenfalls reduziert aktiven Allels CYP2D6*9, für das eine Aktivität von 0,5 definiert wurde. Desweiteren führten Kirchheiner et al. (2004) eine SGD (auch als Feinaktivität bezeichnet) für das Vorliegen einer Duplikation ein. In diesem Fall dupliziert sich die vorher definierte Aktivitätspunktzahl des dupliziert vorliegenden Allels.

Durch die Zuweisung der Aktivitätspunkte für jedes einzelne Allel wird es nun möglich, genauere Aussagen hinsichtlich der Aktivität von CYP2D6 zu machen.

In dieser Doktorarbeit wurden neben den reduziert aktiven Allelen (CYP2D6*9, CYP2D6*10, CYP2D6*41) auch die Duplikation von CYP2D6 sowie die aktiven Allele CYP2D6*35 und CYP2D6*2 betrachtet, um eine Einteilung mittels semiquantitativer Gendosis treffen zu können.

1.5 Phänotypisierung: Metoprolol als Probesubstanz für die CYP2D6-Aktivität

Als Probesubstanz zur Ermittlung des Phänotyps von CYP2D6 eignet sich sehr gut der lipophile β_1 -selektive-Adrenorezeptor-Blocker Metoprolol. Er gehört zu den deutschlandweit am häufigsten verschriebenen Arzneimitteln (455,2 Mio. DDD in 2002) und wird v.a. in der Therapie von arterieller Hypertonie und koronarer Herzkrankheit eingesetzt. Er wird als Razemat gegeben und besteht aus den beiden Enantiomeren R- und S-Metoprolol, die zu je 50 % im Körper vorliegen. Beide Enantiomere unterscheiden sich in vivo hinsichtlich ihres Metabolismus und ihrer Aktivität voneinander, worauf im Folgenden näher eingegangen wird.

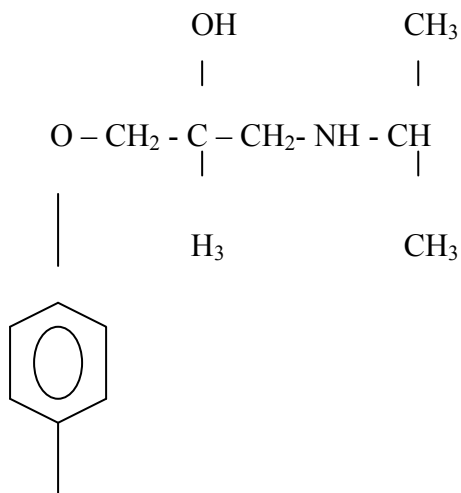


Abbildung 1

Chemische Struktur von Metoprolol – (^3H)

1.5.1 Metabolismus von Metoprolol

Metoprolol wird hauptsächlich über die Leber oxidativ metabolisiert und nur zu einem geringen Teil unverändert über den Urin ausgeschieden (Regardh et al. 1974). In verschiedenen Studien korrelierte die orale Clearance für Metoprolol sehr stark mit der Oxidation von Debrisoquin (Lennard et al. 1982a), Spartein (Clark 1985) und Bufuralol (Dayer et al. 1983a), so dass man von gleichen Metabolisierungswegen dieser Medikamente ausgehen konnte. McGourty et al. konnte dies 1985 durch eine Studie an 143 hypertensiven Patienten und 10 Familien bestätigen. Somit konnte gezeigt werden, dass auch Metoprolol über das polymorphe CYP2D6-Enzym verstoffwechselt wird.

Der Metabolismus von Metoprolol erfolgt über drei Hauptabbauwege, von denen zwei CYP2D6-abhängig sind (Borg et al. 1975; McGourty et al. 1985):

CYP2D6-abhängig:

- O-Demethylierung zum flüchtigen Metaboliten H105/22 gefolgt von einer weiteren Oxidation zum Aminosäureprodukt H117/04
- α -Hydroxylierung zu α -Hydroxymetoprolol

CYP2D6-unabhängig:

- N-Demethylierung gefolgt von einer Deamination der Isopropylamino-Seitenkette zu H104/83

Die CYP2D6-Abhängigkeit der α -Hydroxylierung konnte anhand der größeren Plasmakonzentrationen von Metoprolol in Langsammetabolisierern sowie der signifikant niedrigeren Ausscheidung von α -Hydroxymetoprolol im Vergleich zu Schnellmetabolisierern nachgewiesen werden (Lennard et al. 1982). Allerdings werden nur 10 % der eingenommenen Metoprolol-Dosis α -hydroxyliert (Borg et al. 1975), so dass die CYP2D6-Abhängigkeit allein dieses Abbauweges nicht die hohen Plasmakonzentrationen von Metoprolol in PMs erklären kann. Auch die O-Demethylierung, mittels der 65 % des eingenommenen Metoprolols metabolisiert werden, scheint unter CYP2D6-Einfluss zu stehen (McGourty et al. 1985). So war die Partialclearance von Metoprolol via O-Demethylierung in Langsammetabolisierern signifikant niedriger als in Schnellmetabolisierern (Lennard et al. 1986). In Ratten konnte gezeigt werden, dass sich nach der O-Demethylierung wiederum eine α -Hydroxylierung anschließt

(Arfwidsson et al. 1976), die bei Langsammetabolisierern ebenfalls verringert ist, wodurch sich die Akkumulation des O-Desmethyl-Metaboliten bei Langsammetabolisierern erklären lässt. Die CYP2D6-Abhängigkeit der α -Hydroxylierung wie auch der O-Demethylierung erklärt, dass ca. 70 % des gesamten Metabolismus von Metoprolol in vivo mittels des polymorphen Enzymes CYP2D6 geregelt werden (Johnson & Burlew 1996). Durch den CYP2D6-abhängigen Metabolismus von Metoprolol kann auch die niedrigere Plasmakonzentration in Intermediär-Metabolisierern erklärt werden. Rau et al. (2002) konnten mittels einer Studie an 91 Patienten, die über mindestens 8 Wochen Metoprolol einnahmen, eine 3,9 x höhere Plasmakonzentration in IMs im Vergleich zu EMs messen. Neben der Plasmakonzentration und der oben angesprochenen Partialclearance belegen noch weitere pharmakokinetische Parameter die polymorphe Kontrolle der Abbauwege von Metoprolol. So sind nach Einmalgabe von Metoprolol in Trägern defizienter Allele (PMs) sowohl die Eliminationshalbwertszeit als auch die durchschnittliche Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) im Vergleich zu Schnellmetabolisierern verändert. Die Eliminationshalbwertszeit war in Langsammetabolisierern 3 x so lang und die AUC 6 x so hoch im Vergleich zu EMs (Lennard et al. 1983; Silas et al. 1985).

1.5.2. Auswirkungen des CYP2D6-Polymorphismus auf die β -Adrenorezeptorblockade von Metoprolol

Durch den Metabolismus von Metoprolol über das genetisch polymorphe CYP2D6-Enzym können Unterschiede im Therapieansprechen bei Trägern von Mutationen des CYP2D6-Gens im Vergleich zu Trägern, die über eine normale Aktivität des CYP2D6-Enzyms verfügen, entstehen. So weisen Langsammetabolisierer nach Einmalgabe von Metoprolol eine längere β 1-Adrenorezeptorblockade auf als Schnellmetabolisierer (nach 24h: β -Blockade in EMs: 5,3 % +/- 5,6 % vs. 18,9 % +/- 3,8 % in PMs) (Lennard et al. 1983). Hieraus kann ein erhöhtes Risiko für das Auftreten unerwünschter Nebenwirkungen bei einer Therapie mit Metoprolol resultieren. Wuttke et al. (2002) zeigten, dass von 24 Patienten, die nach Metoprololgabe über Nebenwirkungen klagten, 38 % Träger defizienter Allele waren. Dieser Anteil an Langsammetabolisierern ist ca. 4 x höher als das Vorkommen in der kaukasischen Bevölkerung (6 – 10 % PMs unter Kaukasiern) und scheint ein Beleg für das höhere Risiko von PMs zu sein, unerwünschte Arzneimittelwirkungen zu entwickeln. Allerdings konnten Fux et al. (2005) dies anhand einer Studie mit 121 Patienten nicht bestätigen. Trotz der erhöhten Plas-

makonzentration von Metoprolol in PMs, entwickelten diese nicht mehr unerwünschte Arzneimittelwirkungen als Intermediär- und Schnellmetabolisierer. Allerdings war die Studie aufgrund der geringen Anzahl von Langsammetabolisierern (3,3 %) limitiert. Eine Betrachtung der Metabolite von Metoprolol brachte keine weitere Klärung im Hinblick auf die Veränderung der β -Blockade, da diese über keinen relevanten β -Blockade-Effekt in den im Menschen vorliegenden Konzentrationen verfügen (Borg et al. 1975; Johnsson et al. 1975; Kendall et al. 1991).

1.5.3 Enantioselektivität von CYP2D6 bezüglich Metoprolol

Da Metoprolol als Razemat vorliegt, werden die beiden Enantiomere R- und S-Metoprolol über die drei oben dargestellten Metabolisationswege abgebaut. Hierbei ist eine Enantioselektivität zu beobachten. So konnten Lennard et al. (1983) zeigen, dass nach Einmalgabe von 200 mg Metoprolol die AUC von S-Metoprolol in Schnellmetabolisierern um 35 % größer war als in Langsammetabolisierern. Auch die Plasmakonzentration des S-Enantiomers war in EMs erhöht. In PMs hingegen waren AUC, Plasmakonzentration und Eliminationshalbwertszeit für das R-Enantiomer erhöht. In beiden Phänotypen überwog die renale Clearance des R-Enantiomers gegenüber der des S-Enantiomers (Lennard et al. 1983). Dayer et al. (1985) konnten ähnliche Ergebnisse erzielen. Aufgrund der somit belegten größeren Fähigkeit von Schnellmetabolisierern R-Metoprolol zu eliminieren, konnte ein stereoselektiver Metabolismus von Metoprolol nachgewiesen werden. Langsammetabolisierer hingegen scheinen diese Enantioselektivität verloren zu haben. Bei ihnen belegen diese Daten einen Verlust der bevorzugten Elimination des R-Enantiomers (Rau et al. 2002).

Die geringe α -OH-Metoprolol-Produktion in PMs unterstützt die Beobachtung, dass beide Enantiomere via CYP2D6 zu α -OH-Metoprolol metabolisiert werden (Jonkers et al. 1991; Lanchote et al. 2000). Aufgrund des enantioselektiven Metabolismus von Metoprolol ist die AUC des weniger aktiven R-Metoprolols in EMs geringer als für S-Metoprolol, in PMs dagegen die AUC von R-Metoprolol (Rau et al. 2002).

Lennard et al. (1986) konnten nachweisen, dass auch die Eliminationswege der beiden Enantiomere unterschiedlich sind. So wird R-Metoprolol überwiegend O-demethyliert, wohingegen S-Metoprolol mehrheitlich α -hydroxyliert wird. Da in vivo die O-Demethylierung überwiegt (Dayer et al. 1985a), an die sich eine weitere α -Hydroxylierung anschließt (Arfwidsson

et al. 1976), üben Polymorphismen von CYP2D6 überwiegend einen Einfluss auf das R-Enantiomer aus.

1.5.4 Auswirkungen der Enantioselektivität von Metoprolol auf die β -Adrenorezeptorblockade

Neben den Unterschieden im Metabolismus der Enantiomere, lassen sich auch Unterschiede in der Pharmakodynamik belegen. So konnten einige Studien zeigen, dass ein Großteil der β -Adrenorezeptorblockade von Metoprolol durch das S-Enantiomer bewirkt wird (Barret et al. 1968; Lennard et al. 1983; Silas et al. 1985; Lennard et al. 1986). S-Metoprolol ist 50 – 500 x aktiver in der β -Blockade als R-Metoprolol und kann somit als das „aktive“ Enantiomer von Metoprolol bezeichnet.

2. Ziel dieser Arbeit

Durch die Bestimmung weiterer funktionell bedeutsamer Allele von CYP2D6 soll eine Feineinteilung für die Enzymaktivität in den Gruppen Ultraschnell- und Schnellmetabolisierer gefunden werden. Hierzu soll die semiquantitative Gendosis für jedes Allel determiniert werden, um mittels dieser Einteilung eine bessere Vorhersage des CYP2D6-Phänotyps ermöglichen zu können.

Das Konzept der semiquantitativen Gendosis soll dann für die Phänotypen Schnell- und Ultraschnellmetabolisierer anhand der Pharmakokinetik von S- und R-Metoprolol und deren Hydroxy-Metaboliten überprüft werden. Dabei soll auch untersucht werden, ob sich ein enantioselektiver Effekt von CYP2D6 auf den Metabolismus von Metoprolol auch für Individuen mit hoher und sehr hoher CYP2D6-Aktivität zeigen lässt.

3. Material und Methoden

3.1 Probandenauswahl

Es handelt sich um eine prospektive Kohortenstudie an gesunden Probanden, die anhand ihres CYP2D6-Genotyps in die Studie eingeschlossen wurden (sog. Panelstudie). Ziel dieser klinischen Studie war es, den Metoprolol-Metabolismus bei Schnell- und Ultraschnellmetabolisierern (EMs vs. UMs) zu untersuchen (Kirchheiner et al. 2004). Hierfür wurde den Probanden einmalig 100 mg Metoprolol verabreicht und dessen Metabolismus über einen Zeitraum von 24 h dokumentiert. Es wurden Herzfrequenz und Blutdruck in Ruhe sowie unter Belastung gemessen und die renale Clearance mittels Sammelurin, der in den Zeiträumen 0 – 6 h und 6 – 12 h nach Medikamenteneinnahme gesammelt wurde, ermittelt. Die Metoprololwirkung unter Belastung wurde nach der von Lennard et al. (1983) beschriebenen Methode untersucht, bei der die Probanden mittels Fahrradergometrie zunächst vor Medikamenteneinnahme bis zu einer Herzfrequenz von 140 Schlägen pro Minute belastet wurden. Die hierbei durch Gang und Geschwindigkeit festgestellte Belastung sollte nach Metoprololeinnahme wieder erreicht werden, wobei eventuelle Auswirkungen des Metoprolols durch Messung der Herzfrequenz beurteilt werden konnten.

Mittels Genotypisierung und Analyse der CYP2D6-Genduplikation wurde eine Gruppe der ultraschnellen Metabolisierer (UM-Gruppe), die mindestens drei aktive CYP2D6-Allele (2 x aktives Allel/*1) besitzen und somit über eine Duplikation des CYP2D6-Gens verfügen, einer Gruppe von schnellen Metabolisierern (EM-Gruppe), die Träger von 2 aktiven CYP2D6-Allelen (*1/*1) sind, gegenübergestellt. Die Gruppen wurden in Alter und Body Mass Index (BMI) angepasst. Bei der Zuordnung der Probanden wurde eine Altersdifferenz von +/- 10 Jahren und ein Unterschied des BMI von +/- 15 % zugelassen.

3.2 Erweiterte CYP2D6-Typisierung der Probanden der klinischen Studie

CYP2D6-Genotypisierung mittels PCR-RFLP und Fragmentlängenanalyse mit Gelelektrophorese

Für die Amplifikation der CYP2D6-Allele (*2, *9, *10, *35 und *41) wurde eine Nested-PCR durchgeführt, d.h. die spezifische Amplifikation eines die Mutationen dieser Allele umspannenden DNA-Fragments. Das Verfahren der Nested-PCR bietet den Vorteil, dass sowohl die Empfindlichkeit wie auch die Spezifität der DNA-Vervielfältigung erhöht werden. Da das CYP2D6 Gen hochhomolog zu seinen Pseudogenen CYP2D7AP, CYP2D7BP und CYP2D8 ist, muss durch den Einsatz spezifischer Primer für CYP2D6 eine Koamplifikation der Pseudogene verhindert werden. Dies geschieht, indem zunächst das gesamte CYP2D6-Gen amplifiziert wird. In den folgenden PCRs (Nested-PCRs) kann nun ein Amplifikat innerhalb des CYP2D6-Gens spezifisch vervielfältigt werden. Da dieses Verfahren sehr empfindlich und v.a. für Verunreinigungen anfällig ist, muss auf sorgfältiges Arbeiten zur Vermeidung von Kontaminationen geachtet werden.

Reaktionsbedingungen im Einzelnen

Im Folgenden werden die Reaktionsbedingungen der in dieser Arbeit durchgeführten Genotypisierungen aufgeführt. Neben den Reaktionsansätzen für die verschiedenen PCRs und RFLPs sind die jeweiligen Programme der Thermocycler und Bedingungen für die Durchführung der Elektrophorese aufgeführt. Die dargestellten Mengenangaben für die PCR-Reaktionen beziehen sich jeweils auf eine Probe und wurden mit der Anzahl der zu analysierenden Proben multipliziert. Eine genaue Übersicht über die einzelnen PCR-Reaktionen gibt Tabelle 8. Die verwendeten Primer mit Angabe der jeweiligen Sequenzen werden in Tabelle 9 dargestellt. Vor Herstellung der Reaktionsansätze wurden die verwendeten Lösungen (Primer, dNTPs, Puffer, MgCl₂) mittels eines halbautomatischen Schüttlers aufgetaut, auf Eis gestellt und anschließend pipettiert. Dieser nun hergestellte sogenannte Master-Mix wurde gemischt, zentrifugiert und in die PCR-Gefäße gegeben. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde die genomische DNA in einem Nachbarraum zugefügt. Für die PCR-Reaktionen 1, 5 und 7 waren dies jeweils 2 µl genomische DNA. In die übrigen Nested-PCRs wurden Verdünnungen des

jeweiligen Long-Amplifikates eingesetzt (PCR-Reaktionen Nr. 2 - 4: 1,2 µl des 1:5 verdünnten Amplifikates aus PCR Nr. 1; PCR-Reaktion Nr. 6: 2 µl des 1:100 verdünnten Amplifikates aus PCR Nr. 5; PCR-Reaktion Nr. 8: 1,2 µl des 1:5 verdünnten Amplifikates aus PCR Nr. 7; PCR-Reaktion Nr. 10: 1,2 µl des 1:10 verdünnten Amplifikates aus PCR Nr. 9; s. Tabelle 8). Der nun vollständige PCR-Ansatz konnte nach erneutem Mischen und Zentrifugieren bei ca. 85 °C in den Thermocycler gestellt werden. Dieser sog. Hot-Start vermeidet die Bildung unspezifischer Amplifikate und Primerdimere. Die Detektion der Polymorphismen wurde durch anschließenden Verdau mit Restriktionsendonukleasen ermöglicht.

Amplifikation des gesamten CYP2D6-Gens (4681 bp)

Es wurden zwei Reaktionsansätze hergestellt, um einen vorzeitigen Abbau der genomischen DNA und der Primer durch die PWO-Polymerase zu verhindern. Die PWO-Polymerase verfügt über eine read-ahead-Funktion, d.h. sie bricht bei Erreichen eines fehlerhaften Uracils den Amplifikationsvorgang ab. Dadurch werden weniger fehlerhafte DNA-Klone synthetisiert als bei einer Amplifikation mit Taq-Polymerase. Die sequenzgenaue Amplifikation ist bei dieser Reaktion von entscheidender Bedeutung, da erst in den folgenden Nested-PCRs allelspezifische Polymorphismen detektiert werden. Die Namen der beiden thermostabilen Polymerasen Taq und PWO leiten sich von den Bakterien ab, aus denen sie stammen (PWO = *Pyrococcus woesei*; Taq = *Thermus aquaticus*).

Reaktionsansatz 1:	Primer LA F01 (10 µM)	0,75 µl
	Primer LA R01 (10 µM)	0,75 µl
	dNTP's (2 mM)	6,25 µl
	dest. H ₂ O	6,70 µl
	Taq-Polymerase	0,55 µl
Reaktionsansatz 2:	10x Puffer 2	2,7 µl
	dest. H ₂ O	4,8 µl
	PWO-Polymerase	2,5 µl

Cyclerprogramm: 2 min 94 °C
 35 x (10 s 96 °C - 20 s 57 °C - 5 min 68 °C)

Es wurde eine Rampe hineingeschaltet, was bedeutet, dass die Temperaturenniedrigung zwischen dem 1. und 2. Schritt 40 s betragen soll.

7 min 68 °C – 4 °C

Elektrophorese: 40 min bei 120 V auf 1,5 %igem Ethidiumbromid-Agarosegel
 DNA-Marker: 1 kb (MBI-Fermentas)

Das amplifizierte Fragment mit einer Länge von 4681 bp wird 1:5 verdünnt und in die folgenden Nested-PCRs eingesetzt.

Nested-PCR der einzelnen Varianten (*2, *9, *10, Position 2938 C>T)

Der Reaktionsansatz der Varianten *2, *9, *10 sowie der Position 2938 C>T unterscheidet sich nur durch die jeweils spezifischen Primer. Diese sind aus der Tabelle 7 ersichtlich. Die Mengenangaben der verwendeten Reagenzien, das Thermocyclerprogramm sowie die Bedingungen der Elektrophorese sind für alle vier Varianten gleich. Somit ist der folgende Reaktionsansatz für alle drei Nested-PCRs gültig (CYP2D6*9 und die Position 2938 C>T werden in einem Nested-PCR-Ansatz bestimmt). Für die spezifischen Vorwärts- und Rückwärtsprimer der jeweiligen Varianten wurde exemplarisch die Menge eines Vorwärts- und Rückwärtsprimers angegeben.

Reaktionsansatz:	10x PCR Puffer	2,50 µl	Primer	vorwärts	rückwärts
	MgCl ₂ (25 mM)	1,25 µl	CYP2D6*2	P81	P92
	dNTPs (2 mM)	2,50 µl	CYP2D6*9	P*5	P62
	dest. H ₂ O	17,5 µl	CYP2D6*10	P113	P121
	Primer vorwärts (10 µM)	0,50 µl	2938C>T	P*5	P62
	Primer rückwärts (10 µM)	0,50 µl			
	Taq-Polymerase	0,25 µl			

Tabelle 7

Zugabe von 1,2 µl des 1:5 verdünnten Amplifikates aus der Long-PCR für die Amplifikation des gesamten CYP2D6-Gens.

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

Elektrophorese: 40 min bei 120 V auf 2,5 %igem Ethidiumbromid-Agarosegel
DNA-Marker: 100 bp (MBI-Fermentas)

Die hier angegebene Annealing-Temperatur gilt für die beiden Varianten *2 und *9. Die Annealing-Temperatur zur Detektion von CYP2D6*10 beträgt 58 °C.

Proben mit einem Fragment entsprechender Länge sind positiv und können mittels RFLP verdaut werden. Die amplifizierte Fragmentlängen der vier Varianten sind:

CYP2D6*2: 881 bp
CYP2D6*9: 386 bp
CYP2D6*10: 418 bp
2938C>T: 383 bp

Die Reaktionsansätze für die RFLP-Reaktion der jeweiligen Varianten sowie deren Auswertungen werden nun im Einzelnen dargestellt. Zum Reaktionsansatz werden jeweils 10 µl PCR-Produkt der allel-spezifischen Nested-PCR gegeben.

Nachweis der CYP2D6-Mutation G>4268C (CYP2D6*2)

(diese wurde nur durchgeführt, wenn keines der folgenden Allele vorlag: *4, *9, *10, *41, da der G>4268C Basenaustausch auch bei diesen vorkommt)

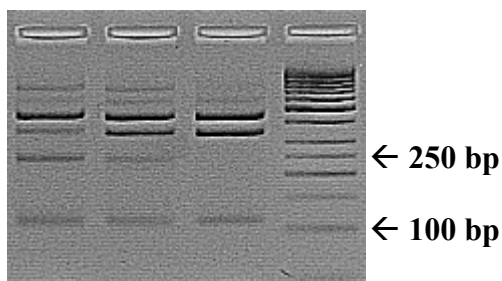
Reaktionsansatz: dest. H₂O 7 µl
 Y+ Puffer 2 µl
 Eco 24 1 µl

Zugabe von 10µl PCR-Produkt aus PCR Nr. 2 (s. Tabelle 8).

Elektrophorese: 60 min bei 100V auf 3,5 %igem Ethidiumbromid-Agarosegel.
DNA-Marker 50 bp (MBI-Fermentas)

Auswertung

Genotyp	<u>*1/*1</u>	<u>*1/*2</u>	<u>*2/*2</u>
Codierung	0	1	2
Bandenmuster (bp)	420	420 336	420 336
	235	235	
	107	107	107
	101	101	
	18	18	18



Nachweis der CYP2D6-Mutation CYP2D6*9 (Deletion des Basentriplets AGA an Position 2701-03) sowie der Position C>2938T

Reaktionsansatz:	dest. H ₂ O	4,7 µl
	B+	1,5 µl
	NEB 4	1,5 µl
	BSA	0,3 µl
	Mbo II	1,0 µl
	Hin 6	1,0 µl

Zugabe von 10 µl PCR-Produkt aus PCR Nr. 3 (s. Tabelle 8).

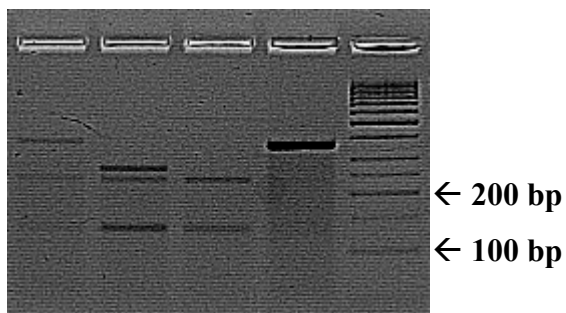
Elektrophorese: 60 min bei 100 V auf 3,5 %igem Ethidiumbromid-Agarosegel

DNA-Marker: 50 bp (MBI-Fermentas)

Auswertung

Genotyp	<u>*1/*1</u>	<u>*1/*9</u>	<u>*9/*9</u>	<u>*1/2938</u>	<u>2938/2938</u>	<u>*9/2938</u>
*9	0	1	2	0	0	1
2938	0	0	0	1	2	1
Bandenmuster (bp)				354	354	354
		262	262		262	262
	230	230		230		
	124	124	124	124		124
	32	32		32	32	32

Der Basenaustausch 2938C>T findet sich bei den Allelen CYP2D6*2, *35 und *41. Er dient der Abgrenzung der CYP2D6-Allele *2 und *41 gegenüber dem Wildtypallel (CYP2D6*1).



Nachweis der CYP2D6-Mutation C>188T (CYP2D6*10)

Reaktionsansatz: dest. H₂O 6 µl
NEB 2 µl
Hph1 2 µl

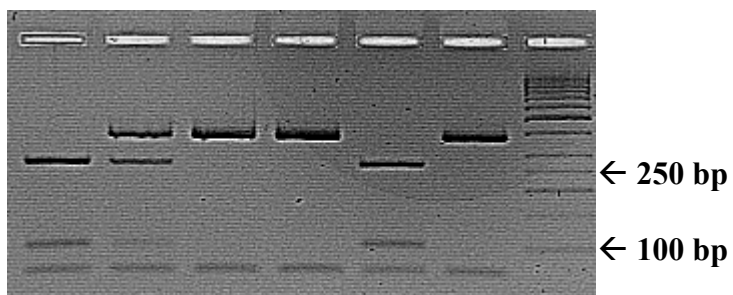
Zugabe von 10 µl PCR-Produkt aus PCR Nr. 4 (s. Tabelle).

Elektrophorese: 40 min bei 120 V auf 2,5 %igem Ethidiumbromid-Agarosegel

DNA-Marker 50 bp (MBI-Fermentas)

Auswertung

Genotyp	<u>*1/*1</u>	<u>*1/*10</u>	<u>*10/*10</u>
Codierung	0	1	2
Bandenmuster (bp)	362	362 262 100	262 100
	71	71	71



Amplifikation der CYP2D6 Promotorregion (1675 bp)

Zur genaueren Analyse der Promotorregion von CYP2D6 wird ebenfalls das Verfahren der Long-PCR angewandt. Hierbei entsteht ein Fragment mit 1675 bp, welches bei der sich anschließenden Nested-PCR weiter amplifiziert wird.

Reaktionsansatz 1:	Primer Pupf 14+ (10 μ M)	0,75 μ l
	Primer Pupr 1669 (10 μ M)	0,75 μ l
	dNTP's (2 mM)	6,25 μ l
	dest. H ₂ O	6,90 μ l
	Taq-Polymerase	0,35 μ l
Reaktionsansatz 2:	10x Puffer 1	2,70 μ l
	dest. H ₂ O	5,80 μ l
	PWO-Polymerase	1,50 μ l

Cyclerprogramm:	2 min 94 °C
	10 x (10 s 96 °C – 20 s 72 °C – 6 min 68 °C)
	25 x (10 s 96 °C – 20 s 62 °C – 6 min 68 °C)
	7 min 68 °C – 4 °C

Elektrophorese:	40 min bei 120 V auf 1,5 %igem Ethidiumbromid-Agarosegel
DNA-Marker:	1 kb (MBI-Fermentas)

Um die Spezifität der Long-Amplifikations-Primer zu erhöhen, wird ein „Touch down“-PCR - Programm verwendet. Die anfängliche Annealing-Temperatur liegt hierbei mehrere Grad Celsius über der optimalen Anlagerungstemperatur der Primer. Sie wird in den darauffolgenden Zyklen schrittweise gesenkt bis die Primer-spezifische Temperatur erreicht ist. Damit vermeidet man ein unspezifisches Anlagern der Primer und erhöht die Spezifität der PCR.

Nachweis der CYP2D6-Variante -1496C (CYP2D6*41)

Reaktionsansatz:	10x PCR Puffer	2,0 µl
	MgCl ₂ (50 mM)	0,6 µl
	dNTPs (2 mM)	2,0 µl
	dest. H ₂ O	14,2 µl
	Primer P II pf 1 (10 µM)	0,5 µl
	Primer P II pr 302 (10 µM)	0,5 µl
	Taq DNA Polymerase	0,2 µl

Zugabe von 1,2 µl des 1:5 verdünnten Amplifikates aus der Long-PCR zur Amplifikation der Promotorregion.

Cyclerprogramm: 2 min 94 °C
12 x (10 s 94 °C – 20 s 66 °C – 1 min 72 °C)
7 min 72 °C

Elektrophorese: 40 min bei 120 V auf 2,5 %igem Ethidiumbromid-Agarosegel

DNA-Marker: 50 bp (MBI-Fermentas)

Restriktion mit Bsp LI

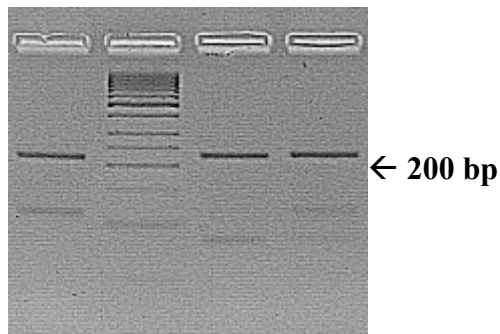
Reaktionsansatz:	H ₂ O (steril, bidest)	6,5 µl
	y Tango Puffer	3,0 µl
	Bsp LI	0,5 µl

Elektrophorese: 60 min bei 100 V auf 4 %igem Agarosegel

DNA-Marker: 50 bp (MBI-Fermentas)

Auswertung

Genotyp:	<u>*41/*41 (CC)</u>	<u>*2/*41(CG)</u>	<u>*2/*2(GG)</u>
Codierung:	0	1	2
Muster (bp):	212	212	212
		110	110
	77	77	
	33	33	



Long-PCR für CYP2D6*35

Für die CYP2D6-Variante *35 wurde eine Long-PCR nach Lovlie et al. (2001) durchgeführt. Hierbei wird ein Produkt der CYP2D6-Promotorregion generiert, welches in einer anschließenden Nested-PCR weiter amplifiziert wird. Das entstehende PCR-Produkt hat eine Länge von 3600bp.

Reaktionsansatz 1:	Primer Cyp 502 (10 μ M)	0,75 μ l
	Primer Cyp 505 (10 μ M)	0,75 μ l
	dNTP's (2 mM)	6,25 μ l
	dest. H ₂ O	6,90 μ l
	Taq DNA Polymerase	0,35 μ l
Reaktionsansatz 2:	10x Puffer 1	2,7 μ l
	dest. H ₂ O	5,8 μ l
	PWO-Polymerase	1,5 μ l

Cyclerprogramm: 2 min 94 °C
35 x (15 s 96 °C – 4 min 68 °C)
7 min 68 °C – 4 °C

Elektrophorese: 2 h 15 min bei 120 V auf 0,8 %igem Agarosegel
DNA-Marker: 1 kb (MBI Fermentas)

Es wird eine two-step-PCR durchgeführt, welche nur aus zwei Temperaturschritten besteht, da die Annealing- und die Extension-Temperaturen gleich hoch sind.

Nachweis der CYP2D6-Variante G31A (CYP2D6*35)

Reaktionsansatz:	10 x PCR Puffer	4,0 µl
	MgCl ₂ (50 mM)	2,0 µl
	dNTP's (2 mM)	1,0 µl
	Primer CYP 511 (10 µM)	0,5 µl
	Primer CYP 518 (10 µM)	0,5 µl
	dest. H ₂ O	31,8 µl
	Taq DNA Polymerase	0,2 µl

Zugabe von 2 µl des 1:100 verdünnten Amplifikates aus der Long-PCR für CYP2D6*35

Cyclerprogramm: 2 min 94 °C
22 x (40 s 94 °C – 40 s 69 °C – 2 min 72 °C)
3 min 72 °C – 4 °C

Elektrophorese: 30 min bei 120 V auf 2 %igem Agarosegel
DNA-Marker: 50 bp (MBI-Fermentas)

Restriktion mit Nla III

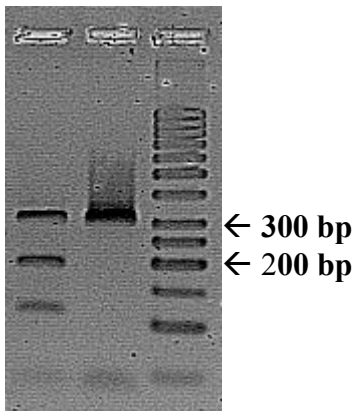
Reaktionsansatz:	dest. H ₂ O	7,5 µl
	NEB 4	2,0 µl
	Nla III	0,3 µl
	BSA	0,2 µl

Elektrophorese: 75 min bei 120 V auf 2,5 %igem Agarosegel

DNA-Marker: 50 bp (MBI-Fermentas)

Auswertung

Genotyp:	<u>*1/*1</u>	<u>*1/*35</u>	<u>*35/*35</u>
Codierung:	0	1	2
Muster (bp):	306	306	
		194	194
		112	112
	35	35	35



Analyse des duplizierten Alleles von CYP2D6: CYP2D6*1x2 oder CYP2D6*2x2

(n. Sachse et al. 1997; PCR-Reaktionen Nr. 9 und Nr. 10 aus Tabelle 8)

Zunächst wurde mittels einer Long-PCR ein 10-kb langes PCR-Produkt amplifiziert, welches zwischen Exon 9 des 1. Allels und Intron 2 des 2. Allels lokalisiert ist.

Reaktionsansatz 1:	Primer P2x2r (10 µM)	0,75 µl
	Primer P2x2f (10 µM)	0,75 µl
	dNTP's (2 mM)	6,25 µl
	dest. H ₂ O	6,90 µl
	Taq DNA Polymerase	0,35 µl
Reaktionsansatz 2:	10x Puffer 2	2,7 µl
	dest. H ₂ O	5,8 µl
	PWO-Polymerase	1,5 µl

Cyclerprogramm:	2 min 94 °C
	10 x (10 s 96 °C – 20 s 70 °C – 6 min 68 °C)
	25 x (15 s 96 °C – 20 s 60 °C – 6 min 68 °C)
	7 min 68 °C – 4 °C

Elektrophorese:	2 h 15 min bei 120 V auf 0,8 %igem Agarosegel
DNA-Marker:	1 kb (MBI Fermentas)

Das PCR-Produkt wurde 1:10 verdünnt und in die sich anschließende Nested-PCR (PCR-Reaktion Nr. 10) eingesetzt:

Reaktionsansatz:	10x Gene Craft Puffer	5,0 µl
	MgCl ₂ (50 mM)	1,25 µl
	dNTP's (2 mM)	5,0 µl
	Primer p2x2f (10 µM)	1,0 µl
	Primer P92 (10 µM)	1,0 µl
	dest. H ₂ O	36,25 µl
	Taq DNA Polymerase	0,5 µl

Zugabe von 1,2 µl des 1:10 verdünnten Amplifikates aus der Long-PCR-Reaktion Nr. 9 (n. Sachse et al. 1997).

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

Elektrophorese: 40 min bei 120 V auf 2,5 %igem Ethidiumbromid-Agarosegel
DNA-Marker: 50 bp (MBI-Fermentas)

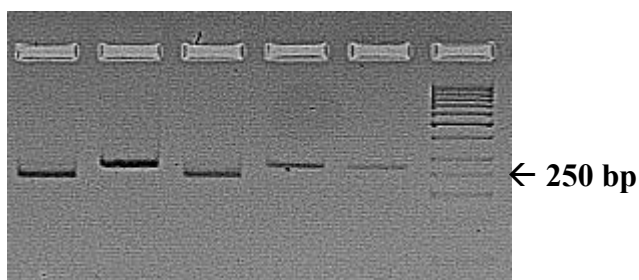
Restriktion mit Ban II

Reaktionsansatz: dest. H₂O 7 µl
NEB 4 2 µl
Ban II 1 µl

Elektrophorese: 60 min bei 100 V auf 3,5 %igem Ethidiumbromid-Agarosegel
DNA-Marker: 50 bp (MBI-Fermentas)

Auswertung	Dup*1	Dup*2
		264
	231	
	33	

Bei Duplikation des *1 Allel erfolgt die Spaltung in zwei Fragmente von 231 bp und 33 bp Länge. Liegt eine Duplikation des *2 Allels vor, erfolgt keine Spaltung durch Ban II.



Übersicht über alle PCR-Reaktionen

PCR Nr.	Detektierte Mutation	PCR-Primer	Fragmentlänge (bp)	Restriktionsenzym	Wildtyp Allel (bp)	Mutiertes Allel (bp)
1	Gesamtes CYP2D6	LA-F01 LA-R01	4681	n.b.	4681	
2	*2(4268G>C)	P81/P92	881	Eco 24	420/235/ 107/101/18	420/336/ 107/18
3	*9 (Del AGA) 2938C>T	P*5/62 P*5/62	386 383	MboII + Hha I MboII + Hha I	230/124/32	262/124 354/32
4	*10 (188C>T)	P113/P121	418	Hph I	362/71	262/100/71
5	*35 (Long-PCR)	CYP 502/ CYP 505	3600	n.b.	3600	
6	*35 (31G>A)	CYP 511/ CYP 518	341	Nla III	306/35	194/112/35
7	*41 (Long-PCR)	Pupf14+/ Pupr 1669	1656	n.b.	1656	
8	*41 (1496G>C)	PII pf1/ PII pr302	322	Bsp LI	212/77/33	212/110
9		P2x2f P2x2r	10000	n.b.	10000	
10		P2x2f/P92	264	Ban II	231/33	264

Tabelle 8

Die PCRs Nr. 2-4 sind Nested-PCRs der PCR Nr. 1

PCR Nr. 6 ist die Nested-PCR von PCR Nr. 5

PCR Nr. 8 ist die Nested-PCR von PCR Nr. 7

PCR Nr. 10 ist die Nested-PCR von PCR Nr. 9

(Methoden n. Sachse et al. 1997; Lovlie et al. 1996; Lovlie et al. 2001)

Verwendete Primer

CYP-Gen

bzw. Allel	Primer	Sequenz des Primers	Richtung
CYP2D6	LA-F01	5'- CCA GAA AGC AGT GGA GGA GGA CG	f
	LA-R01	5'- CCT GGC ATA TAG CTC CCT GAC GC	r
CYP2D6*2	P81	5'- CGT CTA GTG GGG AGA CAA AC	f
	P92	5'- CTC AGC CTC AAC GTA CCC CT	r
CYP2D6*9 & Position 2938	P*5	5'- AGG CCT TCC TGG CAG AGA TGA AG	f
	P62	5'- CCC CTG CAC TGT TTC CCA GA	r
CYP2D6*10	P113	5'- TCA ACA CAG CAG GTT CA	f
	P121	5'- CTG TGG TTT CAC CCA CC	r
CYP2D6 (Dup*1 oder *2)	P2x2f	5'- CCA CCA TGG TGT CTT TGC TTT C	f
	P2x2r	5'- ACC GGA TTC CAG CTG GGA AAT G	r
	P2x2f	5'- CCA CCA TGG TGT CTT TGC TTT C	f
	P92	5'- CTC AGC CTC AAC GTA CCC CT	r
CYP2D6*35	CYP 502	5'- CCG GAT TCC AGC TGG GAA ATG	f
	CYP 505	5'- CAC TGG CTC CAA GCA TGG CAG	r
	CYP 511	5'- AGG TTC ACT CAC AGC AGA GGG	f
	CYP 518	5'- CCT GGT CGA AGC AGT ATG GTG	r
CYP2D6*41	Pupf 14	5'- GCC TGG ACA ACT TGG AAG AAC C	f
	Pupr 1669	5'- AGG AAG ATG GCC ACT ATC AC	r
	PII pf 1	5'- GAA TTC AAG ACC AGC CTG GAC AAC TTG GAA GGA CC	f
	PII pr 302	5'- CCC CTC CAT TGT GCA ATG ATG	r

Primer für die Analyse der angegebenen Allele mittels PCR-RFLP

Primer Lokalisation von CYP2D6 (Genbank acc. No. M33388)

Tabelle 9

Verwendete Restriktionsendonukleasen

Enzym	Konzentration	Puffer	Herkunft	Schnittstelle
BspLI	10U/μl	Y+	Bacillus species RJ3-212	5'- G G N↓N C C -3' 3'- C C N↑N G G -3'
MboII	5U/μl	B+	Moraxella bovis	5'- G A A G A(N)8↓ -3' 3'- C T T C T(N)7↑ -5'
Eco24I	10U/μl	Y+	Escherichia coli RFL 24	5'- G Pu G C Py↓C -3' 3'- C↑Py C G Pu G -5'
Hha I	20U/μl	NEB4	Haemophilus haemolyticus	5'- G C G↓C -3' 3'- C↑G C G -5'
HphI	10U/μl	NEB4	Haemophilus pseudo-haemolyticus	5'- G G T G A(N)8↓ -3' 3'- C C A C T (N)7↑ -5'
NlaIII	10U/μl	NEB4	Neisseria lactamica	5'- C A T G↓ ...-3' 3'- ...↑G T A C -5'
Bsa AI	5U/μl	NEB3	Bacillus stearothermophilus	5'- Py A C↓G T Pu -3' 3'- Pu T G↑C A Py -5'
Bst NI (Mva I)	10U/μl	NEB (Tango)	Micrococcus varians	5'- C C↓A/T G G -3' 3'- G G T/A↑C C -5'

Tabelle 10

Geräte und Chemikalien

Chemikalien

Agarose
dNTP's
DNA Marker (50 bp, 100 bp, 1 kb)
DNA-Oligonucleotide (Primer)
Taq-DNA Polymerase (5 U/ μ l)
PWO-Polymerase (0,1 U/ μ l)
Expand Long PCR System

Hersteller

Eurogentec
MBI Fermentas
MBI Fermentas
TIB MOLBIOL
Biozym
Biozym
Boehringer-Mannheim

MgCl₂ (50 mM)
10x PCR-Puffer
TRIS-HCl

Biozym
Biozym

Geräte

MagNa-Pure
Thermocycler: Gene Amp PCR System 9600 + 9700
Videosystem EagleEye
Zentrifugen
Inkubationsschränke
Halbautomatischer Schüttler
Diverse Flachbett-Elektrophoresekammern
und Elektrophorese-Spannungsgeräte
Pipetten

Hersteller

Roche
Perkin Elmer
Stratgene
Eppendorf, Beckmann, Sigma
Biometra
Hofer, Heidolph
Protrans, Biorad, Hofer
Eppendorf

Software

NCBI-Blast

Hersteller

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/Blast>

Tabelle 11: Geräte und Chemikalien

Verbrauchsartikel des Labors wie Einmal - Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße wurden von den Firmen Biozym und Eppendorf bezogen.

3.3 HPLC-Analyse

Zur Quantifizierung der beiden Enantiomere von Metoprolol (R- und S-Metoprolol) sowie deren vier Metabolite (SS-Metoprolol, SR-Metoprolol, RS-Metoprolol, RR-Metoprolol) wurde die Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (High Performance Liquid Chromatographie - HPLC) angewandt. Hiermit können chemische Lösungen mit komplexer Zusammensetzung aufgetrennt und analysiert werden. Das Prinzip der HPLC beruht auf der Trennung der Komponenten eines Substanzgemisches durch ein Phasensystem, bestehend aus einer flüssigen Phase (Eluent) und einer stationären Phase (Trennsäule), wobei die flüssige Phase unter hohem Druck über die stationäre Phase transportiert wird. Durch unterschiedliches Interagieren der Komponenten der Probe mit der stationären Phase, ergeben sich unterschiedliche Verweilzeiten (Retentionen) an der Säule, wodurch die einzelnen Stoffe zeitlich versetzt das Festbett verlassen. Nach dem Durchlaufen der Trennstrecke werden die Stoffe mittels eines Detektors erfasst und in einem Chromatogramm dargestellt. Sie können nun quantitativ bestimmt werden. Die Detektorauswahl wird von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Probebestandteile und des Eluenten bestimmt. Auch muss das Trennmittel sorgfältig ausgewählt werden, um eine möglichst genaue Auftrennung der verschiedenen Bestandteile einer Probe zu ermöglichen. Für die Detektion von R- und S-Metoprolol sowie der vier α -Hydroxy-Metabolite (SS-, RS-, RS- und RR-Metoprolol) wurde eine gute Trennung mit einer Lösung aus 88 % Hexan, 6 % Ethanol, 6 % Methanol und 0,4 % Triethylamin (880 ml: 60 ml: 60 ml: 4 ml) erreicht. Die Detektion erfolgte mit einer chiralen Säule, der Chiralpak AD 250 mm x 4,6 mm der Firma Daicel Chemical Industries. Zusätzlich kam eine Vorsäule, Phenomex C₁₈, 4 mm x 3 mm zum Einsatz, um einen Teil der noch vorhandenen Verunreinigungen in der Analyselösung abzufangen. Damit war es möglich die Selektivität und die Lebensdauer der stationären Phase zu erhöhen. Die Messung erfolgte bei Raumtemperatur, der Fluss lag bei 1,2ml/min und die Stoppzeit eines Durchgangs betrug 60 Minuten. Die Anlage lief konsequent mit einem Druck von 19 bis 21 bar. Die Anregungswellenlänge des Fluoreszenzdetektors betrug 275 nm, die Emissionswellenlänge lag bei 315 nm. Es wurden folgende Retentionszeiten ermittelt:

R-Metoprolol: 7 min

S-Metoprolol: 8,2 min

SR- α -Hydroxy-Metoprolol: 19,5 min

SS- α -Hydroxy-Metoprolol: 23,7 min

RR- α -Hydroxy-Metoprolol: 29,7 min

RS- α -Hydroxy-Metoprolol: 33,9 min

Die Stärke der emittierten Strahlung wird als Fluoreszenzintensitäts-Zeit-Kurve dargestellt. Die chromatographischen Signale werden als Peaks bezeichnet, aus deren Retentionszeit qualitative Aussagen über die jeweilige Substanz getroffen werden können. Mit Hilfe von Kalibrierstandards werden hierfür Eichkurven erstellt, anhand derer die Plasmakonzentration der Probe errechenbar ist. Diese Kalibrierstandards legen auch die Bestimmungsgrenze des Analyten fest d.h. dessen kleinste messbare Konzentration, die noch mit definierter Richtigkeit und Präzision (+/-20 %) bestimmt werden kann. Die Bestimmungsgrenze für R- und S-Metoprolol lag bei je 7,5 ng/ml und bei je 3,75ng/ml pro Metabolit.

Für die Gruppe der ultraschnellen Metabolisierer (UMs) ergaben sich folgende Konzentrationsmaxima: R-Metoprolol 30,08ng/ml, S-Metoprolol 43,59ng/ml, SR- α -Hydroxy-Metoprolol 9,54ng/ml, SS- α -Hydroxy-Metoprolol 12,77ng/ml, RR- α -Hydroxy-Metoprolol 28,78ng/ml und RS- α -Hydroxy-Metoprolol 42,29ng/ml.

Für die Gruppe der Schnellmetabolisierer (EMs) wurden folgende Konzentration gemessen: R-Metoprolol 45,28ng/ml, S-Metoprolol 72,04ng/ml, SR- α -Hydroxy-Metoprolol 7,97ng/ml, SS- α -Hydroxy-Metoprolol 8,04ng/ml, RR- α -Hydroxy-Metoprolol 22,17ng/ml und RS- α -Hydroxy-Metoprolol 31,03ng/ml.

Der Zeitpunkt des Erreichens der Maximalkonzentration lag in UMs wie in EMs bei einer Stunde. Es zeigt sich, dass S-Metoprolol in beiden Gruppen eine höhere Konzentration im Blut erreicht als R-Metoprolol, hingegen ist die Konzentration der S-Metaboliten (SR und SS) geringer als die der R-Metaboliten (RR und RS). Dies deutet auf einen schnelleren Metabolismus des R-Metoprolols hin.

3.4 Statistische Datenauswertung

Die Zuweisung des Genotyps erfolgte aufgrund der erhobenen, die jeweiligen Allele charakterisierenden Polymorphismen (nach <http://imm.ki.se/CYPalleles/2D6.html>). Die pharmakokinetischen Parameter von R-Metoprolol, S-Metoprolol, RS-, SS-, SR-, und RR- α -Hydroxy-Metoprolol wurden mittels nichtparametrischer Auswertung berechnet (Winnonlin Version 1.5); die Fläche unter der Konzentrations-Zeitkurve wurde mittels linearer Trapezregel und Extrapolation ins Unendliche berechnet, die orale Clearance ist als Clearance/Bioverfügbarkeit angegeben. Die Halbwertszeit wurde aus dem linearen Teil der Plasma-Konzentrationszeit-Kurve aus mindestens drei Konzentrationsmessungen ermittelt.

Zur statistischen Auswertung von Unterschieden zwischen den CYP2D6-Genotyp-Gruppen wurde bei Zweigruppenvergleichen (UM versus EM) der parametrische t-test verwendet. Zur statistischen Auswertung eines Trendes in Abhängigkeit der Aktivität von CYP2D6 wurde der Jonckheere Terpstra Trend Test verwendet. Die statistische Datenanalyse wurde mittels SPSS Software Version 12 vorgenommen.

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Genotypisierung der Studienteilnehmer

(CYP2D6-Allele CYP2D6*2, *9, *10, *35, *41 sowie allelspezifische Analyse der Genduplikation)

In Tabelle 12 sind die Ergebnisse der Genotypisierung dargestellt und der hieraus resultierende Genotyp für jeden Probanden. Desweiteren wurden die Ergebnisse der für die Allele bestimmten Mutationen (meist einzelne Basenaustausche) aufgeführt.

Der ursprüngliche Genotyp (UM bzw. EM) der Probanden stammt aus der Genotypisierung der Probanden, die in die klinische Studie von Kirchheiner et al. eingeschlossen wurden. Für diese Studie wurden die Allele CYP2D6*3 bis *6 sowie die Duplikation (CYP2D6*NxM) bestimmt.

Mittels der erneuten Genotypisierung durch die Bestimmung der in der Tabelle dargestellten Polymorphismen, lässt sich nun eine genauere Einteilung der Probanden hinsichtlich ihres Genotyps treffen. So konnten Probanden, die bisher als Schnellmetabolisierer (EMs) klassifiziert wurden, als Träger der *9, *10 und *41 Allele charakterisiert werden, was phänotypisch die Gruppe der IMs darstellt. Dies traf für fünf Probanden zu, in denen die Allele *9, *10 oder *41 heterozygot vorlagen. In drei Fällen gemeinsam mit dem Wildtypallel (CYP2D6*1), in je einem Fall gemeinsam mit CYP2D6*2 bzw CYP2D6*35.

Desweiteren konnte die Gruppe der EMs, bisher als Wildtyp (CYP2D6*1/*1) bezeichnet, nun in Träger von CYP2D6*1, *2 und *35 unterschieden werden. Nach der erneuten Genotypisierung konnte nur für drei der ursprünglich 13 Probanden der im Vorscreening ermittelte Genotyp CYP2D6*1/*1 bestätigt werden. Die übrigen 10 Probanden waren Träger der neu detektierten Polymorphismen und konnten in je fünf IMs und EMs eingeteilt werden.

In der Gruppe der Ultraschnellmetabolisierer konnte durch die erneute Genotypisierung das jeweils duplizierte Allel bestimmt werden. Ursprünglich wurde von einer Duplikation des *2-Allels ausgegangen (dieses Allel liegt laut Datenlage häufiger dupliziert vor; Sachse et al.

1997). Von den 12 UMs, die Träger einer Duplikation sind, wiesen acht eine Duplikation des *2-Allels auf. In vier Fällen war das Wildtypallel dupliziert (CYP2D6*1x2/M).

Durch die erneute Genotypisierung der UM-Gruppe konnten vier Probanden als heterozygote Träger der Allele mit verminderter Aktivität (CYP2D6*9, *10 und *41) charakterisiert werden. Diese Probanden weisen eine etwas geringere Aktivität von CYP2D6 auf als die anderen UMs, in denen die Duplikation eines CYP2D6-Allels gemeinsam mit den Allelen *1, *2 oder *35 vorliegt, die eine normal schnelle CYP2D6-Aktivität bedingen.

Übersicht über die mittels PCR-RFLP untersuchten Polymorphismen in den Probanden und der daraus resultierenden Festlegung des Genotyps

		CYP2D6-Allele	*41	*35	*10	*9			*2
		Position	-1496	31	188	2701-3	2938	4268	
		AS-Austausch	C>G	G>A	C>T	AGAdel	C>T	G>C	
Code	Geno- typ alt	Geno- typ neu	Dup						
3	*1/*1	*1/*10	0	CC	GG	CT	AGA	CC	GC
6	*1/*1	*2/*41	0	CG	GG	CC	AGA	TT	CC
8	*1/*1	*35/*41	0	CC	GA	CC	AGA	TT	CC
44	*1/*1	*1/*9	0	CC	GG	CC	AGA/del	TT	GG
51	*1/*1	*1/*41	0	CC	GG	CC	AGA	CT	GC
5	*1/*1	*1/*2	0	CG	GG	CC	AGA	CT	GC
7	*1/*1	*1/*1	0	CC	GG	CC	AGA	CC	GG
25	*1/*1	*1/*1	0	CC	GG	CC	AGA	CC	GG
26	*1/*1	*1/*1	0	CC	GG	CC	AGA	CC	GG
37	*1/*1	*1/*35	0	CC	GA	CC	AGA	CT	GC
41	*1/*1	*1/*2	0	CG	GG	CC	AGA	CT	GC
49	*1/*1	*2/*35	0	GG	GA	CC	AGA	TT	CC
50	*1/*1	*1/*35	0	CC	GA	CC	AGA	CT	GC
10	*2x2/*1	*1x2/*9	1	CC	GG	CC	AGA/del	CC	GG
11	*2x2/*1	*1x2/*10	1	CC	GG	CT	AGA	CT	GC
20	*2x2/*1	*2x2/*41	1	CG	GG	CC	AGA	TT	CC
46	*2x2/*1	*2x2/*41	1	CG	GG	CC	AGA	TT	CC
15	*2x2/*1	*2x2/*35	1	GG	GA	CC	AGA	TT	CC
17	*2x2/*1	*1x2/*35	1	CC	GA	CC	AGA	CT	GC
18	*2x2/*1	*2x2/*1	1	CG	GG	CC	AGA	CT	GC
19	*2x2/*1	*1x2/*1	1	CC	GG	CC	AGA	CC	GG
23	*2x2/*1	*2x2/*35	1	GG	GA	CC	AGA	TT	CC
24	*2x2/*1	*2x2/*1	1	CG	GG	CC	AGA	CT	GC
38	*2x2/*1	*2x2/*35	1	GG	GA	CC	AGA	TT	CC
40	*2x2/*1	*2x2/*1	1	CG	GG	CC	AGA	CT	GC

Tabelle 12

4.2 Semiquantitative Gendosis (SGD) für CYP2D6

Wie oben bereits erwähnt, kann durch die erneute Genotypisierung der Probanden eine genauere Einteilung hinsichtlich der Aktivität von CYP2D6 erfolgen. So wurde für jedes von uns genotypisierte Allel eine semiquantitative Gendosis (SGD) festgelegt (s. Tabelle 13). Durch diese Einteilung resultiert eine genauere Gruppenzuordnung hinsichtlich der Aktivität für CYP2D6, die eine bessere Unterscheidung der phänotypischen EMs vs. UMs zulässt. Mittels der SGD wurden jedem Allel Aktivitätspunkte zugeordnet. So bekamen die drei von uns bestimmten Varianten mit verlangsamter Aktivität (Phänotyp: IM: *9, *10 und *41) jeweils 0,5 Aktivitätspunkte. Für den Wildtyp (CYP2D6*1) und die Varianten CYP2D6*2 und *35, die den EM-Phänotyp kennzeichnen, wurde 1 Aktivitätspunkt vergeben. Eine Duplikation, die den UM-Phänotyp charakterisiert, führte zu einer Verdoppelung des Punktwertes des duplizierten Allels.

Durch diese Zuweisung der Aktivitätspunkte können die beiden Phänotypen EM und UM nun in insgesamt vier Aktivitätsgruppen unterteilt werden. So konnten die Schnellmetabolisierer (EMs) nach der Genotypisierung in die beiden Gruppen mit den jeweiligen semiquantitativen Gendosen von 1,5 und 2,0 unterteilt werden, was sich aus der Bestimmung der Varianten mit verminderter Aktivität ergab (*9, *10 und *41; SGD je Variante: 0,5). Fünf der ehemals 13 EMs waren heterozygote Träger der oben genannten Varianten mit verminderter Aktivität. Die Gesamt-Gendosis dieser Probanden beträgt 1,5 und setzt sich aus der SGD der neu detektierten Varianten *9, *10 und *41 (SGD = 0,5) und *1, *2 und *35 (SGD = 1,0) zusammen. In der Gruppe der verbleibenden acht EMs konnte der Genotyp genauer bestimmt werden, auch wenn hieraus keine Änderung der Aktivität resultierte, da die drei in dieser Gruppe detektierten Varianten CYP2D6*1, *2 und *35 jeweils eine SGD von 1,0 aufweisen. Die SGD in dieser Gruppe lag somit bei 2,0 je Proband. Drei Probanden waren heterozygote Träger des *2-Allels und drei Probanden heterozygote Träger des *35-Allels. In einem Probanden lagen diese beiden Polymorphismus gemeinsam vor (Genotyp: CYP2D6*2/*35).

Interessant wird die nähere Analyse der Träger einer Duplikation, die 12 unserer Probanden aufweisen. Diese als Ultraschnellmetabolisierer bezeichnete Gruppe verfügte in unserer Studienpopulation über drei aktive Allele (ein aktives Allel liegt jeweils dupliziert vor). Nach der

Genotypisierung konnten diese 12 UMs hinsichtlich ihrer SGD in zwei Gruppen unterteilt werden. Hierbei waren vier Probanden heterozygote Träger der Varianten mit verminderter Aktivität (*9, *10 und *41; SGD = 0,5). In jeweils einem Probanden lag die Duplikation kombiniert mit den Allelen *9 bzw. *10 vor. In den übrigen beiden Probanden war die Duplikation mit CYP2D6*41 kombiniert. Um die Gesamt-Gendosis zu bestimmen, addiert man die allelspezifische SGD von 0,5 der Varianten *9, *10 und *41 mit der SGD für das jeweils duplizierte Allel. In zwei Probanden lag eine Duplikation des Wildtypallels vor (CYP2D6*1), in den anderen beiden Probanden war das *2-Allel dupliziert. Da die SGD für *1 wie für *2 bei 1,0 liegt, ergibt sich bei der Duplikation dieser Allele eine Verdopplung der SGD. Diese ist somit in beiden Allelen $2 \times 1,0$ ($2 \times *1$ oder $2 \times *2$) = 2,0. Für die vier Probanden ergibt sich nunmehr eine Gesamt-Gendosis von 2,5 (*9, *10, *41 je 0,5 + $2 \times *1$ bzw. $2 \times *2$ je 2,0 = 2,5).

In den übrigen acht UMs waren drei Probanden heterozygote Träger des *35-Allels, welches wie das Wildtypallel (CYP2D6*1) und das *2-Allel eine SGD von 1,0 aufweist. Dupliziert war in einem Fall das Wildtypallel (CYP2D6*1), in den übrigen sechs Probanden das *2-Allel. Die Gesamt-Gendosis in dieser Gruppe liegt somit bei 3,0 ($2 \times *1$ bzw. $2 \times *2 = 2,0 + *1, *2$ oder *35 = 1,0).

Die Unterscheidung der Duplikation von CYP2D6*1 vs. CYP2D6*2 konnte mittels den PCR-Reaktionen Nr. 9 und 10 (s. Tabelle 8) (nach Sachse et al. 1997) gemacht werden. In der Gesamtgruppe der Ultraschnellmetabolisierer mit semiquantitativen Gendosen von 2,5 (n = 4) und 3,0 (n = 8) lag in drei Probanden eine Duplikation des Wildtypallels (CYP2D6*1), in den übrigen neun Probanden eine Duplikation von CYP2D6*2 vor. Dieses Ergebnis hatte keinen Einfluss auf die Aktivität von CYP2D6, da wie oben bereits erwähnt *1 wie auch *2 über eine SGD von 1,0 verfügen.

Übersicht über die semiquantitative Gendosis nach zusätzlicher Genotypisierung von Varianten mit verminderter und normal schneller Aktivität (*9, *10, *41: verminderte Aktivität; *2, *35: normale Aktivität):

Code	Genotyp		Phänotyp	Genotyp		Aktivität		SGD
	alt	Aktive Allele		neu	Aktivität			
					Allel 1	Allel 2		
3	*1/*1	2	EM→IM	*1/*10	1,0	0,5	1,5	
6	*1/*1	2	EM→IM	*2/*41	1,0	0,5	1,5	
8	*1/*1	2	EM→IM	*35/*41	1,0	0,5	1,5	
44	*1/*1	2	EM→IM	*1/*9	1,0	0,5	1,5	
51	*1/*1	2	EM→IM	*1/*41	1,0	0,5	1,5	
5	*1/*1	2	EM	*1/*2	1,0	1,0	2,0	
7	*1/*1	2	EM	*1/*1	1,0	1,0	2,0	
25	*1/*1	2	EM	*1/*1	1,0	1,0	2,0	
26	*1/*1	2	EM	*1/*1	1,0	1,0	2,0	
37	*1/*1	2	EM	*1/*35	1,0	1,0	2,0	
41	*1/*1	2	EM	*1/*2	1,0	1,0	2,0	
49	*1/*1	2	EM	*2/*35	1,0	1,0	2,0	
50	*1/*1	2	EM	*1/*35	1,0	1,0	2,0	
10	*2x2/*1	3	UM	*1x2/*9	2,0	0,5	2,5	
11	*2x2/*1	3	UM	*1x2/*10	2,0	0,5	2,5	
20	*2x2/*1	3	UM	*2x2/*41	2,0	0,5	2,5	
46	*2x2/*1	3	UM	*2x2/*41	2,0	0,5	2,5	
15	*2x2/*1	3	UM	*2x2/*35	2,0	1,0	3,0	
17	*2x2/*1	3	UM	*1x2/*35	2,0	1,0	3,0	
18	*2x2/*1	3	UM	*2x2/*1	2,0	1,0	3,0	
19	*2x2/*1	3	UM	*2x2/*1	2,0	1,0	3,0	
23	*2x2/*1	3	UM	*2x2/*35	2,0	1,0	3,0	
24	*2x2/*1	3	UM	*2x2/*1	2,0	1,0	3,0	
38	*2x2/*1	3	UM	*2x2/*35	2,0	1,0	3,0	
40	*2x2/*1	3	UM	*2x2/*1	2,0	1,0	3,0	

Tabelle 13

4.3 Auswirkungen der SGD auf die Pharmakokinetik von Metoprolol

In Abbildung 2 ist der Einfluss der SGD auf die orale Clearance von Metoprolol dargestellt. Es wird deutlich, dass durch die Einteilung in vier Gruppen eine genauere Aufschlüsselung der CYP2D6-Aktivität erreicht wird. So ist erkennbar, dass in UMs wie auch in EMs ein Unterschied in der oralen Clearance je nach ermittelter SGD gemessen wurde.

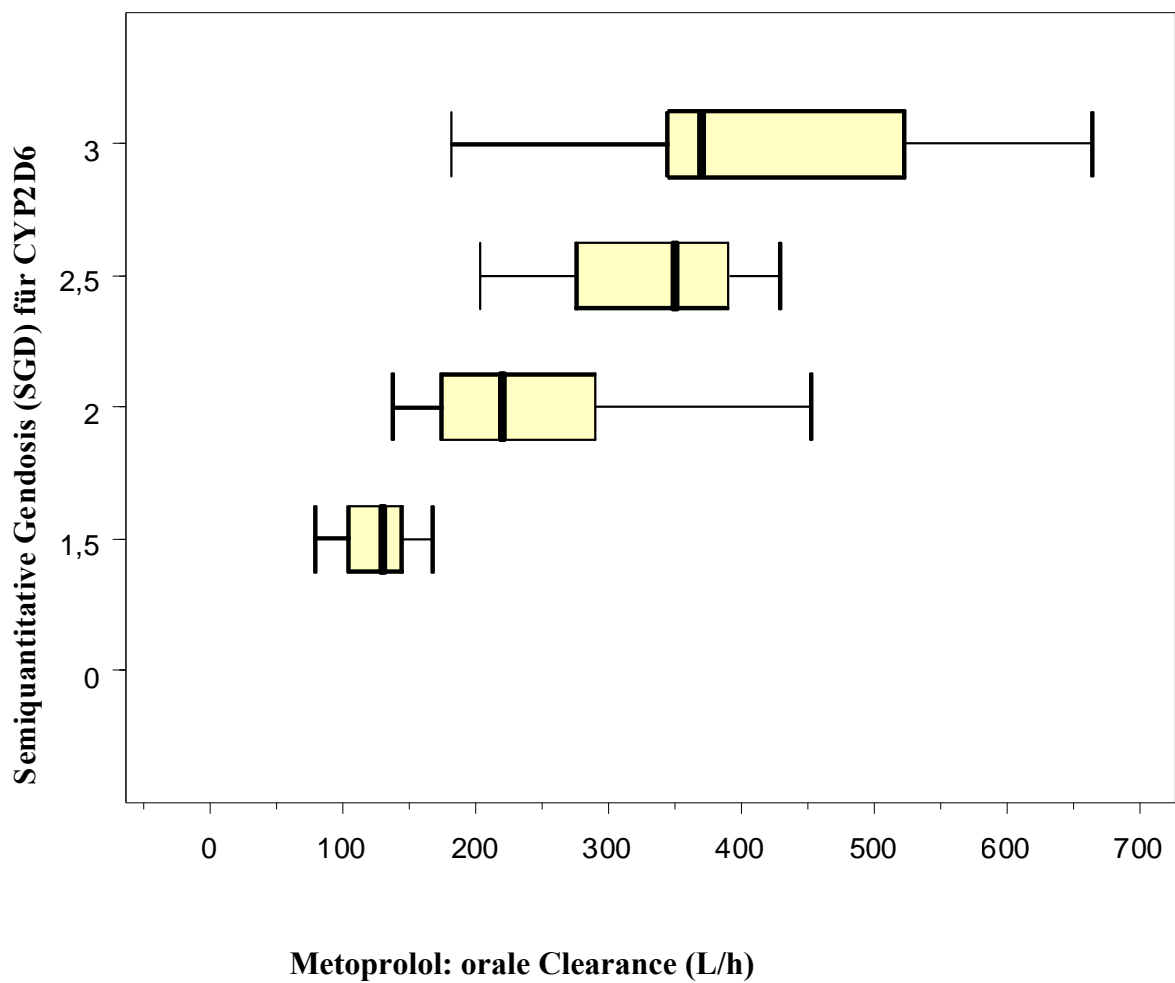


Abbildung 2

Beziehung zwischen der totalen oralen Clearance und der SGD für CYP2D6.

Die semiquantitative Genodosis (SGD) für CYP2D6 ist auf der y-Achse wie folgt dargestellt:

- 1,5: Kombination von einem aktiven Allel (*1, *2 oder *35; SGD: 1,0) mit einem Allel mit verminderter Funktion (*9, *10 oder *41; SGD: 0,5);
- 2: Kombination von zwei aktiven Allelen (*1, *2 oder *35);
- 2,5: Kombination von einem duplizierten Allel (*1x1 oder *2x2) mit einem Allel mit verminderter Aktivität (*9, *10 oder *41);
- 3: Kombination eines duplizierten Allels (*2x1, *2x2 oder *2x35) mit einem aktiven Allel (*1, *2 oder *35).

Auf der x-Achse ist die totale orale Clearance in L/h aufgetragen.

Die erhobenen Daten sind als Box-Plots dargestellt. Die schwarze dicke Linie innerhalb der Boxen kennzeichnet die jeweiligen Mediane, die dünnen Linien zeigen den niedrigsten und höchsten erhobenen Wert an.

4.4 Unterschiede in der Pharmakokinetik von R- und S-Metoprolol sowie deren Metabolite in Abhängigkeit von Phänotyp und SGD

4.4.1 Pharmakokinetische Auswertung nach CYP2D6-Phänotyp UM und EM

In Tabelle 14 sind die pharmakokinetischen Parameter für S- und R-Metoprolol für die beiden Phänotyp-Gruppen EM und UM dargestellt. Es zeigte sich ein signifikanter Einfluss des CYP2D6-Genotyps für beide Enantiomere. Für UMs wie für EMs ist eine höhere Plasmakonzentration des S-Enantiomers zu erkennen (s. Abb. 3). Ein enantioselektiver Einfluss konnte nicht festgestellt werden, da sich in beiden Genotyp-Gruppen die orale Clearance beider Enantiomere etwa um das zweifache unterscheidet.

R- und S-Metoprolol verfügen über jeweils zwei Metabolite: RR-Metoprolol, RS-Metoprolol, SR-Metoprolol sowie SS-Metoprolol. Auch bei ihnen ist ein signifikanter Einfluß des CYP2D6-Genotyps an der größeren maximalen Plasmakonzentration aller vier Metaboliten in der Gruppe der UMs im Vergleich zu der Gruppe der EMs erkennbar.

CYP2D6-Phänotyp	S-Metoprolol			R-Metoprolol			SS-Metoprolol		RR-Metoprolol		SR-Metoprolol		RS-Metoprolol	
	Cl* (L/h)	AUC (ng/ml*h)	Cmax (ng/ml)	Cl (L/h)	AUC (ng/ml)	Cmax (ng/ml)	AUC (ng/ml)	Cmax (ng/ml)	AUC (ng/ml)	Cmax (ng/ml)	AUC (ng/ml)	Cmax (ng/ml)	AUC (ng/ml)	Cmax (ng/ml)
EM	161,7	365,9	80,9	240,1	261,1	55,1	89,65	9,2	247,8	22,9	85,3	9,1	355,7	32,1
	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
UM	65,35	157,7	40,25	116,8	125,8	28,04	30,7	2,3	101,8	7,0	24,3	3,8	92,8	9,4
	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	4 +/-	+/-
Signifi- kanz**	0,003	0,003	0,018	0,003	0,004	0,017	n.s.	<0,001	n.s.	0,006	n.s.	0,1	0,15	0,04

* Daten als Mittelwerte +/- Standardabweichung

** p-Werte nach Analyse mittels T-Test

n.s. nicht signifikant

Tabelle 14

Gemessene Plasmakonzentration der jeweiligen Metabolite im Zeitverlauf

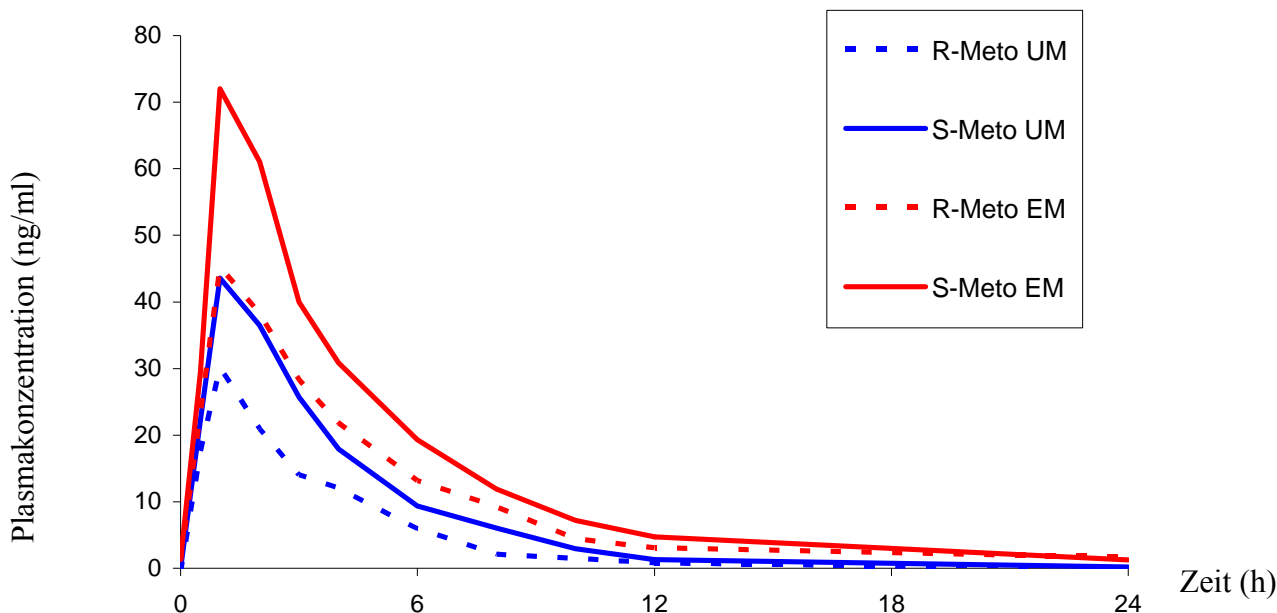


Abbildung 3

4.4.2 Pharmakokinetische Analyse im Hinblick auf Unterschiede in der SGD

Um genauere Kenntnis vom Einfluss der unterschiedlich aktiven Allele auf den Metabolismus von R- und S-Metoprolol sowie deren Metabolite zu erhalten, wurden die pharmakokinetischen Parameter in Abhängigkeit von den vier semiquantitativen Gendosen für CYP2D6 betrachtet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 aufgeführt.

Es zeigte sich ein signifikanter Trend zu niedrigeren Konzentrationen beider Enantiomere von Metoprolol mit zunehmender CYP2D6-Aktivität, wobei sich insbesondere die beiden Gruppe mit den semiquantitativen Gendosen 1,5 und 2,0 unterschieden, während die Einteilung der Duplikationsträger in die beiden Gendosis-Gruppen mit 2,5 und 3,0 Punkten keine Unterschiede weder bei S- noch bei R-Metoprolol zeigten. Bei einer SGD von 2,0 findet sich für R- wie für S-Metoprolol eine fast doppelt so große Clearance sowie eine fast halb so große AUC und Plasmakonzentration als für die Gruppe mit einer SGD von 1,5. Diese Unterschiede im

Metabolismus sind durch die verminderte Aktivität der mittels erneuter Genotypisierung bestimmten Allele *9, *10 und *41 bedingt.

Unter den Ultraschnellmetabolisierern, die nach erneuter Genotypisierung in die beiden Gruppen mit 2,5 bzw. 3,0 Feinaktivitätspunkten unterteilt wurden, lassen sich dagegen keine Unterschiede im Metabolismus der Enantiomere feststellen, obwohl die Zuweisung der Aktivitätspunktzahl von 2,5 ebenfalls durch die weniger aktiven CYP2D6-Allele *9, *10 und *41 bedingt war.

Bei der enantioselektiven Auswertung der α -Hydroxy-Metabolite (SS-OH-, RR-OH-, SR-OH- und RS-OH-Metoprolol) zeigt sich ebenfalls ein signifikanter Trend zu höheren maximalen Plasmakonzentrationen mit zunehmender Feinaktivität von CYP2D6. Die AUCs der Metabolite dagegen zeigen keinen deutlichen CYP2D6-Einfluss mehr.

CYP2D6- SGD	S-Metoprolol			R-Metoprolol			SS- Metoprolol		RR- Metoprolol		SR- Metoprolol		RS- Metoprolol	
	Cl* (L/h)	AUC (ng/ml*h)	Cmax (ng/ml)	Cl (L/h)	AUC (ng/ml)	Cmax (ng/ml)	AUC (ng/ml)	Cmax (ng/ml)	AUC (ng/ml)	Cmax (ng/ml)	AUC (ng/ml)	Cmax (ng/ml)	AUC (ng/ml)	Cmax (ng/ml)
1,5	112,9	481,6	108,8	139,5	373,4	78,1	86,5	8,4	294,2	22,2	92,1	8,4	380,6	28,0
	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
2,0	40,55	133,9	21,0	31,5	81,1	22,8	37,2	2,7	128,2	7,8	21,8	3,7	110,0	8,9
	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
2,5	203,6	266,8	56,9	326,3	164,8	35,3	92,4	9,9	208,1	23,6	79,5	9,7	334,4	35,7
	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
3,0	52,4	99,7	37,7	87,7	52,14	12,5	26,8	1,7	55,1	6,8	26,4	4,2	77,5	8,9
	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
3,5	386,8	159,3	43,5	635,2	116,7	26,1	263,1	13,1	211,1	27,9	68,2	10,0	361,3	42,3
	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
4,0	200,6	78,3	31,2	410,2	80,4	15,1	197,7	0,8	69,0	8,35	19,5	1,5	76,9	14,5
	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
4,5	322,5	205,0	48,7	455,9	131,9	34,7	135,3	13,8	297,9	33,5	104,5	11,5	432,0	48,2
	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
5,0	194,3	109,3	20,9	182,2	73,1	13,6	32,7	2,1	69,4	6,6	40,1	2,45	79,9	12,1
	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Signifi- kantz**	0,001	0,001	0,008	0,001	0,001	0,016	0,044	0,001	n.s.	0,006	n.s.	n.s.	0,1	0,002

* Daten als Mittelwerte +/- Standardabweichung

** P-Werte nach Analyse mittels Jonckheere-Terpstra-Trend Test

n.s. nicht signifikant

Tabelle 15

5. Diskussion

5.1 CYP2D6 – semiquantitative Gendosis (SGD)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch eine weitere Untersuchung von CYP2D6-Allelen die CYP2D6-Genotypen entsprechend einer semiquantitativen Gendosis eingeteilt und so eine genauere Vorhersage der CYP2D6-Enzymaktivität erreicht. Es wurden hierbei die Allele für verminderte Aktivität (CYP2D6*9, *10 und *41) sowie das CYP2D6*35-Allel, welches mit schneller Aktivität für CYP2D6 einhergeht, berücksichtigt. Das Konzept der semiquantitativen CYP2D6-Gendosis wurde von Steimer et al. anhand einer Studie an 50 depressiven Patienten entwickelt, deren Antidepressiva-Medikation CYP2D6-abhängig metabolisiert wurde. Steimer et al. verglichen die Ergebnisse einer vorangegangenen Phänotypisierung der Patienten mit den für jeden Patienten determinierten Genotypen. Bei der Genotypisierung wurden besonders Varianten mit reduzierter Aktivität berücksichtigt.

Durch die Vielzahl der CYP2D6-Polymorphismen können Allele in unterschiedlichen Kombinationen vorliegen und verschiedene CYP2D6-Genotypen bedingen. Um die Enzymaktivität jedes Genotypen (Kombination aus zwei Allelen) möglichst genau vorhersagen zu können, wurde zunächst die Aktivität jedes einzelnen Allels auf einen Wert zwischen 1 = normale Aktivität, 0,5 = geringere Aktivität oder 0 = keine Aktivität festgelegt. Nun konnten die Summen der Allele gebildet und mit den pharmakokinetischen Parametern der CYP2D6-Substrate (Antidepressiva in diesem Fall) verglichen werden. Hierbei wurde die Änderung der Metabolic Ratio (MR = Verhältnis Muttersubstanz/Metabolit im Urin) in heterozygoten Trägern vermindert aktiver Allele (CYP2D6*41, CYP2D6*10) mit der MR von homozygoten Wildtyp-Trägern (CYP2D6*1/*1) verglichen. Es fiel eine 1,95-fach niedrigere MR in heterozygoten Trägern von CYP2D6*41 sowie eine 2,67-fach niedrigere MR in heterozygoten Trägern von CYP2D6*10 auf. Diese Ergebnisse führten zur Festlegung der Aktivitätspunktzahl von 0,5 in Trägern dieser vermindert aktiven Allele. Das ebenfalls analysierte CYP2D6*35-Allel bedingte keine höhere CYP2D6-Aktivität in der Studie von Steimer, was die Annahme eines ultraschnellen Metabolismus aufgrund dieses Allels nicht belegen konnte. Eine Aktivitätspunktzahl von 1,0 charakterisiert dieses Allel. Als Konsequenz dieser Ergebnisse wurde

der Begriff der semiquantitativen Gendosis (SGD) eingeführt, der eine genauere Einteilung hinsichtlich der Aktivität der einzelnen Allele ermöglicht.

Wir haben die von Steimer vorgeschlagene SGD von 0,5 Punkten für vermindert aktive Allele übernommen und ergänzt, indem auch für das vermindert aktive CYP2D6*9-Allel eine SGD von 0,5 Punkten eingeführt wurde. In Trägern der Duplikation wurde die SGD des jeweilig dupliziert vorliegenden Allels verdoppelt. Aufgrund der Unterscheidung der vermindert aktiven Allele von den schnellen Allelen mit Hilfe der SGD, konnten die 12 Duplikationsträger in zwei Gruppen aufgeteilt werden. Durch die Einführung der allelspezifischen Aktivität war somit eine Einteilung unserer Probanden in vier feinaktive Gruppen möglich. Dies kann in Zukunft einer individuelleren Dosisfindung dienen. Steimer et al. (2004) haben in ihrer Arbeit schon Ansätze hierzu vorgeschlagen, in dem sie aufgrund der SGD Dosisanpassungen in Prozent der Standarddosis errechneten.

5.2 Metoprolol als Probesubstanz

Um die aktuelle Enzymaktivität eines Probanden zu determinieren, sind adäquate Probesubstanzen nötig, die im besten Falle ausschließlich über das zu beurteilende Enzym metabolisiert werden (Frank et al. 2007). Desweiteren sollten sie leicht verfügbar, einfach applizierbar und gut verträglich sein (Fuhr et al. 2007). Die Enzymaktivität kann u.a. mittels des Verhältnisses von Muttersubstanz zu Metabolit im Urin (der sog. Metabolic ratio = MR) sicher und zuverlässig bestimmt werden. Diese Methode ist für Proband und Untersucher komplikationslos durchführbar. Bei einer guten Probesubstanz sollte die MR weitgehend unabhängig von individuellen Einflüssen wie z.B. dem Urin-pH, der renalen Clearance oder der Hormonkonzentration sein, um den aktuellen Phänotyp sicher bestimmen zu können. Auch muss auf eine gute Reproduzierbarkeit der erhobenen pharmakokinetischen Parameter geachtet werden (Fuhr et al. 2007). Interindividuelle Unterschiede zwischen den jeweiligen MRs lassen nun die Differenzierung in die verschiedenen Phänotypen zu.

Für CYP2D6 sind seit den 70er Jahren die beiden Probesubstanzen Spartein und Debrisoquin bekannt und in vielen Studien in vivo und in vitro auf ihre Zuverlässigkeit überprüft worden (Dalen et al. 2000; Dayer et al. 1988; Distlerath et al. 1984; Griese et al. 1998; Streetman et

al. 2000). In letzter Zeit wurden Dextrometorphan und Metoprolol als CYP2D6-Probesubstanzen verwendet (Dalen et al. 2000; Streetman et al. 2000). Ihr Vorteil gegenüber Spartein und Debrisoquin liegt vor allem in der weltweiten Verfügbarkeit. Während Debrisoquin noch in einigen Ländern im Handel ist, wurde Spartein vom Markt genommen und steht als Probesubstanz somit nicht mehr zur Verfügung.

Dextrometorphan und Metoprolol als neuere Probesubstanzen sind gut tolerabel und nebenwirkungsarm, was sich auch in unserer Studienpopulation zeigte. Beide haben den Nachteil, dass der Urin-pH großen Einfluss auf die MR hat und zu intraindividuellen Schwankungen von 20 – 80 % führt (Labbé et al. 2000). Durch die großen Unterschiede der MR in PMs vs. EMs für Metoprolol (Lennard et al. 1982), führen die intraindividuellen Schwankungen jedoch kaum zu einer Missklassifikation des Phänotyps (Labbé et al. 2000). Die große Variabilität in der EM-Gruppe für den urinären MR von Dextrometorphan macht eine Unterscheidung hier schwieriger. Die Determination zwischen IMs und EMs ist hiermit fast nicht möglich (Evans & Relling 1991).

In unserer Untersuchung wurde daher nicht die MR im Urin verwendet, sondern eine Plasmakinetik von Metoprolol gemessen, was zwar eine genaue Phänotyp-Bestimmung von CYP2D6 ermöglicht (Lennard et al. 1982a; Lennard et al. 1983; Dayer et al. 1985a), jedoch für die klinische Praxis mit relativ vielen Blutentnahmen beim Probanden resp. Patienten verbunden ist und daher als generelle Phänotypisierungsmethode eher weniger empfohlen werden kann.

5.3 Enantioselektivität des CYP2D6-Metabolismus von Metoprolol

5.3.1 Einfluss von CYP2D6 auf Enantiomere der Muttersubstanz

Neben der α -Hydroxylierung, die nahezu vollständig durch CYP2D6 vermittelt wird, ist auch die in vivo überwiegende O-Demethylierung zumindest zu einem Teil CYP2D6-abhängig (Otton et al. 1988). Während S-Metoprolol überwiegend α -hydroxyliert wird und somit dem polymorphen Metabolismus via CYP2D6 weniger unterliegt, wird R-Metoprolol schneller O-demethyliert. (Lennard et al. 1986; Murthy et al. 1990).

In mehreren Studien konnte für Schnellmetabolisierer ein enantioselektiver Metabolismus anhand der schnelleren Elimination von R-Metoprolol belegt werden, wohingegen Langsammetabolisierer diese Enantioselektivität verloren haben (Jonkers et al. 1991). In unserer Studie wurde auf Unterschiede im Hinblick auf eine Enantioselektivität des Metabolismus in EMs im Vergleich zu UMs geachtet. In beiden Phänotypgruppen wurde eine höhere Plasmakonzentration des S-Enantiomers gemessen. Des Weiteren zeigte sich kein Unterschied im Metabolismus der beiden Enantiomere in EMs und UMs, da sich die orale Clearance der beiden Metabolite in EMs wie in UMs um ungefähr den gleichen Faktor voneinander unterschied.

5.3.2 Einfluss von CYP2D6 auf Enantiomere der α -Hydroxy-Metabolite

In unserer Studienpopulation wurden die beiden Enantiomere der α -Hydroxy-Metabolite bestimmt. Da α -Hydroxy-Metoprolol über zwei chirale Zentren verfügt, können beide Enantiomere in je zwei Metaboliten vorliegen (RR-, RS-, SS-, SR- α -Hydroxy-Metoprolol). Die α -Hydroxylierung ist CYP2D6 abhängig, allerdings erfolgt die weitere Metabolisierung der α -Hydroxy-Metabolite nicht mehr ausschließlich über CYP2D6 (Lennard et al. 1985), so dass die AUC und Plasmakonzentrationen der Metabolite die Summe aus CYP2D6-abhängigen Bildungsvorgängen und nicht-CYP2D6-abhängigen Eliminierungsvorgängen abbilden.

Betrachtet man die vier Metabolite der beiden Enantiomere, war ein signifikanter Einfluss des CYP2D6-abhängigen Metabolismus nur noch für die maximale Plasmakonzentration der Metabolite festzuhalten. Mit Zunahme der Aktivität von CYP2D6 wurde auch mehr Metoprolol

abgebaut, was sich an der höheren Konzentration der Metabolite in UMs bzw in Trägern mit der höheren Gendosis (SGD) ablesen lässt. Wie bereits erwähnt werden 10 % des Gesamt-Metoprolols α -hydroxyliert, während 65 % O-demethyliert werden. Lennard et al. (1985) konnten zeigen, dass die Clearance von O-Demethyl-Metoprolol in Langsammetabolisierern niedriger war als in Schnellmetabolisierern, was eine CYP2D6-Abhängigkeit auch dieses Abbauweges belegt. In unserer Studie wurden ausschließlich die α -Hydroxy-Metabolite bestimmt, für die eine Enantioselektivität des Metabolismus nicht festzustellen war. Eine Bestimmung der O-Demethyl-Metabolite im Hinblick auf einen Einfluss der CYP2D6-Aktivität sowie eines stereoselektiven Metabolismus innerhalb dieses Abbauweges, könnte einen noch differenzierteren Blick auf die Unterschiede im Metoprolol-Metabolismus geben.

6. Zusammenfassung

Diese Arbeit baut auf einer klinischen Studie zum Einfluss der CYP2D6-Genduplikation und des ultraschnellen Metabolismus auf die Pharmakokinetik von Metoprolol in gesunden Probanden auf. Ziel der Arbeit war es durch eine erweiterte Genotypisierung von CYP2D6-Allelen, welche eine verminderte oder eine erhöhte CYP2D6-Aktivität bedingen, eine über die übliche Einteilung in Langsam- (PM), Schnell- (EM) und Ultraschnellmetabolisierer (UM) hinausgehende genauere Klassifikation für den Metabolisierungsstatus von CYP2D6 zu finden. Im zweiten Ziel der Arbeit wurde das Konzept der semiquantitativen Gendosis von CYP2D6 anhand des Einflusses auf den Metabolismus von Metoprolol in vivo enantioselektiv untersucht.

Genotypisiert wurden neben den vermindert aktiven Allelen CYP2D6*9, *10 und *41 auch die aktiven Allele CYP2D6*2 und CYP2D6*35. Die pharmakokinetischen Daten von R- und S-Metoprolol sowie deren Metaboliten (SS-Metoprolol, SR-Metoprolol, RS-Metoprolol, RR-Metoprolol) wurden mittels High Performance Liquid Chromatographie (HPLC) erhoben.

Für die Feinklassifizierung der CYP2D6-Aktivität in semiquantitative Gendosen wurde jedem Allel entsprechend der vorhergesagten Enzymaktivität ein Wert zwischen 0 und 1 zugeordnet und die semiquantitative Gendosis anhand des Genotyps als Summenwert der einzelnen Allele errechnet. Das Vorliegen einer Duplikation führte jeweils zu einer Verdopplung des Punktwertes des dupliziert vorliegenden Allels. So erhielten die für den EM-Phänotyp kodierenden Genotypen 1,5 oder 2, die für den UM-Phänotyp kodierenden Genotypen 2,5 oder 3 Aktivitätspunkte.

Anschließend wurde die Einteilung in semiquantitative CYP2D6-Gendosen anhand pharmakokinetischer Parameter von Metoprolol überprüft. Es zeigte sich ein signifikanter Einfluss der semiquantitativen CYP2D6-Gendosis auf die orale Clearance beider Enantiomere von Metoprolol, sowie auf die maximale Plasmakonzentrationen der α -Hydroxy-Metabolite. Eine Enantioselektivität des Einflusses konnte dabei nicht festgestellt werden.

Damit wurde zum einen Metoprolol als geeignetes Probesubstrat zur Messung der CYP2D6-Aktivität in vivo bestätigt, zum anderen der Vorteil einer genaueren Klassifizierung der CYP2D6-Phänotypen im Vergleich zur herkömmlichen Unterteilung gezeigt. Eine Genotypisierung für das polymorphe Enzym CYP2D6 sollte, insbesondere für die Abgrenzung Schnell- versus Ultraschnellmetabolisierer, auch die Bestimmung der Allele mit herabgesetzter und erhöhter Enzymaktivität erfassen.

Literaturverzeichnis

Akhillu E, Persson I, Bertilsson L, Johansson I, Rodrigues F, Ingelman-Sundberg M: Frequent distribution of ultrarapid metabolizers of debrisoquine in an ethiopian population carrying duplicated and multiduplicated functional CYP2D6 alleles. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996 Jul;278(1):441-6

Allorge D, Harlow J, Boulet O et al: In-vitro analysis of the contribution of CYP2D6.35 to ultra-rapid metabolism. *Pharmacogenetics.* 2001 Nov;11(8):739-41

Arfwidsson A, Borg KO, Hoffmann KJ, Skanberg I: Metabolism of metoprolol in the rat in vitro and in vivo. *Xenobiotica.* 1976 Nov;6(11):691-711

Bathum L, Johansson I, Ingelman-Sundberg M, Horder M, Brosten K: Ultrarapid metabolism of sparteine: frequency of alleles with duplicated CYP2D6 genes in a Danish population as determined by restriction fragment length polymorphism and long polymerase chain reaction. *Pharmacogenetics.* 1998 Apr;8(2):119-23

Bertilsson L, Aberg-Wistedt A, Gustafsson LL, Nordin C: Extremely rapid hydroxylation of debrisoquine: a case report with implication for treatment with nortriptyline and other tricyclic antidepressants. *Ther Drug Monit.* 1985;7(4):478-80

Borg KO, Carlsson E, Hoffmann KJ, Jonsson TE, Thorin H, Wallin B: Metabolism of metoprolol-(3-h) in man, the dog and the rat. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 1975;36(Suppl 5):125-35

Broly F, Meyer UA: Debrisoquine oxidation polymorphism: phenotypic consequences of a 3-base-pair deletion in exon 5 of the CYP2D6 gene. *Pharmacogenetics.* 1993 Jun;3(3):123-30

Cai WM, Nikoloff DM, Pan RM et al.: CYP2D6 genetic variation in healthy adults and psychiatric African-American subjects: implications for clinical practice and genetic testing. *Pharmacogenomics J.* 2006 Sep-Oct;6(5):343-50. Epub 2006 Mar 21

Chida M, Ariyoshi N, Yokoi T et al.: New allelic arrangement CYP2D6*36 x 2 found in a Japanese poor metabolizer of debrisoquine. *Pharmacogenetics*. 2002 Nov;12(8):659-62

Clark DW: Genetically determined variability in acetylation and oxidation. Therapeutic implications. *Drugs*. 1985 Apr;29(4):342-75

Dahl ML, Johansson I, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M, Sjoqvist F: Ultrarapid hydroxylation of debrisoquine in a Swedish population. Analysis of the molecular genetic basis. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995 Jul;274(1):516-20

Dahl ML, Yue QY, Roh HK et al: Genetic analysis of the CYP2D locus in relation to debrisoquine hydroxylation capacity in Korean, Japanese and Chinese subjects. *Pharmacogenetics*. 1995 Jun;5(3):159-64

Dalen P, Dahl M, Andersson K, Bertilsson L: Inhibition of debrisoquine hydroxylation with quinidine in subjects with three or more functional CYP2D6 genes. *Br J Clin Pharmacol*. 2000 Feb;49(2):180-4

Dalen P, Dahl ML, Bernal Ruiz ML, Nordin J, Bertilsson L: 10-Hydroxylation of nortriptyline in white persons with 0, 1, 2, 3, and 13 functional CYP2D6 genes. *Clin Pharmacol Ther*. 1998 Apr;63(4):444-52

Daly AK: Pharmacogenetics of the major polymorphic metabolizing enzymes. *Fundam Clin Pharmacol*. 2003 Feb;17(1):27-41

Dayer P, Balant L, Kupfer A, Courvoisier F, Fabre J: Contribution of the genetic status of oxidative metabolism to variability in the plasma concentrations of beta-adrenoceptor blocking agents. 1983;24(6):797-9

Dayer P, Leemann T, Marmy A, Rosenthaler J: Interindividual variation of beta-adrenoceptor blocking drugs, plasma concentration and effect: influence of genetic status on behaviour of atenolol, bopindolol and metoprolol. *Eur J Clin Pharmacol*. 1985;28(2):149-53

Distlerath LM, Guengerich FP: Characterization of a human liver cytochrome P-450 involved in the oxidation of debrisoquine and other drugs by using antibodies raised to the analogous rat enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984 Dec;81(23):7348-52

Eichelbaum M, Bertilsson L, Sawe J, Zekorn C: Polymorphic oxidation of sparteine and debrisoquine: related pharmacogenetic entities. *Clin Pharmacol Ther.* 1982 Feb;31(2):184-6

Eichelbaum M, Spannbrucker N, Dengler HJ: Proceedings: N-oxidation of sparteine in man and its interindividual differences. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1975;287 Suppl:R94

Eichelbaum M, Spannbrucker N, Steincke B, Dengler HJ: Defective N-oxidation of sparteine in man: a new pharmacogenetic defect. *Eur J Clin Pharmacol.* 1979 Sep;16(3):183-7

Evans WE, Relling MV: Concordance of P450 2D6 (debrisoquine hydroxylase) phenotype and genotype: inability of dextromethorphan metabolic ratio to discriminate reliably heterozygous and homozygous extensive metabolizers. *Pharmacogenetics.* 1991 Dec;1(3):143-8

Frank K, Jaehde U, Fuhr U: Evaluation of probe drugs and pharmacokinetic metrics for CYP2D6 phenotyping. *Eur J Clin Pharmacol.* 2007 Apr;63(4):321-333. Epub 2007 Feb 2

Fuhr U, Jetter A, Kirchheiner J : Appropriate phenotyping procedure for drug metabolizing enzymes and transporters in human and their simultaneous use in the “cocktail” approach. *Clin Pharmacol. Ther.* 2007 Feb;81(2):270-83

Gaedigk A, Blum M, Gaedigk R, Eichelbaum M, Meyer UA: Deletion of the entire cytochrome P450 CYP2D6 gene as a cause of impaired drug metabolism in poor metabolizers of the debrisoquine/sparteine polymorphism. *Am J Hum Genet.* 1991 May;48(5):943-50

Gaedigk A, Gotschall RR, Forbes NS, Simon SD, Kearns GL, Leeder JS: Optimization of cytochrome P4502D6 (CYP2D6) phenotype assignment using a genotyping algorithm based on allele frequency data. *Pharmacogenetics.* 1999 Dec;9(6):669-82

Gaedigk A, Ndjountche L, Divakaran K et al: Cytochrome P4502D6 (CYP2D6) gene locus heterogeneity: characterization of gene duplication events. *Clin Pharmacol Ther.* 2007 Feb;81(2):242-51

Griese EU, Asante-Poku S, Ofori-Adjei D, Mikus G, Eichelbaum M: Analysis of the CYP2D6 gene mutations and their consequences for enzyme function in a West African population. *Pharmacogenetics* 1999 Dec;9(6):715-23

Griese EU, Zanger UM, Brudermanns U et al.: Assessment of the predictive power of genotypes for the in-vivo catalytic function of CYP2D6 in a German population. *Pharmacogenetics.*1998 Feb;8(1):15-26

Heim M, Meyer UA: Genotyping of poor metabolisers of debrisoquine by allele-specific PCR amplification. *Lancet* 1990 Sep 1;336(8714):529-32

Heim MH, Meyer UA: Evolution of a highly polymorphic human cytochrome P450 gene cluster: CYP2D6. *Genomics* 1992 Sep;14(1):49-58

Ingelman-Sundberg M: Duplication, multiduplication, and amplification of genes encoding drug-metabolizing enzymes: evolutionary, toxicological, and clinical pharmacological aspects. *Drug Metab Rev.* 1999 May;31(2):449-59

Ingelman-Sundberg 2004: pharmacogenetics of cytochrome P450 and its application in drug therapy: the past, present and future. *Trends Pharmacol. Sci* 2004 Apr;25(4):193-200

Ingelman-Sundberg M: Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J.* 2005;5(1):6-13

Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, McLellan RA: Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol Sci.*1999 Aug;20(8):342-9

Johansson I, Lundqvist E, Bertilsson L, Dahl ML, Sjoqvist F, Ingelman-Sundberg M: Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultra-rapid metabolism of debrisoquine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Dec 15;90(24):11825-9

Johansson I, Oscarson M, Yue QY, Bertilsson L, Sjoqvist F, Ingelman-Sundberg M: Genetic analysis of the Chinese cytochrome P4502D locus: characterization of variant CYP2D6 genes present in subjects with diminished capacity for debrisoquine hydroxylation. *Mol Pharmacol*. 1994 Sep;46(3):452-9

Johnson JA, Burlew BS: Metoprolol metabolism via cytochrome P4502D6 in ethnic populations. *Drug Metab Dispos*. 1996 Mar;24(3):350-5

Johnsson G, Regardh CG, Solvell L: Combined pharmacokinetic and pharmacodynamic studies in man of the adrenergic beta1-receptor antagonist metoprolol. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*.1975;36(Suppl 5):31-44

Jonkers RE, Koopmans RP, Portier EJ, Boxtel van CJ: Debrisoquine phenotype and the pharmacokinetics and beta-2-receptor pharmacodynamics of metoprolol and its enantiomers. *J Pharmacol Exp Ther*. 1991; 1991 Mar;256(3):959-66

Kagimoto M, Heim M, Kagimoto K, Zeugin T, Meyer UA: Multiple mutations of the human cytochrome P450IID6 gene (CYP2D6) in poor metabolizers of debrisoquine. Study of the functional significance of individual mutations by expression of chimeric genes. *J Biol Chem*. 1990 Oct 5;265(28):17209-14

Kendall MJ, Maxwell SR, Sandberg A, Westergren G: Controlled release metoprolol. Clinical pharmacokinetic and therapeutic implications. *Clin Pharmacokinet*. 1991 Nov;21(5):319-30
Erratum in: *Clin Pharmacokinet* 1992 Feb;22(2):143

Kimura S, Umeno M, Skoda RC, Meyer UA, Gonzalez FJ: The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene, and a pseudogene. *Am J Hum Genet*. 1989 Dec;45(6):889-904

Kirchheiner J, Heesch C, Bauer S et al: Impact of the ultrarapid metabolizer genotype of cytochrome P450 2D6 on metoprolol pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther.* 2004 Oct;76(4):302-12

Kirchheiner J, Seeringer A, Brockmoller J: State of the art of pharmacogenetic diagnostics in drug therapie. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2006; Oct;49(10):995-1003

Labbe L, Sirois C, Pilote S et al: Effect of gender, sex hormones, time variables and physiological urinary pH on apparent CYP2D6 activity as assessed by metabolic ratios of marker substrates. *Pharmacogenetics.* 2000 Jul;10(5):425-38

Leathart JB, London SJ, Steward A, Adams JD, Idle JR, Daly AK: CYP2D6 phenotype-genotype relationships in African-Americans and Caucasians in Los Angeles. *Pharmacogenetics.* 1998 Dec;8(6):529-41

Lennard MS, Silas JH, Freestone S, Trevethick J: Defective metabolism of metoprolol in poor hydroxylators of debrisoquine. *Br J Clin Pharmacol.* 1982 Aug;14(2):301-3

Lennard MS, Tucker GT, Silas JH, Freestone S, Ramsay LE, Woods HF: Differential stereoselective metabolism of metoprolol in extensive and poor debrisoquin metabolizers. *Clin Pharmacol Ther.* 1983 Dec;34(6):732-7

Lennard MS, Tucker GT, Woods HF: The polymorphic oxidation of beta-adrenoceptor antagonists. Clinical pharmacokinetic considerations. *Clin Pharmacokinet.* 1986 Jan-Feb;11(1):1-17

Lennard MS, Tucker GT, Silas JH, Woods HF: Debrisoquine oxidation phenotype and the metabolism and action of metoprolol, timolol, propranolol and atenolol. *Xenobiotica,* 1986 May;16(5):435-47

Lovlie R, Daly AK, Matre GE, Molven A, Steen VM: Polymorphisms in CYP2D6 duplication-negative individuals with the ultrarapid metabolizer phenotype: a role for the CYP2D6*35 allele in ultrarapid metabolism? *Pharmacogenetics*. 2001 Feb;11(1):45-55

Lovlie R, Daly AK, Molven A, Idle JR, Steen VM: Ultrarapid metabolizers of debrisoquine: characterization and PCR-based detection of alleles with duplication of the CYP2D6 gene. *FEBS Lett*. 1996 Aug 19;392(1):30-4

Lundqvist E, Johansson I, Ingelman-Sundberg M: Genetic mechanisms for duplication and multiduplication of the human CYP2D6 gene and methods for detection of duplicated CYP2D6 genes. *Gene* 1999 Jan 21;226(2):327-38

Mahgoub A, Idle JR, Dring LG, Lancaster R, Smith RL: Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man. *Lancet* 1977 Sep 17;2(8038):584-6

Marez D, Legrand M, Sabbagh N et al: Polymorphism of the cytochrome P450 CYP2D6 gene in a European population: characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution. *Pharmacogenetics*. 1997 Jun;7(3):193-202

Masimirembwa C, Persson I, Bertilsson L, Hasler J, Ingelman-Sundberg M: A novel mutant variant of the CYP2D6 gene (CYP2D6*17) common in a black African population: association with diminished debrisoquine hydroxylase activity. *Br J Clin Pharmacol*. 1996 Dec;42(6):713-9

Mc Gourty JC, Silas JH, Lennard MS, Tucker GT, Woods HF: Metoprolol metabolism and debrisoquine oxidation polymorphism--population and family studies. *Br J Clin Pharmacol*. 1985 Dec;20(6):555-66

McLellan RA, Oscarson M, Seidegard J, Evans DA, Ingelman-Sundberg M: Frequent occurrence of CYP2D6 gene duplication in Saudi Arabians. *Pharmacogenetics*. 1997 Jun;7(3):187-91

Meyer UA: Molecular genetics and the future of pharmacogenetics. *Pharmacol. Ther.* 1990;46(3):349-55

Meyer UA, Zanger UM: Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1997;37:269-96

Murthy SS, Shetty HU, Nelson WL, Jackson PR, Lennard MS: Enantioselective and diastereoselective aspects of the oxidative metabolism of metoprolol. *Biochem Pharmacol.* 1990 Oct 1;40(7):1637-44

Nebert DW, Russell DW: Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* 2002 Oct 12;360(9340):1155-62

Nelson DR, Koymans L, Kamataki T et al.: P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics.* 1996 Feb;6(1):1-42

Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SM, Maltais LJ, Wain HM, Nebert DW: Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics.* 2004 Jan;14(1):1-18

Otton SV, Crewe HK, Lennard MS, Tucker GT, Woods HF: Use of quinidine inhibition to define the role of the sparteine/debrisoquine cytochrome P450 in metoprolol oxidation by human liver microsomes: *J Pharmacol Exp Ther.* 1988 Oct;247(1):242-7

Raimundo S, Fischer J, Eichelbaum M, Griese EU, Schwab M, Zanger UM: Elucidation of the genetic basis of the common 'intermediate metabolizer' phenotype for drug oxidation by CYP2D6. *Pharmacogenetics.* 2000 Oct;10(7):577-81

Raimundo S, Toscano C, Klein K et al: A novel intronic mutation, 2988G>A, with high predictivity for impaired function of cytochrome P450 2D6 in white subjects. *Clin Pharmacol Ther.* 2004 Aug;76(2):128-38

Rau T, Heide R, Bergmann K et al.: Effect of the CYP2D6 genotype on metoprolol metabolism persists during long-term treatment. *Pharmacogenetics*. 2002 Aug;12(6):465-72

Regardh CG, Borg KO, Johansson R, Johansson G, Palmer L: Pharmacokinetic studies on the selective beta1-receptor antagonist metoprolol in man. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1974 Aug;2(4):347-64

Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, Roots I: Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet*. 1997 Feb;60(2):284-95

Saxena R, Shaw GL, Relling MV et al.: Identification of a new variant CYP2D6 allele with a single base deletion in exon 3 and its association with the poor metabolizer phenotype. *Hum Mol Genet*. 1994 Jun;3(6):923-6

Silas JH, Mc Gourty JC, Lennard MS, Tucker GT, Woods HF: Polymorphic metabolism of metoprolol: clinical studies. *Eur J Clin Pharmacol*. 1985;28 Suppl:85-8

Steen VM, Andreassen OA, Daly AK et al.: Detection of the poor metabolizer-associated CYP2D6(D) gene deletion allele by long-PCR technology. *Pharmacogenetics*. 1995 Aug;5(4):215-23

Steimer W, Zopf K, von Amelunxen S et al: Allele-specific change of concentration and functional gene dose for the prediction of steady-state serum concentrations of amitriptyline and nortriptyline in CYP2C19 and CYP2D6 extensive and intermediate metabolizers. *Clin Chem*. 2004 Sep;50(9):1623-33. Epub 2004 Jun 17

Streetman DS, Bertino JS Jr, Nafziger AN: Phenotyping of drug-metabolizing enzymes in adults: a review of in-vivo cytochrome P450 phenotyping probes. *Pharmacogenetics*. 2000 Apr;10(3):187-216

Toscano C, Klein K, Blievernicht J et al.: Impaired expression of CYP2D6 in intermediate metabolizers carrying the *41 allele caused by the intronic SNP 2988G>A: evidence for modulation of splicing events. *Pharmacogenomics*. 2006 Oct;16(10):755-66

Wang SL, Huang JD, Lai MD, Liu BH, Lai ML: Molecular basis of genetic variation in debrisoquin hydroxylation in Chinese subjects: polymorphism in RFLP and DNA sequence of CYP2D6. *Clin Pharmacol Ther*. 1993 Apr;53(4):410-8

Yokota H, Tamura S, Furuya H et al.: Evidence for a new variant CYP2D6 allele CYP2D6J in a Japanese population associated with lower in vivo rates of sparteine metabolism. *Pharmacogenetics*. 1993 Oct;3(5):256-63

Zanger UM, Fischer J, Raimundo S: Comprehensive analysis of the genetic factors determining expression and function of hepatic CYP2D6. *Pharmacogenetics*. 2001 Oct;11(7):573-85

Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M: Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2004 Jan;369(1):23-37. Epub 2003 Nov 15

Internetadressen:

<http://drnelson.utm.edu/CytochromeP450.html>

<http://medicine.iupui.edu/flockhart>

<http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2d6.html>

<http://www.hapmap.org>

Publikationen

Kirchheiner J, Heesch C, Bauer S et al: Impact of the ultrarapid metabolizer genotype of cytochrome P450 2D6 on metoprolol pharmacokinetics and pharmacodynamics. Clin Pharmacol Ther. 2004 Oct;76(4):302-12

Kirchheiner J, Seeringer A, Brockmoller J: State of the art of pharmacogenetic diagnostics in drug therapie. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 2006; Oct;49(10):995-1003

Kirchheiner J, Seeringer A: Clinical implications of pharmacogenetics of cytochrome P450 drug metabolizing enzymes. Biochim Biophys Acta. 2007 Mar;1770(3):489-94. Epub 2006 Oct 4

Lebenslauf

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

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ivar Roots für die Überlassung des Dissertationsthemas und für die Möglichkeit, die Arbeit am Institut für Klinische Pharmakologie der Charité anzufertigen.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Julia Kirchheiner für die sehr engagierte und ausdauernde Unterstützung in der praktischen und theoretischen Einarbeitung in die Thematik der Dissertation sowie für die zahlreichen Hilfestellungen bei der Durchführung der Arbeit.

Vom Institut der Klinischen Pharmakologie der Charité danke ich im besonderen Steffen Bauer und Mark Goldammer, die immer ein offenes Ohr für auftretende Fragen und Probleme hatten und mir bei deren Lösung mit vielen guten Ratschlägen geholfen haben.

Ein herzliches Danke schön an Anja und Jasmin vom Labor für Molekulargenetik der Klinischen Pharmakologie der Charité für die Zusammenarbeit und Hilfe bei der Bearbeitung der Proben und den molekulargenetischen Analysen.

Nicht zuletzt gilt ein großer Dank meiner Familie, die immer für mich da ist!

Ohne Kai und Andreas wäre ich nicht nur am Computer gescheitert! Danke für eure Umarmungen, den Espresso und alle lieben Worte!

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Angela Seeringer, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: **„Untersuchung des Konzeptes der semiquantitativen CYP2D6-Genosis bei Ultrarapidschleimmetabolisierern im Vergleich zu Schnelmetabolisierern anhand der Pharmakokinetik von S- und R-Metoprolol“** 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