

Zentrum für Experimentelle Medizin
des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf
aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und
Toxikologie, Arbeitsbereich Klinische Pharmakologie
Leitung: Prof. Dr. R. Böger

Einfluss der CYP2D6 Intermediate- und Ultrarapid- Metaboliser-Allele auf die perioperative Komplikationsrate

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von
Munif Haddad
aus Yabroud, Syrien

Hamburg, 2006

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am:

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in:

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in:

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....1

EINLEITUNG.....3

PHARMAKOGENETIK.....3

CYTOCHROM-ENZYMSUPERFAMILIE:4

CYP2D64

CYP2D6 - POLYMORPHISMUS UND GENVARIANTEN:6

GENOTYP-PHÄNOTYP KLASIFIZIERUNG8

KLINISCHE BEDEUTUNG DES CYP2D6-POLYMORPHISMUS:.....9

ZIELE DER ARBEIT10

MATERIAL UND METHODEN11

MATERIALIEN UND BEZUGSQUELLEN.....11

DNA- UND PCR-REAGENZIE.....11

PRIMER UND PROBES.....11

CHEMIKALIEN, REAGENZIE11

VERBRAUCHSMATERIALIEN.....12

GERÄTE12

ALLGEMEINE ARBEITSMETHODEN13

STERILISIERUNG DER ARBEITSMATERIALIEN13

EDV13

PATIENTEN UND KLINISCHE VARIABLEN13

PROBENGEWINNUNG15

GENANALYSEN15

DNA-EXTRAKTION:15

NACHWEIS DER INTERMEDIATE-ALLELE 41* UND 9*17

PROBEN-SEQUENZIERUNG20

REAL-TIME-PCR FÜR DEN NACHWEIS VON GEN-DUPLIKATION:.....21

ERGEBNISSE.....27

CHARAKTERISIERUNG DES PATIENTEN-KOLLEKTIVS:27

GENOTYPISIERUNG	29
PRÄPARATION DER GENOMISCHEN DNA:.....	29
NACHWEIS DER INTERMEDIATEMETABOLISER-ALLELE 41* UND 9*	30
QUANTITATIVE PCR ZUM NACHWEIS VON GENDUPLIKATIONEN UND DELETIONEN:.....	36
DIE GENOTYPISIERUNG DER PATIENTEN NACH DER UNTERSUCHUNG AUF GENDUPLIKATIONEN SOWIE DER NACHWEIS VON DEN INTERMEDIATE-ALLELEN 9* UND 41*	39
BEDEUTUNG DES GENOTYPS FÜR DAS POSTOPERATIVE RISIKO:	41
ALLE STUDIENPATIENTEN	42
PATIENTEN MIT EINER MEDIKATION VON CYP2D6-SUBSTRATEN.....	44
PATIENTEN MIT EINER MEDIKATION VON CYP2D6-ABHÄNGIGEN BETABLOCKERN	46
PATIENTEN OHNE MEDIKATION VON CYP2D6-ABHÄNGIGEN BETABLOCKERN	48
<u>DISKUSSION</u>	49
GENOTYPISIERUNG:	50
BEDEUTUNG DER GENDUPLIKATIONEN UND IM-ALLELE FÜR DAS POSTOPERATIVE RISIKO:	51
<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	55
<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	56
<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	58
<u>DANKSAGUNG</u>	62
<u>CURRICULUM VITAE</u>	63

EINLEITUNG

PHARMAKOGENETIK

Der Begriff Pharmakogenetik ist 1959 von dem Heidelberger Humangenetiker Vogel beschrieben worden. Dieses Wissenschaftsgebiet untersucht den Einfluss genetischer Polymorphismen auf die Pharmakodynamik und –kinetik von Arzneimitteln. Viele der in der Medizin eingesetzten Arzneimittel lösen bei Patienten nach einer Standarddosis unterschiedliche Reaktionen aus, vom Ausbleiben des therapeutischen Effektes bis hin zur Akkumulation, unerwünschten Medikamentenwirkungen und Intoxikationen. Außerdem haben Patienten bei vielen Medikamenten, wie Betablockern, Antidepressiva und oralen Antikoagulantien, einen erheblich unterschiedlichen Medikamentenbedarf, um den erwünschten Therapieerfolg zu erzielen.

Verabreichte Arzneimittel werden absorbiert, an Proteine gebunden zum Wirkungsort transportiert, können dort zum Teil über Rezeptoren ihre Wirkung entfalten und werden in der Regel metabolisiert und aus dem Körper eliminiert.

Bei der Metabolisierung werden zwei Phasen unterschieden. Bei der Phase-1-Reaktion handelt es sich um eine Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse, wodurch eine funktionelle Gruppe wie die Hydroxylgruppe an das Medikamentmolekül gebunden oder eine bzw. mehrere vorhandene funktionelle Gruppen freigesetzt werden. Phase-2-Reaktionen sind Konjugationsreaktionen. Die typischen Phase-2-Reaktionen sind die Glukuronidierung, die Sulfatierung und die Methylierung.

An den Phase-1-Reaktionen sind die Cytochrom-Enzyme beteiligt. Es handelt sich um eine Gruppe von Hämproteinen, die hauptsächlich in der Leber und im Darm exprimiert wird.

Für viele der am Medikamentenstoffwechsel beteiligten Enzyme und Transportproteine sind die codierenden Gene identifiziert worden. Polymorphismen (Genvarianten mit einer Häufigkeit von mehr als 1%) oder seltene Genmutationen (Genvarianten mit einer Häufigkeit von weniger als 1%) sind bekannt. Diese Genaberrationen führen zur fehlenden oder herabgesetzten Synthese des entsprechenden Proteins oder zur Bildung von funktionell defekten Proteinen mit z.B. dem Verlust oder Mangel an Aktivität bei oxidativen Enzymen oder einer geänderten Affinität bei Transportproteinen.

CYTOCHROM-ENZYMSUPERFAMILIE:

Die Cytochrom-Enzymfamilie ist eine Gruppe von mehr als 500 Isoenzymen, die in der Membran des endoplasmatischen Retikulums der Zelle verankert sind. Sie werden als CYP-P450 Enzyme bezeichnet. Der Name leitet sich davon ab, dass das Cytochrom-Protein im reduzierten Zustand ein Absorptionsmaximum bei 450 nm zeigt. Im Folgenden wird Cytochrom als CYP abgekürzt.

CYP-Enzyme sind ubiquitär und kommen bei vielen Spezies vor. Die unterschiedlichen Isoenzyme werden in Familien und Subfamilien gegliedert. Isoenzyme mit einer Aminosäure-Sequenzhomologie von mehr als 40% werden in einer Enzymfamilie zusammengefasst. Diese Familie wird durch eine arabische Zahl gekennzeichnet (CYP1, CYP2...etc.). Innerhalb einer Familie werden Isoenzyme mit einer Homologie von mehr als 55 % in einer Subfamilie eingeteilt, die Subfamilie bekommt zusätzlich einen Buchstaben (z.B. CYP2D, CYP2C...), die einzelnen Enzyme in einer Subfamilie werden mittels einer arabischen Zahl nummeriert (CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6...).

39 Isoenzyme der CYP-Superfamilie sind beim Menschen gefunden worden (Überblick: www.Drnelson.utm.edu/cytochromp450), davon sind 13 am Arzneimittelstoffwechsel beteiligt (Schwab et al. 2002), der Rest spielt eine Rolle bei der Biotransformation von endogenen Substraten und Hormonen wie Steroiden, Östrogenen und Fettsäuren. CYP-Enzyme sind hauptsächlich in der Leber exprimiert. Die Hauptfunktion ist der Abbau von Medikamenten durch Hydroxylierung oder Demethylierung (Phase-1-Reaktion) (Zanger et al. 2004). Dabei zeichnen sich die CYP-Enzyme durch ihr breites Substratspektrum aus. Viele Substrate werden durch das gleiche Enzym metabolisiert trotz ihrer unterschiedlichen Strukturen, gleichzeitig werden einige Substrate von mehr als einem Isoenzym metabolisiert. Die wichtigsten CYP-Enzyme für den Arzneimittelstoffwechsel beim Menschen sind CYP3A3, CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6.

CYP2D6

20-25 % der derzeit klinisch eingesetzten Arzneimittel sind CYP2D6-Substrate (Sachse et al. 1997). Die ersten, die in den 70er Jahren zur Entdeckung dieses Enzyms geführt haben, sind Debrisoquine, ein Antihypertensivum, und Spartein, ein Antiarrhythmikum (Mahgoub et al. 1977, Eichelbaum et al. 1975, 1979). Daher wird CYP2D6 auch Debrisoquine/Sparteinoxidase genannt.

Nach der Isolierung des CYP2D6-Proteins aus Lebermikrosomen (Distlerath et al. 1985) folgte die Isolierung der cDNA durch Gonzalez et al. 1988, dann folgte die Sequenzierung des Genlocus auf Chromosom 22q 13.1 durch Kimura et al. 1989. Alle Basennummerierungen beziehen sich auf diese Referenz-Sequenz (in der NCBI-Datenbank als M33388 gekennzeichnet).

Zurzeit sind über 100 Medikamente als CYP2D6-Substrate bekannt. In der Tabelle 1 ist eine Auswahl häufig verwendeter Medikamente aufgelistet, die CYP2D6-Substrate sind.

Betablocker Antiarrhythmika	Antidepressiva, Psychopharmaka	Analgetika und Andere
Carvedilol	Amitriptylin	Codein
Metoprolol	Clomipramin	Dextromethorphan
Propranolol	Desipramin	Dihydrocodein
Timolol	Imipramin	Ethylmorphin
Alprenolol	Nortriptylin	Hydrocodon
Encanide	Paroxetin	Oxycodon
Flecainide	Haloperidol	Tramadol
Procainamid	Perphenazin	Phenformin
Propafenon	Resperidon	
Sparteïn	Thioridazin	

Tabelle 1: Auswahl der häufigen klinisch verwendeten CYP2D6-Substrate

Einige der CYP2D6-Substrate sind gleichzeitig Enzyminhibitoren wie z.B. Propranolol (Rowland et al. 1994). Die Enzyminduktion wurde für eine Reihe von Medikamenten beschrieben, wie z.B. Rifampin und Dexamethason (www.edhayes.com/CYP450-3.html). Spezifische Substrate (wie Debrisoquine oder Sparteïn) wurden als Testsubstanzen eingesetzt, um die Enzymfunktion *in vivo* zu überprüfen und entsprechend den Phänotyp zu ermitteln. Nach der Gabe einer Standarddosis wird nach einem definierten Zeitintervall die Konzentration des Medikaments und dessen Metaboliten im Urin gemessen und daraus eine Ratio gebildet. Nach dieser Metabolisierungsratio (MR) wird der Phänotyp definiert. Anhand der Untersuchung mit Sparteïn werden vier Phänotypen unterschieden (Zanger et al. 2004):

- Ultrarapidmetaboliser (UM) mit gesteigerter Enzymfunktion, MR $<0,15$
- Extensivmetaboliser (EM) mit normaler Enzymfunktion, MR von $0,15$ bis $< 1,2$
- Intermediatemetaboliser (IM) mit herabgesetzter Enzymfunktion, MR von $1,2 - 2$
- Poormetaboliser (PM) ohne nachweisbarer Enzymaktivität, MR >20

Die Verteilung dieser Phänotypen ist ethnisch sehr unterschiedlich. Bei Kaukasiern sind sie in Studien wie folgt gefunden worden: 5-10 % PMs, 10-15 % IMs, 70-80 % EMs und 3-5 % UMs (Sachse et al. 1997, Griese et al. 1998, Ingelman-Sundberg. 1999, Zanger et al. 2001).

CYP2D6 - POLYMORPHISMUS UND GENVARIANTEN:

Der CYP2D Genlocus besteht aus 3 Genen, dem CYP2D6-Gen und den zwei Pseudogenen CYP2D7 und CYP2D8, die eine hohe Homologie zu CYP2D6 zeigen. Das CYP2D6-Gen besteht aus 9 Exons und 8 Introns und ist hoch polymorph. Zurzeit sind 58 Allele definiert mit insgesamt mehr als 100 Allel-Varianten. Eine genetische Änderung, die zu einem Aminosäureaustausch oder einem defekten Protein führt, wird als Schlüssel-Mutation betrachtet und führt zu einem neuen Allel. Andere Mutationen, die zusammen mit der Schlüssel-Mutation vorkommen, führen zu einer Allelvariante, z.B. Allel 4* hat 14 Varianten, die gemeinsam die Mutation 1864 G>A haben (Ingelman-Sundberg et al. 2001, „The CYPAllele nomenclature homepage“: www.imm.ki.se/CYPAlleles).

CYP2D6-Allele, die zum kompletten Verlust der Enzymaktivität führen, werden als Poormetaboliser-Allele (PM-Allele) definiert. CYP2D6-Allele, die eine herabgesetzte Enzymaktivität verursachen, werden als Intermediatemetaboliser-Allele (IM-Allele) eingestuft und diejenigen mit normaler Enzymfunktion, werden als Extensivmetaboliser-Allele klassifiziert (EM-Allele). Jene, die zur gesteigerten Enzymaktivität führen, werden als Ultrarapidmetaboliser-Allele definiert (UM-Allele), hierzu zählen Duplikationen des Wildtyp-Allels.

In der Tabelle 2 sind die wichtigsten Allele in jeder Metabolisierungsgruppe zusammengefasst.

Allel-Typ	Bekannte Allele	Schlüssel-Mutation	Frequenz (Kaukasier)
UM-Allel	Genduplikationen oder – amplifikation (zwischen 3 und 13 Kopien). Bekannt sind 2 (n) x 1*, 2 (n) x 2*. Die Duplikation vom Allel 4* führt nicht zum UM- Status	Mehrere Genkopien	2-5%
EM-Allele	Wildtyp-Allel 1* Allel 2*	Keine Mutationen 2850C>T und CYP2D7- Konversion im Intron 1	50 % 24 %
IM-Allele	Allel 41* Allel 9*, Allel 10* Allel 17*	2988 G>A und CYP2D7- Konversion im Intron 1 2613-2615delAGA 100C>T, 1023C>T, 2850C>T	8,4 % 2 % 1,53% 0 %
PM-Allele	Allel 4* Allel 3* Allel 5* Allel 6* Andere Allele werden nur in Einzelfällen gefunden	1846G>A 2549delA Gendeletion 1707delT	20,7 % 2 % 2 % 1 %

Tabelle 2: Die häufigen CYP2D6-Allele. In der ersten Spalte links ist der Allel-Typ, in der zweiten der Allel-Name nach der o.a.Nomenklatur, in der dritten Spalte die Schlüssel-Mutationen oder andere genetische Merkmale für jedes Allel (Homepage der Komitee für CYP2D6 Nomenklatur) und in der vierten Spalte die Frequenzen dieser Allele aufgeführt (Sachse et al. 1997, Raimundo et al. 2004)

Das häufigste IM-Allel bei Kaukasiern ist das Allel 41* mit einer Frequenz von ca. 8,4 % (Raimundo et al. 2004). Es wurde zuerst zusammen mit dem heute als EM-Allel identifizierten Allel 2* als IM-Allel definiert (Sachse et al. 1997). Die Folge war, dass die MR in der Gruppe der IM-Metaboliser mit dem Genotyp PM-Allel/2* sehr unterschiedlich war. Manche Patienten hatten eine ähnliche MR wie PM, andere wie EM.

Im Jahr 2000 wurde der Unterschied zum Allel 2* erkannt, damit wurde das Allel 41* als eigenständiges Allel definiert. Es wurde indirekt bestimmt aufgrund eines typischen Allel 2*-Genotyps mit Fehlen der Genmutation -1584 C>G (Raimundo et al. 2000). Erst im Jahr 2004 wurde die direkte Bestimmung des 41* Allels möglich durch die Entdeckung der für das Allel 41* spezifischen 2998G>A Genmutation (Raimundo et al. 2004). Andere IM-Allele sind das Allel 9* mit einer Frequenz von ca. 2% und das Allel 10*, das häufiger bei Asiaten vorkommt (38,6 % bei Japanern im Vergleich zu weniger als 2% bei Kaukasiern, (Kubota et al. 2000)). Das Allel 17* ist bei Kaukasiern nicht gefunden worden, ist aber häufig bei Afrikanern vorhanden (Leathart et al. 1998).

Durch die Entwicklung der TaqMan-Methode zum Nachweis der Genkopien wurde der Nachweis von Genduplikation oder –amplifikation nachhaltig verbessert (Schaeffeler et al. 2003).

GENOTYP-PHÄNOTYP KLASSIFIZIERUNG

Dem UM-Phänotyp liegen in den meisten Fällen Genduplikationen oder -amplifikationen zu Grunde. So reicht eine heterozygote Genduplikation (UM-Allel) in Kombination mit einem EM-Allel für den Phänotyp UM.

Definitionsgemäß reicht für den EM-Phänotyp mindestens ein vollfunktionelles Allel (1* oder 2*). Die Patienten mit diesem Phänotyp haben den Genotyp EM/EM oder EM/IM oder EM/PM.

Dem Phänotyp PM liegt der Genotyp PM/PM zu Grunde, er ist also homozygot für ein PM-Allel, wie es z.B. bei dem Genotyp 4*/4* der Fall ist, oder er zeigt eine Compound-Heterozygotie für zwei unterschiedliche PM-Allele. Durch die Untersuchung der fünf bekanntesten PM-Allele 3*, 4*, 5*, 6* und 15* werden praktisch alle Kaukasier mit dem PM-Phänotyp detektiert (Sachse et al. 1997).

Der IM-Phänotyp setzt die Allel-Konstellation IM/PM voraus. In den Phänotypisierungsstudien war die IM-Population eine Gruppe mit einer MR zwischen den zwei Gruppen EM und PM. Der genetische Hintergrund wurde später entdeckt. Die ersten bekannten IM-Allele waren das Allel 9* und 10 *. Die beiden wurden bei weniger als 20% der Kaukasier mit IM-Phänotyp gefunden. Später wurde das Allel 41* definiert. Bei Kaukasiern werden mit der Bestimmung der Allele 41* und 9* über 70% aller möglichen IM detektiert (Raimundo et al. 2004, Zanger et al. 2004).

KLINISCHE BEDEUTUNG DES CYP2D6-POLYMORPHISMUS:

Während es inzwischen zahlreiche Studien zur Auswirkung des CYP2D6-Polymorphismus auf den Metabolismus und die Plasmakonzentration von Medikamenten gibt, ist die klinische Relevanz dieses Polymorphismus, insbesondere im kardiovaskulären Bereich wenig untersucht (Wuttke et al. 2002, Rau et al. 2004).

OP-Patienten sind grundsätzlich einem hohen Risiko für einen Myokardinfarkt und andere Komplikationen einschließlich unerwünschter Arzneimittelnebenwirkungen ausgesetzt. Patienten mit höherem Risiko aufgrund von Begleiterkrankungen oder Risiken wie KHK weisen höhere Komplikationsraten in der perioperativen Phase auf. Aus diesen Gründen erhalten diese Patienten unter anderem eine Medikation mit Betablockern. Der Nutzen dieser Therapie wird in der Literatur kontrovers diskutiert, so zeigten Studien eine protektive Wirkung (Mangano et al. 1996) andere hingegen keinen klaren Vorteil dieser Medikation wie die Studie von Juul et al. 2006. Eine Metaanalyse von McGory et al. 2005 zeigt aber insgesamt einen positiven Einfluss.

Da ein großer Teil der klinisch eingesetzten Betablocker CYP2D6-Substrate sind, könnte dessen Polymorphismus einen Einfluss haben: Zum einen durch die Akkumulation mit den entsprechenden unerwünschten Nebenwirkungen und zum anderen das Therapieversagen durch eine zu schnelle Metabolisierung (oder eine zu niedrig empfohlene Dosierung). Diese multimorbiden Patienten erhalten in der perioperativen Phase zudem andere Wirkstoffe wie Analgetika oder Psychopharmaka, die zum Teil auch CYP2D6-Substrate sind. Durch diese Kombination von Wirkstoffen besteht die Möglichkeit der Interaktion oder bei entsprechendem Genotyp das Risiko für Intoxikationen durch Akkumulation und mögliche zusätzliche Inhibition des Enzyms. Hier finden sich Ansatzpunkte, um mittels Genotypisierung eine individuelle Risikoabschätzung und ggfs. eine entsprechende Abstimmung des therapeutischen Procederes vorzunehmen.

ZIELE DER ARBEIT

Bislang ist der Einfluss von CYP2D6-Allelen auf die perioperative Komplikationsrate in Abhängigkeit von der Medikation wenig untersucht.

Der Zusammenhang zwischen dem Genotyp, bzw. Phänotyp und den Komplikationen sollte in dieser Studie bei 298 Patienten untersucht werden. Unter der Annahme, dass in der Poormetaboliser-Gruppe häufiger Komplikationen auftreten, waren zunächst nur die Poormetaboliser-Allele identifiziert und bezüglich des klinischen Verlaufs untersucht worden. Diese Voruntersuchung hat aber ein höheres perioperatives Risiko abhängig von der Anzahl der EM-Allele gezeigt. Die Poormetaboliser (Genotyp PM/PM, also null funktionelle Allele) hatten weniger Komplikationen als andere Gruppen.

Da die Gruppe mit den gehäuften Komplikationen (Extensivmetaboliser, also mit dem Genotyp EM/PM oder EM/EM) bislang nur hinsichtlich des PM-Allels untersucht wurde, ist es zu erwarten, dass ein Teil dieser Patienten die Konstellation IM/PM (also keine vollfunktionelle Allele) haben. Dieser Genotyp verhält sich eher wie der PM/PM und somit wären diese Patienten falsch klassifiziert.

In dieser Arbeit sollte die weitere Charakterisierung mittels der zwei häufigsten IM-Allele vorgenommen werden. Bei den 116 Patienten, die zuvor als heterozygot für die PM-Allele identifiziert wurden, sollte überprüft werden, wie viele den Genotyp IM/PM haben (Intermediatemetaboliser).

Unter dem Aspekt, dass EM-Allele mit einem höheren Risiko einhergehen, sollte zudem durch die Untersuchung von Genduplikationen (Gen-Dosis-Effekt) geprüft werden, ob diese ein zusätzlich erhöhtes perioperatives Risiko bedeuten.

Es sollte also untersucht werden, ob durch die genauere Klassifizierung der Patienten-Genotypen und dadurch das Vermeiden von Fehlklassifikation des Genotyps bei der alleinigen Untersuchung von PM-Allelen, der Trend in der Voruntersuchung bestätigt oder sogar verbessert werden kann.

MATERIAL UND METHODEN**MATERIALIEN UND BEZUGSQUELLEN****DNA- UND PCR-REAGENZIEN**

Produkt	Firma
Qia Amp DNA Blood Kit	Qiagen
GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit	Amersham Pharmacia Biotech
Expand Long Template PCR System	Roche
RED Taq™ DNA Polymerase	Sigma
TaqMan 2x Universal PCR Mastermix	Applied Biosystems
Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
Sequenzierungspuffer	Seq. Service Labor UKE
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
DNA-Ladder 100b, 1Kb	Invitrogen
100 mM dNTP Set PCR Grade	Invitrogen

PRIMER UND PROBES

Produkt	Firma
Primer für Vor-PCR	MWG-Biotech-AG
Primer für Nested-PCR	MWG-Biotech-AG
Primer für CYP2D6-Duplikationsnachweis	MWG-Biotech-AG
Primer für Albumin	MWG-Biotech-AG
Primer für Sequenzierung (m)	MWG-Biotech-AG
Probes für CYP2D6 und Albumin	Applied Biosystems

CHEMIKALIEN, REAGENZIEN

Produkt	Firma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
DNA Agarose	Biozym
Ethidiumbromid	Merck
PCR-Wasser	Baxter
Na ₂ EDTA	Merck

Natriumacetat	Merck
Ethanol	Merck
Tris	Gibco/BRL
Eisessig	Merck
Brombphenolblau	Merck
Xylenecyanol	Serva
Ficol (type 400)	Pharmacia Biotech
Fibrinogen U Reagenz	Dade-Behring
Latex HS-CRP	Roche

VERBRAUCHSMATERIALIEN

Material	Firma
Tubes 1.5, 2.0 ml	Nunc
PCR-Mikrotiterplatte, 96 Well	Applied Biosystems
PCR-Tubes, 0,5 ml	Biozym
EDTA-Monovetten	Sarstedt
Polaroid Film	Industrie Photoservice

GERÄTE

Produkt	Firma
Gefriertruhe (-70°C)	Kryotec
Gefriertruhe (-30°C)	Kryotec
Glasmaterialien	Allgemeiner Laborbestand
Glasplatten für Gele	Biometra
Heizblock / Dri-BlockDB1	Techne
Miniautoklav	Tecnomara, Fernwald
PCR-Cycler / Mini Cycler PTC 200	MJ Research
Picofuge	Stratagene
Referenzpipetten	Eppendorf
Ultrazentrifuge Beckmann L2 65B	Beckmann, München
Gen Analyser 3100 (Kapilar elektrophorese)	Applied Biosystems
TaqMan 7900 HAT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Spectrophotometer UV-160	Shimadzu
Elektrophorese-Gerät HE99, HE 33	Pharmacia Biotech
Modular System P	Roche
Behring coagulation system BCS	Dade-Behring

ALLGEMEINE ARBEITSMETHODEN

STERILISIERUNG DER ARBEITSMATERIALIEN

Gegenstände aus Polypropylen (Eppendorf-Tubes, Pipettenspitzen) wurden im Autoklav in feuchter Hitze bei 121 °C und 2 bar für 4 h autoklaviert.

EDV

Die direkte Datenerfassung erfolgte mit einem PC unter Windows XP Home Edition und Word für Windows XP, die Weiterverarbeitung mit einem PC unter Windows XP, sowie Office 2003 (Textverarbeitung und Tabellenkalkulation). Zur Analyse der Daten wurde das SSPS-Statistikpaket (Version 12.0) verwendet.

Um die Sequenzierungsdaten auszuwerten, mit Referenzgenen zu vergleichen und zur Berechnung der quantitativen PCR wurden im Internet folgende zur Verfügung stehende Programme und Datenbanken verwendet:

7000 SDS v 1.1 RQ Software	http://appliedbiosystems.com
Bioedit:	http://grcf.med.jhu.edu/
The National Center for Biotechnology Information:	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Literaturrecherche:	EndNote, Version 6.0

PATIENTEN UND KLINISCHE VARIABLEN

Die Patienten wurden präoperativ von erfahrenen Anästhesisten untersucht und bezüglich des Operationsrisikos evaluiert. Es erfolgte eine physische Untersuchung u.a. nach der ASA-PS-Classification der American Society of Anesthesiologists (Lewin et al. 1971) und nach dem Revised Cardiac Risk Index (Lee et al. 1999).

Eingeschlossen wurden Patienten mit einem Alter ab 18 Jahren, bei denen eine elektive nicht kardiochirurgische Operation indiziert und eine Vollnarkose geplant war.

Ausgeschlossen wurden Patienten der Klasse 4 oder höher nach der ASA-Klassifikation, mit einem stattgehabten Myokardinfarkt, einem akuten koronaren Syndrom oder einem Insult in den letzten drei Monaten. Zudem wurden Patienten mit Notoperationen, herzchirurgischen Operationen oder mit Lebenserwartung weniger als 6 Monate ausgeschlossen.

Bei der Auswahl der Patienten sollten mindestens 50% der Patienten mit hohem OP-Risiko rekrutiert werden. Dabei wurden folgende Operationsarten als Hochrisiko-OPs eingestuft: vaskuläre Operationen suprainguinal, intrathorakale Operationen, intraabdominelle

Operationen mit einem erwarteten Blutverlust von mehr als 1 Liter oder Operationen mit einer Operationsdauer von mehr als 3 Stunden in 2 oder mehr Kompartimenten.

Patienten wurden durch den behandelnden Arzt aufgeklärt und haben ihr schriftliches Einverständnis gegeben. Für die Studie lag ein positives Votum der Hamburger Ethikkommission vor (Nr.: A2 OB / 7/ 02).

Folgende Patientendaten wurden erhoben:

Klinische Daten: Operationsrisiko anhand der oben genannten Kriterien; Organ- oder systemische Erkrankungen wie z.B. eine Leberzirrhose (definiert nach Child-Kriterien), eine Niereninsuffizienz (definiert als Serum-Kreatinin von 2mg/dl oder höher), eine chronische obstruktive Lungenerkrankung, ein Diabetes Mellitus (definiert nach Standard Kriterien), eine Hypertonie (Blutdruckwerte systolisch >140 mmHg und oder diastolisch > 90 mmHg), eine ischämische Herzerkrankung (definiert durch das Vorliegen eines Myokardinfarkts in der Anamnese und einer Q-Wave im EKG, positiver Troponin-Test, positive koronare Angiographie, positives Belastungs-EKG, positive Stress-Echokardiographie, positive Dipyridamole-Thallium-Szintigraphie, Nitrat-sensitive Angina Pectoris mit PTCA/Stent oder Koronararterien-Bypass-Operation), ein Insult in der Anamnese (definiert durch typische neurologische Ausfälle oder typische Befunde im CCT oder MRT), eine Herzinsuffizienz oder eine Herzrhythmusstörung.

Medikation: Insbesondere Medikationen mit CYP2D6-Substraten wie Betablocker oder Psychopharmaka sowie eine Medikation mit Codein oder Tramadol wurden dokumentiert.

Laborparameter: Es wurden folgende Laborparameter gemessen: Blutbild, klinisch-chemisches Profil (unterschiedliches Analysenspektrum je nach Operationsart), Basisgerinnung bestehend aus Quick, PTT, TZ und Fibrinogen. Dazu wurde präoperativ das hoch-sensitive C-reaktive Protein gemessen.

Der postoperative Beobachtungszeitraum war auf 30 Tage festgelegt. Während dieser Zeit wurden die Patienten hinsichtlich folgender Endpunkte nachbeobachtet.

Endpunkt-Definition:

Der primäre Endpunkt war aus folgenden sekundären Endpunkten definiert:

- Tod jeglicher Ursache.

- Myokardinfarkt intra- bzw. postoperativ charakterisiert durch das Auftreten von ST-Segment-Veränderungen oder Q-Wave oder typischen Symptomen mit positivem Troponin-Test.
- Akutes Koronarsyndrom: Auftreten von typischen Brustschmerzen länger als 30 Minuten, die therapieresistent waren und mit typischen EKG-Änderungen oder mit angiographischen Befunden ohne erhöhte Enzym-Werte.
- Schwere Herzrhythmusstörungen, darunter fallen Herzstillstand, ventrikuläre und supraventrikuläre therapiebedürftige Arrhythmien, kompletter AV-Block
- Dekompensierte kongestive Herzinsuffizienz, definiert durch die typischen Symptome mit Zeichen eines Lungenödems im Thorax-Röntgen.
- Symptomatische Venenthrombose, Lungenembolie oder Insult beim Vorkommen von klinischen Symptomen und pathologischen Befunden in Angiographie, Sonographie bzw. CT.

Für die Auswertung, ob diese Ereignisse in Abhängigkeit vom CYP2D6 Polymorphismus haben, folgte zum Schluss eine Kaplan-Meier-Überlebensanalyse. Die Signifikanzgrenze war als $p=0,05$ definiert.

PROBENGEWINNUNG

Eine EDTA-Blutprobe wurde durch eine Standard-Blutentnahme präoperativ entnommen, d.h. vor der Gabe etwaiger Blutprodukte und gemäß den Vorschriften dem Patienten zugeordnet und gesammelt. Vor der DNA-Präparation wurden die Proben anonymisiert, bis zur DNA-Extraktion wurden die Proben bei -80 °C aufbewahrt.

GENANALYSEN

DNA-EXTRAKTION:

1- Nach dem Protokoll von Qiagen:

Reagenzien wurden vor der Durchführung auf Raumtemperatur gebracht. Es wurden 200 ml EDTA-Blut in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube pipettiert und mit 20 μl Qiagen-Protease versetzt, darzu 200 μl AL-Puffer zugefügt, 15 Sekunden gevortext und 10 Minuten bei 56 °C inkubiert.

Danach wurden 200 µl Ethanol (96-100 %) dazu pipettiert und gevortext. Der Mix wurde dann auf ein QIAamp Spin Column aufgetragen, bedeckt und bei 8000rpm eine Minute zentrifugiert, dann wurde die Säule auf ein neues Tube aufgestellt, 500 µl AW1 Puffer darauf pipettiert und wieder eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde erneut auf ein neues Tube gestellt, darauf 500 µl AW2-Puffer pipettiert und anschließend 3 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde dann auf ein frisches 1,5 ml Tube gestellt und mit 200 µl Elutionspuffer (AE-Puffer) versetzt, 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert und dann eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Die gewonnene DNA-Probe wurde bei -80°C aufbewahrt.

2- Nach dem Protokoll von Amersham

Zuerst wurde der TE-Puffer auf 70°C erwärmt, dann 500 µl Extraction Solution in 1,5 ml Eppendorf Tubes pipettiert und 100 µl Vollblut dazu gegeben und gevortext. Die Mischung wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Eine GFX-Column wurde auf ein 2 ml Tube gestellt, der Inhalt des Eppendorf Tube auf die GFX-Column pipettiert, 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugiert, das Tube entleert, die GFX-Column auf das enleerte Tube gestellt und 500 µl Extraction Solution darauf pipettiert und dann 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugiert.

Das Tube wurde entleert, die Column wiederum auf das enleerte Tube gestellt, 500 µl Wash Solution darauf pipettiert und 3 Minuten bei 15000 rpm zentrifugiert.

Die Column wurde auf ein neues Eppendorf Tube gestellt, 100 µl auf 70°C erwärmter TE-Puffer auf die Column-Matrix pipettiert und 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert, danach 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugiert und dann unverzüglich für mindestens 15 Minuten auf Eis gekühlt. Dann wurde entweder die erste PCR-Reaktion durchgeführt oder die DNA bei -80°C aufbewahrt

Nach der Isolation wurde die DNA-Konzentration stichprobenweise gemessen.

Agarose-Gel-Ansatz

Ansatz TAE-Puffer 50 x:

120 g Tris, 28,55 ml Eisessig und 50 ml 0,5 M EDTA PH 8 wurden auf 1000 ml H₂O aufgefüllt und gelöst.

TAE-Puffer Gebrauchslösung:

200 ml 50 x TAE-Puffer auf 10 l Wasser auffüllen

Laufpuffer mit Bromphenolblau für DNA Ladder

10 x TAE-Puffer, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylenecyanol und 25% Ficoll (type 400) wurden in H₂O bis zur kompletten Auflösung gemischt.

Laufpuffer ohne Bromphenolblau

10 x TAE-Puffer, 0,25 % Xylenecyanol und 25% Ficoll (type 400) wurden in H₂O bis zur kompletten Auflösung gemischt.

Ansatz 100bp bzw. 1kbp Ladder:

5µl 100 bp- bzw 1kbp-DNA Ladder und 10 µl Laufpuffer (mit / ohne Bromphenolblau) wurden in 85 µl TAE-Puffer aufgelöst und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Ansatz Agarose-Gel:

Es wurden 0,8 g DNA-Agarosepulver (für die Nested PCR 2 g) in einen Glas-Messzylinder mit 100ml TAE-Puffer aufgelöst und gemischt, mit einem Glasdeckel bedeckt und dann für 2 Minuten bei 680 Watt in der Mikrowelle erhitzt. Sobald die Lösung ganz klar wurde, wurden 5µl Ethidiumbromid zugefügt und gemischt. Nach Abkühlung der Lösung auf 50-60°C, wurde das Gel in die vorbereitete Kammer gegossen.

Das Gel wurde benutzt, nachdem es auspolimerisiert war (20-30 Minuten).

NACHWEIS DER INTERMEDIATE-ALLELE 41* UND 9***Durchführung der ersten PCR-Reaktion (Vor-PCR):**

In dieser PCR-Reaktion wurde ein 4688 bp langes CYP2D6-Gensegment, das alle 9-Exons enthält, mit dem Expand Long Template PCR System der Firma Roche nach Sachse et al.1997 amplifiziert. Die PCR ist eine Variante der konventionellen PCR-Reaktion nach Mullis et. al.

Primer (nach Sachse et al.1997):

P100 Forward: 5'-GGC CTA CCC TGG GTA AGG GCC TGG AGC AGG A-3'

P200 Reverse: 5'-CTC AGC CTG AAC GTA CCC CTG TCT CAA ATC CG-3'

Puffer:

Verwendet wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer.

PCR-Ansatz: 25 μ l

Reagenz	Menge in μ l
H ₂ O	16,60 μ l
PCR-Puffer 1 10x	2,5 μ l
DMSO 100%	1,20 μ l
dNTP je 10 mM	0,6 μ l
Primer-Mix (je 10 μ M)	1,0 μ l
Taq Poly Mix. (3,6 U/ μ l)	0,6 μ l
DNA	2,5 μ l

Cycler Programm:

Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Zeit (min:Sek)
1- Initiale Denaturierung	95	02:00
34 Zyklen		
2- Denaturierung	95	00:15
3- Annealing	63	00:45
4- Elongation	68	04:30
5- End Extention	68	07:00
6- Ende	4	60:00

In jeder Arbeitsserie lief eine Wasserprobe als Negativ-Kontrolle mit. Anschließend wurde die Amplifikation auf einem 0,8% Agarosegel kontrolliert.

Hierzu wurden 5 μ l PCR-Produkt mit 1 μ l Laufbuffer (ohne Bromphenolblau) versetzt und auf das Agarosegel aufgetragen, sowie eine 1kbp DNA-Ladder. Die Stromspannung wurde für 5 Minuten auf 80V und dann für weitere 20-30 Minuten bei 120V eingestellt. Dann erfolgte die Detektion der Banden unter UV-Licht und die Dokumentation erfolgte durch konventionelle Photographie. Das PCR Produkt wurde 1:5 mit H₂O verdünnt und bei -80°C aufbewahrt.

Durchführung der zweiten PCR-Reaktion (Nested-PCR):

In diesem Ansatz wurde ein CYP2D6-Gensegment, das die Loki für Allel 41* und Allel 9* umfasst mit einer konventionellen PCR-Reaktion, Red Taq DNA Polymerase, Kit D4309 der Firma Sigma Aldrich, nach Mullis et al. 1987, amplifiziert. Als Template wurde das PCR-Produkt der Vor-PCR benutzt (siehe oben)

Primer:

Nested-Forward: 5'-TCC AAA AGG CTT TCC TGA -3'

Nested-Reverse: 5'-CCC TAT CAC GTC GTC GAT-3'

PCR-Ansatz: 25 µl

Reagenz	Menge in µl
H ₂ O	19 µl
PCR-Puffer 10 x	2,5 µl
dNTP je 10 mM	0,5 µl
Primer-Mix je 10 µM	0,5 µl
RED Taq Polymerase. (1 U/µl)	1,5 µl
Vor PCR-Produkt (1:5 verdünnt)	1 µl

Cycler Programm:

Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Zeit (min:Sek)
1- Initiale Denaturierung	95	02:00
30 Zyklen		
2- Denaturierung	95	00:15
3- Annealing	51	00:30
4- Elongation	72	02:30
5- End Extension	72	07:00
6- Ende	4	60:00

In jeder Arbeitsserie lief eine Wasserprobe als Negativ-Kontrolle mit. Anschließend wurde der PCR-Erfolg durch ein 2% Agarosegel kontrolliert.

Hierzu wurden 5 µl PCR-Produkt mit 1 µl Laufbuffer (ohne Bromphenolblau) versetzt und auf das Agarosegel aufgetragen, sowie eine 1kbp DNA-Ladder. Die Stromspannung wurde für 5 Minuten auf 80V und dann für weitere 20-30 Minuten bei 120V eingestellt. Dann erfolgte

die Detektion der Banden unter UV-Licht und die Dokumentation erfolgte durch konventionelle Photographie. Das PCR Produkt wurde 1:5 mit H₂O verdünnt und bei -80°C aufbewahrt.

Reinigung des Nested PCR-Produktes vor der Sequenzierung

Die Aufreinigung wurde mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ wie folgt durchgeführt: Es wurde das 5x Volumen PB-Puffer zum 1x Volumen PCR Produkt (100 µl+20 µl)zugefügt und gemixt. Für jede Probe wurde eine QIAquick spin column mit einem 2 ml Gefäß vorbereitet, dann die präparierte Probe auf die Säule pipettiert und für 60 Sekunden zentrifugiert (alle Zentrifugationsschritte wurden bei 13.000 rpm durchgeführt). Die Flüssigkeit wurde vom Tube entfernt. Für das Waschen wurden 750µl PE-Buffer auf die Säule pipettiert und 60 Sekunden zentrifugiert, die Flüssigkeit vom Tube entfernt und wieder 60 Sekunden zentrifugiert. Dann wurde das QIAquick spin column auf ein frisches 1,5 ml Eppendorf Tube gestellt. Für die Elution der DNA wurden 30 µl Elutionspuffer (EB) direkt auf die Säule (in die Mitte) pipettiert, die Proben für 1 Minute inkubiert und dann 1 Minute zentrifugiert. Das gereinigte PCR-Produkt wurde bei -30°C aufbewahrt.

PROBEN-SEQUENZIERUNG

Es wurde die konventionelle Sequenzierungsmethode nach Sanger et al. 1977 verwendet. Eingesetzt wurde das Kit ABI PRISM BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing der Firma Applied Biosystems. Das zuvor gewonnene und aufgereinigte Nested-PCR-Produkt wurde mit drei unterschiedlichen Primern sequenziert.

Primer:

Nested-Forward: 5'-TCC AAA AGG CTT TCC TGA -3'

Nested-Reverse: 5'-CCC TAT CAC GTC GTC GAT-3'

Nested-Middle: 5'-GTG ACC ACC TCG ACC ACG-3'

Sequenzierungsansatz: 20 µl

Reagenz	Menge in µl
H ₂ O	9 oder 7µl
Term.Ready React. Mix	4 µl
Sequenzierungspuffer	4 µl
Seq. Primer 3,2 µM	1 µl
Nested PCR-Produkt (gereinigt)	2 oder 4 µl

Cycler Programm 1:

Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Zeit (min:Sek)
25 Zyklen		
1- Denaturierung	95	00:10
2- Annealing	50	00:05
3- Elongation	60	04:00

Cycler Programm 2:

Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Zeit (min:Sek)
25 Zyklen		
1- Denaturierung	95	00:10
2- Annealing	50	00:05
3- Elongation	55	04:00

Nach der Sequenzierungsreaktion wurde die synthetisierte DNA aufgereinigt. Dazu wurden 20 µl Sequenzierungsansatz mit 2 µl 3 M NaAc (PH 5,2) und 50 µl 100 % Ethanol versetzt und 30 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das DNA-Pellet mit 250 µl 70 % Ethanol gewaschen. Die Auftrennung der Ansätze und die Messung der Fluoreszenzintensitäten wurden durch ein Servicelabor des UKE mit dem „Gen Analyser 3100“ durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit dem Programm Bio Edit ausgewertet.

REAL-TIME-PCR FÜR DEN NACHWEIS VON GEN-DUPLIKATION:

Die Real-Time PCR wurde nach dem TaqMan-Prinzip durchgeführt.

Das Prinzip in Kürze: Zusätzlich zu dem für die Amplifikation benötigten Primerpaar wurde der Reaktion eine Gensonde (Probe) zugesetzt, die spezifisch an das entstehende PCR-Produkt zwischen den zwei Primern bindet. Dieses als TaqMan-Sonde bezeichnete Oligonukleotid ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Donor) und in unmittelbarer Nähe zu diesem mit einer fluoreszenzlöschenden Verbindung (Quencher) verknüpft. Im Falle einer vorhandenen Ziel-DNA im PCR-Ansatz verlängert die Taq-Polymerase die spezifisch gebundenen Primer und stößt dabei auf die ebenfalls spezifisch gebundene Sonde, die aufgrund der 5'-3'-Nuklease-Aktivität der Taq-Polymerase abgebaut wird. Die dadurch

eintretende räumliche Trennung von Donor und Quencher führt zu einem Fluoreszenzsignal, welches direkt mit der PCR-Produktzunahme korreliert. In der Abbildung 1 ist das Methodenprinzip dargestellt.

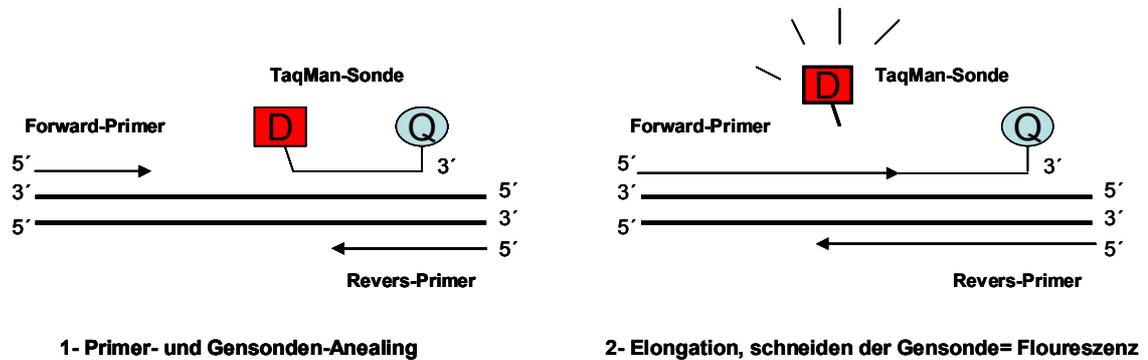


Abbildung 1: Prinzip der TaqMan Technik: (1) Zuerst folgt die Bindung der Primer sowie die doppelt fluoreszenzmarkierte Gensonde. (2) Dann folgt die Elongation. Durch die Taq-Polymerase-Aktivität wird die Gensonde abgeschnitten, die resultierte räumliche Trennung von Donor und Quencher führt zu einem Fluoreszenz-Signal.

Der „Threshold Cycle“ (Ct) wird als der Zyklus definiert, bei dem eine signifikante Signalsteigerung im Vergleich zum Vorzyklus registriert wird (exponentielle Phase), der Threshold hängt bei gleicher PCR-Effizienz von der Konzentration der DNA ab. In der Abbildung 2 ist ein Beispiel der Signalsteigerung von einer Verdünnungsreihe einer Probe vom Wildtyp dargestellt.

Beim Ansatz von Standard-Proben mit bekannter DNA-Konzentration oder eine Verdünnungsreihe einer Probe vom Wildtyp kann die Signal-Intensität bzw der Ct in Menge umgerechnet werden.

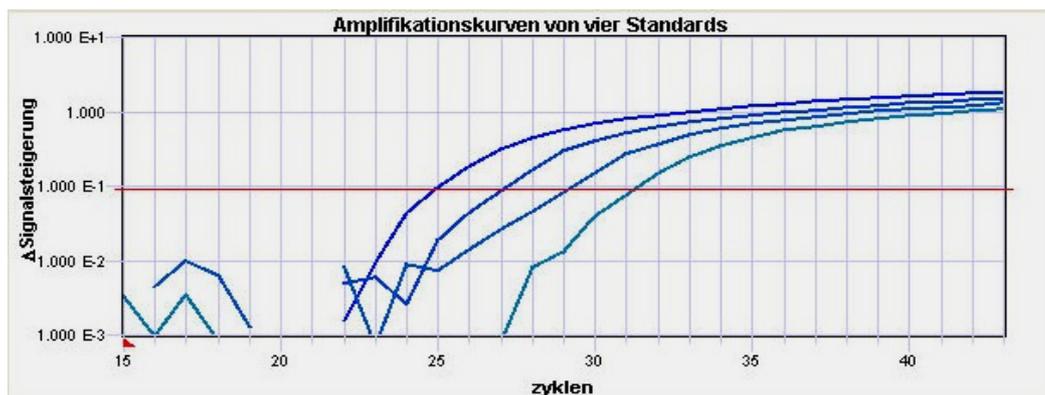


Abbildung 2: Abhängigkeit der Signalsteigerung und des Thresholds von der DNA-Konzentration. Amplifikationskurven von vier Standard-Proben. Mit absteigender DNA-Konzentration tritt die exponentielle Phase später im Laufe der Reaktion auf,

Aufbau der Applikation:

Unter der Annahme, dass jede Person 2 Albumin-Genallele besitzt, wurde eine RealTime PCR-Variante nach Schaffeler et al. 2003 und nach Aarskog et al. 2000 durchgeführt. Es wurden parallel ein Albumin-Gensegment von Exon 12 und ein CYP2D6-Gensegment vom Exon 9, das spezifisch für CYP2D6-Gen ist, amplifiziert. Die PCR-Produkt-Konzentration wurde anhand einer Kalibrationskurve berechnet. Das Verhältnis CYP2D6/Albumin wurde berechnet. Die Auswertung erfolgte nach dem folgenden Schema (Tabelle 3):

CYP2D6-Allelzahl (n)	Erwartete Ratio CYP2D6/Albumin
Wildtyp (2)	1
Dupli- bzw Amplifikation (>2)	Ab 1,5
Heterozygot deletiert (1)	0,5
Homozygot deletiert (0)	0

Tabelle 3: Auswertungsschema

In der Abbildung 3 sind die Amplifikationskurven von Proben mit unterschiedlichen Genotypen dargestellt. a: eine Negativkontrolle (Wasser-Probe). Hier hat keine Amplifikation für beide Gene stattgefunden. b: eine Probe mit homozygoter CYP2D6-Deletion, es ist nur

das Albumin-Gen amplifiziert worden. c-e: Proben mit anderen Genotypen zeigen Amplifikation für beide Gene mit unterschiedlicher Stärke der CYP2D6-Genamplifikation.

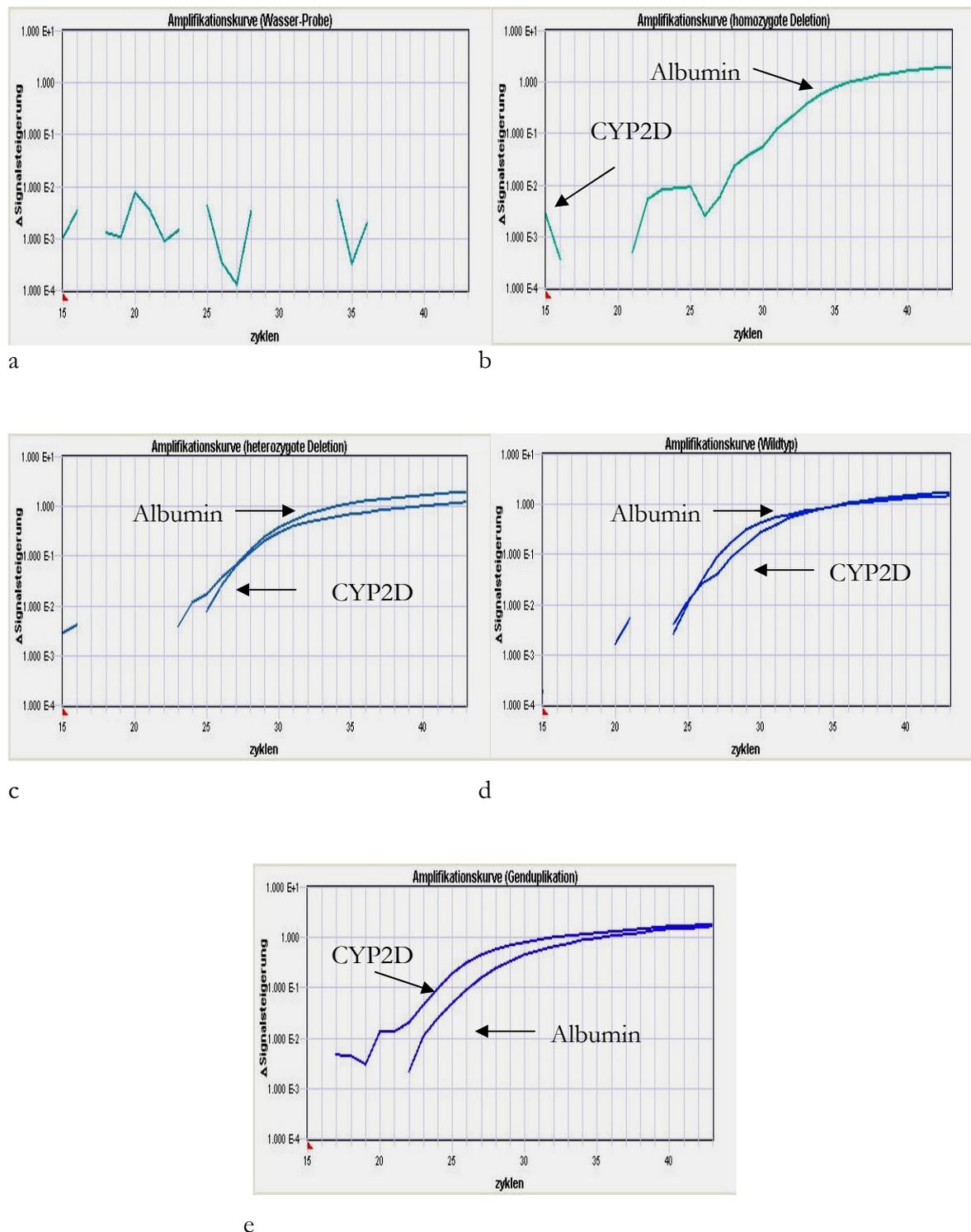


Abbildung 3: Amplifikationskurven von Proben unterschiedlicher Genotypen. a: In der Wasserkontrolle ist keine Amplifikation zu sehen. b.: In der Probe mit homozygoter CYP2D6-Gendeletion ist eine Amplifikation nur bei Albumin zu sehen. c-e: In den Proben mit heterozygoter CYP2D6-Gendeletion (c), vom Wildtyp (d) und mit Genduplikation (e) sind beide Gene mit unterschiedlicher Intensität amplifiziert.

Primer und Probes: CYP 2D6-Primer nach Schaeffeler et al. 2003 , Albumin-Primer nach Aarskog et al. 2000

CYP2D6 Forward: 5'-CTT CAC CTC CCT GCT GCA G -3'
 CYP2D6 Reverse: 5'-TCA CCA GGA AAG CAA AGA CA -3'
 Albumin Forward: 5'-TGT TGC ATG AGA AAA CGC CA -3'
 Albumin Reverse: 5'-GTC GCC TGT TCA CCA AGG ATT -3'
 CYP2D6 Probe: FAM - CCG GCC CAG CCA CCA TGG - TAMRA
 Albumin Probe VIC – AAG TGA CAG AGT CAC CAA ATG CTG CAG AG – TAMRA

Für Albumin wurde VIC, für CYP2D6 FAM als Fluoreszenz-Donor benutzt, für beide diente der TAMRA als Quensher.

Methodendurchführung der TaqMan-PCR:

Es wurden zwei Varianten verglichen:

1. getrennte Reaktionsgefäß für Albumin und CYP2D6 in der gleichen Serie
2. Duplex-Reaktion mit beiden Reaktionen in demselben Gefäß.

Beide Varianten wurden mit dem KIT TaqMan Universal PCR Mastermix der Firma Applied Biosystems in 96-well Mikrotiterplatten auf dem TaqMan 7900 HAT Fast Real-Time PCR System durchgeführt.

Ansatz für Duplikation (getrennt) (25µl)

Reagenz	Menge Albumin Ansatz	Menge CYP2D6 Ansatz
H ₂ O	5 µl	5 µl
Taq Man 2x Mastermix	12,5 µl	12,5 µl
Primer Mix Albumin je 10 µM	2,5 µl	
Primer Mix CYP2D6 je 10 µM		2,5 µl
Albumin-Probe 5 µM	2,5 µl	
CYP2D6-Probe 5 µM		2,5 µl
DNA	2,5 µl	2,5 µl

Ansatz für Duplikation Duplex (25µl)

Reagenz	Menge
Taq Man 2x Mastermix	12,5 µl
Primer Mix Albumin je 10 µM	2,5 µl
Primer Mix CYP2D6 je 10 µM	2,5 µl
Albumin-Probe 2 µM	2,5 µl
CYP2D6-Probe 2 µM	2,5 µl
DNA	2,5 µl

TaqMan Programm:

Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Zeit (min:Sek)
Initiale Inkubation	50	02:00
Erste Denaturierung	95	10:00
43 Zyklen		
	95	00:15
	60	01:00

Die genomische DNA von den Patienten- und Kontrollproben wurde 1:16 mit dH₂O verdünnt. Die Standard-Probe wurde in vier Verdünnungsstufen durchgeführt: 1:2, 1:8, 1:32 und 1:128. Die Ergebnisse wurden mit der Gerätesoftware bearbeitet. Es wurden Kalibrationskurven für CYP2D6 und Albumin erstellt und anhand dieser die Menge des PCR-Produktes berechnet. Anschliessend wurde die Ratio CYP2D6/Albumin berechnet.

ERGEBNISSE

CHARAKTERISIERUNG DES PATIENTEN-KOLLEKTIVS:

Es wurden 298 Patienten aus zwei Zentren, 201 aus dem Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, 97 aus dem Allgemeinen Krankenhaus Hamburg-Harburg, in dem Zeitraum von Oktober 2002 bis Februar 2004 konsekutiv in die Studie eingeschlossen. Davon waren 120 Frauen (40,3%) und 178 Männer (59,7 %). Das Alter der Patienten war zwischen 18 und 90 Jahren, damit ergab sich ein Mittelwert von 58,4 Jahren und ein Median von 62 Jahren.

181 Patienten (60,9 %) hatten hohes OP-Risiko. 3 Patienten (1%) hatten eine Leberzirrhose, 10 Patienten (3,4%) waren niereninsuffizient, 39 Patienten (13,1%) hatten einen Diabetes Mellitus, 38 Patienten (12,8%) hatten eine KHK , 11 Patienten (3,7%) waren herzinsuffizient, 32 Patienten (10,7%) hatten eine pulmonale Dysfunktion, 114 Patienten (38%) hatten einen arteriellen Hypertonus, die Blutdruckwerte hatten einen Mittelwert von 135,4 ±19,5 mmHg systolisch/80,3 ± 9,5 mmHg diastolisch mit einem Median von 140/80 mmHg.

Die Fibrinogenkonzentration gemessen nach der Clauss-Methode hatte einen Mittelwert von 5,20 g/l bei einem Median von 3,53 g/l. Das C-reaktive Protein, gemessen mit einem latex-verstärkten turbidimetrischen Immunoassay (High Sensitiv-CRP-Kit auf dem Modularsystem der Firma Roche), hatte einen Mittelwert von 10,2 ± 26,2 mg/l bei einem Median von 2,5 mg/l.

Insgesamt 55 Patienten wiesen eine Medikation mit Substanzen, die über CYP2D6 metabolisiert werden, auf. Davon waren bei 43 Patienten Betablocker, hauptsächlich Metoprolol und Carvedilol mit einer Median-Tagesdosis von 47,5 mg (47,5-95) für Metoprolol und 18,8 mg (10,9-50) für Carvedilol verordnet worden. Die anderen CYP2D6-Substrate wurden wie folgt verabreicht: Amitriptylin bei 3 Patienten, Tramadol (Antiphlogistikum) bei 6 Patienten, Ritonavir (Virostatikum gegen HIV-Infektion) bei zwei Patienten und Morphin bei einem Patienten.

Die Häufigkeiten der unterschiedlichen Organ- und Systemerkrankungen sowie die Medikation mit Beta-Blockern und CYP2D6-Substraten sind in der Tabelle 4 aufgelistet

Qualitative Charakteristika	Anzahl	Prozent
Patienten	298	100 %
Männer	120	40,3 %
Frauen	178	59,3 %
OP-Risiko hoch	181	60,9 %

Leberzirrhose	3	1 %
Niereninsuffizienz	10	3,4 %
Diabetes Mellitus	39	13,1 %
Arterieller Hypertonus	114	38,3 %
KHK	38	12,8 %
Herzinsuffizienz	11	3,7 %
Pulmonale Dysfunktion	32	10,7 %
Medikation mit CYP2D6-Substraten	55	18,5 %
Betablocker-Medikation	43	14,4 %

Tabelle 4: Häufigkeiten von Organ- und Systemerkrankungen sowie den wichtigsten Medikationen. Die Definition des OP-Risikos sowie die Kriterien der aufgeführten Diagnosen sind unter Material und Methoden aufgeführt. In der mittleren Spalte ist die absolute Patientenzahl, in der rechten die relative Patientenzahl bezogen auf 298 Studienpatienten dargestellt.

In dem Beobachtungszeitraum von 30 Tagen postoperativ wurden die Ereignisse für alle unter Material und Methoden definierten Variablen (Endpunkte) registriert. Bei einem Patienten (0,35%) wurde eine ST-Streckensenkung festgestellt, kein Patient hatte einen Herzinfarkt, zwei Patienten (0,7%) hatten ein akutes Koronarsyndrom, 22 Patienten (7,4%) hatten schwere Herzrhythmusstörungen, 5 Patienten (1,7%) hatten eine akute Herzinsuffizienz entwickelt, bei je 7 Patienten (2,3%) wurde eine Pneumonie bzw. Sepsis festgestellt, bei 4 Patienten (1,3%) wurde eine tiefe Beinvenenthrombose und bei drei Patienten (1%) eine Lungenembolie diagnostiziert. Drei Patienten sind postoperativ gestorben. In der Tabelle 5 ist eine Zusammenfassung der Ereignisse postoperativ dargestellt:

Endpunkt	Ereignisse	Prozent der Gesamt Patientenzahl
Kombinierter Endpunkt*	26	
ST-Streckensenkung	1	0,35 %
Myokardinfarkt	0	0 %
Akutes Koronarsyndrom	2	0,7 %
Herzrhythmusstörung	22	7,4 %
Herzinsuffizienz	5	1,7 %
Pneumonie	7	2,3 %
Sepsis oder SIRS	7	2,3 %
Multiorganversagen	0	0 %

Thrombose	4	1,3 %
Lungenembolie	3	1 %
Tod	3	1 %

Tabelle 5: Zusammenstellung der postoperativen Ereignisse der definierten Patientenvariablen. In der Tabelle sind die absoluten Zahlen sowie der Prozentsatz bezogen auf die Gesamt-Patientenzahl (298) aufgeführt.

** Mehrfachnennungen möglich, nur das erste Ereignis zählt für den kombinierten Endpunkt.*

GENOTYPISIERUNG

PRÄPARATION DER GENOMISCHEN DNA:

Isoliert wurde die DNA aus den 298 Patientenproben. Einige Probandenproben sowie die ersten Patientenproben wurden mit dem GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit der Firma Amersham präpariert. Die Ausbeute bei den eingefrorenen Proben war qualitativ und quantitativ unbefriedigend. Alle weiteren Proben wurden mit dem Qia Amp DNA Blood Kit der Firma Qiagen bearbeitet. Die DNA-Konzentration wurde mit dem Spectrophotometer UV-160 der Firma Shimadzu gemessen. In der Tabelle 6 sind Vergleichsmessungen einiger Patientenproben dargestellt

Probe-Nummer	DNA-Konzentration Amersham	DNA-Konzentration Qiagen
520	27,5 ng/µl	19,5 ng/µl
522	25,0 ng/µl	39,5 ng/µl
523	29,0 ng/µl	32,0 ng/µl
524	37,0 ng/µl	42,0 ng/µl
528	58,0 ng/µl	74,5 ng/µl
529	31,5 ng/µl	47,5 ng/µl

Tabelle 6: DNA-Konzentration von parallel präparierten Patientenproben mit dem Amersham- bzw. Qiagen-KIT

NACHWEIS DER INTERMEDIATEMETABOLISER-ALLELE 41* UND 9***Vor PCR und PCR5*:**

In der Vor-PCR-Reaktion wurde ein 4688 bp langes Gensegment amplifiziert mit für CYP2D6 spezifischen Primern, das alle neun Exons umfasste und zwischen den Positionen -268 und +4420 lag. Als Kontrolle wurde eine DNA mit einer homozygoten Gendeletion (Genotyp 5*5*), wo keine Amplifikation zu erwarten ist, verwendet. Parallel wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt zum Nachweis einer Gendeletion (PCR5*) mit zwei Primern, die an den Flankenregionen des CYP2D6-Genes binden. Nur beim Vorliegen einer Gendeletion wurde ein 3500 BP langes Gensegment amplifiziert. Die Ergebnisse der Vor-PCR sowie PCR5* sind in der Abbildung 4 dargestellt. Im Teil a ist ein Gel von einem Vor-PCR-Ansatz dargestellt, in der Spur 2 ist eine Wasser-Kontrolle, in den Spuren 2-6 Patienten-Proben aufgetragen, es ist ein 4688 Basen langes PCR-Produkt zu sehen. In der Spur 7 ist eine Probe von einem Patienten mit einer bekannten homozygoten Gendeletion (Genotyp 5*5*), bei der keine Amplifikation stattfindet, aufgetragen. Im Teil b ist ein Gel von einem PCR5*-Ansatz dargestellt: in der Spur 2 ist eine Wasser-Kontrolle, in der Spur 8 ist eine Probe von einem Patienten mit einer bekannten homozygoten Gendeletion (Genotyp 5*5*), es ist ein 3500 Basen langes PCR-Prudukt zu sehen. In den Spuren 2-7 sind Patienten-Proben, die Probe in der Spur 3 weist eine Gendeletion auf, die Proben in den Spuren 4-7 zeigen keine Deletion. Die Kombination von beiden PCR-Reaktionen erlaubt die Beurteilung der Gendeletion: Bei einer homozygoten Gendeletion zeigt die PCR5* eine Bande und die Vor-PCR keine Bande. Bei heterozygoter Gendeletion zeigen beide eine Bande. Beim Wildtyp zeigt nur die Vor-PCR eine Bande, wie in der Abbildung 4 zu erkennen.

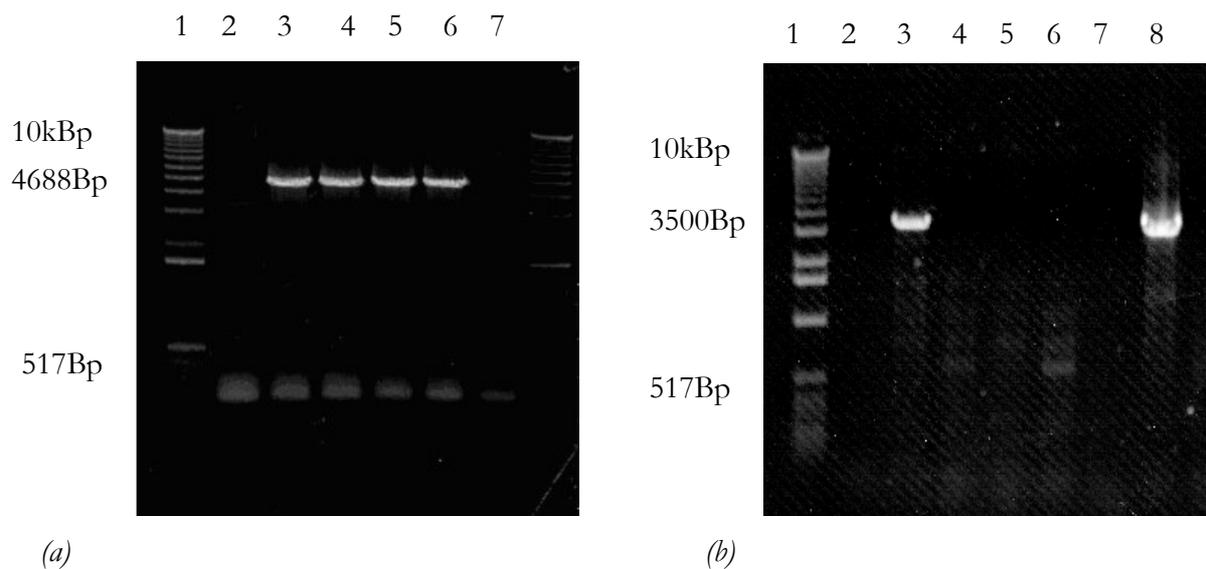


Abbildung 4: (a) Polaroidbild des 0.6 % Agarose Gels unter UV-Licht. Aufgetragen wurden: in der Spur 1 ein Standard (PCR-Ladder) mit Fragmentlängen von 517-40000Bp, zu sehen sind bis 10000 , in der Spur 2 eine Wasser-Probe, in den Spuren 3-6 Patientenproben mit vorhandenem CYP-2D6-Gen. In der Spur 7 eine Probe mit homozygoter CYP2D6-Gendeletion. (b) Polaroidbild des 0.6 % Agarose Gels unter UV-Licht. Aufgetragen wurden: in der Spur 1 ein Standard (PCR-Ladder) mit Fragmentlängen von von 517-40000Bp, zu sehen sind bis 10000 , in der Spur 2 eine Wasser-Probe, in den Spuren 3-6 Patientenproben mit vorhandener CYP-2D6-Gen. In der Spur 7 eine Probe mit homozygoter CYP2D6-Gendeletion.

Nested PCR und Sequenzierung:

Das Ziel war die Erfassung der Polymorphismen für die Allele 9* (AGA 2613-2615)und 41* (G 2988A). Dafür wurde das Gensegment zwischen den Basen +2502 und +3191 amplifiziert. Die Methode wurde mit der erwarteten Annealing-Temperatur durchgeführt und wiederholt bis eine optimale Gel-Bande entstanden. In der Abbildung Abbildung 5 ist der PCR-Produkt der NestedPCR-Reaktion dargestellt. In der Spur 1 ist eine Wasser-Probe aufgetragen, in den Spuren 2-12 sind Patienten-Proben aufgetragen, wo die erwartete 690 Basen lange Bande zu sehen ist. In der 13. Spur ist ein Standard (PCR-Ladder) mit Fragmentlängen von 100 bis 2072 Bp aufgetragen.

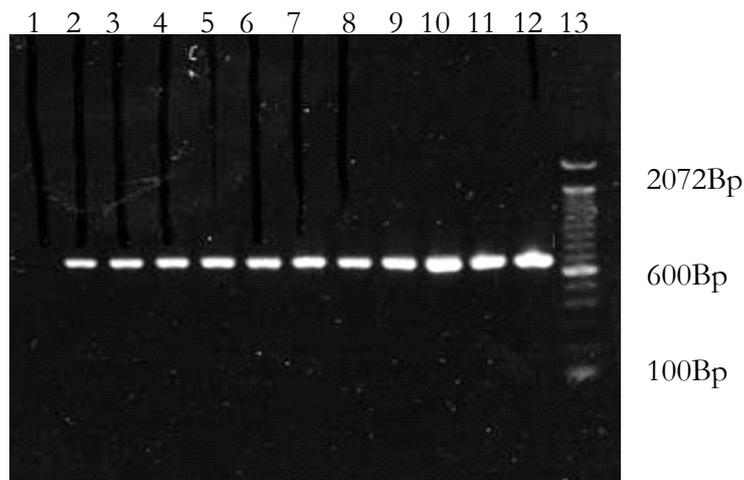


Abbildung 5: Polaroidbild des 2.0 % Agarose Gels unter UV-Licht. Aufgetragen wurden in der Spur 1 eine Wasser-Probe, in den Spuren 2-12 Patientenproben, in der Spur 13 in der Spur 1 ein Standard (PCR-Ladder) mit Fragmentlängen von 100 bis 2072 Bp.

Anschließend wurde mit drei unterschiedlichen Primern sequenziert. Aufgrund der hohen Heterogenität waren unterschiedliche Sequenzierungen notwendig, um störungsfreie Sequenzierungen zu erhalten, gleichzeitig wurden Polymorphismen validiert, deshalb wurden die gleichen zwei Primer verwendet, die bei der PCR-Reaktion benutzt wurden, und einer, der mitten im Amplikon band und damit nur den Polymorphismus für das Allel 41* erfasste, eingesetzt. In der Abbildung 6 bis Abbildung 12 sind die unterschiedlichen Polymorphismen dargestellt, wie sie sich aus der Sequenzierung ergaben.

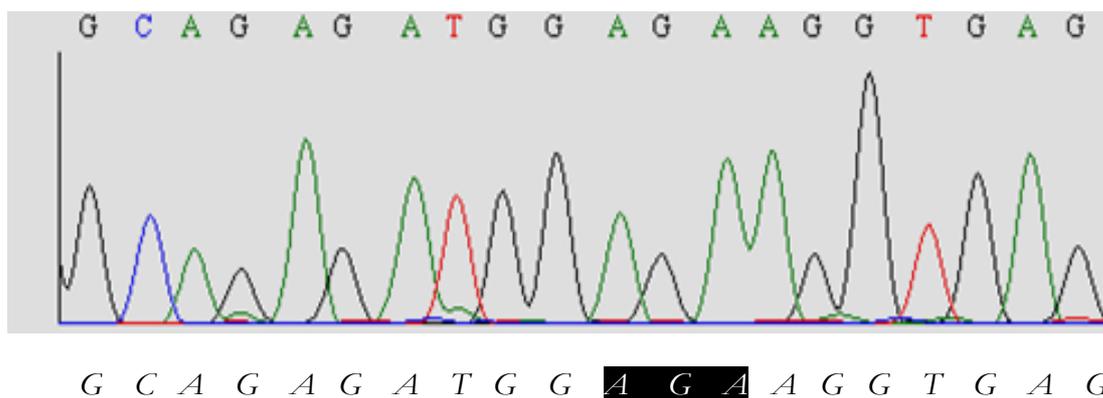


Abbildung 6: Allel 9* vom Wildtyp (1613-15AGA). Ansatz mit dem Primer Nested-Forward. Abschnitt eines Sequenzierungsansatzes von einer Patientenprobe. Darunter die Sequenz des Wildtyp-Allel 9* Die markierten 3 Basen sind beim Wildtyp vorhanden.

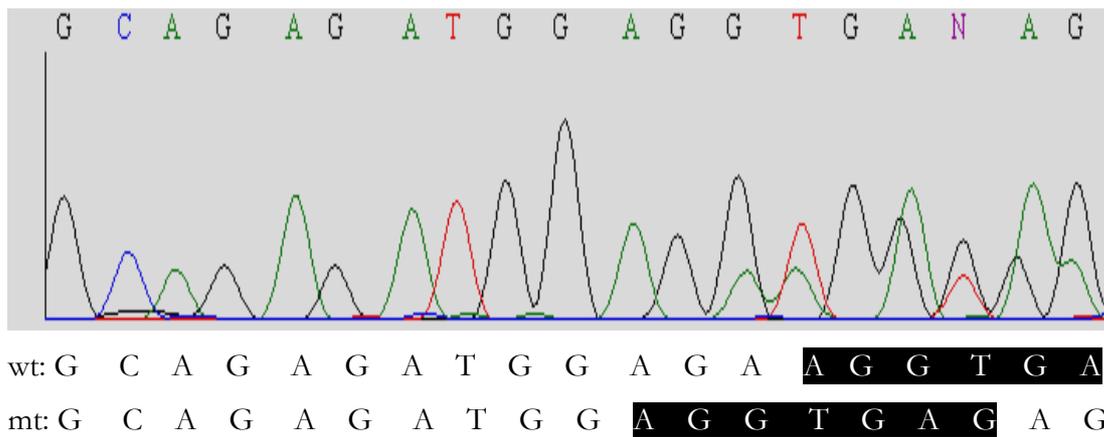


Abbildung 7: Allel 9* heterozygot mutiert (1613-15AGA Deletion). Ansatz mit dem Primer Nested-Forward. Abschnitt eines Sequenzierungsansatzes von einer Patientenprobe. Darunter ist die Sequenz des Wildtyps (obere Reihe) und des mutierten Allel 9* (untere Reihe) dargestellt. Durch die Deletion der 3 Basen 1613-15 AGA ist ein Allel um 3 Basen nach vorne verschoben. Entsprechend die Überlappung der Basen in der Sequenzierung nach der Deletions-Stelle

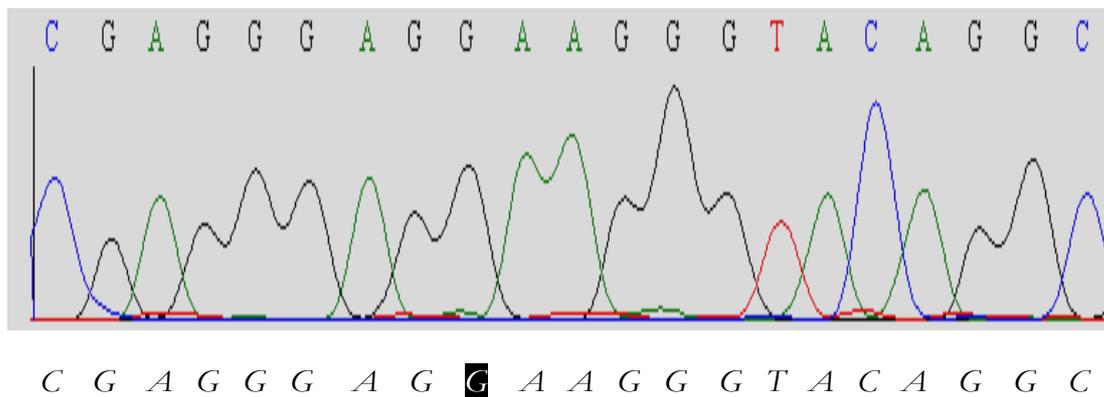


Abbildung 8: Allel 41* vom Wildtyp (G2988). Ansatz mit dem Primer Nested-Forward Abschnitt eines Sequenzierungsansatzes von einer Patientenprobe. Darunter ist die Sequenz des Wildtyp-Allell 41* dargestellt. In der Position 2988 ist ein G vorhanden (markiert).

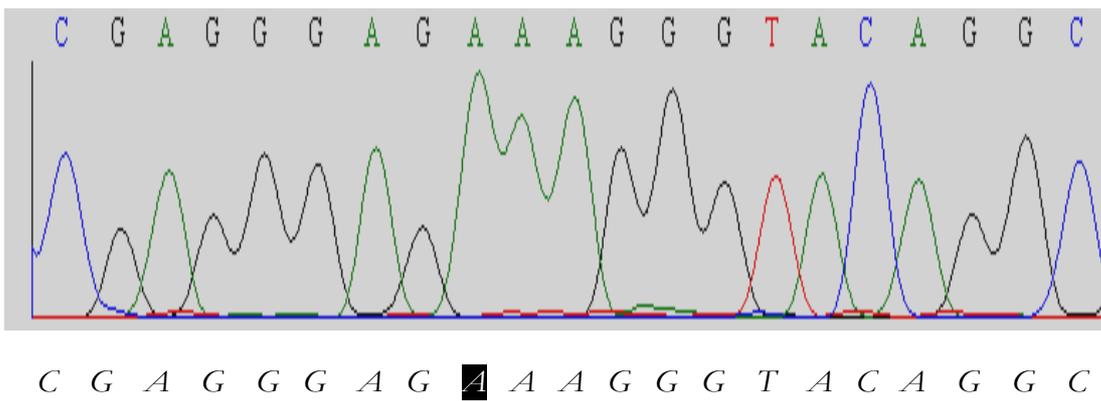


Abbildung 9: Allel 41* homozygot mutiert (G2988A). Ansatz mit dem Primer Nested-Forward. Abschnitt eines Sequenzierungsansatzes von einer Patientenprobe. Darunter ist die Sequenz des mutierten Allels 41* dargestellt. In der Position 2988 ist nur A vorhanden (markiert).

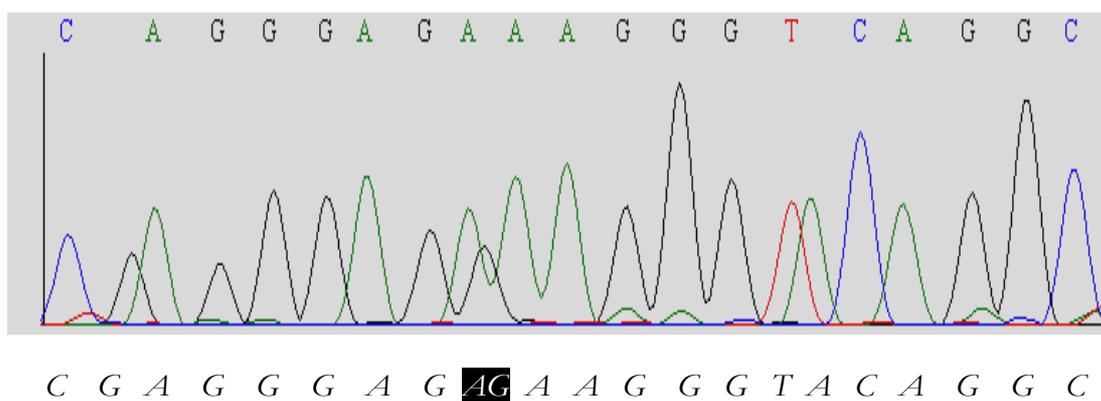


Abbildung 10: Allel 41* heterozygot mutiert (G2988A). Ansatz mit dem Primer Nested-Middle. Abschnitt eines Sequenzierungsansatzes von einer Patientenprobe. Darunter ist die Sequenz des mutierten Allel 41* dargestellt. In der Position 2988 sind beide G und A vorhanden (markiert).

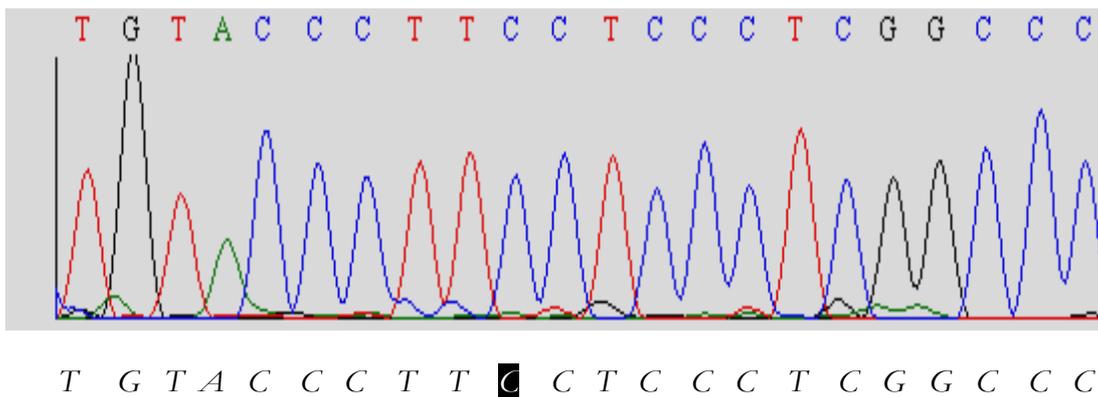


Abbildung 11: Allel 41* vom Wildtyp (G2988). Ansatz mit dem Primer Nested-Reverse. Abschnitt eines Sequenzierungsansatzes von einer Patientenprobe. Darunter ist die Sequenz der Antisens-DNA des Wildtyp-Allel 41* dargestellt. In der Position 2988 ist C vorhanden (markiert).

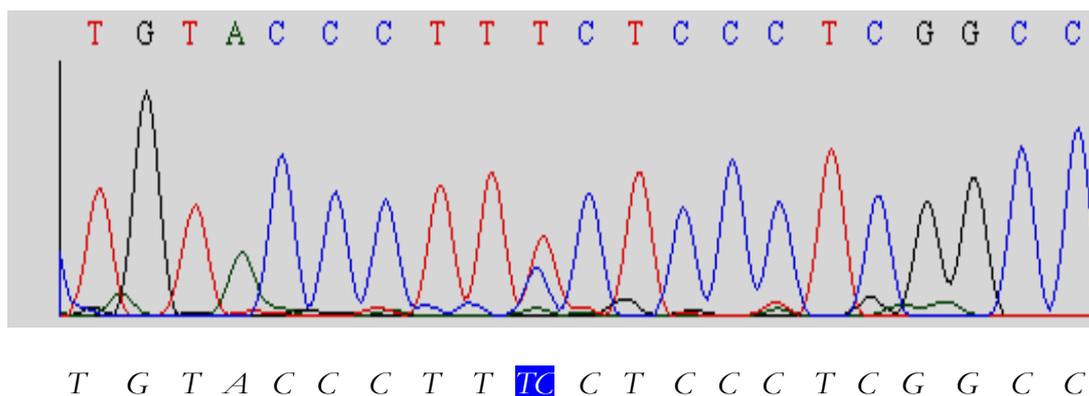


Abbildung 12: Allel 41* heterozygot mutiert (G2988A). Ansatz mit dem Primer Nested-Reverse. Abschnitt eines Sequenzierungsansatzes von einer Patientenprobe. Darunter ist die Sequenz der Antisens-DNA des Wildtyp-Allell 41* dargestellt. In der Position 2988 sind T und C vorhanden (markiert)

Patientenergebnisse:

Es wurden die Patientenproben, die ein Poormetaboliser-Allel in den Voruntersuchungen gezeigt haben, untersucht.

Von den 116 untersuchten Patienten waren 9 Patienten heterozygot für das Allel 41*, ein Patient heterozygot für das Allel 9. Die restlichen 106 Proben zeigten Wildtypmuster für beide Allele.

QUANTITATIVE PCR ZUM NACHWEIS VON GENDUPLIKATIONEN UND DELETIONEN:

Monoplex-PCR-Variante:

In dieser Variante wurden zwei getrennte Ansätze für Albumin und CYP2D6 parallel durchgeführt. Es wurde für jeden Ansatz eine Standardkurve mit 4 Verdünnungsstufen aus einer Probe ohne Gendeletion oder -duplikation durchgeführt. Die Patienten-DNA wurde 1:10 vorverdünnt, damit die Signalintensität des PCR-Produktes im Bereich der Kalibrationskurve liegt. Da einige Proben außerhalb der Kurve lagen, wurde die Patienten-DNA in allen darauf folgenden Ansätze 1:16 vorverdünnt.

Die Linearität der Standardkurven war $> 0,95$. das Slope mit $-3,5$ bis $-4,5$.

Duplex-PCR-Variante:

Bei dieser Variante wurden die zwei Gene in einem Reagenztube mittels Duplex-PCR amplifiziert und ausgewertet.

Standardreihe: Eine DNA-Probe ohne Gendeletion oder -duplikation wurde als Standard genommen und davon vier Verdünnungsstufen hergestellt: 1:2, 1:8, 1:32 und 1:128 die Konzentrationen wurden entsprechend als 128, 32, 8, 2 festgelegt. Die Patientenproben würden 1:16 vorverdünnt. Alle Patientenproben wurden mit dieser Methode analysiert. Die Abbildung 13 zeigt die Standardkurve und die Steigerung der Signalintensität des CYP2D-Genes, Die Abbildung 14 zeigt entsprechend das Albumin-Gen in der Duplex-PCR.

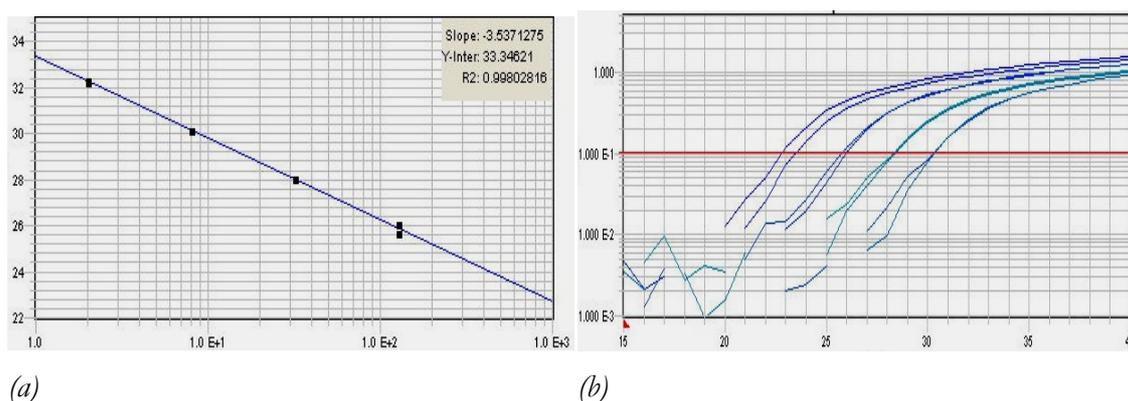
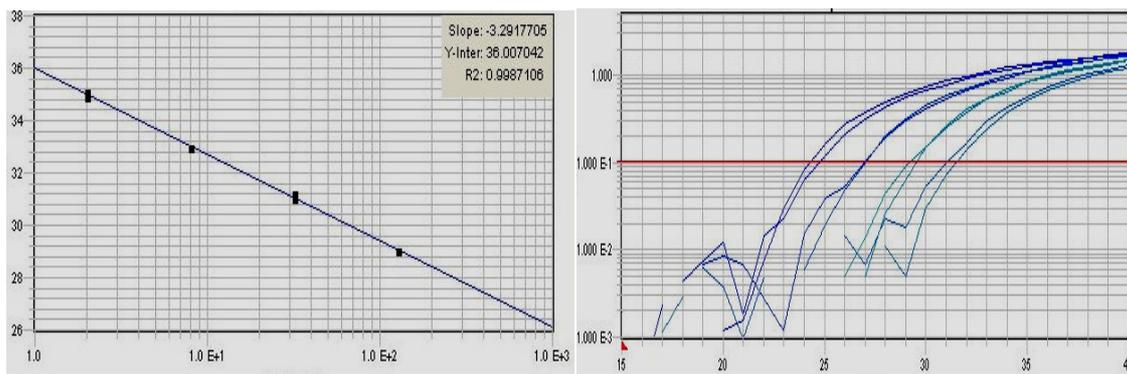


Abbildung 13: (a): Graphische Darstellung der Kalibrationskurve für CYP2D6-PCR-Reaktion: auf der Abszissenachse sind die Vorgegebenen Konzentrationen der Standards. Auf der Ordinatenachse die Ct. r^2 liegt bei 0,998, Slope ist -3,53. (b): die Signalsteigerung im Laufe der PCR-Reaktion: auf der Abszissen ist der PCR-Zyklus, auf der Ordinate die Signalsteigerung logarithmisch, die horizontale rote Linie zeigt die Grenze wo die Signalsteigerung signifikant war (Ct)



(a)

(b)

Abbildung 14: (a): Graphische Darstellung der Kalibrationskurve für Albumin-PCR-Reaktion: auf der Abszissenachse sind die vorgegebenen Konzentrationen der Standards, auf der Ordinatenachse die Ct. r^2 liegt bei 0,998, Slop ist -3,29. (b): die Signalsteigerung im Laufe der PCR-Reaktion: auf der Abszisse ist der PCR-Zyklus, auf der Ordinate die Signalsteigerung logarithmisch, die horizontale rote Linie zeigt die Grenze, wo die Signalsteigerung signifikant war (Ct)

Quantifizierung:

Die Signalintensität für jeden PCR-Produkt wurde anhand der eigenen Kalibrationskurve in eine relative „Quantität“ umgerechnet. Anschließend wurde eine Ratio gebildet:

$$Q\text{-CYP2D6}/Q\text{-Albumin (aus dem gleichen Reaktionstube)}$$

Validierung der Methode:

Es wurden Proben mit bekanntem Genotyp (Wildtyp, heterozygote Deletion: 1*5*, homozygote Deletion 5*5* und Genduplikation) analysiert. Der Genotyp war im Vorfeld mit anderen Methoden bestimmt worden (Long Distance PCR für Deletion, Methode nach Rau für die Duplikation. Die Poormetaboliser-Allele waren durch Multiplex-PCR mit anschließender Ligase-Reaktion analysiert worden). In unterschiedlichen Analysenserien lag die CYP2D6/Albumin-Ratio für die Kontrollproben wie in der Tabelle 7 angegeben. Wiederholte Messungen einer Probe mit homozygoter Gendeletion (Genotyp 5*5*) zeigte keine Amplifikation für CYP2D6 bei einer normalen Amplifikation für Albumin, entsprechend einer CYP2D6/Albumin-Ratio von 0.

Genotyp	Duplikation	1*5*	1*1*
Ratio CYP/Alb	1,66	0,41	1,01
	1,7	0,39	1,06
	1,63	0,48	0,73
	1,76	0,34	0,86
	1,50	0,34	0,98
	1,69	0,58	0,9
	1,52	0,25	1,05
	1,61	0,40	0,94
Mittelwert	1,63	0,39	0,94
Standardabweichung	0,08	0,09	0,11

Tabelle 7: Die CYP2D6/Albumin-Ratios nach Amplifikation mit TaqMan-PCR-Methode von Proben mit unterschiedlichen Allel-Anzahl gemessen in verschiedenen Probenserien. In der zweiten Spalte von links sind die einzelnen Ergebnisse (Ratio) von einer Probe mit Genduplikation darunter ist der Mittelwert und die Standardabweichung. In der dritten Spalte sind die Ergebnisse von einer Probe mit heterozygoter Gendeletion (1/5*), in der rechten Spalte sind die Ergebnisse einer Probe mit zwei Allelen.*

Analyse der Patienten-Proben:

Die Patientenproben wurden in Doppelbestimmung analysiert, bei einer Ratioabweichung von mehr als 0,2 wurden die entsprechenden Proben wiederholt. In jeder Probenserie wurden Kontrollproben mit einer Genduplikation und –deletion mitanalysiert. Abweichungen in der Amplifikationseffizienz in den einzelnen PCR-Reaktionen wurden berücksichtigt. Bei einem CYP2D6/Albumin-Ratio von 1,25 oder größer galt die Genduplikation als vorhanden.

Patienten-Ergebnisse: es wurden 298 Patienten-Proben analysiert. Bei 11 Patienten wurde die Genduplikation nachgewiesen, die CYP2D6/Albumin-Ratio lag bei dieser Patientengruppe zwischen 1,25 und 2,22, Mittelwert 1,72 Median 1,71.

Die CYP2D6/Albumin-Ratio bei den Patienten mit heterozygoter Allel-Deletion war im Mittel 0,42 und lag zwischen 0,25 und 0,6. bei einem Patienten mit dem Genotyp 5*/15* war die Ratio 0,74.

Die Ratio bei den Patientenproben ohne Gendeletion bzw. Genduplikation lag im Mittel bei 0,90 und schwankte zwischen 0,60 und 1,50. Alle Werte, die über 1,2 lagen waren in einer oder zwei

unabhängigen Analysenserien wiederholt worden und hatten in dem Kontrolllauf eine Ratio von <1,1.

DIE GENOTYPISIERUNG DER PATIENTEN NACH DER UNTERSUCHUNG AUF GENDUPLIKATIONEN SOWIE DER NACHWEIS VON DEN INTERMEDIATE-ALLELEN 9* UND 41*.

In der Voruntersuchung wurden nur die Poormetaboliser-Allele (PM) 3*, 4*, 5*, 6*, 7*, 8*, 12*, 14*, 15*, 19* und 20* untersucht. Beim Vorkommen von einem PM-Allel wurde der Phänotyp als Intermediate-, von zwei PM-Allelen als Poormetaboliser definiert. Wenn kein PM-Allel nachgewiesen wurde, dann wurde der Patient entsprechend als Extensivmetaboliser (EM) klassifiziert

Nach der Untersuchung der Genduplikation und Intermediateallele 9* und 41* hat sich der Genotyp bei 22 Patienten geändert, entsprechend änderte sich der Phänotyp. Die Patienten sind daraufhin neu klassifiziert worden. Beim Vorkommen von Genduplikationen wurde der Phänotyp als Ultrarapidmetaboliser (UM) definiert. Bei dem Vorhandensein von mindestens einem Extensivmetaboliser-Allel (EM), wurde der Phänotyp als Extensivmetaboliser klassifiziert. Bei dem Vorhandensein von einem PM- und einem Intermediatemetaboliser-Allel (IM) wurde der Phänotyp als Intermediatemetaboliser eingeordnet und beim Vorkommen von zwei PM-Allelen entsprechend als Poormetaboliser charakterisiert. Beim gleichzeitigen Vorkommen von einem PM-Allel und einer Genduplikation war es nicht möglich mit der zur Verfügung stehenden Analytik zu unterscheiden, ob das PM-Allel oder EM-Allel amplifiziert wurde. Bei den drei Patienten, die diese Konstellation hatten, wurde der Genotyp und entsprechend der Phänotyp als „nicht definiert“ klassifiziert.

In der Tabelle 8 ist die Patienten-Genotypisierung vor und nach der Untersuchung der Genduplikation und der Intermediateallele aufgelistet:

Erwarteter Phänotyp	Genotyp nach Untersuchung nur von PM-Allelen		Genotyp nach Untersuchung von PM-, IM-und UM-Allelen	
	Allel-Typ (Anzahl der funktionellen Allele)	n (%)	Allel-Typ (Anzahl der funktionellen Allele)	n (%)
Ultrapidmetaboliser			EM/UM (>2) 1*/1*, 2* oder Dup.	9 (3%)
Extensivmetaboliser	EM/EM (IM oder Duplikation) 1*/1* (2*,41*,9* oder Dup.) >1	157 (53%)	EM/EM (IM) 1*/1* (2*,41*, 9*) (2)	148 (49,7%)
Extensivmetaboliser			EM/PM (1) 1*/4* 1*/5* 1*/3* 1*/6* 1*/15* 1*/19*	103 (34,6%) 72 12 10 7 1 1
Intermediatemetaboliser	EM (IM, oder Dup)/PM (0<und<2) 1*/4* 1*/5* 1*/3* 1*/6* 1*/15* 1*/19*	116 (38,6%) 83 13 10 7 2 1	PM/IM (0 <und <1) 4*/9* 4*/41* 5*/41* 15*/41*	10 (3,4%) 1 7 1 1
Poormetaboliser	PM/PM (0)	25 (8,4%)	PM/PM (0)	25 (8,4%)

	3*/4*	3	3*/4*	3
	3*/5*	1	3*/5*	1
	4*/4*	11	4*/4*	11
	4*/5*	4	4*/5*	4
	4*/6*	2	4*/6*	2
	4*/15*	2	4*/15*	2
	4*/19*	1	4*/19*	1
	5*/15*	1	5*/15*	1
nicht definiert			EM/PM/UM? 1*X/4*oder 1*/4*X	3 (1%)

Tabelle 8: Patienten-Klassifikation nach der Untersuchung von nur Poormetaboliser-Allelen (PM) und nach der Untersuchung von Genduplikation und der IM-Allelen 9 und 41*. In der ersten Spalte links ist der erwartete Phänotyp beschrieben. In der zweiten Spalte ist der Genotyp, Anzahl der funktionellen Allele (in klammern) und die gefundenen Allel-Konstellationen nach der Untersuchung von nur PM-Allele mit Anzahl und Prozentsatz aufgelistet, In der dritten Spalte ist der Genotyp, Anzahl der funktionellen Allele (in klammern) und die gefundenen Allel-Konstellationen nach der zusätzlichen Untersuchung von IM- und UM-Allelen mit Anzahl und Prozentsatz aufgelistet*

BEDEUTUNG DES GENOTYPS FÜR DAS POSTOPERATIVE RISIKO:

Für die Auswertung wurde eine Kaplan-Meier-Überlebensanalyse durchgeführt. Ausgewertet wurden die definierten Endpunkte bezüglich ihrer Abhängigkeit von der Anzahl der vollfunktionellen Allele. Es wurden 295 Patienten in die Auswertung eingeschlossen, die drei Patienten mit unklarem Genotyp wurden ausgeschlossen.

Die Häufigkeiten der Patientenvariablen und Grunderkrankungen, also KHK, OP-Risiko, Leberzirrhose, Diabetes Mellitus und Hypertonus und vor allem die Medikation mit Beta-Blockern zeigten anhand eines p-Wertes von > 0.05 keine Abhängigkeit vom Vorkommen der CYP2D6-Allele. Die Messwerte des C-Reaktiven Proteins und des Fibrinogens zeigten gleichfalls keine Abhängigkeit.

In drei Schritten wurde die Abhängigkeit der definierten postoperativen Ereignisse vom CYP2D6-Genotyp analysiert, zuerst wurden alle Patienten untersucht. Dann wurden die Patienten eingeschlossen, die perioperativ eine Medikation mit CYP2D6-Substraten erhalten haben und im letzten Schritt wurden nur die Patienten eingeschlossen, die perioperativ eine Medikation mit Betablocker, die über CYP2D6 metabolisiert werden, erhalten haben.

ALLE STUDIENPATIENTEN

Für den primären Endpunkt, bestehend aus kardiovaskulären Ereignissen und Tod, wurden insgesamt 26 Ereignisse registriert.

Bezogen auf die Anzahl der vollfunktionellen Allele waren die Ereignisse wie folgt verteilt:

1 von 35 Patienten (2,9 %) ohne vollfunktionelles Allel (Genotyp PM/PM oder PM/IM), 6 von 103 Patienten (5,8%) mit einem vollfunktionellem Allel (Genotyp EM/PM), 18 von 148 Patienten(12,2%) mit 2 vollfunktionellen Allelen (Genotyp EM/EM) und 1 von 9 Patienten (11.1%) mit mehr als zwei vollfunktionellen Allelen (Genotyp EM/UM), Long rank p for trend=0,038. In der Abbildung 15 ist eine graphische Darstellung der Komplikationsfreiheit versus der Anzahl der vollfunktionellen Allele bei allen Studienpatienten gezeigt.

Um die Anzahl der Patienten in den Subpopulationen zu vergrößern sind die letzten zwei Genotypen (EM/EM, EM/UM) zusammengefasst. Entsprechend ergab sich eine Ereignis-Verteilung in den drei Gruppen wie folgt: 1 von 35 Patienten (2,9 %) ohne vollfunktionelles Allel (Genotyp PM/PM oder PM/IM), 6 von 103 Patienten (5,8%) mit einem vollfunktionellem Allel (Genotyp EM/PM), 19 von 157 Patienten(12,1%) mit 2 oder mehr vollfunktionellen Allelen (Genotyp EM/EM oder EM/UM), Long rank p for trend=0,032. In der Abbildung 16 ist die gleiche graphische Darstellung wie in der Abbildung 15, aber nach der Zusammenfassung der Patienten mit zwei oder mehr vollfunktionellen Allelen.

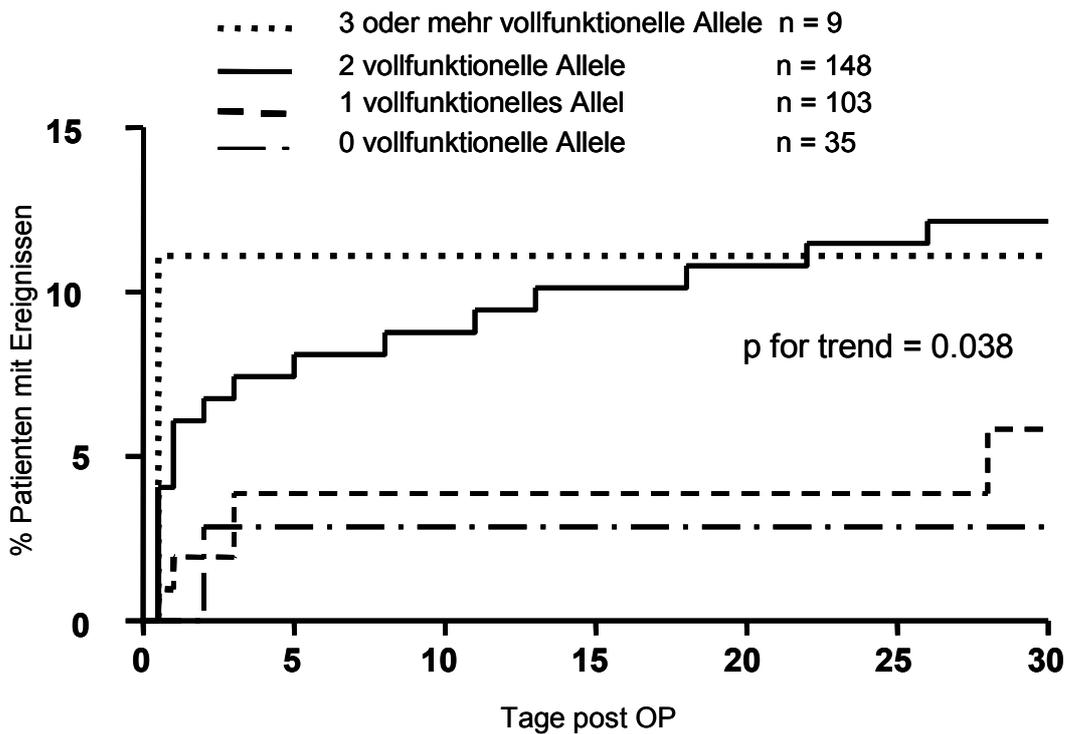


Abbildung 15: Die Häufigkeit von peri- und postoperativen Ereignissen bei allen 295 Studienpatienten für den Endpunkt 1 bezogen auf die Anzahl der vollfunktionellen CYP2D6-Allele. Die Patientenzahl sowie die Allelzahl der einzelnen Gruppen sind in der Legende angegeben

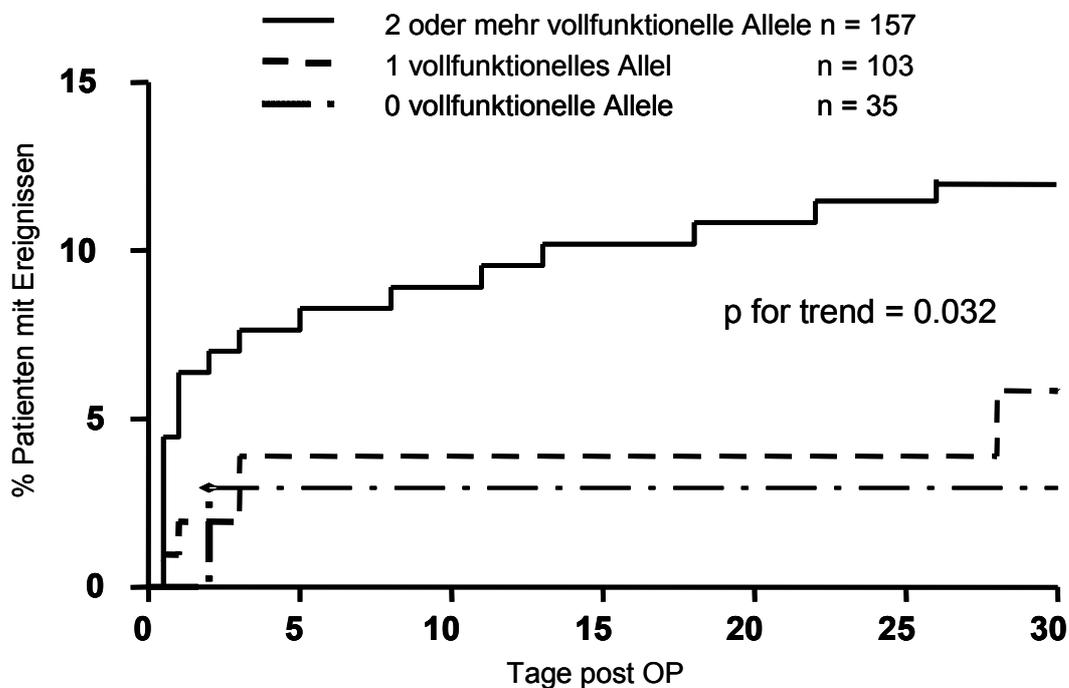


Abbildung 16: Die Häufigkeit von peri- und postoperativen Ereignissen bei allen 295 Studienpatienten für den Endpunkt 1 bezogen auf die Anzahl der vollfunktionellen CYP2D6-Allele. Die Gruppen mit 2, 3 oder mehr

Allelen sind zusammengefasst. Die Patientenzahl sowie die Allelzahl der einzelnen Gruppen sind in der Legende angegeben

PATIENTEN MIT EINER MEDIKATION VON CYP2D6-SUBSTRATEN

Bei den 55 Patienten, die Medikamente erhalten haben, die CYP2D6-abhängig metabolisiert werden, wurden für den primären Endpunkt insgesamt 9 Ereignisse registriert. Bezogen auf die Anzahl der vollfunktionellen Allele waren die Ereignisse wie folgt verteilt: 0 von 8 Patienten (0 %) ohne vollfunktionelles Allel (Genotyp PM/PM oder PM/IM), 2 von 19 Patienten (10,5%) mit einem funktionellem Allel (Genotyp EM/PM), 6 von 25 Patienten (23,1%) mit 2 vollfunktionellen Allelen (Genotyp EM/EM) und 1 von 3 Patienten (33,1%) mit mehr als zwei vollfunktionellen Allelen (Genotyp EM/UM), Long rank p for trend=0,051 und damit über der Signifikanzgrenze. Eine graphische Darstellung der Komplikationsfreiheit versus der Anzahl der vollfunktionellen Allele bei dieser Patientengruppe ist in der Abbildung 17 gezeigt.

Genau wie in der Auswertung aller Patienten wurden hier auch die letzten zwei Genotypen (EM/EM, EM/UM) zusammengefasst, entsprechend ergab sich eine Ereignis-Verteilung in den drei Gruppen wie folgt: 0 von 8 Patienten (0 %) ohne vollfunktionelles Allel (Genotyp PM/PM oder PM/IM), 2 von 19 Patienten (10,5%) mit einem vollfunktionellem Allel (Genotyp EM/PM) und 7 von 28 Patienten (24,1%) mit 2 oder mehr vollfunktionellen Allelen (Genotyp EM/EM, EM/UM), Long rank p for trend=0,067, und damit noch deutlicher über der Signifikanzgrenze. In der Abbildung 18 ist eine graphische Darstellung der Komplikationsfreiheit versus der Anzahl der vollfunktionellen Allele nach dieser Patiententeilung gezeigt.

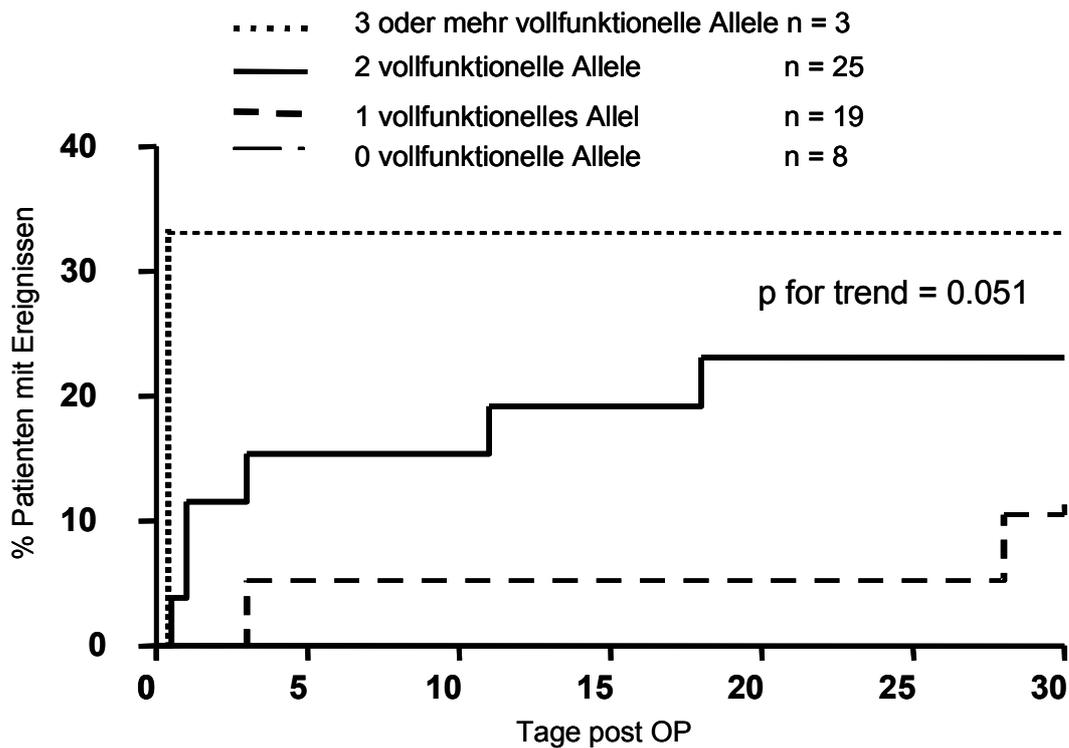


Abbildung 17: Die Häufigkeit von peri- postoperativen Ereignissen bei 56 Patienten, die mit CYP2D-Substrate behandelt wurden, für den Endpunkt 1 bezogen auf die Anzahl der vollfunktionellen CYP2D6-Allele. Die Patientenzahl sowie die Allelzahl der einzelnen Gruppen sind in der Legende angegeben

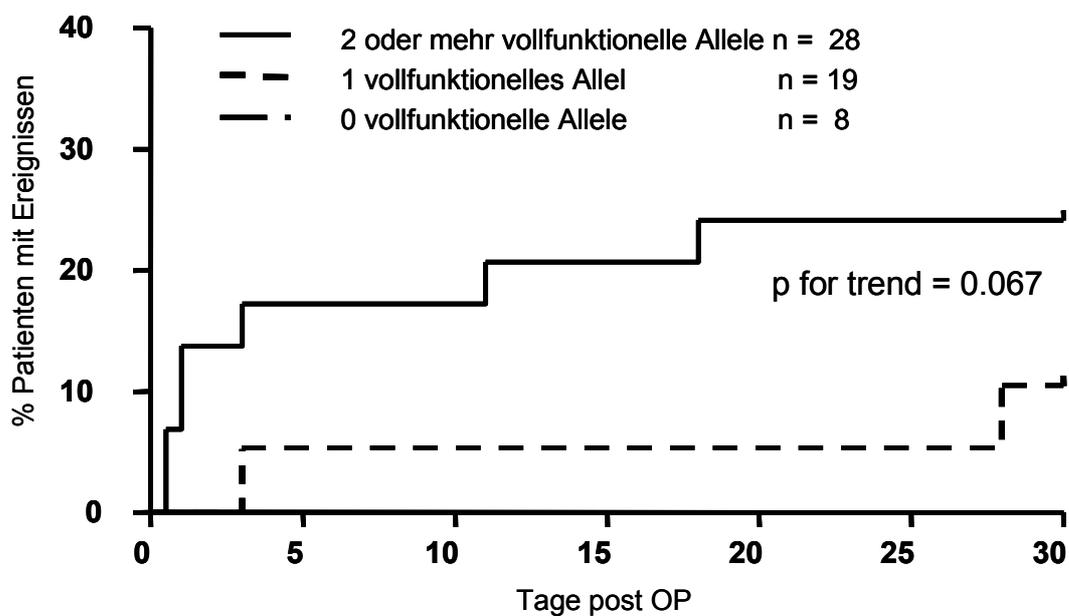


Abbildung 18: Die Häufigkeit von postoperativen Ereignissen bei 56 Patienten, die mit CYP2D-Substrate behandelt wurden, für den Endpunkt 1 bezogen auf die Anzahl der vollfunktionellen CYP2D6-Allele. Die

Gruppen mit 2, 3 oder mehr Allelen sind zusammengefasst. Die Patientenzahl sowie die Allelzahl der einzelnen Gruppen sind in der Legende angegeben

PATIENTEN MIT EINER MEDIKATION VON CYP2D6-ABHÄNGIGEN BETABLOCKERN

Bei 43 von den oben genannten 56 Patienten, waren die CYP2D6 abhängigen Medikamente Betablocker. In dieser Gruppe wurden für den primären Endpunkt 8 Ereignisse registriert. Bezogen auf die Anzahl der vollfunktionellen Allele waren die Ereignisse wie folgt verteilt: 0 von 7 Patienten (0 %) ohne vollfunktionelles Allel (Genotyp PM/PM oder PM/IM), 2 von 17 Patienten (11,8%) mit einem vollfunktionellem Allel (Genotyp EM/PM), 5 von 17 Patienten (29,4%) mit 2 vollfunktionellen Allelen (Genotyp EM/EM) und 1 von 2 Patienten (50%) mit mehr als zwei funktionellen Allelen (Genotyp EM/UM), Long rank p for trend=0,024. Eine graphische Darstellung der Komplikationsfreiheit versus der Anzahl der vollfunktionellen Allele bei der Betablocker-Patientengruppe ist in der Abbildung 19 gezeigt.

Bei der geringen Fallzahl wurden hier auch die letzten zwei Genotypen (EM/EM, EM/UM) zusammengefasst, entsprechend ergab sich eine Ereignis-Verteilung in den drei Gruppen wie folgt: 0 von 7 Patienten (0 %) ohne vollfunktionelles Allel (Genotyp PM/PM oder PM/IM), 2 von 17 Patienten (11,8%) mit einem vollfunktionellem Allel (Genotyp EM/PM) und 6 von 19 Patienten (31,6%) mit 2 oder mehr vollfunktionellen Allelen (Genotyp EM/EM bzw. EM/UM), Long rank p for trend=0,041. In der Abbildung 20 ist eine graphische Darstellung der Komplikationsfreiheit versus der Anzahl der vollfunktionellen Allele bei der Betablocker Patientengruppe nach dieser Teilung gezeigt.

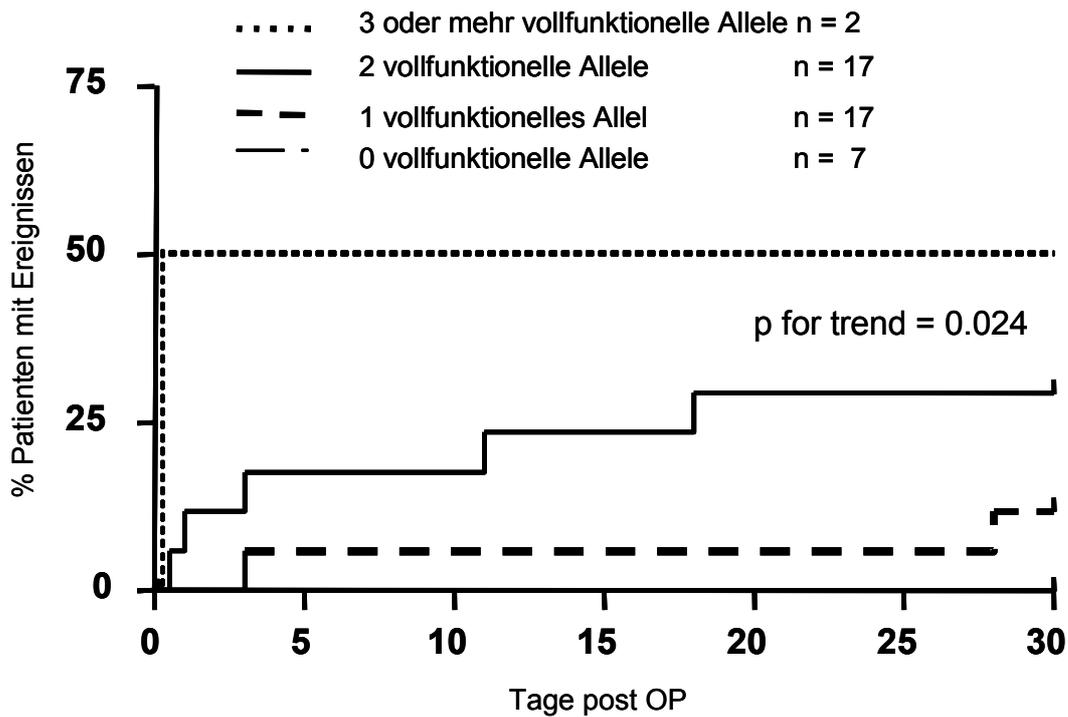


Abbildung 19: Die Häufigkeit von peri- und postoperativen Ereignissen bei 43 Patienten, die mit CYP2D-abhängigen Betablocker behandelt wurden, für den Endpunkt 1 bezogen auf die Anzahl der vollfunktionellen CYP2D6-Allele. Die Patientenzahl sowie die Allelzahl der einzelnen Gruppen sind in der Legende angegeben

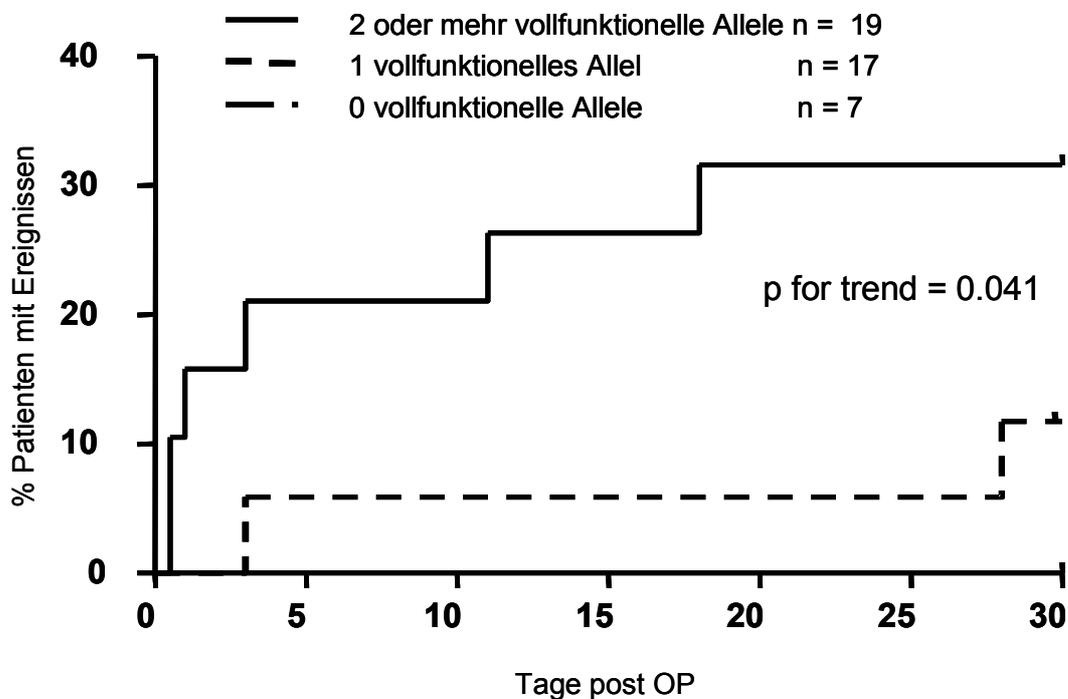


Abbildung 20: Die Häufigkeit von peri- und postoperativen Ereignissen bei 43 Patienten, die mit CYP2D-abhängigen Betablocker behandelt wurden, für den Endpunkt 1 bezogen auf die Anzahl der vollfunktionellen CYP2D6-Allele. Die Gruppen mit 2, 3 oder mehr Allelen sind zusammengefasst, entsprechend sind die

Patienten in drei Gruppen geteilt. Die Patientenzahl sowie die Allelzahl der einzelnen Gruppen sind in der Legende angegeben

PATIENTEN OHNE MEDIKATION VON CYP2D6-ABHÄNGIGEN BETABLOCKERN

Bei den restlichen 252 Patienten, die keine CYP-2D6 abhängige Betablocker bekamen, waren für den primären Endpunkt 18 Ereignisse registriert worden. Bezogen auf die Anzahl der vollfunktionellen Allele waren die Ereignisse wie folgt verteilt: 1 von 28 Patienten (3,6 %) ohne vollfunktionelles Allel (Genotyp PM/PM oder PM/IM), 4 von 86 Patienten (4,7%) mit einem vollfunktionellem Allel (Genotyp EM/PM), 13 von 131 Patienten(9,9%) mit 2 vollfunktionellen Allelen (Genotyp EM/EM). und 0 von 7 Patienten (0%) mit mehr als zwei funktionellen Allelen (Genotyp EM/UM). Long rank p for trend=0,221. Genau wie bei der Betablocker-Patientengruppe wurden hier die EM/EM und EM/UM Genotypen zusammengefasst, entsprechend ergab sich eine Ereignis-Verteilung wie folgt: 1 von 28 Patienten (3,6 %) ohne vollfunktionelles Allel (Genotyp PM/PM oder PM/IM), 4 von 86 Patienten (4,7%) mit einem vollfunktionellem Allel (Genotyp EM/PM) und 13 von 138 Patienten(9,6%) mit 2 oder mehr vollfunktionellen Allelen (Genotyp EM/EM und EM/UM), Long rank p for trend=0,139.

DISKUSSION

Im ersten Teil der aktuellen Studie waren 298 Patienten zuerst bezüglich des Vorkommens von PM-Allelen und deren Einfluss auf die perioperative Komplikationsrate untersucht worden. Wider Erwarten hatte sich herausgestellt, dass die Patienten mit PM-Genotyp oder mindestens einem PM-Allel signifikant weniger perioperative Komplikationen hatten im Vergleich zu den Patienten ohne PM-Allele ($p = 0,032$). Hauptsächlich waren dies kardiovaskuläre Komplikationen. Dieser Trend zeigte eine Abhängigkeit von der Therapie mit Betablockern, die über CYP2D6 metabolisiert werden, ($p = 0,041$) aber keine Abhängigkeit, wenn alle eingesetzten CYP2D6-Substrate in die Analyse eingeschlossen wurden ($p=0,067$).

In dieser Arbeit wurden diese 298 Patienten auf Genduplikationen untersucht. Die Genduplikationen wurden bei 12 Patienten (4%) gefunden. Drei dieser 12 Patienten hatten vorher den Genotyp EM/PM. Es konnte also nicht unterschieden werden, ob das PM-Allel oder das EM-Allel amplifiziert war, entsprechend konnte der Genotyp nicht definiert werden. Die drei Patienten wurden also von der Analyse ausgeschlossen und somit wurden 9 Patienten (3%) eindeutig als UM definiert, also als Patienten mit mehr als zwei vollfunktionellen Allelen (Genotyp EM x n/EM)

Parallel wurden die häufigsten IM-Allele, namentlich 41* und 9* bei 116 Patienten untersucht, die in der Voruntersuchung nur ein PM-Allel hatten. In dieser Patientengruppe wurde ein IM-Allel bei 10 Patienten gefunden (8,6%), entsprechend 3,3% von den Gesamtpatienten, 9 Patienten hatten das Allel 41*, 1 Patient hatte das Allel 9*.

Durch den Nachweis von Genduplikationen und IM-Allelen des CYP2D6-Genes hat sich der Genotyp bei 22 Patienten (7,4 %) geändert, damit war es möglich, die Patientengruppen besser zu differenzieren. Die Anzahl der vollfunktionellen Allele hat sich entsprechend bei 10 Patienten von 1 auf 0 reduziert, und bei 9 Patienten von 2 auf 3 oder mehr erhöht. Bei 3 Patienten war der Genotyp nicht klar zu definieren.

Die Patienten-Analyse nach der neuen, genaueren Patienten-Klassifikation hat die positive Korrelation der perioperativen Ereignisse mit der Anzahl der vollfunktionellen Allele bestätigt. Diese Assoziation von perioperativen Ereignissen und vollfunktionellen Allelen wurde insbesondere in der Subgruppe der Patienten bestätigt, die über CYP2D6 metabolisierte

Betablocker erhalten haben. Für diese Subgruppe hat sich in der Auswertung eine höhere Signifikanz ergeben als zuvor.

GENOTYPISIERUNG:

Das Vorkommen der Genduplikationen in der Studienpopulation von 4% zeigt keinen wesentlichen Unterschied zur Prävalenz in der europäischen Bevölkerung von ca. 3 % (Sachse et al 1997, Ingelman-Sundberg, 1999).

Das Vorkommen der IM-Allele in der Studiensubpopulation scheint unter der Prävalenz in der europäischen Bevölkerung zu sein. Das Allel 41* wurde 9 x nachgewiesen bei der Untersuchung von 232 Allelen (116 Patienten x 2) entsprechend 3,8 % bei einer Prävalenz von 8,4 % bei Kaukasiern (Raimundo et al. 2004). Das Allel 9* sollte mit einer Häufigkeit von 2% vorkommen (Sachse et al. 1997), machte aber 0,8 % der untersuchten Allele aus. Die niedrigere Prävalenz von IM-Allelen in der Studiensubpopulation könnte an der Selektion der Patientengruppe mit einem PM-Allel liegen. Diese Selektion basiert darauf, dass für den Genotyp Intermediatemetaboliser die typische Konstellation in dem gemeinsamen Auftreten eines PM-Allels zusammen mit einem IM-Allels besteht. Bei dieser Gruppe würde der Nachweis eines IM-Allels zur Änderung des Genotyps von EM zu IM führen. Ausserdem haben Personen mit dem Genotyp EM/IM vermutlich keinen signifikanten Unterschied bezüglich der CYP2D6-Enzymaktivität im Vergleich zum Genotyp EM/EM (Rau et al. 2002). Bei dem IM/IM Genotyp ist der Phänotyp nicht klar. In einer Studie zeigte ein Patient mit dem Genotyp IM/IM keinen Unterschied in der Plasmakonzentration von Desipramin zu den EM/IM oder EM/PM Patienten (Furman et al. 2004). Aus diesen Gründen wurden die IM-Allele bei den Patienten ohne PM-Allel nicht untersucht.

Was den Phänotyp betrifft, waren anhand dieser Analyse weniger IM definiert als nach der Prävalenz von 10 % unter den Studienpatienten zu erwarten waren (erwartet war n=30, detektiert wurden n=10). Das ist u.a. darauf zurückzuführen, dass bei einem Teil des IM-Phänotyps bis dato kein genetischer Polymorphismus gefunden wurde (Raimundo et al. 2004). In der Tabelle 9 ist die Prävalenz der definierten Phänotypen in dieser Studie verglichen mit Ergebnissen aus der Literatur (Bock et al. 1994, Sachse et al. 1997, Ingelman-Sundberg, 1999) dargestellt.

Phänotyp	Prävalenz bei den Studienpatienten in %	Allgemeine Prävalenz in %
Ultrarapidmetaboliser (UM)	3	3-5
Extensivmetaboliser	85	70-80
Intermediatemetaboliser	3	10-15
Poormetaboliser	8,4	7-10

Tabelle 9: Prävalenz der unterschiedlichen Metabolisertypen bei den Studienpatienten und die allgemeine Prävalenz nach Bock et al. 1994, Sachse et al. 1997, Ingelman-Sundberg. 1999.

Die Auswahl der 2 IM-Allele 41* und 9* für die Untersuchung basierte darauf, dass durch deren Bestimmung mehr als 2 Drittel der IM-Allele bei dieser Population detektiert werden können (Raimundo et al. 2004), andere IM-Allele sind bei Kaukasiern selten, wie z.B. das Allel 17*, das bei Afrikanern häufig ist (Leathart et al. 1998) oder das Allel 10, das häufiger bei Asiaten vorkommt (Griese et al. 1998, Kubota et al. 2000).

BEDEUTUNG DER GENDUPLIKATIONEN UND IM-ALLELE FÜR DAS POSTOPERATIVE RISIKO:

Viele Untersuchungen zum CYP2D6-Polymorphismus konzentrierten sich auf seinen Einfluss auf die Pharmakokinetik von einzelnen Medikamenten. Auf der einen Seite stand der Poormetaboliser-Phänotyp ohne funktionelle Allele und die daraus resultierende Akkumulation von Medikamenten und die damit verbundenen unerwünschten Wirkungen, auf der anderen Seite stand der Ultrarapidmetaboliser-Phänotyp als Ursache für nicht adäquate Medikamentenwirkung und Therapieversagen im Mittelpunkt des Interesses.

In der aktuellen Studie zeigte die Patienten-Subgruppe mit einer Betablocker-Therapie (43 Patienten) eine Abhängigkeit der perioperativen Komplikationen von der Anzahl der EM-Allelen. Die in dieser Studie durchgeführte Untersuchung der IM- und UM-Allele hat diese Signifikanz verdeutlicht. Trotz der höheren Zahl an Metabolisergruppen zeigte die Kaplan Meier-Statistik einen noch klareren Trend als in der ursprünglichen, größeren Analyse. Die auftretenden Komplikationen bei diesen Patienten wie Arrhythmien oder ein akutes Koronarsyndrom deuten auf eine nicht ausreichende Betablocker-Wirkung hin. Diese

Beobachtungen sprechen dafür, dass die Dosierung der Betablocker in der perioperativen Periode für diese Patienten nicht ausreichend ist. Vor dem Hintergrund pharmakoepidemiologischer Studien, die zeigen, dass im klinischen Alltag Betablocker vielfach unterdosiert sind, kommt dieser Beobachtung eine besondere praktische Relevanz zu (Cleland et al. 2002)

Einige Studien zeigten, dass Poor- und Intermediatemetaboliser unter der Therapie mit Metoprolol signifikant höhere Plasmakonzentrationen haben (Rau et al. 2002).

Bei Poor- und Intermediatemetabolisern wird möglicherweise die zu niedrige Dosis durch die Akkumulation der Medikamente kompensiert. Andere Patienten mit einer normalen bzw. gesteigerten Enzymfunktion geraten durch die schnelle Metabolisierung des Medikaments in eine Unterdosierung mit der Folge von gehäuften kardiovaskulären Komplikationen.

Ob der UM-Genotyp noch höhere Raten an Komplikationen hätte, konnte diese Untersuchung aufgrund der niedrigen Patientenanzahl in dieser Subgruppe nicht beweisen. Der Trend deutet aber darauf hin.

Fall Kontroll Studien zeigen im Gegensatz für den PM-Genotyp ein bis zu fünffach erhöhtes Risiko für Nebenwirkungen unter einer Metoprolol-Therapie im Vergleich zum EM-Genotyp (Wuttke et al. 2002). Dies waren aber hauptsächlich medikamentenspezifische Nebenwirkungen, die mit steigender Plasmakonzentration häufiger auftreten.

„Therapieversagen“ wurde im Gegensatz zur aktuellen Studie allerdings nicht erfasst, was die völlig andere Bewertung des Risikos erklärt.

Die Studien zur perioperativen Betablocker-Gabe und zum möglichen Nutzen im Vergleich zu den Nebenwirkungen zeigen bei nichtkardiochirurgischen Patienten unterschiedliche Ergebnisse. Mangano et al. (1996) zeigten eine protektive Wirkung für Atenolol, das kein CYP2D6-Substrat ist, in der perioperativen Phase, während Juul et al. (2006) keine Wirkung einer Metoprolol-Therapie auf die kardiovaskulären Komplikationen in der perioperativen Phase sehen. Eine Berücksichtigung des genetischen Hintergrundes könnte eine Erklärung für diese Diskrepanz geben (Maas et al. 2003).

Zusätzlich zur Patienten-Subgruppe mit der Betablocker-Therapie sind bei einer Subgruppe von 12 Patienten andere CYP2D6-Substrate verabreicht worden. Das waren u.a. Amitriptyline (n=3), Tramadol (n=6), Morphin (n=1) und Ritonavir (n=1). Aufgrund der niedrigen Patientenanzahl in dieser kleinen Subgruppe konnten keine statistische Analysen durchgeführt werden.

Die Analyse in der Gesamtgruppe mit einer Medikation aller CYP2D6-Substrate zeigte keine Abhängigkeit der perioperativen Komplikationen von der Anzahl der vollfunktionellen CYP2D6-Allele ($p=0,051$). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die Nebenwirkungen und

Komplikationen bei CYP2D6-Substraten außer den Betablockern eine positive Korrelation mit dem PM-Genotyp und Plasmakonzentration hatten, sich ein PM-Phänotyp also in der entgegengesetzten Richtung auswirkte wie Betablocker.

Für Amitriptylin zeigte eine Untersuchung von Steimer et al. (2004), dass PM- und IM-Allele mit höheren Plasmakonzentrationen abhängig von der Anzahl der funfunktionellen Allele korrelieren. In einer Pilotstudie von Rau et al. 2004 waren 9 von 28 Patienten, die Komplikationen unter Therapie mit CYP2D6-abhängigen Antidepressiva zeigten, Poormetaboliser. Das entspricht der vierfachen Prävalenz wie bei Kaukasiern (29% vs 7%, $p < 0,0001$). Bei den Nonrespondern hatten 3 von 16 (19%) Genduplikationen. Entsprechend der fünffachen Prävalenz (19% vs 4%, $p = 0,0012$)

Inzwischen zeigen Studien, dass Poormetaboliser weniger Nutzen vom Tramadol haben als Extensivmetaboliser (Stamer et al. 2003) und dass Tramadol seine Wirkung erst komplett entfaltet nach der Metabolisierung durch CYP2D6 (Enggaard et al. 2006).

Die verminderte schmerzmildernde Wirkung vom Tramadol bei den Poormetabolisern unter diesen Hochrisiko-Patienten könnte der Auslöser für kardiovaskuläre Ereignisse sein. Aufgrund der niedrigen Patientenanzahl in den einzelnen Subgruppen versteht sich diese Untersuchung als Pilotstudie, deren Ergebnisse durch Studien mit größeren Patientenzahlen bestätigt werden sollte.

Insgesamt spricht diese Studie für einen Einfluss des CYP2D6-Polymorphismus auf die kardiovaskuläre perioperative Komplikationsrate bei nichtkardiochirurgischen Patienten. Bei einer Betablocker-Medikation dürfte der Poormetaboliser- oder Intermediatemetaboliser-Status unter der zurzeit empfohlenen Dosierung von Vorteil sein. Ein Ultrarapidmetaboliser-Status könnte einen Nachteil darstellen. Bei anderen Substraten könnte es sein, dass die Extensivmetaboliser von ihrem Status profitieren.

Die Abwägung zwischen einer höheren Dosierung mit dem Risiko für Nebenwirkungen und einer niedrigeren Dosierung mit dem Risiko der nicht ausreichenden Wirkung, rechtfertigt die Untersuchung von diesen genetischen Faktoren mit dem Ziel, allgemeine therapeutische Empfehlungen zur Dosierung dem individuellen Patiententyp anzupassen.

„Die Entdeckung pharmakogenetischer Faktoren, die an der Regulation und Expression der CYP450-Enzyme beteiligt sind, erklärt, warum Wirkungen und Nebenwirkungen von Medikamenten ausgeprägte individuelle Unterschiede zeigen. Die Entwicklung neuer molekularbiologischer Techniken haben einfache Genotypisierungsmethoden ermöglicht.

Hiermit kann die individuelle Metabolisierungskapazität für CYP450-Enzyme bezüglich bestimmter Medikamente vorhergesagt werden. Wenngleich noch Forschungsbedarf besteht, sprechen die bereits vorliegenden Erkenntnisse eindeutig dafür, dass durch Anwendung des vorhandenen pharmakogenetischen Wissens gravierende Nebenwirkungen sowie Therapieversager vermieden werden können. Die flächendeckende und vor allem kostengünstige Verfügbarkeit entsprechender Genotypisierungsverfahren zur Vorhersage des Phänotyps ist dafür eine vordringliche Aufgabe und Voraussetzung. Deshalb sollte es im Rahmen einer optimierten Arzneimitteltherapie vordringliche Aufgabe sein, pharmakogenetische Diagnostik frühzeitig, analog zu anderen Laboruntersuchungen, in der klinischen Routine einzusetzen.“ Schwab, Dtsch Arztebl 2002; 99: A 497–504 [Heft 8]

ZUSAMMENFASSUNG

Zahlreiche der im klinischen Alltag eingesetzten Medikamente werden über CYP2D6 metabolisiert. Für CYP2D6 sind eine Reihe von Genpolymorphismen beschrieben, die mit einem Funktionsverlust und erhöhten Plasmakonzentrationen der Medikamente einhergehen. Aufgrund der stark erhöhten Plasmakonzentrationen bei Patienten mit gestörtem CYP2D6-Metabolismus erwartet man neben einer verstärkten Wirkung auch ein erhöhtes Risiko für unerwünschte Arzneimittelwirkungen. Betroffen von CYP2D6-Polymorphismen sind z.B. Betablocker wie Metoprolol, die derzeit auch zur perioperativen kardiovaskulären Protektion eingesetzt werden. In der Literatur gibt es bisher keine prospektiven Daten zur klinischen Bedeutung von Polymorphismen des CYP2D6-Gens für Patienten in der perioperativen Phase.

Die aktuelle Arbeit bildet den zweiten Teil einer prospektiven klinischen Studie zur klinischen Bedeutung der CYP2D6 Polymorphismen. In der Studie konnte bisher bei 298 nichtkardiologischen Patienten gezeigt werden, dass entgegen den allgemeinen Erwartungen, Patienten die mindestens ein sogenanntes Poormetaboliser-Allel tragen, das mit einer gestörten CYP2D6-Aktivität einhergeht, ein erniedrigtes Risiko für unerwünschte Ereignisse in der perioperativen Phase haben. Die genaue Analyse der Daten deutete an, dass mehr noch als die Zahl der PM-Allele, die Zahl der vollfunktionellen Allele von Bedeutung sein könnte. Dies genauer zu untersuchen war der wesentliche Inhalt dieser Arbeit. Hierzu sollten ergänzend zu den bereits bekannten Daten nun auch Duplikationen des CYP2D6-Gens und Polymorphismen, die mit einer intermediären CYP2D6-Aktivität einhergehen (IM-Allele), bestimmt werden.

Wesentliches Ergebnis der ergänzenden und genaueren Analyse des CYP2D6-Gens ist, dass sich bei 22 Patienten (7,4%) eine Reklassifikation des erwarteten funktionellen Typs ergeben hat.

Basierend auf der neuen Klassifikation, die nun auch Duplikationen und IM-Allele berücksichtigt, ergaben sich Ereignisraten von 11,1% für Duplikationen, 12,2% für EM/EM- und EM/IM-Genotyp, 5,8% für EM/PM-Genotyp und 2,9 % für IM/PM- und PM/PM-Genotyp.

Die erhöhten Ereignisraten bei Patienten, deren CYP2D6-Allelstatus eine normale bzw. gesteigerten CYP2D6-Aktivität und damit einen raschen Metabolismus erwarten lässt, könnte als Hinweis für eine relative Unterdosierung von kardioprotektiv wirkenden CYP2D6-Substraten wie Metoprolol angesehen werden.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzungen, soweit im Text nicht erklärt:

µg	Mikrogramm
AS	Aminosäuren
ASA	American society of anästhesiologist
Av-Block	Atrio-ventikuläre Blockade
Bp	Basenpaare
CCT	Cranial computer Tomographie
CT	Computer Tomographie
Ct	Cycle threshold
CYP	Cytochrom p450 Enzym
DMSO	Dimethylsulfoxide
DANN	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	2`Deoxynukleoside 5`Triphosphat
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EDV	Elektronische Datenverarbeitung
EKG	Elektrokardiographie
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
G	Gram
H	Stunde
H ₂ O	destilliertes Wasser
HIV	Human Immundefizienz Virus
HS-CRP	Hoch sensitive C-reaktives Protein
KHK	Koronare Herzkrankheit
M	Molar
MHC	Major Histocompatibility Complex
Min	Minuten
MR	Metabolisierungsratio
MRT	Magnet Resonanz Tomographie
Mt	mutiert
NaAc	Natrium-Acetate
Ng	Nanogram
OP	Operation

PCR	Polymerase Chain Reaction
PTT	Partielle Thromboplastin Zeit
Rpm	Rotation pro Minute
RT	Raumtemperatur
Sek	Sekunden
TAMRA	N,N,N,N-tetramethyl-6-carboxyrhodamine
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
TZ	Thrombinzeit
UV-Licht	Ultraviolett-Licht
VIC	Fluorecin Dye
Wt	Wildtyp

LITERATURVERZEICHNIS

Aarskog, N. K. and C. A. Vedeler (2000). "Real-time quantitative polymerase chain reaction. A new method that detects both the peripheral myelin protein 22 duplication in Charcot-Marie-Tooth type 1A disease and the peripheral myelin protein 22 deletion in hereditary neuropathy with liability to pressure palsies." *Hum Genet* 107(5): 494-8.

Bock, K. W., D. Schrenk, et al. (1994). "The influence of environmental and genetic factors on CYP2D6, CYP1A2 and UDP-glucuronosyltransferases in man using sparteine, caffeine, and paracetamol as probes." *Pharmacogenetics* 4(4): 209-18.

Cleland, J. G., A. Cohen-Solal, et al. (2002). "Management of heart failure in primary care (the IMPROVEMENT of Heart Failure Programme): an international survey." *Lancet* 360(9346): 1631-9.

Distlerath, L. M., P. E. Reilly, et al. (1985). "Purification and characterization of the human liver cytochromes P-450 involved in debrisoquine 4-hydroxylation and phenacetin O-deethylation, two prototypes for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism." *J Biol Chem* 260(15): 9057-67.

Eichelbaum, M., N. Spannbrucker, et al. (1975). "Proceedings: N-oxidation of sparteine in man and its interindividual differences." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 287 Suppl: R94.

Eichelbaum, M., N. Spannbrucker, et al. (1979). "Defective N-oxidation of sparteine in man: a new pharmacogenetic defect." *Eur J Clin Pharmacol* 16(3): 183-7.

Enggaard, T. P., L. Poulsen, et al. (2006). "The analgesic effect of tramadol after intravenous injection in healthy volunteers in relation to CYP2D6." *Anesth Analg* 102(1): 146-50.

Furman, K. D., D. R. Grimm, et al. (2004). "Impact of CYP2D6 intermediate metabolizer alleles on single-dose desipramine pharmacokinetics." *Pharmacogenetics* 14(5): 279-84.

Gonzalez, F. J., F. Vilbois, et al. (1988). "Human debrisoquine 4-hydroxylase (P450IID1): cDNA and deduced amino acid sequence and assignment of the CYP2D locus to chromosome 22." *Genomics* 2(2): 174-9.

Griese EU, Zanger UM, Brudermanns U, Gaedigk A, Mikus G, Morike K, Stuvén T, Eichelbaum M (1998) Assessment of the predictive power of genotypes for the in-vivo catalytic function of CYP2D6 in a German population. *Pharmacogenetics* 8:15– 26

- Ingelman-Sundberg, M. (1999). "Duplication, multiduplication, and amplification of genes encoding drug-metabolizing enzymes: evolutionary, toxicological, and clinical pharmacological aspects." *Drug Metab Rev* 31(2): 449-59.
- Ingelman-Sundberg, M., M. Oscarson, et al. (2001). "Human cytochrome P-450 (CYP) genes: a web page for the nomenclature of alleles." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10(12): 1307-8.
- Juul, A. B., J. Wetterslev, et al. (2006). "Effect of perioperative beta blockade in patients with diabetes undergoing major non-cardiac surgery: randomised placebo controlled, blinded multicentre trial." *Bmj* 332(7556): 1482.
- Kimura, S., M. Umeno, et al. (1989). "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* 45(6): 889-904.
- Kubota, T., Y. Yamaura, et al. (2000). "Frequencies of CYP2D6 mutant alleles in a normal Japanese population and metabolic activity of dextromethorphan O-demethylation in different CYP2D6 genotypes." *Br J Clin Pharmacol* 50(1): 31-4.
- Leathart, J. B., S. J. London, et al. (1998). "CYP2D6 phenotype-genotype relationships in African-Americans and Caucasians in Los Angeles." *Pharmacogenetics* 8(6): 529-41.
- Lee TH, Marcantonio ER, Mangione CM, Thomas EJ, Polanczyk CA, Cook EF, Sugarbaker DJ, Donaldson MC, Poss R, Ho KK, Ludwig LE, Pedan A, Goldman L.
Derivation and prospective validation of a simple index for prediction of cardiac risk of major noncardiac surgery. *Circulation*. 1999 Sep 7;100(10):1043-9.
- Lewin I, Lerner AG, Green SH, Del Guercio LR, Siegel JH.
Physical class and physiologic status in the prediction of operative mortality in the aged sick. *Ann Surg*. 1971 Aug;174(2):217-31. No abstract available.
- Maas, R. and R. H. Boger (2003). "Antihypertensive therapy: special focus on drug interactions." *Expert Opin Drug Saf* 2(6): 549-79.
- Mahgoub, A., J. R. Idle, et al. (1977). "Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man." *Lancet* 2(8038): 584-6.

- Mangano, D. T., E. L. Layug, et al. (1996). "Effect of atenolol on mortality and cardiovascular morbidity after noncardiac surgery. Multicenter Study of Perioperative Ischemia Research Group." *N Engl J Med* 335(23): 1713-20.
- McGory, M. L., M. A. Maggard, et al. (2005). "A meta-analysis of perioperative beta blockade: what is the actual risk reduction?" *Surgery* 138(2): 171-9.
- Mullis, K. B. and F. A. Faloona (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." *Methods Enzymol* 155: 335-50.
- Raimundo, S., J. Fischer, et al. (2000). "Elucidation of the genetic basis of the common 'intermediate metabolizer' phenotype for drug oxidation by CYP2D6." *Pharmacogenetics* 10(7): 577-81.
- Raimundo, S., C. Toscano, et al. (2004). "A novel intronic mutation, 2988G>A, with high predictivity for impaired function of cytochrome P450 2D6 in white subjects." *Clin Pharmacol Ther* 76(2): 128-38.
- Rau, T., R. Heide, et al. (2002). "Effect of the CYP2D6 genotype on metoprolol metabolism persists during long-term treatment." *Pharmacogenetics* 12(6): 465-72.
- Rau, T., G. Wohlleben, et al. (2004). "CYP2D6 genotype: impact on adverse effects and nonresponse during treatment with antidepressants-a pilot study." *Clin Pharmacol Ther* 75(5): 386-93.
- Rowland, K., W. W. Yeo, et al. (1994). "Inhibition of CYP2D6 activity by treatment with propranolol and the role of 4-hydroxy propranolol." *Br J Clin Pharmacol* 38(1): 9-14.
- Sachse, C., J. Brockmoller, et al. (1997). "Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences." *Am J Hum Genet* 60(2): 284-95.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5463-7.
- Schaeffeler, E., M. Schwab, et al. (2003). "CYP2D6 genotyping strategy based on gene copy number determination by TaqMan real-time PCR." *Hum Mutat* 22(6): 476-85.
- Schwab, M. Marx, C. et al. (2002). "Pharmakogenetic der Zytochrom-P-450-Enzyme. Bedeutung für Wirkungen und Nebenwirkungen von Medikamenten" *Dtsch Ärztebl.* 2002; 99: A 497-504 [Heft 8]
- Stamer, U. M., K. Lehnen, et al. (2003). "Impact of CYP2D6 genotype on postoperative tramadol

analgesia." *Pain* 105(1-2): 231-8.

Steimer, W., K. Zopf, et al. (2004). "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* 50(9): 1623-33.

Wuttke, H., T. Rau, et al. (2002). "Increased frequency of cytochrome P450 2D6 poor metabolizers among patients with metoprolol-associated adverse effects." *Clin Pharmacol Ther* 72(4): 429-37.

Zanger, U. M., J. Fischer, et al. (2001). "Comprehensive analysis of the genetic factors determining expression and function of hepatic CYP2D6." *Pharmacogenetics* 11(7): 573-85.

Zanger, U. M., S. Raimundo, et al. (2004). "Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369(1): 23-37.

DANKSAGUNG

Abschließend möchte ich mich hier bei Herrn Prof. Dr. R. Böger und Herrn Prof. Dr. C. Wagener für die Möglichkeit der Promotion und die Überantwortung des Themas bedanken.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Dr. Renke Maas, der als mein Betreuer und Arbeitsgruppenleiter nicht nur fachlich versiert war.

Die Zahl derer, denen ich im Labor danken muss, ist groß!

Die Arbeit wäre nicht zu diesem Ende gekommen, hätte mich nicht Dr. Thomas Streichert bei der Gestaltung mit viel Routine unterstützt.

Und wem hätte ich mehr zu danken, als meiner Frau Zakiéh, die auf dem langen Weg viel Last mitgetragen hat!

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten:

Vor- und Zuname: Munif Haddad
Geburtsdatum: 10.03.1963
Geburtsort: Yabroud (Syrien)
Nationalität: Deutsch
Familienstand: verheiratet
Konfession: Römisch-katholisch
Meldeadresse: Sedanstrasse 24, 20146 Hamburg

Ausbildung:

Schulische Ausbildung:

- Besuch der Grundschule (Yabroud/Syrien): 1969 - 1975
- Besuch des Gymnasiums (Yabroud/Syrien):
Sekundarstufe I (Mittlere Reife): von 1975 - 1978
Sekundarstufe II: von 1978 bis Juli 1981 mit
Abschluß Abitur

Universitäre Ausbildung:

- Beginn des Studiums der Humanmedizin zum Wintersemester (01.10.1981) an der Medizinfakultät in Aleppo/Syrien
- Ende des Basic-Studiums im Juli 1984. Ende des Clinical-Studiums im Juli 1987
- Praktisches Jahr vom August 1987 bis Juli 1988
- Abschluss des Studiums mit dem 3. Staatsexamen am 29.11.1989

Tätigkeiten:

- 1990 bis 1992 Sanitätsarzt in der syrischen Armee (Wehrdienst-Pflicht)
- Anfang 1993 bis Juni 1994 Assistenzarzt im Allgemeinen Krankenhaus in Yabroud/Syrien
- September 1994 bis Oktober 1997 Assistenzarzt im Allgemeinen Krankenhaus Harburg/Hamburg in der Abteilung für Mikrobiologie bei Herrn Dr. V. Freitag und in der Abteilung für Transfusionsmedizin und Blutgerinnung bei Herrn Prof. Dr. U. Budde
- Seit November 1998 Assistenzarzt im Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Eppendorf in Hamburg bei Herrn Prof. Dr. C. Wagener

EIDESSTAATLICHE VERSICHERUNG:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Munif Haddad

Unterschrift :