

Zusammenfassung

Hintergrund und Ziele: Die katalytische Aktivität des hepatischen Enzyms Cytochrom P450 2D6 (CYP2D6) zeigt große interindividuelle Unterschiede. Der Phänotyp des intermediate metabolizers ist durch eine deutlich reduzierte enzymatische Aktivität charakterisiert. Dieser Phänotyp wird bei Kaukasiern v.a. bei Trägern des *41-Allels beobachtet, die gleichzeitig ein Null-Allel oder ein weiteres *41-Allel besitzen. Die genetische Variation 2988A im Intron 6 gilt als Signaturpolymorphismus des *41-Allels. Diese Studie untersuchte, ob der Polymorphismus 2988G>A im Intron 6 auch funktionell bedeutsam ist, indem das Splicing des CYP2D6 Gens beeinflusst wird.

Methoden: Ausgehend von genomischer DNA von phänotypierten Patienten wurde zunächst durch PCR ein genomischer Abschnitt des CYP2D6-Gens amplifiziert und kloniert. Die Patienten waren homozygot für das *1, das *2 bzw. das *41-Allel. Der Bereich vom Intron 5 bis Intron 7 wurde in den Exon-Trapping Vektor pSPL3 kloniert und die richtige Basenabfolge der drei Minigen-Konstrukte durch Sequenzierung verifiziert. Das Splicing wurde nach Transfektion in eukaryotische Zellen untersucht. Die RNA wurde extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Das Splicing wurde durch PCR und nested PCR sowie Sequenzierung untersucht.

Ergebnisse und Beobachtungen: Bei den Genkonstrukten des *1 und *2-Allels wurde nur ein Spliceprodukt nachgewiesen, welches in Größe und Basenabfolge dem erwarteten Produkt (316 bp) entspricht. Im Falle des *41-Allels wurde neben dem regulären Produkt noch ein aberrantes Transkript (359 bp) nachgewiesen, das durch Verwendung einer alternativen Splicedonorsite entstand, die durch die Variation 2988A im Intron 6 bedingt ist. Bei sehr niedriger Konzentration ließ sich trotz gelungener Transfektion und intaktem Konstrukt kein Spliceprodukt nachweisen, das sowohl Exon 6 als auch Exon 7 des CYP2D6-Gens enthält.

Praktische Schlussfolgerungen: Der Polymorphismus 2988G>A ist funktionell bedeutsam. Bei Vorliegen der 2988A-Variante tritt neben dem physiologischen Spliceprodukt ein aberrantes Spliceprodukt auf, das Teile des Introns 6 enthält. Prüft man die funktionellen Effekte der zusätzlichen Basen, so ergibt sich eine Leserasterverschiebung im C-terminalen Abschnitt und ein vorzeitiges Stopcodon. Das Protein dürfte nicht-funktionell sein, da die Häm-Bindungsstelle deletiert ist. Das Transkript kann zudem dem nonsense-mediated decay unterworfen werden, da das vorzeitige Stopcodon diesen Mechanismus vermutlich aktivieren kann. Der Polymorphismus kann darüber hinaus ein Exonskipping zumindest eines der untersuchten Exons auslösen. Zusammenfassend können alle drei Mechanismen (Frameshift/Deletion), Nonsense mediated decay und Exonskipping zu der Verminderung der *41-assoziierten enzymatischen Aktivität beitragen.