

Aus dem Institut für Experimentelle und
Klinische Pharmakologie und Toxikologie
des Zentrums für Experimentelle Medizin
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. Th. Eschenhagen

**Bedeutung des *CYP2D6*-Genpolymorphismus für die Therapiesicherheit
und Wirksamkeit von *CYP2D6*-abhängig metabolisierten Antidepressiva**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von
Gerlinde Wohlleben
aus Nürnberg

Hamburg 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 07.01.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Thomas Eschenhagen

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. K. Wiedemann

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. Martin Lambert

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Entdeckung des <i>CYP2D6</i> -Genpolymorphismus	6
1.2	Hepatische Cytochrom-P450-Isoenzyme.....	8
1.3	<i>CYP2D6</i> -Phänotyp	9
1.4	<i>CYP2D6</i> -Allele	10
1.5	<i>CYP2D6</i> -Genotyp und <i>CYP2D6</i> -Phänotyp	13
1.6	<i>CYP2D6</i> -Substrate.....	15
1.7	<i>CYP2D6</i> und Arzneimittelinteraktionen.....	16
1.8	Affektive Störungen und deren Arzneibehandlung.....	18
1.8.1	Affektive Störungen	18
1.8.2	Antidepressiva.....	18
1.8.2.1	Einteilung und Wirkmechanismen der Antidepressiva.....	19
1.8.2.2	Unerwünschte Arzneimittelwirkungen der Antidepressiva	20
1.8.2.3	Pharmakokinetik der Antidepressiva	21
1.9	<i>CYP2D6</i> -Genpolymorphismus und dessen klinische Relevanz	22
1.10	Zielsetzung.....	25
2	Patienten, Material und Methoden	26
2.1	Patienten.....	26
2.2	<i>CYP2D6</i> -Genotypisierung	28
2.2.1	DNA-Extraktion.....	29
2.2.2	Konzentrationsbestimmung der DNA.....	29
2.2.3	Allel-Differenzierung durch allelspezifische fluoreszierende Sonden	29
2.2.3.1	Versuchsbedingungen	30
2.2.4	<i>Long-range</i> -PCR	31
2.2.4.1	Deletionsanalyse	31
2.2.4.1.1	Versuchsbedingungen.....	33
2.2.4.2	Duplikationsanalyse.....	34
2.2.4.2.1	Versuchsbedingungen.....	35
2.2.5	PCR-RFLP	36
2.2.5.1	Nachweis der Allele <i>CYP2D6</i> *8, *10, *12 und *14.....	37
2.2.5.1.1	Versuchsbedingungen.....	39
2.2.5.1.2	Methodenoptimierung.....	41
2.2.5.2	Nachweis der Allel *2/*41-assoziierten Mutation (2850C>T)	42
2.2.5.2.1	Versuchsbedingungen.....	43
2.2.5.3	Nachweis der Promotermutation (-1584C>G).....	44

2.2.5.3.1	Versuchsbedingungen.....	45
2.3	Statistik.....	46
2.4	Substanzen, Hilfsmittel und Geräte	47
2.4.1	Substanzen	47
2.4.2	Hilfsmittel und Geräte	48
3	Ergebnisse	49
3.1	Patienten	49
3.2	Methodische Ergebnisse der <i>CYP2D6</i> -Genotypisierung.....	51
3.2.1	Allel-Differenzierung	51
3.2.2	<i>Long-range</i> -PCR	52
3.2.2.1	Deletionsanalyse	52
3.2.2.2	Duplikationsanalyse.....	54
3.2.3	PCR-RFLP	55
3.2.3.1	Nachweis der Allele <i>CYP2D6</i> *8, *10, *12 und *14.....	55
3.2.3.2	Nachweis der Allel *2/*41-assoziierten Mutation (2850C>T) und der Promotermutation (-1584C>G)	57
3.3	<i>CYP2D6</i> -Genotyp- und Allelverteilung.....	59
3.3.1	<i>CYP2D6</i> -Genotyp-Verteilung der Patienten mit UAW	60
3.3.2	<i>CYP2D6</i> -Genotyp-Verteilung der Patienten mit Therapieversagen.....	61
3.4	Patienten mit unerwünschten Arzneimittelwirkungen unter Antidepressiva-Therapie: PM versus Non-PM	62
3.4.1	Demographische Daten, Therapieindikationen und weitere Erkrankungen (PM versus Non-PM).....	62
3.4.2	Unerwünschte Arzneimittelwirkungen unter Antidepressiva-Therapie (PM versus Non-PM)	63
3.4.3	Therapeutische Konsequenzen nach Auftreten der UAW unter Antidepressiva-Therapie (PM versus Non-PM).....	65
3.4.4	Therapeutische Konsequenzen nach Auftreten der UAW unter Antidepressiva-Therapie (PM und IM versus EM)	66
3.4.5	Begleitmedikation (PM versus Non-PM)	66
3.5	Patienten mit Therapieversagen unter Antidepressiva-Therapie: UM versus Non-UM	66
3.5.1	Demographische Daten, Therapieindikationen und weitere Erkrankungen (UM versus Non-UM)	67
3.5.2	Therapeutische Konsequenzen bei Therapieversagen unter Antidepressiva-Therapie (UM versus Non-UM)	67
4	Diskussion	69

5	Zusammenfassung.....	74
5.1	Hintergrund und Ziele	74
5.2	Methoden	74
5.3	Ergebnisse und Beobachtungen.....	75
5.4	Praktische Schlussfolgerungen	75
6	Literaturverzeichnis	76
7	Abkürzungsverzeichnis	84
8	Verzeichnis der Vorveröffentlichungen.....	86
9	Danksagung.....	87
10	Lebenslauf	88
11	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	89
12	Anhang: Fragebogen	90

1 Einleitung

1.1 Entdeckung des CYP2D6-Genpolymorphismus

Ende der 70er Jahre entdeckten Ärzte in London und Bonn während Pharmakokinetik-Studien unabhängig voneinander, dass es bei einigen Probanden nach Verabreichung des Antiarrhythmikums Spartein bzw. des Antihypertensivums Debrisoquin zu unerwartet starken unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW) kam. Nach Einnahme von Spartein traten UAW, wie Übelkeit, Doppelbilder, Verschwommensehen, Schwindel und Kopfschmerzen auf. Debrisoquin dagegen führte bei einigen Patienten zu ausgeprägter orthostatischer Hypotonie. Weitere Untersuchungen ergaben schließlich, dass die Ursache hierfür in einem verminderten Metabolismus zu finden war. Dies führte dazu, dass trotz gleicher Dosierung die Plasmakonzentrationen der getesteten Substanzen bei den betreffenden Patienten um ein Vielfaches höher waren.

Nach einmaliger Einnahme von Spartein bzw. Debrisoquin wurden die Konzentrationen der Muttersubstanz und deren Metabolite (4-Hydroxydebrisoquin bzw. 2- und 5-Dehydrospartein) im Urin bestimmt. Auffällig war dabei, dass der metabolische Quotient (MQ, *metabolic ratio*), das Verhältnis von Muttersubstanz zu Metabolit, bimodal verteilt war, was bedeutet, dass sich zwei voneinander getrennte Verteilungsschwerpunkte ergaben. So wurden die Probanden anhand ihres MQ in zwei Gruppen eingeteilt: *Extensive metabolizer* (EM) mit niedrigem MQ und hoher metabolischer Aktivität und *poor metabolizer* (PM) mit hohem MQ und deutlich reduzierter oder nicht vorhandener metabolischer Aktivität. Im Gegensatz zu EM waren bei PM die Metabolite im Urin nur in geringen Konzentrationen bzw. gar nicht nachweisbar, während die Muttersubstanz nahezu vollständig im Urin wiedergefunden wurde. (Mahgoub et al. 1977, Eichelbaum et al. 1979, Meyer und Zanger 1997, Meyer 2000). Abbildung 1 zeigt die multimodale Verteilung des MQ nach einmaliger Einnahme von Debrisoquin und die Grenze, die EM und PM voneinander trennt (modifiziert nach Bertilsson und Dahl 1996).

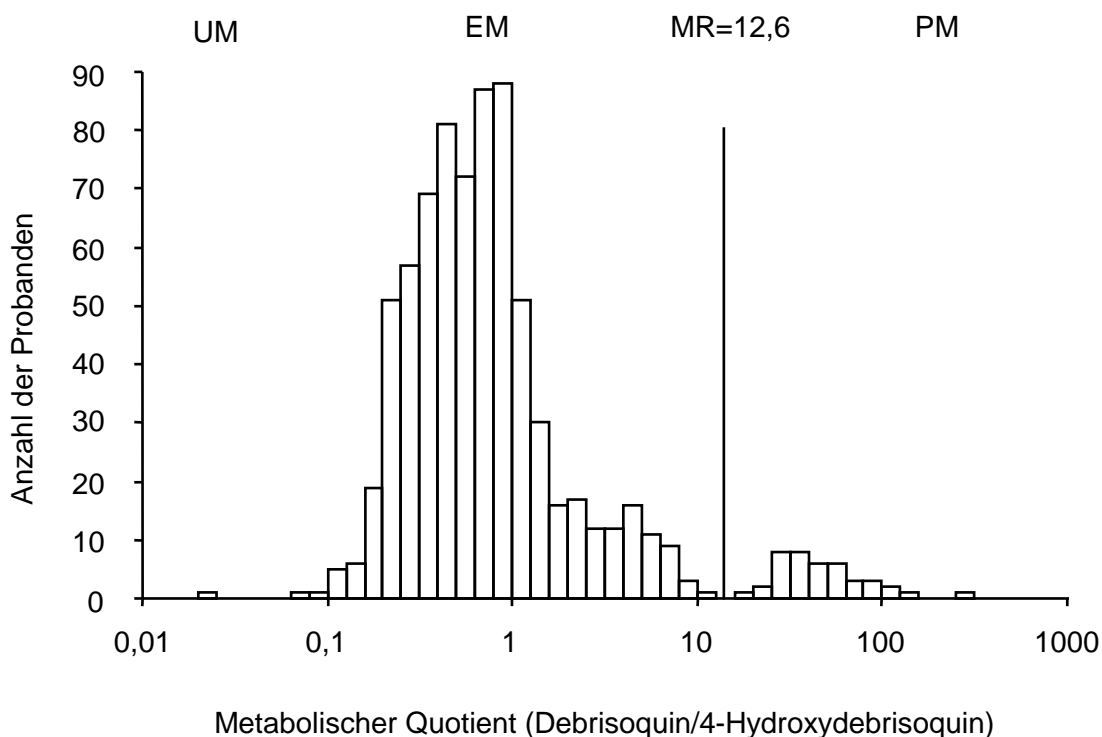


Abbildung 1: Verteilung des metabolischen Quotienten (Debrisoquin/4-Hydroxydebrisoquin) im Urin bei gesunden Probanden. Die Grenze zwischen EM und PM liegt bei einem MQ von 12,6. PM weisen einen MQ > 12,6 auf (modifiziert nach Bertilsson und Dahl 1996).

Die Verteilung des MQ und Untersuchungen der Familienmitglieder von PM deuteten auf einen monogenetisch kontrollierten Arzneistoffabbau hin. Die Befunde legten nahe, dass der PM-Status einem autosomal-rezessiven Erbgang folgt.

Der verminderte Abbau von Debrisoquin bzw. Spartein und die daraus resultierenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen wurden auf einen pharmakogenetischen Effekt zurückgeführt, der Debrisoquin-Spartein-Polymorphismus genannt wurde. Später wurde durch weitere Studien schließlich das *CYP2D6*-Gen identifiziert, das den oxidativen Abbau von Debrisoquin und Spartein bewirkt (Gonzalez FJ et al. 1988a, Gonzalez FJ et al. 1988b). Der *CYP2D6*-Genpolymorphismus ist mittlerweile eines der am besten erforschten Beispiele für den Einfluss von Genpolymorphismen auf den Arzneistoffmetabolismus (Meyer und Zanger 1997, Meyer 2000).

Anfang der 90er Jahre führten Wissenschaftler in Stockholm und Huddinge zusammen eine große Studie über Einflüsse des Debrisoquin-Spartein-Polymorphismus auf die Metabolisierung von Desmethylimipramin bei 1011 Schweden durch.

Fünf Probanden aus zwei verschiedenen Familien fielen dabei mit einem sehr niedrigen MQ ($<0,1$) von Debrisoquin/OH-Debrisoquin auf, so dass auf molekulargenetischer Ebene nach der Ursache für diesen beschleunigten Metabolismus gesucht wurde.

Zwei Söhne der einen Familie zeigten bei diesen molekulargenetischen Untersuchungen zwei Kopien des *CYP2D6*-Gens, wohingegen in der anderen Familie der Vater und dessen zwei Kinder 12 *CYP2D6*-Genkopien aufwiesen.

Die Ergebnisse dieser Genanalysen stellen den ersten beschriebenen Fall von genetisch fixierter vererbter Genamplifikation dar (Johansson et al. 1993, Ingelman-Sundberg et al. 1999).

1.2 Hepatische Cytochrom-P450-Isoenzyme

Die Gene der P450-Enzymfamilie entstanden vor mindestens 3,5 Mrd. Jahren, noch vor der Trennung von Prokaryonten und Eukaryonten (Nebert et al. 1989). Aus diesem Grund kommen die P450-Enzyme sowohl in Mikrosomen als auch in Mitochondrien von Leberzellen vor. Aber auch in extrahepatischen Geweben, wie z.B. im Gastrointestinaltrakt (Prueksaritanont et al. 1995), im Gehirn (Warner et al. 1993) und in der Lunge (Guidice et al. 1997), konnten Cytochrom-P450-Enzyme nachgewiesen werden.

Die Isoenzyme der Cytochrom-P450-Familie werden als CYP_nX_m bezeichnet, wobei n für die Nummer der Genfamilie steht, X den Buchstaben der Gensubfamilie angibt, und an der Stelle von m die Gennummer genannt wird. Beim Menschen sind mehr als 18 verschiedene Genfamilien und 43 Subfamilien bekannt (Nelson 2001). Die Gene von Subfamilien befinden sich immer auf einem Chromosom (Ketter et al. 1995). Für den Arzneistoffmetabolismus sind vor allem 4 Genfamilien mit folgenden Subfamilien von zentraler Bedeutung: CYP3A (v.a. CYP3A4) ist für die Elimination von mehr als der Hälfte aller Arzneistoffe zumindest teilweise verantwortlich, daneben sind vor allem noch CYP1A2, die CYP2C-Unterfamilie und CYP2D6 am Arzneistoffmetabolismus beteiligt (Ring und Wrighton 2000).

Der Anteil der in der klinischen Praxis gebräuchlichen Arzneimittel, an dessen Metabolisierung CYP2D6 beteiligt ist, liegt bei etwa 25% (Benet et al. 1996). Verglichen mit CYP3A und CYP2C, die mit einem Anteil von 30% bzw. 20% die am stärksten exprimierten Subfamilien in der menschlichen Leber sind, liegt der Anteil

von CYP2D6 am hepatischen Cytochrom-P450-Enzymkontingent nur bei durchschnittlich 2-5% (Shimada et al. 1994).

Eine wesentliche Aufgabe des Cytochrom-P450-Enzymsystems ist die Biotransformation von Xenobiotika. Darunter versteht man natürlich vorkommende oder künstlich hergestellte Fremdstoffe mit meist lipophilem Charakter. Diese Stoffe werden durch Einfügung oder Abspaltung funktioneller Gruppen, meist über oxidative oder reduktive Prozesse im Rahmen der Phase-I-Reaktion, in hydrophilere und somit für den Körper renal oder biliär leichter eliminierbare Metaboliten überführt (Fichtl et al. 2001).

Neben dem *CYP2D6*-Genpolymorphismus wurden noch die bei Kaukasiern weniger häufig vorkommenden *CYP2C9*- und *CYP2C19*-Genpolymorphismen beschrieben (Flockhart 2002). Innerhalb der kaukasischen Bevölkerung kommen *CYP2C9-poor metabolizer* mit einer Häufigkeit von ca. 2% vor, während der Anteil an *CYP2C19-poor metabolizern* bei 4% liegt (Brockmöller et al. 1996). Allerdings ist die Vererbung hier nicht rezessiv; häufig werden Einschränkungen der metabolischen Kapazität bereits bei Vorliegen eines vermindert aktiven Allels beobachtet. Genetische Varianten werden erst dann als Genpolymorphismus bezeichnet, wenn sie in der Bevölkerung mit einer Häufigkeit von mindestens 1% vorkommen (Vogel und Motulsky 1986).

1.3 CYP2D6-Phänotyp

Die Aktivität des CYP2D6-Enzyms kann mit Hilfe von Testsubstanzen bestimmt werden, die vorwiegend über das CYP2D6-Enzym abgebaut werden. Klassische Substanzen sind die oben erwähnten Arzneistoffe Debrisoquin und Spartein. Nach einmaliger Einnahme von Debrisoquin bzw. Spartein wird im Urin das Verhältnis von unverändert ausgeschiedener Muttersubstanz zu Metabolit bestimmt (siehe 1.1). Als ein weiteres spezifisches Substrat wird wegen seines günstigeren Nebenwirkungsprofils auch das Antitussivum Dextromethorphan zur Phänotypisierung verwendet. Zu berücksichtigen ist dabei, dass der Abbau von Dextromethorphan nicht nur durch CYP2D6 erfolgt (Smith et al. 1998).

Anhand des metabolischen Quotienten (MQ) werden Individuen heute in vier Gruppen eingeteilt: *Ultrarapid metabolizer* (UM), *extensive metabolizer* (EM), *intermediate metabolizer* (IM) und *poor metabolizer* (PM) (Meyer und Zanger 1997). Früher wurden die UM, EM und IM als EM zusammengefasst und den PM

gegenübergestellt. Die Enzymaktivität ist interindividuell sehr unterschiedlich. In der ehemals als EM klassifizierten Gruppe unterschied sich der metabolische Quotient um den Faktor 1000.

1.4 CYP2D6-Allele

Ende der 80er Jahre ergaben Untersuchungen zur Molekulargenetik des Debrisoquin-Spartein-Polymorphismus, dass sich das Gen, welches für das CYP2D6-Enzym kodiert, auf dem langen Arm von Chromosom 22 (q13.1) befindet. Es besteht aus 9 Exons, die zusammen mit den Introns ca. 4400 Basenpaare (bp) umspannen und ist Teil eines Genclusters, zu dem die hoch homologen Pseudogene *CYP2D7* und *CYP2D8* gehören, welche ebenfalls aus jeweils 9 Exons bestehen (Eichelbaum et al. 1987, Gonzalez et al. 1988, Kimura et al. 1989, Gough et al. 1993).

Inzwischen sind mehr als 40 verschiedene *CYP2D6*-Allele beschrieben worden (*Home Page of the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee 2007*). Unter Berücksichtigung sämtlicher Alleluntergruppen können zurzeit sogar über 80 verschiedene Allele unterschieden werden.

Die meisten *CYP2D6*-Allele sind durch eine Kombination von Mutationen gekennzeichnet. In der Regel wirkt sich nach bisherigen Untersuchungen jedoch nur eine genetische Variation maßgeblich auf die CYP2D6-Aktivität aus. Diese genetischen Veränderungen werden zur Diagnostik des jeweiligen Allels verwendet. Aufgrund der gleichen Schlüssel-Mutation werden Allele zu Allel-Familien zusammengefasst.

Die häufigsten Mutationen, die im *CYP2D6*-Gen vorkommen, sind Veränderungen einzelner Nukleotide, wie Deletion, Insertion oder Austausch. Allerdings kommen auch Deletion und Duplikation (bzw. höhergradige Amplifikationen) des kompletten Gens vor. Die Auswirkungen der veränderten Gensequenz auf die Expression bzw. Funktion des CYP2D6-Enzyms reichen von einfachen Punktmutationen ohne funktionelle Konsequenz bis zu Mutationen, die zu einer Genvariante mit erhöhter, reduzierter oder fehlender CYP2D6-Aktivität führen (Griese et al. 1998). Die unterschiedlichen Genotypen des *CYP2D6*-Polymorphismus können somit funktionell unterschiedliche Phänotypen zur Folge haben, müssen es aber nicht.

Daly et al. (1996) schlugen ein vereinheitlichendes System der Nomenklatur der *CYP2D6*-Allele vor. Demzufolge wird das normal aktive Wildtyp-Allel als *CYP2D6**1 definiert und das in seiner Aktivität ähnliche, früher mit L bezeichnete Allel wird heute als *CYP2D6**2 bezeichnet. Bei Kaukasiern sind die vier häufigsten Null-Allele, die zu einer Enzymdefizienz führen, *CYP2D6**3, *4, *5 und *6 (früher: A, B, D und T). In ihrer Aktivität zwischen normal aktiven Allelen und Null-Allelen liegen die funktionellen Allele mit deutlich reduzierter, jedoch noch vorhandener Aktivität von *CYP2D6* (z.B. *CYP2D6**9, *10 und *41).

Die Duplikation bzw. Amplifikation eines normal aktiven Allels ($n \times CYP2D6^*1$ oder *2) ist mit einer erhöhten Aktivität des *CYP2D6*-Enzyms verbunden. Johansson et al. (1993) beobachteten in ihrer Studie, dass eine Beziehung zwischen der Anzahl aktiver Gene und dem metabolischen Quotienten besteht (Gen-Dosis-Effekt). Allerdings sind diese Beobachtungen noch in Unkenntnis der häufig vorkommenden IM-Allele gemacht worden.

Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse einer Studie von Sachse et al. (1997) an 589 Kaukasiern. Es wird die Häufigkeitsverteilung der 19 untersuchten Allele und deren Enzymaktivität *in vivo* angegeben. Die Null-Allele mit ihren sich auf die Enzymaktivität am stärksten auswirkenden Mutationen werden in Tabelle 2 aufgelistet.

Allel	Enzymaktivität <i>in vivo</i>	Frequenz
<i>CYP2D6</i> *1	Normal	36,4%
<i>CYP2D6</i> *1x2	Erhöht	0,51%
<i>CYP2D6</i> *2	Normal	32,4%
<i>CYP2D6</i> *2x2	Erhöht	1,34%
<i>CYP2D6</i> *3	Keine	2,04%
<i>CYP2D6</i> *4	Keine	20,7%
<i>CYP2D6</i> *4x2	Keine	0,08%
<i>CYP2D6</i> *5	Keine	1,95%
<i>CYP2D6</i> *6	Keine	0,93%
<i>CYP2D6</i> *7	Keine	0,08%
<i>CYP2D6</i> *8	Keine	0%
<i>CYP2D6</i> *9	Reduziert	1,78%
<i>CYP2D6</i> *10	Reduziert	1,53%
<i>CYP2D6</i> *11	Keine	0%
<i>CYP2D6</i> *12	Keine	0%
<i>CYP2D6</i> *13	Keine	0%
<i>CYP2D6</i> *14	Keine	0%
<i>CYP2D6</i> *15	Keine	0,08%
<i>CYP2D6</i> *16	Keine	0,08%

Tabelle 1: *CYP2D6*-Allele, deren Auswirkungen auf die Aktivität des *CYP2D6*-Enzyms und Häufigkeit bei gesunden Probanden in Deutschland (modifiziert nach der Homepage des Nomenklatur-Komitees 2002; nach Sachse et al. 1997).

Null-Allel	Diagnostische Mutation	Effekt
<i>CYP2D6</i> *3	2549A>del	Verschiebung des Leserasters
<i>CYP2D6</i> *4	1846G>A	Verschiebung eines Spleißsignals
<i>CYP2D6</i> *5	Komplette Sequenz deletiert	Deletion des kompletten Gens
<i>CYP2D6</i> *6	1707T>del	Verschiebung des Leserasters
<i>CYP2D6</i> *7	2935A>C	H324P
<i>CYP2D6</i> *8	1758G>T	Vorzeitiges Stopcodon
<i>CYP2D6</i> *11	883G>C	Verschiebung eines Spleißsignals
<i>CYP2D6</i> *12	124G>A	G42R, R296C, S486T
<i>CYP2D6</i> *13	<i>CYP2D7P/CYP2D6</i> -Hybrid	Verschiebung des Leserasters
<i>CYP2D6</i> *14	1758G>A	P34S, G169R, R296C, S486T
<i>CYP2D6</i> *15	138insT	Verschiebung des Leserasters
<i>CYP2D6</i> *16	<i>CYP2D7P/CYP2D6</i> -Hybrid	Verschiebung des Leserasters

Tabelle 2: Die untersuchten Null-Allele, deren aktivitätsbestimmende Mutationen und die Veränderungen der Proteinsequenz (modifiziert nach Eichelbaum et al. 1997 und der Homepage des Nomenklatur-Komitees 2002). Die Nummerierung der Nukleotide erfolgte nach der Homepage des Nomenklatur-Komitees (2002). Nukleotid 1620 (A des Startcodons der Translation) in der allgemein als Referenz verwendeten M33388-Sequenz (Kimura et al 1998) entspricht Nukleotid 1 in dieser Tabelle. Allerdings weist diese Sequenz zwei Fehler auf. Eine fehlerfreie Sequenz wurde von Gaedigk et al publiziert (AY545216; 2005).

1.5 *CYP2D6*-Genotyp und *CYP2D6*-Phänotyp

Bei etwa 7-8% der kaukasischen Bevölkerung kommen in beiden *CYP2D6*-Allelen inaktivierende Mutationen vor (Sachse et al. 1997, Griese et al. 1998). Diese Personen verfügen über keine katalytische Aktivität des *CYP2D6*-Enzyms. Phänotypisch sind diese Personen langsame Metabolisierer, sogenannte *poor metabolizer* (PM). Zurzeit sind 17 Null-Allele bekannt (Homepage des Nomenklatur-Komitees 2002). Nach den Ergebnissen der Studien von Broly et al. 1991, Tefre et al. 1994, Saxena et al. 1994, Roots et al. 1994 und Evert et al. 1994 konnten nur durch den Nachweis der 4 häufigsten Null-Allele (*CYP2D6**3, *4, *5 und *6) bereits mehr als 95% der phänotypisch als *poor metabolizer* imponierenden Probanden genotypisch erklärt werden (Sachse et al. 1997).

Ein PM-Phänotyp muss jedoch nicht immer genetisch determiniert sein. Durch Arzneimittelinteraktion kann bei einem Patienten mit EM-Genotyp ein *poor metabolizer*-Phänotyp entstehen (so genannte PM-Phänokopie): Die Plasmakonzentrationen eines *CYP2D6*-Substrates können durch gleichzeitige Einnahme

eines Inhibitors von CYP2D6 (z.B. Chinidin, Fluoxetin, Amiodaron) auch bei EM so hoch ansteigen wie bei einem PM. Bis zur vollen Ausprägung einer Enzyminhibition können 2-3 Wochen vergehen (McInnes und Brodie 1988, Harvey und Preskorn 1996, Wilkinson 2001).

Ca. 11% der kaukasischen Bevölkerung werden aufgrund ihres metabolischen Quotienten zwischen der Gruppe der EM und PM eingeordnet (Bock et al. 1994). Diese als *intermediate metabolizer* (IM) bezeichnete Gruppe ist genotypisch schwieriger zu klassifizieren als die Gruppe der PM (Griese et al. 1998). In dieser Gruppe der *intermediate metabolizer* sind vor allem Heterozygote für ein Null-Allel und ein reduziert aktives Allel zu finden (PM/IM), selten auch Heterozygote für ein Null-Allel und ein normal aktives Allel (PM/EM). In dem Kollektiv der *intermediate metabolizer* kommen auch Individuen vor, die Homozygot für zwei reduziert aktive Allele sind (IM/IM). Aber auch Individuen, die zwei gegenwärtig als normal aktive Allele charakterisiert werden, können in diese Gruppe fallen (Raimundo et al. 2000, Zanger et al. 2001).

Die größte Gruppe, die *extensive metabolizer* (EM, ca. 72% der kaukasischen Bevölkerung; Griese et al. 1998), verfügt über eine normale katalytische Aktivität von CYP2D6 und ist ebenfalls eine genotypisch uneinheitliche Gruppe, bei denen die Individuen jedoch mindestens über ein normal aktives Allel verfügen. Sie umfasst vor allem Homozygote für zwei normal aktive Allele (EM/EM), aber auch Heterozygote für ein normal aktives und ein reduziert aktives Allel (EM/IM). Unter den Individuen, die neben einem normal aktiven Allel ein Null-Allel aufweisen (EM/PM), imponieren die meisten phänotypisch als EM (Raimundo et al. 2000, Zanger et al. 2001, Rau et al. 2002).

Ungefähr 9% der kaukasischen Bevölkerung (Dahl et al. 1995, Griese et al. 1998) weisen eine sehr hohe Metabolisierungskapazität von CYP2D6 auf und werden deshalb als *ultrarapid metabolizer* (UM) bezeichnet. Als Ursache für diesen beschleunigten Metabolismus ist jedoch nur in etwa 10-30% der Fälle eine Duplikation oder Amplifikation eines funktionellen CYP2D6-Allels zu finden (Løvlie et al. 2001). Im Gegensatz zum Antimode in der Häufigkeitsverteilung zwischen EM und PM existiert hier keine scharfe Trenngrenze. Die Wahl des Cut-Off-Wertes zwischen EM und UM bestimmt den Anteil der Patienten mit Duplikation in der Gruppe der UM. Je weiter der Cutoff-Wert des MQ zu kleineren Werten verschoben wird, umso größer wird der Anteil der Patienten mit Genduplikationen. Andere

genetische Varianten, die für den ultraschnellen Metabolismus verantwortlich sind, konnten bisher nicht identifiziert werden. Arzneistoffe, die zu einer CYP2D6-Enzyminduktion führen, sind derzeit nicht bekannt (Eichelbaum et al. 1986). Lediglich bei Schwangeren konnte eine signifikant höhere CYP2D6-Enzymaktivität bei EM beobachtet werden, die eventuell auf eine Induktion durch Steroidhormone zurückzuführen ist (Hogstedt et al. 1983, Wadelius et al. 1997).

In Tabelle 3 werden die verschiedenen *CYP2D6*-Genotypen nach der Anzahl ihrer aktiven Allele pro Genom eingeteilt und deren Häufigkeitsverteilung angegeben.

	CYP2D6-Genotyp	Frequenz
3 aktive Allele:	UM/EM	2,7%
	UM/IM	
2 aktive Allele:	EM/EM	54%
	EM/IM	
	IM/IM	
	UM/PM	
1 aktives Allel:	EM/PM	36%
	IM/PM	
Kein aktives Allel:	PM/PM	7,3%

Tabelle:3 *CYP2D6* Allel-Kombinationen und deren Häufigkeit in der kaukasischen Bevölkerung (modifiziert nach Sachse et al. 1997).

1.6 CYP2D6-Substrate

Obwohl CYP2D6 mit einem relativ geringen Anteil von nur 2-5% am gesamten Cytochrom-P450-Enzymkontingent in der Leber vertreten ist (Shimada et al. 1994), gehört es zu den bedeutendsten Enzymen im Arzneistoffmetabolismus. Es metabolisiert ca. 25% aller in der klinischen Praxis gebräuchlichen Arzneimittel, unter anderem verschiedene Antidepressiva, Neuroleptika, Opiode, Antiarrhythmika, Antihypertensiva, das Antiöstrogen Tamoxifen, einige Beta-Blocker und Antiemetika (Benet et al. 1996, Bertz und Granneman 1997). Mehr als 65 Pharmaka werden vorwiegend über CYP2D6 verstoffwechselt (Wilkinson 2001, Flockhart 2002).

Es gibt Arzneimittel, wie z.B. das trizyklische Antidepressivum Nortriptylin, welche selbst aktiv sind und über CYP2D6 zu einem ebenfalls aktiven Metaboliten abgebaut werden (Nordin und Bertilsson 1995). Bei den meisten Psychopharmaka hingegen ist die Muttersubstanz selbst wirksam, wird aber durch CYP2D6 zu einem

inaktiven Metaboliten verstoffwechselt. Im Gegensatz dazu erlangt das Arzneimittel Codein erst durch die Metabolisierung über CYP2D6 seine analgetische Wirkung (Sindrup und Brøsen 1995, Poulsen et al. 1996).

1.7 CYP2D6 und Arzneimittelinteraktionen

Neben pharmakodynamischen Wechselwirkungen, wie z.B. die Konkurrenz zweier Substanzen am selben Rezeptor, kommen vor allem pharmakokinetische Interaktionen auf der Ebene von Absorption, Verteilung, Metabolisierung und Ausscheidung eines Arzneistoffs vor.

Zu den wichtigsten Mechanismen pharmakokinetischer Interaktionen gehören Enzyminhibition und Enzyminduktion. Durch Beeinflussung der Konzentration oder der Aktivität von Enzymen können Inhibitoren und Induktoren den Arzneistoffmetabolismus verlangsamen oder beschleunigen. Dies kann, besonders bei Medikamenten mit enger therapeutischer Breite, zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen oder zur Unwirksamkeit führen. Die Aktivität bzw. die Konzentration von Enzymen kann durch direkte Inhibition des Enzyms oder durch Modulation der Genexpression beeinflusst werden.

Durch Enzyminhibition kann bei einem Patienten mit EM-Genotyp ein *poor metabolizer* Phänotyp entstehen, was als PM-Phänokopie bezeichnet wird. Als potenter Inhibitor für CYP2D6 gilt das Antiarrhythmikum Chinidin, welches mit hoher Affinität an dieses Enzym bindet, selbst jedoch kein CYP2D6-Substrat ist, also nicht von ihm biotransformiert wird (Brøsen 2000).

Unter den Psychopharmaka sind v.a. in der Gruppe der selektiven Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer (SSRI) bedeutsame CYP2D6-Inhibitoren zu finden. Paroxetin ist der potenteste Inhibitor unter den SSRI. In einer Studie erhöhte Paroxetin die Halbwertszeit von Desipramin nach 20-tägiger Einnahme um das dreifache (Brøsen et al. 1993). Bei zwei Patienten stiegen die Plasmakonzentrationen von Trimipramin und Desmethyltrimipramin während gleichzeitiger Verabreichung von Paroxetin signifikant an, was zu Sedierung und orthostatischer Dysregulation führte (Leinonen et al. 1995). In einem anderen Fall, bei dem ein Patient wegen Schwindel in eine Klinik eingewiesen wurde, sind während gleichzeitiger Einnahme von Clomipramin und Paroxetin außergewöhnlich hohe Plasmakonzentrationen von Clomipramin und Desmethylclomipramin aufgefallen (Skjelbo und Brøsen 1998). Fluoxetin zählt ebenfalls zu den wichtigen

CYP2D6-Inhibitoren. In klinischen Studien konnte bei Koadministration eine starke Beeinträchtigung des Desipramin-Abbaus beobachtet werden (Preskorn et al. 1994). In einigen Fall-Berichten, bei denen es zu toxischen Erscheinungen kam, wurde ein bis zu 5-facher Anstieg der Plasmakonzentrationen von Nortriptylin, Clomipramin und Desipramin bei gleichzeitiger Einnahme von Fluoxetin beschrieben (Vaughan 1988, Preskorn et al. 1990, Vandael et al. 1992, Westermeyer 1991). Die SSRI Sertralin und Citalopram hingegen verfügen über eine schwächere inhibitorische Potenz, wobei in einer Studie nachgewiesen wurde, dass bei Einsatz von höheren Sertralin-Dosen eine Inhibition von CYP2D6 zu beobachten ist (Crewe et al. 1992, Preskorn et al. 1994, Sproule et al. 1997). Der inhibitorische Effekt von Fluvoxamin auf CYP2D6 scheint sehr gering zu sein (Spina et al. 1993, Baumann 1996).

Unter den trizyklischen Antidepressiva sind keine wesentlichen CYP2D6-Inhibitoren zu finden. Da sie aber CYP2D6-Substrate sind und eine relativ geringe therapeutische Breite haben, kann es unter einer Koadministration mit CYP2D6-Inhibitoren zu UAW kommen. Auch tetrazyklische und AD mit anderen Strukturen führen nicht zu einer klinisch relevanten CYP2D6-Inhibition. Innerhalb der Wirkstoffgruppe der MAO-Hemmer ist Moclobemid ein moderater bis starker CYP2D6-Inhibitor (Gram et al. 1995).

Einige klassische Neuroleptika haben ebenfalls die Fähigkeit, CYP2D6 zu inhibieren. Unter ihnen sind Chlorpromazin, Levomepromazin, Perphenazin und Thioridazin die Wirkstoffe mit der stärksten inhibitorischen Potenz, wohingegen Haloperidol einen nur mäßigen inhibitorischen Effekt auf CYP2D6 ausübt. Über die neueren Antipsychotika wurde bisher zu diesem Thema nur wenig veröffentlicht. Die verfügbaren Daten legen jedoch nahe, dass Clozapin und Sertindol schwache CYP2D6-Inhibitoren sind (Otani und Aoshima, 2000).

Bisher sind keine Arzneimittel bekannt, die das CYP2D6-Enzym induzieren können. Eine Liste von CYP2D6-Inhibitoren wurde von D.A. Flockhart zusammengestellt und im Internet veröffentlicht (<http://medicine.iupui.edu/flockhart>).

1.8 Affektive Störungen und deren Arzneibehandlung

1.8.1 Affektive Störungen

Unter affektiven Störungen versteht man eine krankhafte psychische Verstimmung in Richtung Depression oder Manie ohne erkennbaren äußeren Anlass oder organische Erkrankung. Die Erkrankung verläuft häufig in Phasen, die durchschnittlich etwa 6 Monate andauern und von beschwerdefreien Intervallen unterbrochen werden. In etwa 65% der Fälle verlaufen affektive Psychosen unipolar (nur depressive Phasen), in 30% bipolar (depressive und manische Phasen) und bei ca. 5% kommt es ausschließlich zu manischen Episoden. Leitsymptome der endogenen Depression sind neben depressiver Verstimmung die Hemmung von Antrieb und Denken, sowie Schlafstörungen und Suizidgedanken. Die typischen Symptome der Manie sind eine situationsinadäquate, anhaltend gehobene Stimmung und Antriebssteigerung, Ideenflucht sowie Selbstüberschätzung. Das durchschnittliche Manifestationsalter für den Ausbruch der Erkrankung liegt zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr. Frauen sind etwa doppelt so häufig betroffen wie Männer. Man geht heute von einer multifaktoriellen Ätiopathogenese aus, wobei die genetische Disposition ein wesentlicher Faktor zu sein scheint. Aus neurobiologischer Sicht kann die Depression mit einem Mangel an Noradrenalin, Serotonin und Dopamin verbunden sein (Laux 1995, Gleixner et al. 2000). Zwar ist die Erhöhung der Neurotransmitter-Konzentration für die Wirkung von Antidepressiva bedeutsam; was jedoch letztendlich den antidepressiven Effekt bewirkt, ist nicht bekannt. Dabei setzt die antidepressive Wirkung mit einer klinisch bedeutsamen Latenz (ca. 2 bis 4 Wochen) ein.

1.8.2 Antidepressiva

Als Antidepressiva werden Wirkstoffe bezeichnet, die in der Lage sind, eine pathologisch gesenkte Grundstimmung zu heben und in geringerem Ausmaß auch depressive Wahngedanken zu beseitigen. Einige vermögen den Antrieb zu steigern, andere hingegen wirken sedierend. Neben dem Hauptindikationsgebiet der Depression werden Antidepressiva auch zur Behandlung von Angststörungen, Zwangssyndromen, Bulimie und adjuvant zur Therapie chronischer Schmerzen eingesetzt (Göthert et al. 2001). Die Erfolgsquote bei der Behandlung endogener Depressionen mit Antidepressiva liegt bei 60-70% (Schönhöfer et al. 1992).

1.8.2.1 Einteilung und Wirkmechanismen der Antidepressiva

Antidepressiva lassen sich nach Substanzgruppen einteilen. Die „klassischen“ trizyklischen Antidepressiva entfalten ihre therapeutische Wirkung in der Regel durch Hemmung der Wiederaufnahme von Noradrenalin und/oder Serotonin in das präsynaptische Neuron. Nach der klinischen Wirkkomponente werden sie nach Kielholz und Pöldinger in drei Hauptgruppen eingeteilt (Mutschler 1996):

1. Imipramin-Typ:

Wirkung: ausgeprägt stimmungsaufhellend, psychomotorisch ausgeglichen;

Indikation: Vital-depressives Syndrom;

2. Desipramin-Typ:

Wirkung: schwächer stimmungsaufhellend, psychomotorisch aktivierend, antriebssteigernd, sowie eher Angst-fördernd als Angst-unterdrückend;

Indikation: Gehemmt-apathisches depressives Syndrom;

3. Amitriptylin-Typ:

Wirkung: schwächer stimmungsaufhellend, psychomotorisch dämpfend, antriebshemmend und anxiolytisch;

Indikation: Agitiert-ängstliches depressives Syndrom;

Zu den tetrazyklischen Antidepressiva zählen die Wirkstoffe Mianserin und Maprotilin, die vor allem bei ängstlich-agitierten Depressionen wegen ihrer dämpfenden Wirkungskomponente eingesetzt werden. In ihren sonstigen Eigenschaften entsprechen sie weitgehend den trizyklischen Antidepressiva, wobei die unerwünschten anticholinergen Nebenwirkungen weniger ausgeprägt sind (Mutschler 1996). Mianserin hemmt die Wiederaufnahme von NA und Serotonin kaum, steigert jedoch die NA-Freisetzung durch Blockade der inhibitorischen präsynaptischen Alpha2-Autorezeptoren (Göthert et al. 2001). Die sedierende Wirkung wird überwiegend durch eine Blockade von zentralen histaminergen Rezeptoren bewirkt.

Die MAO-Inhibitoren Tranylcypromin und Moclobemid hemmen die oxidative Desaminierung von Noradrenalin, Serotonin und Dopamin in Gliazellen und neuronalen Axonendigungen. Tranylcypromin hemmt irreversibel die mitochondrialen Enzyme MAO-A und MAO-B, wohingegen das neuere Präparat Moclobemid vor allem den Abbau durch MAO-A (70-80%) reversibel hemmt.

Tranlycypromin und Moclobemid werden wegen ihrer stark antriebssteigernden Wirkung bevorzugt bei gehemmt-depressiven Syndromen eingesetzt, wenn zuvor andere Antidepressiva versagt haben (Göthert et al. 2001). Die antidepressive und anxiolytische Wirkung hingegen ist nur schwach ausgeprägt (Küttler 1996).

Die Substanzgruppe der selektiven Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer (SSRI) hemmen, wie aus dem Namen hervorgeht, hauptsächlich die Wiederaufnahme von Serotonin in die präsynaptischen Terminalen. Sie werden heute vorzugsweise wegen ihrer geringer ausgeprägten Nebenwirkungen verordnet (Göthert et al. 2001). Die therapeutische Breite der selektiven Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer gilt als wesentlich größer als die von trizyklischen Antidepressiva, die bei hohen Dosen ausgesprochen toxisch sind.

Der neue Wirkstoff Reboxetin gehört zur Gruppe der selektiven Noradrenalin-Wiederaufnahme-Hemmer (NARI).

1.8.2.2 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen der Antidepressiva

Außer der Wiederaufnahme-Hemmung von Monoaminen blockieren nichtselektive Wiederaufnahmehemmer, zu denen die meisten Trizyklika gehören, in unterschiedlichem Ausmaß Neurotransmitter-Rezeptoren, wodurch das Nebenwirkungsprofil der einzelnen Substanzgruppen bestimmt wird.

Bei den trizyklischen Antidepressiva stehen die v.a. initial auftretenden anticholinergen Nebenwirkungen, wie Mundtrockenheit, Akkommodationsstörungen, Obstipation und Miktionsbeschwerden im Vordergrund, die durch die Blockade von muskarinergen Rezeptoren hervorgerufen werden. Orthostatische Kreislaufstörungen mit reflektorischer Tachykardie sind Ausdruck einer Blockade peripherer Alpha1-Adrenozeptoren. Zentrale Nebenwirkungen, wie Sedierung und Müdigkeit sind auf eine Blockade von Histamin-Rezeptoren (H1) zurückzuführen. Diese Nebenwirkung ist maßgeblich für das Wirkprofil sedierender AD. Eine Blockade von 5-HT_{2A}-Rezeptoren ist wahrscheinlich die Ursache für Appetitsteigerung und Gewichtszunahme (Göthert et al. 2001).

Die anticholinergen UAW sind bei tetrazyklischen Antidepressiva geringer ausgeprägt. Dafür kam es während Mianserin-Einnahme häufiger zu Agranulozytosen und aplastischen Anämien. Unter Maprotilin-Therapie besteht ein

verglichen mit anderen AD ein höheres Risiko für Krampfanfälle (Mutschler 1996, Schönhöfer et al. 1992).

Als unerwünschte Nebenwirkung der MAO-Hemmer ist vor allem eine exzessive zentrale Stimulation mit Unruhe, Tremor, Schlafstörungen, Halluzinationen und Konvulsionen zu nennen (Schönhöfer et al. 1992). Dosisunabhängig wurde eine Hepatotoxizität beobachtet. Nach Zufuhr Tyramin-haltiger Nahrungsmittel (Käse, Rotwein - Tyramin ist ein indirektes Sympathomimetikum) kann es unter der Behandlung mit Tranylcypromin zu lebensbedrohlichen Bluthochdruckkrisen kommen, weil die zugeführten Amine durch die MAO-Hemmung in der Leber nicht mehr abgebaut werden können (Wellhöner 1997).

Da die Affinität der selektiven Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer zu Neurotransmitter-Rezeptoren, wie z.B. Muscarin-, Alpha1- oder H1-Rezeptoren gering ist, treten kaum anticholinerge, kardiovaskuläre oder sedierende Effekte auf. Sie verursachen gewöhnlich keine Gewichtszunahme und erniedrigen die Krampfschwelle weniger als andere Antidepressiva. Zu Beginn der Behandlung kommt es häufiger zu Kopfschmerzen und gastrointestinalen Beschwerden, wie Übelkeit, Erbrechen und Diarrhöe (Göthert et al. 2001). Die Aufnahme von Serotonin wird auch in Thrombozyten vermindert, was eine erhöhte Blutungsneigung z.B. nach operativen Eingriffen bedingen kann. Selektive Noradrenalin-Wiederaufnahme-Hemmer haben kaum eine Affinität zu adrenergen, muskarinergen und H1-Rezeptoren, wodurch eine geringe Inzidenz von damit in Verbindung stehenden UAW zu erwarten ist. Mundtrockenheit, Obstipation, Hyperhidrosis und Schwindel sind die häufigsten UAW der NARI. Diese werden durch die adrenerge Wirkung der Substanz, also als Nebeneffekt des wirksamkeitsbestimmenden Prinzips selbst, ausgelöst (Möller et al. 2000).

1.8.2.3 Pharmakokinetik der Antidepressiva

Viele pharmakokinetische Eigenschaften der Antidepressiva stehen in Bezug zu ihrer relativ hohen Lipophilie. Die Substanzen werden nach oraler Zufuhr rasch und gut resorbiert und erreichen nach 2-8 Stunden maximale Plasmakonzentrationen. Die orale Bioverfügbarkeit kann bei einigen Substanzen wegen eines ausgeprägten *first pass effects* in der Leber gering sein. Das Verteilungsvolumen ist wegen der ausgeprägten Lipophilie hoch. Des Weiteren besteht eine hohe Plasmaproteinbindung (75-90%). Die Eliminationshalbwertszeiten sind meist relativ

lang (9-90 h). Nach einer Einnahme von 1 bis 3 Wochen können in der Regel konstante therapeutische Plasmakonzentrationen gemessen werden.

1.9 CYP2D6-Genpolymorphismus und dessen klinische Relevanz

Depressionen gehören heute zu den psychischen Erkrankungen, mit denen der Arzt am häufigsten konfrontiert wird. Etwa jeder sechste Einwohner der westlichen Industriebevölkerung erkrankt im Laufe seines Lebens einmal an einer Depression.

Bei ca. 70% der depressiven Patienten kann durch Verabreichung von Antidepressiva innerhalb weniger Wochen eine weitgehende Besserung der Symptomatik erzielt werden (Gleixner et al. 2000). Etwa ein Drittel der Patienten erweist sich jedoch als therapieresistent, was häufig ein Einweisungsgrund zur stationären Behandlung und eine Ursache für überdurchschnittlich lange Liegezeiten ist. Manche der Patienten mit mangelndem Ansprechen auf AD erreichen unter Standarddosierung keine ausreichend hohen Plasmakonzentrationen, was durch einen beschleunigten Medikamentenabbau begründet sein kann. Da die meisten Antidepressiva über CYP2D6 metabolisiert werden, könnte der CYP2D6-Genpolymorphismus eine klinische Relevanz für das Therapieversagen bei der Behandlung psychisch Erkrankter haben. Patienten mit einer Duplikation bzw. Amplifikation des CYP2D6-Gens, so genannte ultraschnelle Metabolisierer (UM) mit erhöhter katalytischer Aktivität, haben nachweislich oft deutlich niedrigere Medikamentenkonzentrationen im Blut und kürzere Eliminationshalbwertszeiten als Patienten mit CYP2D6-Wildtyp (EM). Ultraschnelle Metabolisierer haben aber nur in 10-30% der Fälle eine Duplikation oder Amplifikation des funktionellen CYP2D6-Gens (Løvlie et al. 2001). Die Ursachen für ultraschnellen Metabolismus bei Patienten ohne CYP2D6-Genamplifikation sind derzeit nicht bekannt.

Im Gegensatz zu den UM weisen die so genannten PM (*poor metabolizer*) oft vielfach höhere Medikamentenkonzentrationen und längere Eliminationshalbwertszeiten auf als EM (Fjordside et al. 1999). Die Ursache hierfür liegt auf Genebene, denn PM verfügen über kein funktionsfähiges CYP2D6-Allel und deshalb auch über kein aktives CYP2D6-Enzym. Dies könnte besonders bei den häufig verordneten trizyklischen Antidepressiva von klinischer Relevanz sein, da sie eine enge therapeutische Breite haben und es deshalb bei erhöhten Plasmakonzentrationen schneller zu toxischen Effekten kommen kann. Aber auch unter der Behandlung mit anderen Wirkstoffgruppen kam es bei *poor metabolizern*

zu gefährlichen Nebenwirkungen (Chen et al. 1996). Ein Beispiel hierfür ist ein 9-jähriges Kind, welches unter dem selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer Fluoxetin starke Toxizitätserscheinungen zeigte und letztlich verstarb. Die nach dem Tod durchgeführten Untersuchungen ergaben einen PM-Genotyp (Sallee et al. 2000).

Die klinischen Reaktionen auf eine Therapie mit Antidepressiva in Standarddosierung sind interindividuell sehr unterschiedlich. Es ist bisher nicht möglich vorherzusagen, welcher Patient deutliche unerwünschte Arzneimittelwirkungen erleiden wird und bei welchem Patienten die Antidepressiva-Therapie unwirksam sein wird. Eine Möglichkeit die Antidepressiva-Therapie individuell auf den Patienten abzustimmen, ist der Einsatz des therapeutischen *Drug Monitorings* (TDM). Hierbei werden während der Behandlung Medikamentenkonzentrationen im Blut gemessen und dementsprechend die Dosierung angepasst (Hiemke et al. 2000). Anhand des TDM ist es naturgemäß jedoch nicht möglich, bereits vor Behandlungsbeginn die Patienten zu identifizieren, die ein besonderes Risiko haben, unerwünschte Arzneimittelwirkungen zu entwickeln, oder bei denen mit einer unzureichenden Medikamentenwirkung zu rechnen ist.

Durch eine Untersuchung des *CYP2D6*-Gens kann hingegen bereits vor Behandlungsbeginn der Metabolisierungstyp bestimmt werden. Dies könnte die Einstellung auf die individuell passende Dosierung erleichtern. Für die Identifizierung solcher genetisch bedingter langsamer bzw. ultraschneller Metabolisierer, stand bis vor einiger Zeit ausschließlich die Phänotypisierung mit verschiedenen *CYP2D6*-Testsubstraten zur Verfügung (Debrisoquin, Spartein).

In den letzten Jahren machen effiziente molekularbiologische Methoden es möglich, den genetisch festgelegten Metabolisierungstyp durch einen einmaligen Gentest festzustellen. Risikopatienten könnten hiermit in Zukunft einfach und rasch identifiziert werden, so dass die Dosierung bereits zu Beginn der Antidepressiva-Therapie dem veränderten Metabolismus angepasst werden könnte, bzw. auf ein Präparat ausgewichen werden könnte, welches unabhängig von *CYP2D6* verstoffwechselt wird. Der Genotyp ist zudem unabhängig von allen anderen Variablen und lebenslang von gleicher Bedeutung. Der Patient könnte durch diesen einmaligen Gentest sein gesamtes Leben den Vorteil nutzen, bei allen Medikamenten, die über *CYP2D6* verstoffwechselt werden, das Risiko von unerwünschten Arzneimittelwirkungen bzw. mangelnder Wirksamkeit durch

Dosisanpassung zu reduzieren. Allerdings steht eine prospektive Untersuchung in diesem Zusammenhang mit CYP2D6 aus.

Es ist mittelfristig im Rahmen prospektiver Studien zu prüfen, ob durch ein pharmakogenetisches Screening Überdosierungen von AD ebenso vermieden werden könnten wie suboptimale zeitraubende und klinisch unbefriedigende Therapieversuche. Durch Senkung der Nebenwirkungs- und Nonresponserate bei Antidepressiva-Therapie könnte die Arzneimittelsicherheit und –effektivität verbessert werden und damit die Behandlung psychisch Erkrankter erleichtert und der stationäre Aufenthalt verkürzt bzw. vermieden und somit Kosten eingespart werden (Leon et al. 1998, Chou et al. 2000).

Abbildung 2 zeigt die unterschiedliche Höhe der Plasmakonzentrationen nach Einnahme von Nortriptylin in Abhängigkeit von der Anzahl der vorhandenen Allele bei gesunden Probanden.

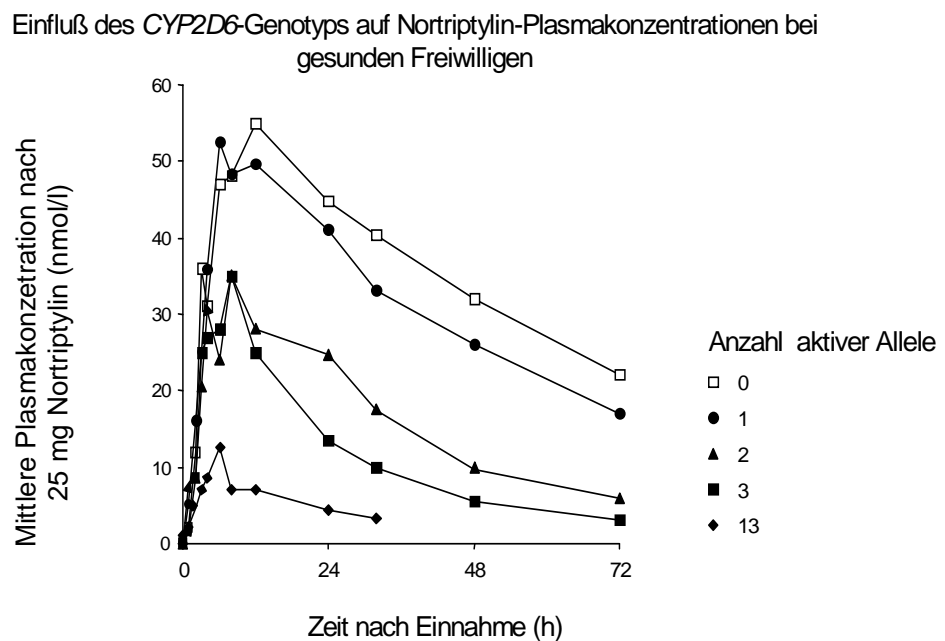


Abbildung 2: Einfluss der verschiedenen *CYP2D6*-Genotypen (0 bis 13 aktive Allele) auf die Nortriptylin-Plasmakonzentration nach Verabreichung von 25 mg Nortriptylin bei gesunden Freiwilligen (Dalén et al. 1998).

1.10 Zielsetzung

Die vorliegende Studie überprüfte in einem retrospektiven Ansatz, ob in einem Kollektiv von Patienten, bei denen unter einer Antidepressiva-Therapie unerwünschte Arzneimittelwirkungen aufgetreten sind, PM im Vergleich zur allgemeinen deutschen Bevölkerung überrepräsentiert sind. Ebenso untersuchte die Studie, ob in der Gruppe der Patienten, bei denen nach mindestens 28 Tagen Antidepressiva-Einnahmedauer kein Therapieerfolg eingetreten ist, die Anzahl von genetisch bedingten UM im Vergleich zur deutschen Bevölkerung überrepräsentiert sind. Die unerwünschten Arzneimittelwirkungen und alle anderen erhobenen Daten wurden anhand eines standardisierten Fragebogens erfasst. Der *CYP2D6*-Genotyp der Patienten wurde durch allel-diskriminierende Sonden-PCR, *Long-range*-PCR und PCR-RFLP analysiert.

2 Patienten, Material und Methoden

Die Studie wurde der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg zur Begutachtung vorgelegt und ihrer Durchführung wurde ohne Auflagen zugestimmt.

2.1 Patienten

Insgesamt wurden 238 niedergelassene Ärzte und Klinikärzte angeschrieben und darum gebeten, von Patienten zu berichten, bei denen es aktuell oder zurückliegend unter einer Therapie mit CYP2D6-abhängig metabolisierten Antidepressiva entweder zu UAW gekommen ist, oder bei denen sich die entsprechenden Medikamente als wirkungslos erwiesen haben. Anhand eines standardisierten Fragebogens (siehe Anhang) wurden folgende Patientendaten erhoben:

- Indikation zur Antidepressiva-Therapie
- Begleiterkrankungen
- Zeitpunkt des Beginns der Antidepressiva-Therapie
- Dosis des Antidepressivums zu Therapiebeginn
- Dosisänderungen des Antidepressivums
- Zeitpunkt des Abbruchs der Antidepressiva-Therapie
- Begleitmedikation während der Antidepressiva-Therapie
- Zeitpunkt des Auftretens der UAW nach Einleitung der Therapie mit dem Antidepressivum
- Art und Ausprägung der UAW
- Therapeutische Konsequenzen, die aus den UAW bzw. dem Therapieversagen resultierten

Die Einschätzung der erhobenen klinischen Reaktionen als unerwünschte Arzneimittelwirkungen bzw. als Therapieversagen wurde zunächst durch den behandelnden Arzt vorgenommen. Die weitere Entscheidung über den Ein- bzw. Ausschluss der Patienten in die Studie erfolgte durch zwei voneinander unabhängige Untersucher des Lehrstuhls für Klinische Pharmakologie der Universität Erlangen-Nürnberg (Th. Rau und Prof. Th. Eschenhagen). Diese Untersucher waren gegenüber dem CYP2D6-Genotyp zum Zeitpunkt der Überprüfung der Ein- und Ausschlusskriterien verblindet.

Die Patienten mussten folgende Einschlusskriterien erfüllen:

- Antidepressivum, welches vorwiegend über CYP2D6 metabolisiert wird
- Klinisch relevante UAW unter Antidepressiva-Therapie in Standarddosierung, die möglichst zu therapeutischen Konsequenzen geführt haben sollen (Dosisreduktion, Therapieabbruch, andere Maßnahmen)
- Ausreichende Therapiedauer (länger als 28 Tage) und mindestens 2/3 der Höchstdosis bei Therapieversagen
- Verlässliche Compliance bei Therapieversagen
- Indikationsbereiche, bei denen ein Therapieerfolg zu erwarten ist
- Keine gleichzeitige Einnahme eines potenten Inhibitors von CYP2D6, dessen Einnahme zu einer PM-Phänokopie führen kann (z.B. Chinidin, Paroxetin, Fluoxetin)
- Fehlen von Leber- und Niereninsuffizienz
- Schriftliche Einverständniserklärung des Patienten

Zwischen Mai 2000 und Februar 2002 sandten 37 Ärzte 103 Blutproben von 55 Patienten mit unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW) und von 48 Patienten mit Therapieversagen, um den *CYP2D6*-Genotyp bestimmen zu lassen. 59 Patienten wurden aufgrund folgender Kriterien nicht in die Studie eingeschlossen:

27 Patienten, die mit UAW gemeldet worden sind:

- Antidepressivum, welches nicht vorwiegend über CYP2D6 abgebaut wird (n=12)
- Keine UAW vorhanden, lediglich auffällig hohe Antidepressiva-Plasmakonzentration (n=4)
- Gleichzeitige Einnahme eines potenten Inhibitors von CYP2D6 (Paroxetin; n=1)
- Kein Antidepressivum (Neuroleptika, Oxycodon; n=4)
- Ungenügende klinische Angaben, so dass eine genaue Analyse unmöglich war (n=2)
- Nicht eruierbar, ob die klinischen Reaktionen tatsächlich UAW waren oder Symptome der psychiatrischen Erkrankung (n=1)
- Fehlen des Fragebogens und/oder der Einverständniserklärung des Patienten (n=3)

32 Patienten, die mit Therapieversagen gemeldet worden sind:

- Antidepressivum, welches nicht vorwiegend über CYP2D6 abgebaut wird (n=19)
- Antidepressivum weniger als 28 Tage eingenommen (n=3)

- Präparat wirksam, lediglich auffällig niedrige Antidepressiva-Plasmakonzentration (n=1)
- Kurz nach Meldung des Therapieversagens Besserung der Symptomatik (n=5)
- Kein Antidepressivum (Neuroleptika; n=2)
- Nachweislich schlechte Compliance (nach Angabe des Patienten; n=1)
- Keine Indikation für Antidepressivum (Wesensveränderung aufgrund kriegsbedingter Kopfverletzung; n=1)

Die übrigen 44 Patienten wurden in die Studie eingeschlossen (28 Patienten mit UAW und 16 Patienten mit Therapieversagen). Alle Patienten gaben schriftlich ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie, insbesondere auch zur *CYP2D6*-Genotypisierung.

2.2 *CYP2D6*-Genotypisierung

Die Analyse des *CYP2D6*-Genabschnittes erfolgte nach DNA-Extraktion aus Vollblut mit unterschiedlichen PCR-Techniken für die verschiedenen Allele. Die Null-Allele *3, *4 und *6 wurden durch Allel-Differenzierung mit fluoreszenzmarkierten Sonden ermittelt. Die Deletion des gesamten *CYP2D6*-Gens (Null-Allel *5), sowie die *CYP2D6*-Duplikation, wurden mittels *Long-range*-PCR nach Steen et al. (1995) nachgewiesen, während die Null-Allele *8, *12 und *14, ebenso die funktionellen Allele *2, *10 und *41 mit konventioneller PCR-RFLP (basierend auf publizierten Methoden von Sachse et al. 1997, Raimundo et al. 2000, Løvlie et al. 2001 und Rau et al. 2002) ermittelt wurden. Die verschiedenen Methoden werden im Folgenden erläutert.

Methoden	Null-Allele	Funktionelle Allele
Allel-Differenzierung	*3, *4, *6	
<i>Long-range</i> -PCR	*5	Duplikation
PCR-RFLP	*8, *12, *14	*2, *10, *41

Tabelle 4: Methoden, die zur Analyse des *CYP2D6*-Genotyps verwendet wurden. Die Allele sind nach veröffentlichten Empfehlungen bezeichnet (Daly et al. 1996, Homepage des Nomenklatur-Komitees 2002).

Die Überprüfung der genannten Null-Allele lässt eine verlässliche Vorhersage des PM-Phänotyps bei >98% der deutschen Bevölkerung zu (Stüven et al. 1996, Griese et al. 1998, Sachse et al. 1998).

2.2.1 DNA-Extraktion

Die DNA wurde spätestens 7 Tage nach Eintreffen der Patienten-Blutprobe mit Hilfe des QIAamp DNA Blood Midi Kits aus EDTA-Vollblut nach Angaben des Herstellers extrahiert:

2 ml EDTA-Vollblut wurden mit 200 μ l QUIAGEN Protease-Stammlösung und 2,4 ml Lyse-Puffer AL in einem 15-ml Zentrifugenröhrchen mit einem Vortexer 2 Min. gemischt und dann im 70 °C warmen Wasserbad 10 Min. inkubiert. Nach Zugabe von 2 ml absolutem Ethanol (>99,8%) und kurzem Mischen wurden von dieser Lösung zunächst 3 ml auf eine QIAamp Midi Säule in einem neuen 15-ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und 3 Min. bei 3000 rpm und 18 °C zentrifugiert. Mit der restlichen Lösung wurde nach Verwerfen des Zentrifugats analog verfahren. Nach erneutem Verwerfen des Zentrifugats wurden 2 ml des Waschpuffers AW1 auf die Säule gegeben und das Röhrchen 1 Min. bei 4000 rpm und 18 °C zentrifugiert. Danach wurden ohne Verwerfen des Zentrifugats 2 ml des Waschpuffers AW2 auf die Säule pipettiert und das Röhrchen 15 Min. bei 4000 rpm und 18 °C zentrifugiert. Um Reste des Ethanols zu verdampfen, wurde die Säule nachfolgend in einem Trockenschrank 10 Min. bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurde die Säule in ein neues 15-ml Zentrifugenröhrchen plaziert. Durch Zugabe von 300 μ l *aqua ad iniectabilia*, Inkubation von 5 Min. bei Raumtemperatur und Zentrifugation von 5 Min. bei 4000 rpm wurde die DNA schließlich eluiert. Um höherkonzentrierte DNA zu erhalten, wurde das Zentrifugat erneut auf die Säule pipettiert und der gleiche Vorgang wiederholt. Die eluierte DNA wurde bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

2.2.2 Konzentrationsbestimmung der DNA

Um die DNA zu quantifizieren, wurden 10 μ l extrahierte DNA mit 90 μ l *aqua ad iniectabilia* verdünnt und die Absorption photometrisch (SmartSpec 3000) in einer Quarzglasküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm bestimmt. Die DNA-Konzentration berechnet das Photometer aus der Absorption bei 260 nm ($1 \text{ OD}_{260 \text{ nm}} \hat{=} 50 \mu\text{g/ml}$). Der Quotient A_{260}/A_{280} dient als Maß für die Reinheit der Probe und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.2.3 Allel-Differenzierung durch allelspezifische fluoreszierende Sonden

Die Detektion der Null-Allele *CYP2D6**3, *4 und *6 erfolgte durch Allel-Differenzierung mittels fluoreszenzmarkierter Sonden (*TaqMan Pre-Developed Assay Reagents for Allelic Discrimination*) auf einem ABI PRISM 7700 *Sequence*

Detection System nach Anleitung des Herstellers. Tabelle 5 zeigt die Mutationen, die für das jeweilige Allel diagnostisch sind.

Allel	Mutation
<i>CYP2D6</i> *3	2549A>del
<i>CYP2D6</i> *4	1846G>A
<i>CYP2D6</i> *6	1707T>del

Tabelle 5 : Leitmutationen der *CYP2D6*-Allele *3, *4 und *6.

Der Nachweis der drei häufigsten Null-Allele *CYP2D6**3, *4 und *6 kann auch, wie von Sachse et al. (1997) beschrieben, durch PCR-RFLP erfolgen (2.2.5). Die PCR-RFLP-Methode wurde jedoch am Lehrstuhl für Klinische Pharmakologie der Universität Erlangen-Nürnberg durch die Allel-Differenzierung ersetzt, da sie in kürzerer Zeit einen höheren Probendurchsatz ermöglicht.

2.2.3.1 Versuchsbedingungen

Der Reaktionsansatz in Tabelle 6 versteht sich als Ansatz für eine Probe. Für eine entsprechend höhere Probenzahl *n* wurde ein *n*-facher Ansatz berechnet. Die Reaktionen wurden gemäß den Anleitungen des Herstellers durchgeführt.

Reagenzien (Konzentrationen)	
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	5,0 µl
TaqMan Universal PCR Master Mix (2x): Enthält AmpliTaq Gold Polymerase, AmpErase UNG und dNTPs	12,5 µl
Allelic Discrimination Mix (10x): Enthält Primer (<i>forward/reverse</i>) und Sonden (Allel 1/Allel 2)	2,5 µl
Summe	20,0 µl
DNA (20 ng/µl) oder Allel 1 Kontrolle (5x): *3, *4, oder *6 oder Allel 2 Kontrolle (5x): *3, *4, oder *6 oder <i>Aqua ad iniectabilia</i> (NTC)	5,0 µl
Endvolumen	25,0 µl

Tabelle 6: Reagenzien. Die Allel 1 Kontrolle ist jeweils homozygot für den Wildtyp (z.B. Allel *4: 1846 G/G), die Allel 2 Kontrolle ist homozygot für die Mutation (z.B. Allel *4: 1846 A/A). Beide Kontrollen wurden bei jedem PCR-Lauf zusammen mit einer NTC (*no template control*) mitgeführt.

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
50 °C	2 Min.	1
95 °C	10 Min.	1
92 °C 60 °C	15 Sek. 1 Min.	35

Tabelle 7: Amplifikationsbedingungen: ABI PRISM 7700 *Sequence Detection System*.

Die Messung der Fluoreszenzsignale am Ende der PCR und deren Analyse und Auswertung wurden mit Hilfe des ABI PRISM 7700 *Sequence Detection Systems* und der ABI PRISM 7700 *Sequence Detection System Software Version 1.7* durchgeführt. Da die PCR selbst sowie die Messung der Fluoreszenzsignale am Ende der PCR in einem Gefäß stattfinden, sind gelelektrophoretische Arbeiten nicht erforderlich. Das Diagramm auf Seite 55 zeigt jeweils das Ergebnis eines PCR-Laufs für die Allele *3, *4 und *6 durch Allel-Differenzierung mittels fluoreszierender Sonden.

2.2.4 *Long-range-PCR*

2.2.4.1 Deletionsanalyse

Um die Deletion des gesamten *CYP2D6*-Gens (Allel *CYP2D6*5*) nachzuweisen, wurde nach einer in der Literatur beschriebenen Methode verfahren (Steen et al. 1995). Hierbei wurde die Deletionsanalyse zunächst nur mit den Primern 2D6-3F und 2D6-3R durchgeführt. Da hiermit jedoch nur bei vorhandener Deletion ein 3,5 Kilobasenpaare (kb) großes Produkt amplifiziert wurde, war bei einem negativen Ergebnis nicht ersichtlich, ob es sich tatsächlich um eine Probe handelte, die keine Deletion aufwies, oder ob eventuell die störanfällige *Long-Range* Reaktion fehlgeschlagen war.

Aus diesem Grund wurde später der Primer P18F zusätzlich hinzugegeben, so dass bei Patienten ohne Deletion ein 4,2 kb großes Amplifikat im Elektrophoresebild zu sehen war (Sachse 1999). Um Amplifikate dieser Größe zu erhalten, wurde die *Long-range*-Technologie mit einer hochprozessiven Polymerase angewendet (GeneAmp XL PCR Kit). Als Positiv-Kontrolle wurde bei jedem Reaktionsansatz eine positiv getestete DNA mitgeführt.

Die Methode konnte leider nicht so optimiert werden, dass auch bei Proben, die das Allel *5 heterozygot aufwiesen, ein 4,2 kb Produkt zuverlässig amplifiziert wurde. Somit konnten unter den beschriebenen Versuchsbedingungen Proben, die das

Allel *5 heterozygot aufwiesen nicht sicher von Proben unterschieden werden, die das Allel *5 homozygot aufwiesen. Die verwendeten Primer, deren Sequenz und Position sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Primer	Sequenz	Position
2D6-3F	ACC GGG CAC CTG TAC TCC TCA [#]	7020-7040* (<i>CYP2D7</i>)
2D6-3R	GCA TGA GCT AAG GCA CCC AGA C [#]	7755-7734** (<i>CYP2D6</i>)
P18F	CGT CTA GTG GGG AGA CAA AC ^{##}	3533-3552** (<i>CYP2D6</i>)

Tabelle 8: Sequenz und Position der verwendeten Primer zum Nachweis des *5-Allels. Die Abkürzungen F und R geben die Richtung der Primer an (*forward* bzw. *reverse*). Die Nummerierung der Primer-Positionen erfolgte nach *X58467 (GenBank, *CYP2D7AP*) und **M33388 (GenBank, *CYP2D6*, Nukleotid 1620 ist A des Startcodons der Translation und entspricht Nukleotid 1 in dieser Tabelle). ([#]Steen et al. 1995 / ^{##}Sachse 1999).

Die Deletionsanalyse wurde nur bei Patienten durchgeführt, die in der Allel-Differenzierung weder heterozygot für ein Null-Allel waren, noch zwei verschiedene Null-Allele aufwiesen. Da bei DNA-Proben, die heterozygot für ein Null-Allel sind, sowohl das Gen mit der Mutation als auch das Wildtyp-Gen bei der Allel-Differenzierung zu erkennen sind, müssen zwei *CYP2D6*-Allele vorhanden sein und somit kann keine Deletion vorliegen. Ebenso müssen Proben mit zwei verschiedenen Null-Allelen zwei *CYP2D6*-Allele aufweisen. Alle Patienten, die kein Null-Allel bei der Allel-Differenzierung aufwiesen, wurden ebenfalls mit genannter Methode auf das Vorliegen einer Deletion überprüft.

2.2.4.1.1 Versuchsbedingungen

Der Reaktionsansatz in Tabelle 9 versteht sich als Ansatz für eine Probe. Für eine entsprechend höhere Probenzahl n wurde ein n -facher Ansatz berechnet.

Reagenzien (Konzentrationen)	
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	23,35 μ l
Puffer (3,3x)	15,15 μ l
Mg(OAc) ₂ (25 mM)	2,0 μ l
dNTP-Mix (jeweils 2,5 mM)	4,0 μ l
Primer-Mix: 2 x <i>forward</i> und 1 x <i>reverse</i> (jeweils 20 μ M)	3,0 μ l
<i>rTth</i> DNA Polymerase XL (2 U/ μ l)	0,5 μ l
Summe	48,0 μ l
DNA*	2,0 μ l *
Endvolumen	50,0 μ l

Tabelle 9: Reaktionsansatz für die Deletionsanalyse.

*Bei Proben mit einer DNA-Konzentration <55 ng/ μ l wurden 3 μ l der gelösten DNA für die PCR eingesetzt und das Volumen an *aqua ad iniectabilia* dafür entsprechend um 1 μ l reduziert.

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
94 °C	1Min.	1
94 °C 65 °C 68 °C	15 Sek. 1 Min. 6 Min.	38
72 °C	12 Min.	1

Tabelle 10: Amplifikationsbedingungen im DNA Thermal Cycler.

Nach Beendigung der PCR wurden 20 μ l des Produktes mit 4 μ l Probenauftragspuffer gemischt (Endkonzentration des Probenauftragspuffer 1x) auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt (siehe auch Seite 67 und 68) und dann unter UV-Beleuchtung photographisch dokumentiert (Gel Doc 2000 Gel Dokumentationssystem). Die Größe der PCR-Produkte wurde durch Vergleich mit einem 1 kb-Längenstandard ermittelt.

2.2.4.2 Duplikationsanalyse

Der Nachweis der Duplikation des *CYP2D6*-Gens erfolgte nach einer in der Literatur beschriebenen Methode ebenfalls durch *Long-range-PCR* (Løvlie et al. 1996). Bei Vorliegen einer Duplikation wurde ein 3,6 kb großes PCR-Produkt amplifiziert. Als Positiv-Kontrolle diente bei jedem Reaktionsansatz eine positiv getestete DNA. Um falsch-negative Ergebnisse auszuschließen wurde zusätzlich eine interne Kontrolle mitgeführt. Durch Einsatz des Primers *cyp-17F* wurde so bei Proben, die keine Duplikation aufwiesen, ein 5,2 kb großes PCR-Produkt generiert.

Eine Probe wies eine Duplikation und in der Allel-Differenzierung das Null-Allel *4 heterozygot auf. Um nun eine Duplikation des Null-Allels *4 auszuschließen, wurden die Primer P2x2F und P2x2R eingesetzt (Johansson et al. 1996). Diese binden duplikationsspezifisch so, dass die Sequenz, die hierbei amplifiziert wird, den Ort einer bei Allel *4 vorkommenden Mutation (100C>T) miteinschließt. Das 10 kb große Amplikon wurde nun mit der konventionellen PCR-RFLP-Methode über PCR-Nr. 3 und anschließendem HphI-Restriktionsenzymverdau auf die Mutation 100C>T untersucht. Bei Nachweis der Mutation 100C>T kann so indirekt auf das Vorliegen einer Duplikation des Allels *4 geschlossen werden (siehe Tabelle 18).

Die Sequenzen und Positionen der verwendeten Primer sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Primer	Sequenz	Position
<i>cyp-17F</i>	TCC CCC ACT GAC CCA ACT CT	4447-4466 ^{***} (<i>CYP2D6</i>) 15726-15745 ^{**} (<i>CYP2D7</i>)
32R	CAC GTG CAG GGC ACC TAG AT	10802-10783 [*] (<i>CYP2D7AP</i>)
P2x2F	GCC ACC ATG GTG TCT TTG CTT TC	4150-4172 ^{***} (<i>CYP2D6</i>)
P2x2R	ACC GGA TTC CAG CTG GGA AAT G	1317-1296 ^{***} (<i>CYP2D6</i>)

Tabelle 11: Sequenz und Position der verwendeten Primer zum Nachweis von *CYP2D6*-Duplikationen. Die Abkürzungen F und R geben die Orientierung der Primer an (*forward* bzw. *reverse*). Die Nummerierung der Primer-Positionen erfolgte nach *X58467 (GenBank, *CYP2D7AP*), **M33387 (GenBank, *CYP2D7*) und ***M33388 (GenBank, *CYP2D6*, Nukleotid 1620 ist A des Startcodons der Translation und entspricht Nukleotid 1 in dieser Tabelle).

2.2.4.2.1 Versuchsbedingungen

Die Reaktionsansätze in den Tabellen 12 und 14 verstehen sich jeweils als Ansatz für eine Probe. Für eine entsprechend höhere Probenzahl n wurde ein n -facher Ansatz berechnet.

Reagenzien (Konzentrationen)	
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	8,6 µl
Puffer (3,3x)	6,0 µl
Mg(OAc) ₂ (25 mM)	0,8 µl
dNTP-Mix (jeweils 2,5 mM)	1,6 µl
Primer-Mix: cyp-17F und 32R	0,8 µl
<i>rTth</i> DNA Polymerase XL (2 U/µl)	0,2 µl
Summe	18,0 µl
DNA*	2,0 µl*
Endvolumen	20,0 µl

Tabelle 12: Reaktionsansatz für die Duplikationsanalyse mit den Primern cyp-17F (*forward*) und 32R (*reverse*). *Bei DNA-Konzentrationen >50 ng/µl wurde lediglich 1,0 µl DNA eingesetzt und das fehlende Volumen entsprechend mit 1 µl *aqua ad iniectabilia* ergänzt.

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
94 °C	1 Min.	1
94 °C 67 °C 68 °C	1 Min. 30 Sek. 6 Min.	35
72 °C	10 Min.	1

Tabelle 13: Amplifikationsbedingungen für die Duplikationsanalyse mit den Primern cyp-17F (*forward*) und 32R (*reverse*) im DNA Thermal Cycler.

Reagenzien (Konzentrationen)	
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	11,67 µl
Puffer (3,3x)	7,58 µl
Mg(OAc) ₂ (25 mM)	1,0 µl
dNTP-Mix (jeweils 2,5 mM)	2,0 µl
Primer-Mix: P2x2F und P2x2R	0,5 µl
<i>rTth</i> DNA Polymerase XL (2 U/µl)	0,25 µl
Summe	23,0 µl
DNA*	2,0 µl*
Endvolumen	25,0 µl

Tabelle 14: Reaktionsansatz für die Duplikationsanalyse mit den Primern P2x2F (*forward*) und P2x2R (*reverse*).

*Bei DNA-Konzentrationen >50 ng/µl wurde lediglich 1,0 µl DNA eingesetzt und das fehlende Volumen entsprechend mit 1 µl *aqua ad iniectabilia* ergänzt.

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
94 °C	1 Min.	1
94 °C 65 °C	15 Sek. 12 Min.	10
94 °C 65 °C	15 Sek. 12 Min.	20
72 °C	10 Min.	1

Tabelle 15: Amplifikationsbedingungen für die Duplikationsanalyse mit den Primern P2x2F (*forward*) und P2x2R (*reverse*) im Thermocycler (Gene Amp PCR System 9600).

Nach beendeter PCR wurden jeweils 20 µl des Produktes mit 4 µl Probenauftragspuffer versetzt und in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Seite 69) und unter UV-Beleuchtung photographisch dokumentiert. Die Größe der PCR-Produkte wurde durch Vergleich mit einem 1 kb-Längenstandard ermittelt.

2.2.5 PCR-RFLP

Der Nachweis der *CYP2D6*-Allele *2, *8, *10, *12, *14 und *41 erfolgte durch PCR-RFLP. Im Gegensatz zu Sachse (1997), der die komplette codierende Sequenz des *CYP2D6*-Gens mit einer PCR vervielfältigte, wurden hier zwei kürzere Sequenzen des *CYP2D6*-Gens mit zwei PCRs (PCR Nr. 1 und 2) spezifisch amplifiziert. Die Allele *8, *10, *12 und *14 wurden in *nested* PCRs aus dem Produkt der PCR Nr. 1

ermittelt (siehe 2.2.5.1), während der Nachweis der mit den Allelen *2 und *41-assoziierten Mutation 2850C>T aus dem Produkt der PCR-Nr. 2 erfolgte (siehe 2.2.5.2).

2.2.5.1 Nachweis der Allele *CYP2D6**8, *10, *12 und *14

Der Nachweis der drei Null-Allele *CYP2D6**8, *12, *14 und des Allels *CYP2D6**10 mit reduzierter Aktivität erfolgte modifiziert nach einer Veröffentlichung von Sachse et al. (Rau et al. 2002).

Die Primer für die PCR Nr. 1 wurden so gewählt, dass die zum *CYP2D6*-Gen hoch homologen Pseudogene *CYP2D7* und *CYP2D8* nicht amplifiziert wurden. Der *forward* Primer bindet zwar nicht nur im *CYP2D6*-Gen, sondern auch in den Pseudogenen (GenBank: M33387), der entsprechende *reverse* Primer ist jedoch *CYP2D6* spezifisch. Durch die Kombination der beiden Primer kann die Sequenz des *CYP2D6*-Gens spezifisch amplifiziert werden. Eine Koamplifikation der hoch homologen Pseudogene (92-97%, Kimura et al. 1989) muss vermieden werden, da hier die gleichen Mutationen wie im *CYP2D6*-Gen vorkommen können. Da diese Mutationen jedoch keine funktionelle Konsequenz haben, könnte vom *CYP2D6*-Genotyp dann nicht auf den richtigen *CYP2D6*-Phänotyp geschlossen werden.

Das verdünnte Produkt der PCR Nr.1 wurde als Edukt in zwei PCRs eingesetzt (*nested* PCRs Nr. 3 und 4) und diese Produkte nachfolgend mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten. Der *forward* Primer für die PCR Nr. 3 entspricht dem *forward* Primer der PCR Nr. 1. Der *reverse* Primer wurde, wie von Sachse et al. (1997) publiziert, übernommen, jedoch um vier Basen verlängert. Der Primer für die PCR Nr. 4 wurde ebenfalls bereits von Sachse et al. 1997 publiziert.

Die Sequenz und Position der verwendeten Primer sind in Tabelle 16 aufgelistet. *Forced mutations* zur Generierung künstlicher Restriktionsschnittstellen sind durch Unterstreichung hervorgehoben. Tabelle 17 fasst die Größe der PCR-Produkte zusammen. Tabelle 18 gibt einen Überblick über die Restriktionsenzyme, die Restriktionsmuster und die dadurch nachweisbaren Mutationen und Allele.

PCR-Nr.	Primer	Sequenz	Position
1	BR6.1F	AGT GTC CTG CCT GGT CCT CTG T	-82 bis -61
	BR6.3R	CGA AAT CTC TGA CGT GGA TAG GA	2258 bis 2236
3	BR6.1F	AGT GTC CTG CCT GGT CCT CTG T	-82 bis -61
	Bs1-R	CCT GTG GTT TCA CCC ACC ATC**	264 bis 244
4	2D6-1F	CCT GGG CAA GAA GTC GCT GGA <u>CCA</u> G*	1682 bis 1706
	2D6-1R	GAG ACT CCT CGG TCT CTC G*	2034 bis 2016

Tabelle 16: Sequenzen und Positionen der verwendeten Primer. Die Abkürzungen F und R geben die Richtung der Primer an (*forward* bzw. *reverse*). *Forced mutations* sind unterstrichen. Die Nummerierung der Primer-Positionen erfolgte nach M33388 (GenBank, *CYP2D6*, Nukleotid 1620 ist A des Startcodons der Translation und entspricht Nukleotid 1 in dieser Tabelle). *Sachse et al. 1997, **modifiziert nach Sachse et al. 1997.

PCR-Nr.	Primer	Vor-PCR Nr.	Größe der PCR-Produkte (bp)
1	BR6.1F	genomische DNA	2340
	BR6.3R		
3	BR6.1F	1	346
	Bs1-R		
4	2D6-1F	1	353
	2D6-1R		

Tabelle 17: Amplifikatgrößen der PCR Nr.1, sowie der zwei *nested* PCRs.

PCR-Nr.	Restriktions- enzym	Restriktionsmuster (bp)		Mutation	Allel
		Wildtyp	Mutation		
3	HphI	<u>274</u> , 72	<u>174</u> , <u>100</u> , 72	100C>T	*4, *10, *14
	MspI	154, <u>142</u> , <u>50</u>	<u>192</u> , 154	124G>A	*12
4	MspI	278, 75	353	1758G>T 1758G>A	*8, *14

Tabelle 18: Restriktionsenzyme, Restriktionsmuster und detektierbare Mutationen und Allele modifiziert nach Sachse et al. 1997. Die Fragmentgrößen, in denen sich Wildtyp-Allel und variantes Allel voneinander unterscheiden, wurden unterstrichen.

2.2.5.1.1 Versuchsbedingungen

Die Reaktionsansätze in den Tabellen 19 und 21 verstehen sich jeweils als Ansatz für eine Probe. Für eine entsprechend höhere Probenzahl n wurde ein n -facher Ansatz berechnet.

Reagenzien (Konzentrationen)	
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	15,5 μ l
Puffer (10x)	4,0 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	2,0 μ l
dNTP-Mix (jeweils 2,5 mM)	4,0 μ l
Primer-Mix: <i>forward</i> und <i>reverse</i> (jeweils 20 μ M)	2,0 μ l
Glycerin (50%)	10 μ l
AmpliTaq Gold (5 U/ μ l)	0,5 μ l
Summe	38,0 μ l
DNA*	2,0 μ l*
Endvolumen	40,0 μ l

Tabelle 19: Reaktionsansatz für PCR Nr. 1.

*Bei Proben mit einer DNA-Konzentration <55 ng/ μ l wurden 3 μ l der gelösten DNA für die PCR eingesetzt und das Volumen an *aqua ad iniectabilia* dafür entsprechend um 1 μ l reduziert.

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
95 °C	10 Min.	1
95 °C	30 Sek.	35
57 °C	30 Sek.	
72 °C	3 Min.	
72 °C	10 Min.	1

Tabelle 20: Amplifikationsbedingungen für PCR Nr. 1 im DNA Thermal Cycler.

Nach beendeter PCR wurden 15 μ l des Produktes von PCR Nr. 1 mit 4 μ l Probenauftragspuffer auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt und unter UV-Beleuchtung photographisch dokumentiert. Die Größe der PCR-Produkte wurde durch Vergleich mit einem 1 kb-Längenstandard ermittelt. Positive Produkte der PCR Nr. 1 wurden für die nachfolgenden *nested* PCRs im Verhältnis 1:10 mit *aqua ad iniectabilia* verdünnt.

Reagenzien (Konzentrationen)	PCR Nr. 3 und 4
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	15,75 µl
Puffer (10x)	3,0 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 µl
dNTP-Mix (jeweils 2,5 mM)	0,5 µl
Glycerin (50%)	5,0 µl
AmpliTaq Gold® (5 U/µl)	0,25 µl
Summe	27,0 µl
Primer-Mix 3 bzw.4: <i>forward</i> und <i>reverse</i> (jeweils 20 µM)	2,0 µl
Produkt von PCR Nr.1	1,0 µl
Endvolumen	30,0 µl

Tabelle 21: Reaktionsansatz für die zwei *nested* PCRs Nr. 3 und 4.

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
95 °C	10 Min.	1
95 °C 57 °C 72 °C	30 Sek. 30 Sek. 1 Min.	35
72 °C	7 Min.	1

Tabelle 22: Amplifikationsbedingungen für PCR Nr. 3 und 4: RoboCycler Gradient.

Nach beendeter PCR wurden 3 µl des Produktes von PCR Nr. 3 bzw. 4 mit 1,5 µl Probenauftragspuffer gemischt auf einem 2%igen Agarosegel analysiert. Die positiven Produkte der *nested* PCRs wurden mit den genannten Restriktionsenzymen und weiteren Reagenzien (siehe Tabelle 18 und 23) 2,5 h bei 37 °C inkubiert.

Reagenzien	HphI(3)	MspI(3)	MspI(4)
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	14,5 µl	15,21 µl	15,21 µl
Puffer (10x)	2,5 µl	2,50 µl	2,50 µl
Restriktionsenzym	1,0 µl (5 U/µl)	0,29 µl (20 U/µl)	0,29 µl (20 U/µl)
Summe	18 µl	18 µl	18 µl
PCR-Produkt	7 µl (Nr. 3)	7 µl (Nr. 3)	7 µl (Nr. 4)
Endvolumen	25 µl	25 µl	25 µl

Tabelle 23: Reaktionsansatz für die drei Restriktionsenzymverdaus.

Danach wurden die Proben mit jeweils 5 µl Probenauftragspuffer gemischt (Endkonzentration des Puffers 1x) auf einem 3%igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt (siehe Seite 70 und 71) und die Ergebnisse der enzymatischen Spaltung unter UV-Beleuchtung photographisch dokumentiert. Die Größe der PCR-Produkte wurde durch Vergleich mit einem 100 bp-Längenstandard ermittelt.

Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)

242 g Tris Base, 37,2 g Na₂EDTA x 2H₂O und 57,1 ml Essigsäure in 1 l *aqua bidest* gelöst, pH 8,5 (Endkonzentration 50x), zum Gebrauch 1:50 mit *aqua bidest* verdünnt (Endkonzentration 1x)

Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg (1 Tablette) in 1 ml *aqua ad iniectabilia* gelöst, zum Gebrauch 1:10 mit *aqua ad iniectabilia* verdünnt (Endkonzentration 1 mg/ml)

Agarosegele

- **1% (2%):** 1 g (2g) Agarose (Peq GOLD Universal-Agarose) je 100 ml 1xTAE durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst, Zugabe von 10 µl verdünnter Ethidiumbromidlösung je 100 ml 1xTAE
- **3%:** 3 g Agarose (Small-DNA-Agarose) je 100 ml 1xTAE durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst, Zugabe von 10 µl verdünnter Ethidiumbromidlösung je 100 ml 1xTAE

Probenauftragspuffer

50 mg Bromphenolblau, 25 mg Xylencyanol und 37,8 g (30%) Glycerin in 100 ml *aqua bidest* gelöst und steril filtriert (Endkonzentration 6x)

2.2.5.1.2 Methodenoptimierung

Im Gegensatz zur PCR Nr. 2 mussten bei der PCR Nr. 1, sowie bei den beiden nested PCRs, Glycerin zugegeben werden, um eine ausreichende DNA-Amplifikation erreichen zu können.

Die einzelnen Reagenzien der PCR Nr. 2 wurden aus Kostengründen jeweils reduziert, so dass das Endvolumen statt 40 µl nur noch 25 µl betrug. Die Effektivität der PCR blieb davon unbeeinflusst.

2.2.5.2 Nachweis der Allel *2/*41-assoziierten Mutation (2850C>T)

Der Nachweis der Mutation 2850C>T erfolgte ebenfalls durch PCR-RFLP, ähnlich einem Ansatz von Løvlie et al. (2001). Da diese Mutation jedoch nicht nur mit dem normal aktiven Allel *CYP2D6**2 und dem reduziert aktiven Allel *CYP2D6**41 assoziiert ist, sondern auch mit den Null-Allelen *CYP2D6**8, *11, *12 und *14 (Home Page of the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee 2002), ist der direkte Nachweis eines Allels durch diese Reaktion nicht möglich.

Da die genannten Null-Allele in der deutschen Bevölkerung jedoch nur mit einer Frequenz von 0-0,3% vorkommen (*8: 0,3%, *11: 0%, *12: 0%, *14: 0%; Sachse et al. 1997, Griese et al. 1998) und zudem drei dieser Null-Allele durch den Nachweis anderer Mutationen mit oben genannter PCR-RFLP-Reaktion ausgeschlossen werden konnten (*8, *12 und *14, siehe 2.2.5.1), ging man beim positiven Nachweis der Mutation 2850C>T vom Allel *CYP2D6**2 bzw. Allel *CYP2D6**41 aus.

Um schließlich diese beiden Allele voneinander unterscheiden zu können, wurde der Promoterbereich analysiert. Das Allel *CYP2D6**2A weist in diesem Bereich die Mutation -1584C>G auf, während beim Allel *CYP2D6**41 die Sequenz in diesem Bereich nicht vom *1-Allel abweicht (Nachweis der Promotermutation siehe 2.2.5.3).

Die Primer für die PCR Nr. 2 wurden so gewählt, dass die Pseudogene von *CYP2D6* (*CYP2D7*/*CYP2D8*) nicht koamplifiziert wurden. Beide Primer binden *CYP2D6*-spezifisch. Die Sequenz und Position der verwendeten Primer sind in Tabelle 24 angegeben. Das 2185 bp große Produkt der PCR Nr. 2 wurde mit dem Restriktionsenzym HhaI geschnitten. Die Restriktionsmuster sind in Tabelle 25 aufgelistet.

PCR-Nr.	Primer	Sequenz	Position
2	BR6.5F	GGA CTC TGT ACC TCC TAT CCA CGT C	2224 bis 2248
	BR6.6R	CCT CAA CGT ACC CCT GTC TCA AAT*	4408 bis 4385

Tabelle 24: Sequenzen und Positionen der verwendeten Primer. Die Abkürzungen F und R geben die Richtung der Primer an (*forward* bzw. *reverse*). Die Nummerierung der Primer-Positionen erfolgte nach M33388 (GenBank, *CYP2D6*, Nukleotid 1620 ist A des Startcodons der Translation und entspricht Nukleotid 1 in dieser Tabelle). *Modifiziert nach Sachse et al. 1997.

PCR-Nr.	Restriktions- enzym	Restriktionsmuster (bp)		Mutation
		Wildtyp	Mutation	
2	HhaI	731, <u>414</u> , <u>372</u> , 277, 256, 91, 44	<u>786</u> , 731, 277, 256, 91, 44	2850C>T

Tabelle 25: Restriktionsmuster zur Detektion der 2850C>T Mutation. Die Fragmentgrößen, in denen sich Wildtyp und Mutation voneinander unterscheiden, wurden unterstrichen.

2.2.5.2.1 Versuchsbedingungen

Die Reaktionsansätze in den Tabellen 26 und 28 verstehen sich jeweils als Ansatz für eine Probe. Für eine entsprechend höhere Probenzahl n wurde ein n -facher Ansatz berechnet.

Reagenzien (Konzentrationen)	
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	14,5 µl
Puffer (10x)	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,95 µl
dNTP-Mix (jeweils 2,5 mM)	2,5 µl
Primer-Mix: <i>forward</i> und <i>reverse</i> (jeweils 20 µM)	1,25 µl
AmpliTaq Gold (5 U/µl)	0,3 µl
Summe	23,0 µl
DNA*	2,0 µl*
Endvolumen	25,0 µl

Tabelle 26: Reaktionsansatz für PCR Nr. 2.

*Bei Proben mit einer DNA-Konzentration <55 ng/µl wurden 3 µl der gelösten DNA für die PCR eingesetzt und das Volumen an *aqua ad iniectabilia* dafür entsprechend um 1 µl reduziert.

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
95 °C	10 Min.	1
95 °C 57 °C 72 °C	30 Sek. 30 Sek. 3 Min.	35
72 °C	10 Min.	1

Tabelle 27: Amplifikationsbedingungen für PCR Nr. 2 im DNA Thermal Cycler.

Nach beendeter PCR wurden 3 µl des Produktes von PCR Nr. 2 mit 2 µl Probenauftragspuffer auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch separiert und unter UV-Beleuchtung photographisch dokumentiert. Die Größe der PCR-Produkte wurde durch Vergleich mit einem 1 kb-Längenstandard ermittelt. Produkte der PCR Nr. 2 wurden mit dem Restriktionsenzym HhaI (siehe Tabelle 28) über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Reagenzien (Konzentrationen)	
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	3,80 µl
Puffer (10x)	2,50 µl
BSA	0,25 µl
Restriktionsenzym HhaI (20 U/µl)	0,45 µl
Summe	7 µl
Produkt von PCR Nr. 2	18 µl
Endvolumen	25 µl

Tabelle 28: Reaktionsansatz für den Restriktionsenzymverdau mit HhaI.

Danach wurden die Proben mit jeweils 5 µl Probenauftragspuffer gemischt, auf einem 2,5%igen Agarosegel elektrophoretisch separiert (siehe Seite 72) und die Ergebnisse der enzymatischen Spaltung unter UV-Beleuchtung photographisch dokumentiert. Die Größe der PCR-Produkte wurde durch Vergleich mit einem 100 bp-Längenstandard ermittelt.

2.2.5.3 Nachweis der Promotermutation (-1584C>G)

Die Allele *CYP2D6**2A und *CYP2D6**41 unterscheiden sich im Promoterbereich des *CYP2D6*-Gens. Allel *2A weist hier die Mutation -1584C>G auf, wohingegen bei Allel *41 die Wildtyp-Sequenz vorliegt (-1584C). Wurde bei Proben, die Allel *2/*41-assoziierte Mutation 2850C>T nachgewiesen (siehe 2.2.5.2) und war die Promotermutation abwesend, so konnte davon ausgegangen werden, dass das in seiner Aktivität reduzierte Allel *41 vorliegt. Wurde hingegen sowohl die Allel *2/*41-assoziierte Mutation 2850C>T als auch die Promotermutation nachgewiesen, war davon auszugehen, dass das in seiner Aktivität voll funktionsfähige Allel *2A vorliegt.

Auch der Nachweis der Promotermutation -1584C>G erfolgte durch PCR-RFLP. Die Sequenz und Position der verwendeten Primer sind in Tabelle 29 aufgeführt, die Restriktionsmuster zeigt Tabelle 30. Der *forward* Primer wurde von Raimundo et al.

(2000) publiziert, jedoch ohne *forced mutation* und AAT-Verlängerung. Sowohl der *forward* als auch der *reverse* Primer binden *CYP2D6*-spezifisch (Sequenzvergleich mit GenBank: M33388, *CYP2D6* und M33387, *CYP2D7/CYP2D8P*; Kimura et al. 1989).

Primer	Sequenz	Position
up14modF	AAT AAT AAT AGC CTG GAC AAC TTG GAA GAC <u>CC</u> *	-1606 bis -1585
up218R	GTG TGC CAC CAC GTC TAG C	-1402 bis -1420

Tabelle 29: Sequenzen und Positionen der verwendeten Primer. Die Abkürzungen F und R geben die Richtung der Primer an (*forward* bzw. *reverse*). Die *forced mutation* ist unterstrichen. Die Nummerierung der Primer-Positionen erfolgte nach M33388 (GenBank, *CYP2D6*, Nukleotid 1620 ist A des Startcodons der Translation und entspricht Nukleotid 1 in dieser Tabelle). *Modifiziert nach Raimundo et al. und Rau et al. 2002.

Größe des PCR-Produktes (bp)	Restriktionsenzym	Restriktionsmuster (bp)		Mutation
		Wildtyp	Mutation	
215	Smal	215	183, 32	-1584C>G

Tabelle 30: Restriktionsmuster zur Detektion der -1584C>G Mutation.

2.2.5.3.1 Versuchsbedingungen

Der Reaktionsansatz in der Tabelle 31 versteht sich als Ansatz für eine Probe. Für eine entsprechend höhere Probenzahl *n* wurde ein *n*-facher Ansatz berechnet.

Reagenzien (Konzentrationen)	
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	15,37 µl
Puffer (10x)	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,0 µl
dNTP-Mix (jeweils 2,5 mM)	2,0 µl
Primer-Mix: <i>forward</i> und <i>reverse</i> (jeweils 20 µM)	1,0 µl
AmpliTaq Gold (5 U/µl)	0,13 µl
Summe	23,0 µl
DNA*	2,0 µl*
Endvolumen	25,0 µl

Tabelle 31: Reaktionsansatz für die PCR.

*Bei Proben mit einer DNA-Konzentration <55 ng/µl wurden 3 µl der gelösten DNA für die PCR eingesetzt und das Volumen an *aqua ad iniectabilia* dafür entsprechend um 1 µl reduziert.

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
95 °C	5 Min.	1
95 °C 63 °C 72 °C	30 Sek. 30 Sek. 1 Min.	40
72 °C	7 Min.	1

Tabelle 32: Amplifikationsbedingungen im DNA Thermal Cycler.

Nach beendeter PCR wurden 3 µl des Produktes mit 1,5 µl Probenauftragspuffer gemischt auf einem 2%igen Agarosegel analysiert. Die Größe der PCR-Produkte wurde durch Vergleich mit einem 100 bp-Längenstandard ermittelt. Die PCR-Produkte wurden mit dem Restriktionsenzym SmaI (siehe Tabelle 33) über Nacht bei 25 °C inkubiert.

Reagenzien	
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	2,2 µl
Puffer (10x)	2,5 µl
Restriktionsenzym SmaI (20 U/µl)	0,3 µl
Summe	5 µl
PCR-Produkt	20 µl
Endvolumen	25 µl

Tabelle 33: Reaktionsansatz für den Restriktionsenzymverdau mit SmaI.

Danach wurden die Proben mit 5 µl Probenauftragspuffer gemischt auf einem 2,5%igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt (siehe Seite 73) und die Ergebnisse der enzymatischen Spaltung unter UV-Beleuchtung photographisch dokumentiert. Die Größe der PCR-Produkte wurde durch Vergleich mit einem 100 bp-Längenstandard ermittelt.

Agarosegel:

2,5%: 2,5 g Agarose (Small-DNA-Agarose) je 100 ml 1xTAE durch Aufkochen in der Mikrowelle lösen, Zugabe von 10 µl Ethidiumbromidlösung je 100 ml 1xTAE

2.3 Statistik

Normalverteilte kontinuierliche Variablen sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. Bei Variablen, deren Verteilung nicht einer Gauß'schen Normalverteilung entsprach, wurden der Median und der Quartilsabstand

(*interquartile range*, IQR) angegeben. Unterschiede in der Häufigkeit kategorieller Daten wurden mittels *Fisher's Exact Test* oder χ^2 -Test analysiert. Quantitative Daten wurden mittels nichtparametrischer Tests für ungepaarte Zweiergruppen verglichen (Mann-Whitney U-Test). Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als signifikant angenommen. Die Daten wurden mit Hilfe der Computerprogramme StatView (SAS Institute Inc.) und Primer of Biostatistics (Version 3.01) ausgewertet. Exakte Konfidenz-Intervalle wurden mit den Programmen der SISA berechnet.

2.4 Substanzen, Hilfsmittel und Geräte

Für die Durchführung der Arbeit sind die folgenden Substanzen, Hilfsmittel und Geräte verwendet worden. Alle Substanzen wurden mit dem höchsten im Handel erhältlichen Reinheitsgrad bezogen.

2.4.1 Substanzen

- Agarose: Small DNA Agarose, Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland und Peq GOLD Universal-Agarose, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
- AmpliTaq Gold DNA Polymerase: Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
- *Aqua ad iniectabilia*: Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
- Bromphenolblau: Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Desoxyribonukleotid-5`-triphosphate (dNTPs): Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
- DNA-Längenstandard: 100 bp und 1 kb; New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland und PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
- Essigsäure: Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
- Ethanol: Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
- Ethidiumbromid: Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz Dihydrat (Na_2EDTA , $2\text{H}_2\text{O}$, Titriplex III): Merck, Darmstadt, Deutschland
- Glycerin: Merck, Darmstadt, Deutschland
- Oligonukleotide (Primer): MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland und TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland
- PCR-Kits: GeneAmp XL PCR Kit und TaqMan Pre-Developed Assay Reagents for Allelic Discrimination, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
- QIAmp DNA Blood Midi Kit: QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland

- Restriktionsenzyme: New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
- Tris Base: AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
- Xylencyanol: Sigma, Deisenhofen, Deutschland

2.4.2 Hilfsmittel und Geräte

- Elektrophorese-Kammern und Zubehör: Sub-Cell GT und Mini-Sub Cell GT, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
- Elektrophorese-Spannungsgeräte: Power Pac 300 Power Supply, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
- Gel Doc 2000 Gel Documentation System: Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
- MicroAmp Optical Tubes und Caps: Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
- PCR Softstrips 0,2 ml: Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
- Pipetten: Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Quarzglasküvetten: Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, Deutschland
- Spektrophotometer: SmartSpec 3000, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
- Thermocycler: DNA Thermal Cycler, Gene Amp PCR System 9600 und ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland und RoboCycler Gradient 96, Stratagene, Amsterdam, Niederlande
- Trockenschrank: Ehret GmbH & Co. KG, Emmendingen, Deutschland
- USF Reinstwassersystem: PURELAB Plus, USF Deutschland GmbH, Ransbach-Baumbach, Deutschland
- Vortex-Genie 2: Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
- Wasserbad: Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
- Zentrifugen: Centrifuge 5415 D und 5810 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- 15-ml Zentrifugenröhrchen: Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

3 Ergebnisse

3.1 Patienten

Insgesamt wurden 44 Patienten in die Studie eingeschlossen. Die wichtigsten demographischen Daten zeigt Tabelle 34. Indikationen zur Antidepressiva-Therapie und zusätzliche Erkrankungen der Probanden sind in Tabelle 35 aufgelistet. Die verabreichten Antidepressiva unter denen UAW aufgetreten sind bzw. unter denen sich nach mindestens 28 Tagen kein Therapieerfolg zeigte, fasst Tabelle 36 zusammen.

Demographische Daten	28 UAW-Patienten	16 Nonresponder
Geschlecht:		
Frauen	19 (68)	13 (81)
Alter (Jahre)	50 ±13	43 ±11
Körpergröße (cm)	169 ±7	169 ±8
Gewicht (kg)	74 ±16	76 ±13

Tabelle 34: Patientendaten. Beim Geschlecht ist die Anzahl der Patienten n (Prozent) angegeben, bei Alter, Körpergröße und Gewicht jeweils der Mittelwert ± Standardabweichung.

Indikationen zur Antidepressivatherapie	UAW-Patienten n (%)	Nonresponder n (%)
Depression (nicht näher erläutert)	13 (46)	4 (25)
Depression mit Angst- bzw. Panikstörung	5 (18)	3 (19)
Angststörung	1 (4)	0 (0)
Bipolare affektive Störung	1 (4)	3 (19)
Reaktive Depression	2 (7)	1 (6)
Dysthymie	1 (4)	1 (6)
Psychovegetatives Erschöpfungssyndrom	2 (7)	0 (0)
Schwangerschaftspsychose	0 (0)	1 (6)
Postpartale Depression	1 (4)	1 (6)
Schizoaffektive Psychose	1 (4)	2 (13)
Insomnie	1 (4)	0 (0)

Weitere Erkrankungen	UAW-Patienten n (%)	Nonresponder n (%)
Keine weiteren Erkrankungen	8 (29)	10 (62,5)
Diabetes mellitus Typ II	1 (4)	0 (0)
Hyperlipoproteinämie	1 (4)	0 (0)
Arterielle Hypertonie	5 (18)	3 (19)
Herzrhythmusstörungen	1 (4)	0 (0)
Tachykardie	1 (4)	0 (0)
Mitralklappenprolaps	1 (4)	0 (0)
Schilddrüsenerkrankung	5 (18)	2 (13)
Allergien	4 (14)	0 (0)
Asthma	1 (4)	0 (0)
Lactose- und Sorbitintoleranz	1 (4)	0 (0)
Prostatahyperplasie	1 (4)	0 (0)
Chronische Kopfschmerzen	3 (11)	0 (0)
Chronisches Schmerzsyndrom	0 (0)	1 (6)
Rheumatische Erkrankung	1 (4)	0 (0)
Fibromyalgie	1 (4)	0 (0)
Rückenbeschwerden (Ischialgie, Diskusprolaps)	2 (7)	0 (0)
Pankreasinsuffizienz	1 (4)	0 (0)
Hydrocele	1 (4)	0 (0)
Chronische Sinusitis	1 (4)	0 (0)
Tinnitus	1 (4)	0 (0)
Axiale Hiatushernie mit Refluxösophagitis	1 (4)	0 (0)
Leukozytose unklarer Genese	1 (4)	0 (0)
Sicca-Syndrom	1 (4)	0 (0)

Tabelle 35: Indikationen zur Antidepressiva-Therapie und weitere Erkrankungen bei den in die Studie eingeschlossenen Patienten (Mehrfachnennungen möglich).

Antidepressiva	28 UAW-Patienten n (%)	16 Nonresponder n (%)
Amitriptylin	9 (32)	3 (19)
Doxepin	5 (18)	7 (44)
Trimipramin	1 (4)	0 (0)
Clomipramin	1 (4)	1 (6)
Imipramin	1 (4)	0 (0)
Maprotilin	2 (7)	0 (0)
Fluoxetin	3 (11)	1 (6)
Fluvoxamin	1 (4)	0 (0)
Paroxetin	2 (7)	1 (6)
Venlafaxin	3 (11)	3 (19)

Tabelle 36: Antidepressiva unter denen UAW auftraten bzw. unter denen sich kein Therapieerfolg zeigte.

3.2 Methodische Ergebnisse der CYP2D6-Genotypisierung

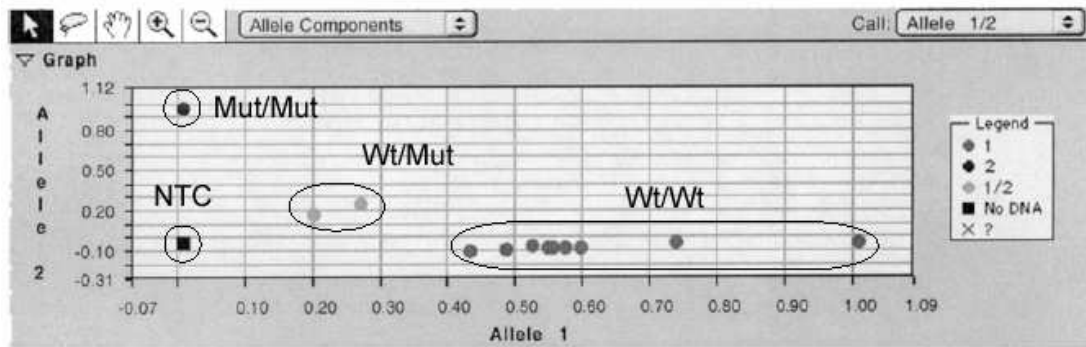
Im folgenden Abschnitt werden anhand von Beispielen einige Ergebnisse der Allel-Differenzierung, *Long-range*-PCR und PCR-RFLP gezeigt und erläutert.

3.2.1 Allel-Differenzierung

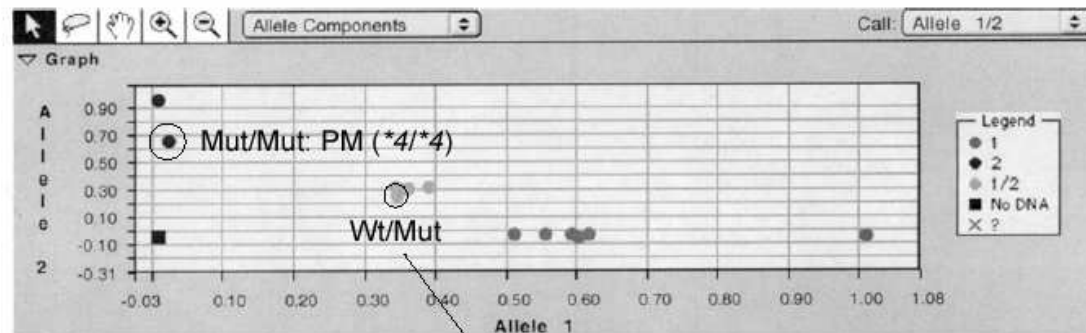
Der Nachweis der drei Null-Allele *CYP2D6**3, *4 und *6 erfolgte durch Allel-Differenzierung mittels fluoreszierender Sonden. Die Daten wurden anschließend mit Hilfe des ABI PRISM 7700 Sequence Detection Systems analysiert und ausgewertet. Abbildung 3 zeigt jeweils das Ergebnis eines PCR-Laufs für die Allele *3, *4 und *6.

In dem vorliegenden Diagramm verteilen sich die Proben je nach der gemessenen Fluoreszenz (VIC™ oder/und FAM) und somit je nach ihrem *CYP2D6*-Genotyp entweder entlang der horizontalen Achse (Allel 1, homozygot Wildtyp, Wt/Wt), entlang der vertikalen Achse (Allel 2, homozygot Mutation, Mut/Mut) oder diagonal (Allel 1 und 2, heterozygot, Wt/Mut). Die NTC (*no template control*) bildet den Kreuzungspunkt der horizontalen und vertikalen Achse. Jeder einzelne Punkt stellt eine Probe dar.

A: Allel *3: 2549A>del



B: Allel *4: 1846G>A



PM (*4/*6)

PM (*4/*6)

C: Allel *6: 1707T>del

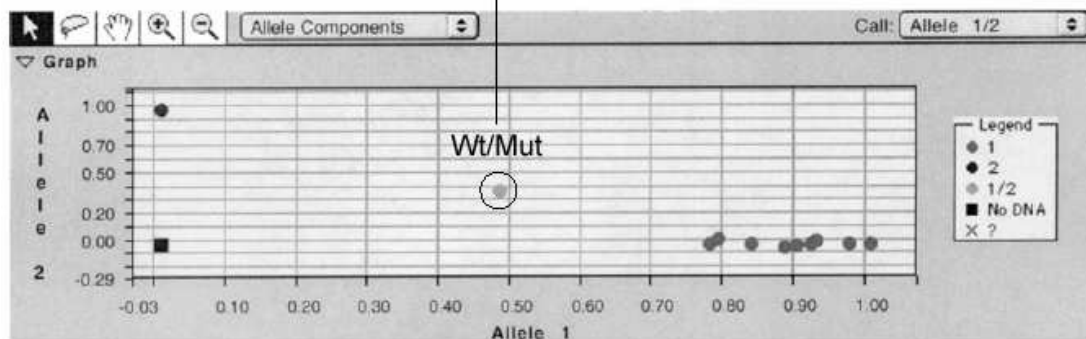


Abbildung 3 : Beispiele der Allel-Differenzierung. **A**: Nachweis von Allel *3, **B**: Nachweis von Allel *4, **C**: Nachweis von Allel *6. *Poor metabolizer* (PM) können homozygot für nur eines der drei Null-Allele sein (z.B. Mut/Mut in B: *4/*4), oder aber auch heterozygot für zwei verschiedene der o.g. Null-Allele (z.B. Wt/Mut in B und C: *4/*6).

3.2.2 Long-range-PCR

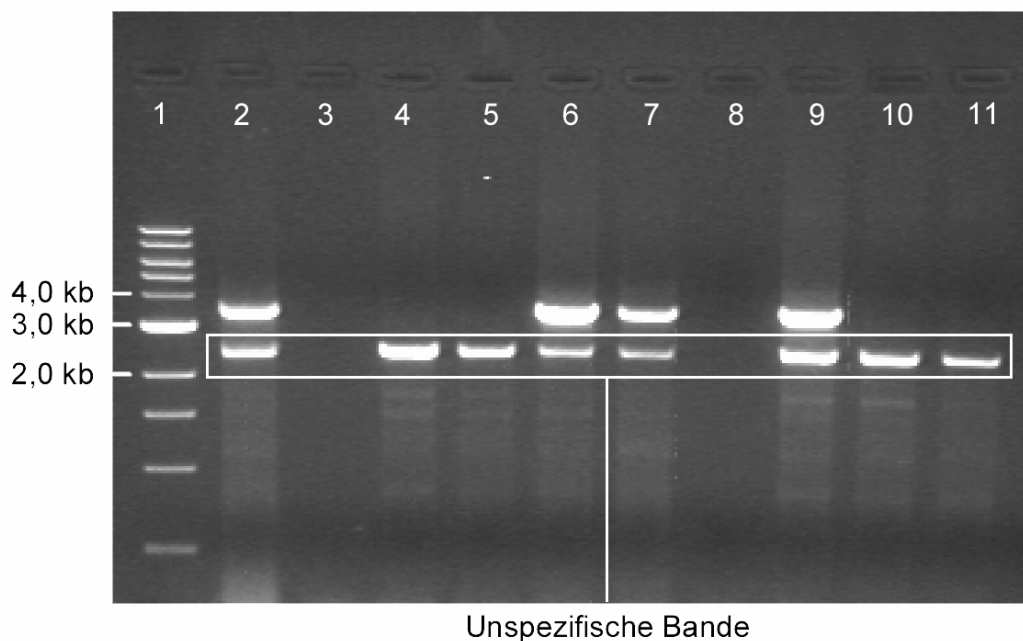
3.2.2.1 Deletionsanalyse

Um die Deletion des kompletten *CYP2D6*-Gens (Allel *CYP2D6**5) nachzuweisen, wurde nach einer in der Literatur beschriebenen Methode verfahren (Steen et al. 1995). Hierbei wurde die Deletionsanalyse zunächst nur mit den Primern 2D6-3F und 2D6-3R durchgeführt. Da hiermit jedoch nur bei vorhandener Deletion ein

3,5 kb großes Produkt generiert wurde, war bei einem negativen Ergebnis nicht ersichtlich, ob die Probe tatsächlich deletionsnegativ war, oder ob eventuell die Reaktion fehlgeschlagen war. Aus diesem Grund wurde der Primer P18F zusätzlich hinzugegeben, so dass auch bei Patienten ohne Deletion ein 4,2 kb großes Amplifikat im Elektrophoresebild zu sehen war (Sachse 1999). Die Methode konnte nicht so optimiert werden, dass auch bei Proben, die das Allel *5 heterozygot aufwiesen, ein 4,2 kb Produkt zuverlässig amplifiziert wurde. Somit konnten unter den beschriebenen Versuchsbedingungen (siehe Tabelle 9 und 10, Seite 29 und 30) Proben, die das Allel *5 heterozygot aufwiesen nicht sicher von Proben unterschieden werden, die das Allel *5 homozygot aufwiesen. Allerdings kommt eine Homozygotie für Allel *5 nur sehr selten vor.

In Abbildung 4 sind exemplarisch Elektrophoresemuster der *Long-range-PCR* ohne interne Kontrolle (**A**) und mit interner Kontrolle (**B**) dargestellt.

A: PCR ohne interne Kontrolle



B: PCR mit interner Kontrolle

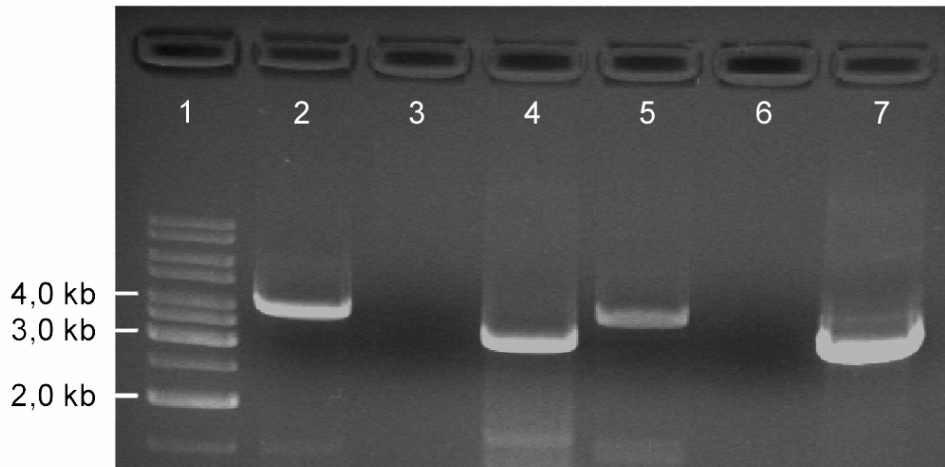


Abbildung 4: Ergebnisse der *Long-range*-PCR zum Nachweis der Deletion des kompletten *CYP2D6*-Gens (*CYP2D6**5). **A:** 3,5 kb Bande bei Vorliegen einer *CYP2D6*-Deletion. Spur 1: der 1 kb-Längenstandard; Spur 2, 6, 7 und 9: Deletion positiv; Spur 4, 5, 10 und 11: Deletion negativ; Spur 3 und 8: NTC (*no template control*). **B:** 3,5 kb Bande beim Vorhandensein einer *CYP2D6*-Deletion und 4,2 kb Bande, wenn keine Deletion vorhanden ist. Spur 1: der 1 kb-Längenstandard; Spur 2 und 5: Deletion negativ; Spur 4 und 7: Deletion positiv; Spur 6: NTC; Spur 3: Reaktion fehlgeschlagen.

3.2.2.2 Duplikationsanalyse

Der Nachweis der Duplikation des *CYP2D6*-Gens erfolgte nach einer in der Literatur beschriebenen Methode ebenfalls durch *Long-range*-PCR (Løvlie et al. 1996). Im positiven Fall einer Duplikation wurde ein 3,6 kb großes PCR-Produkt amplifiziert. Als Positiv-Kontrolle diente bei jedem Reaktionsansatz eine positiv getestete DNA. Um falsch-negative Ergebnisse auszuschließen wurde zusätzlich eine interne Kontrolle mitgeführt. Durch Einsatz des Primers *cyp-17F* wurde so bei Proben, die keine Duplikation aufwiesen, ein 5,2 kb großes PCR-Produkt generiert.

Eine Probe wies eine Duplikation und in der Allel-Differenzierung das Null-Allel *4 heterozygot auf. Um nun eine Duplikation von Allel *4 auszuschließen, wurden hier die Primer P2x2F und P2x2R eingesetzt (Johansson et al. 1996). Diese binden duplikationsspezifisch so, dass die Sequenz, die hierbei amplifiziert wird, den Ort einer bei Allel *4 vorkommenden Mutation (100C>T) miteinschließt. Das 10 kb große Amplikon wurde nun mit der konventionellen PCR-RFLP-Methode über PCR-Nr. 3 und anschließendem HphI-Restriktionsenzymverdau auf das Vorliegen der Mutation 100C>T untersucht. Bei Nachweis der Mutation 100C>T konnte so indirekt auf Allel *4 geschlossen werden. In Abbildung 5 sind die Ergebnisse eines PCR-

Laufs für eine Duplikationsanalyse graphisch dargestellt.

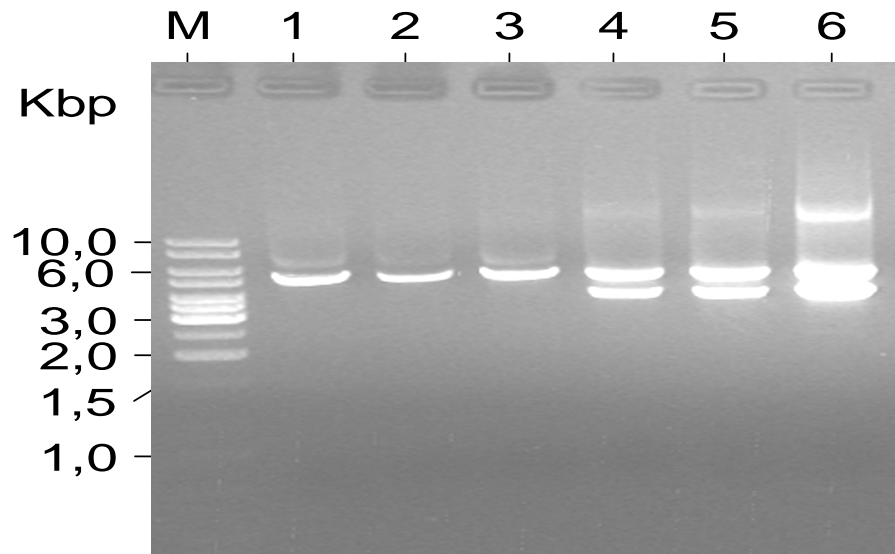


Abbildung 5: Ergebnisse der *Long-range*-PCR zum Nachweis der Duplikation des *CYP2D6*-Gens. 3,6 kb Bande beim Vorhandensein einer *CYP2D6*-Duplikation. Spur M: 1 kb-Längenstandard; Spur 1, 2 und 3: Duplikation negativ; Spur 4, 5 und 6: Duplikation positiv.

3.2.3 PCR-RFLP

3.2.3.1 Nachweis der Allele *CYP2D6**8, *10, *12 und *14

Der Nachweis der drei Null-Allele *CYP2D6**8, *12, *14 und des Allels *CYP2D6**10 mit reduzierter Aktivität erfolgte modifiziert nach einer Veröffentlichung von Sachse et al. (1997). Die konventionelle 2-Stufen-PCR mit anschließendem Restriktionsenzymverdau wurde bereits unter 2.2.5.1 erläutert. Die Abbildungen 6, 7 und 8 zeigen exemplarisch Elektrophoresemuster der drei RFLP-Reaktionen.

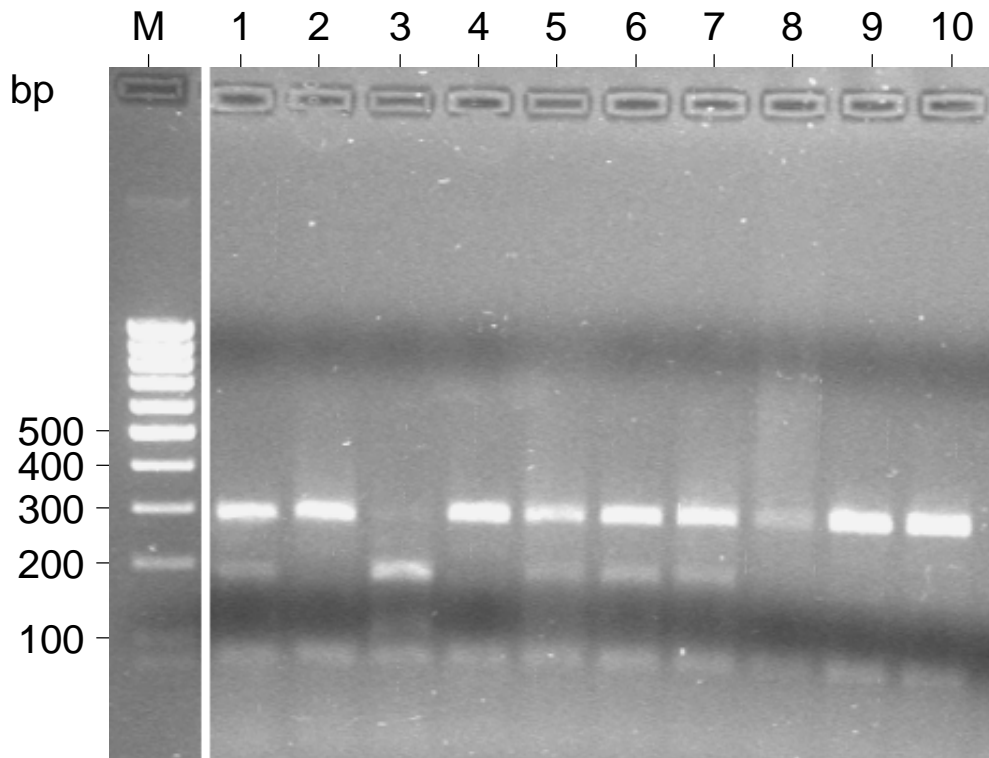


Abbildung 6: Elektrophoresemuster des HphI-Verdaus (PCR Nr. 3) zum Nachweis von Allel *4, *10 und *14. Spur M: 100 bp-Längenstandard; Spur 2, 4, 8, 9 und 10: homozygot Wildtyp (100C/C); Spur 1, 5, 6 und 7: heterozygot (100C/T); Spur 3: homozygot Mutation (100T/T). Um das Vorhandensein von Allel *4 auszuschließen, wurde die Allel-Differenzierung (TaqMan) zum Nachweis des Allels *4 durchgeführt.

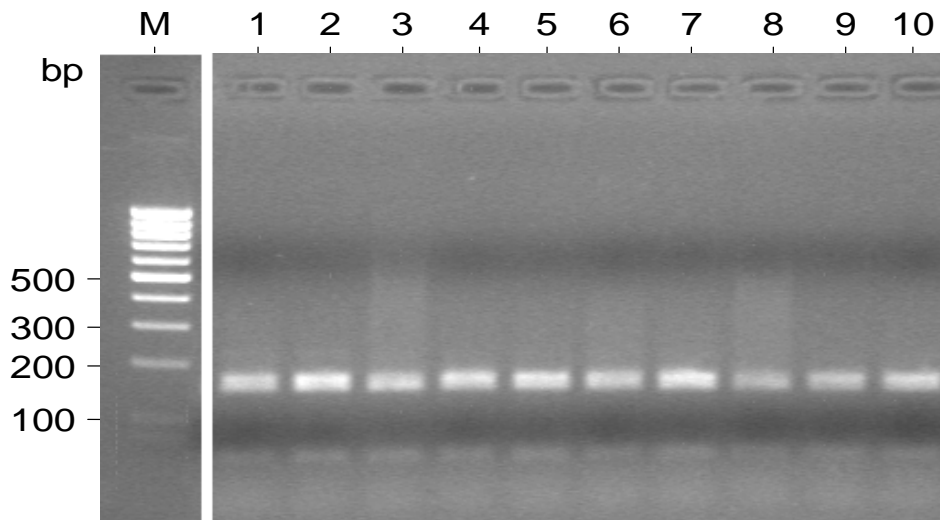


Abbildung 7: Elektrophoresemuster des MspI-Verdaus (PCR Nr. 3) zum Nachweis von Allel *12. Spur M: 100 bp-Längenstandard; Spur 1-10: homozygot Wildtyp (124G/G). Bei keiner Probe wurde die Mutation (124G>A) nachgewiesen, die für Allel *12 diagnostisch ist.

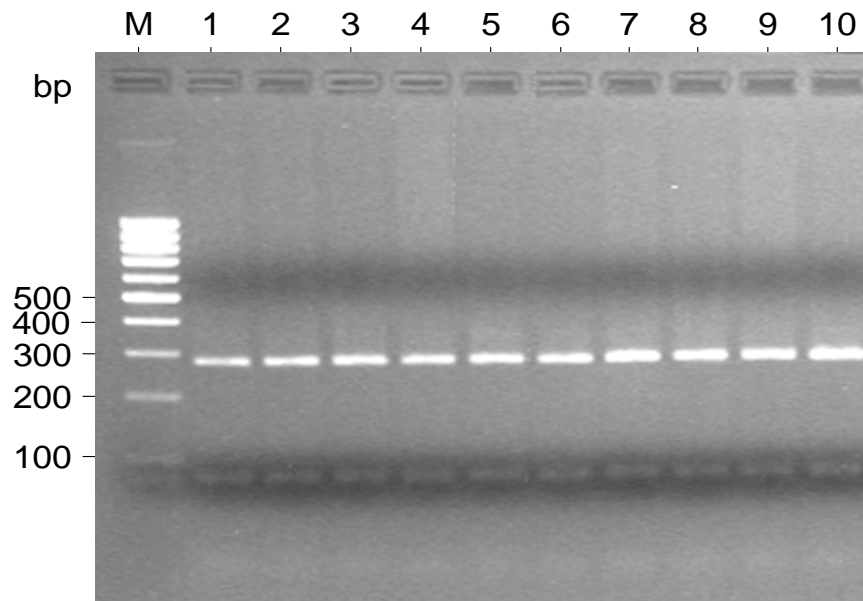
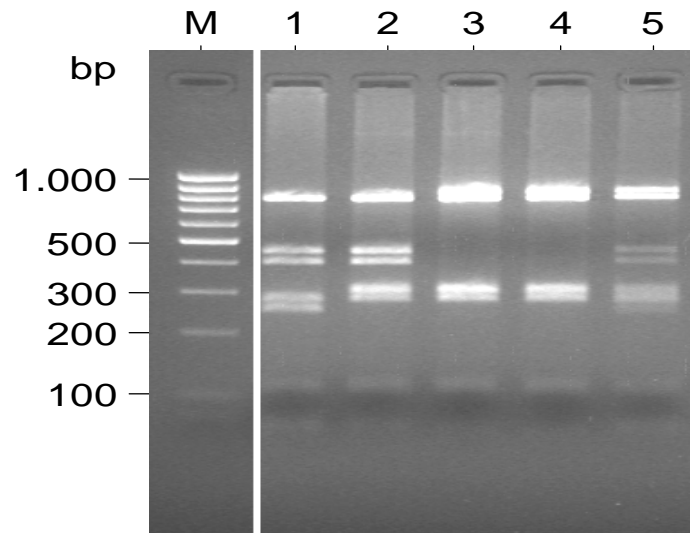


Abbildung 8: Elektrophoresemuster des MspI-Verdau (PCR Nr. 4) zum Nachweis von Allel *8 und *14. Spur M: 100 bp-Längenstandard; Spur 1-10: homozygot Wildtyp (1758G/G). Bei keiner Probe wurde die Mutation nachgewiesen, die für Allel *8 (1758G>T) bzw. für Allel *14 (1758G>A) diagnostisch ist.

3.2.3.2 Nachweis der Allel *2/*41-assoziierten Mutation (2850C>T) und der Promotermutation (-1584C>G)

Die Mutation 2850C>T ist sowohl mit dem Allel *CYP2D6**2A als auch mit dem Allel *CYP2D6**41 assoziiert (Home Page of the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee 2002). Um beide Allele voneinander unterscheiden zu können, wurde der Promoterbereich analysiert. Allel *CYP2D6**2A weist in diesem Bereich die Mutation -1584C>G auf, wohingegen bei Allel *41 keine vom Wildtyp-Allel (*1) abweichende Sequenz vorliegt (-1584C). Wurde bei Proben die Allel *2/*41-assoziierte Mutation 2850C>T nachgewiesen und war die Promotermutation abwesend, so konnte davon ausgegangen werden, dass das in seiner Aktivität reduzierte Allel *41 vorliegt. Wurde hingegen sowohl die Allel *2/*41-assoziierte Mutation (2850C>T) als auch die Promotermutation (-1584C>G) nachgewiesen, war davon auszugehen, dass das in seiner Aktivität voll funktionsfähige Allel *2A vorliegt. Die Durchführung der PCR mit anschließendem Restriktionsenzymverdau wurde bereits unter 2.2.5.2 und 2.2.5.3 beschrieben. In Abbildung 9 sind exemplarisch Elektrophoresemuster der beiden RFLP-Reaktionen dargestellt.

A



B

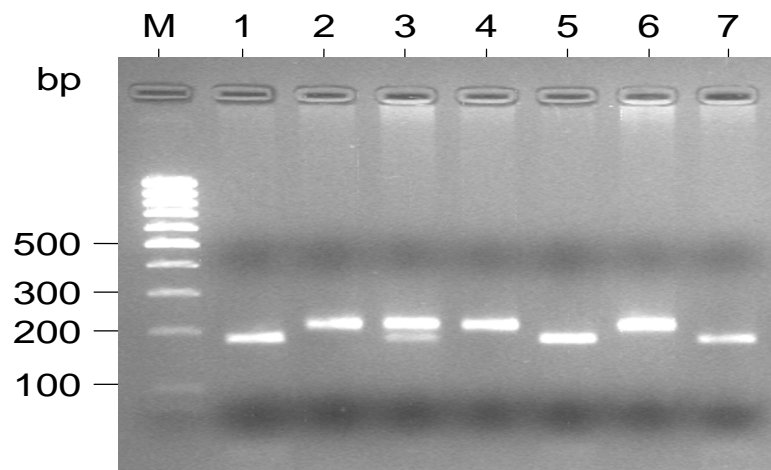


Abbildung 9: Ergebnisse des HhaI- und des SmaI-Verdau. **A:** HhaI-Verdau. Spur M: 100 bp-Längenstandard; Spur 1 und 2: homozygot Wildtyp (2850C/C); Spur 5: heterozygot (2850C/T); Spur 3 und 4 homozygot Mutation (2850T/T). **B:** SmaI-Verdau. Spur M: 100 bp-Längenstandard; Spur 2, 4 und 6: homozygot Wildtyp (-1584C/C); Spur 3: heterozygot (-1584C/G); Spur 1, 5 und 7: homozygot Mutation (-1584G/G).

3.3 CYP2D6-Genotyp- und Allelverteilung

Die unterschiedlichen *CYP2D6*-Genotypen und -Allele, die innerhalb der Studienpopulation nachgewiesen wurden, sind in Tabelle 37 aufgelistet.

CYP2D6-Genotypverteilung		
	28 UAW-Patienten n (%)	16 Nonresponder n (%)
UM:		
*2xN/*2	0 (0)	3 (19)
EM:		
*1/*1	2 (7)	2 (13)
*1/*2	4 (14)	3 (19)
*1/*10	1 (4)	0 (0)
*1/*41	3 (11)	0 (0)
*1/*4	4 (14)	3 (19)
*1/*5	2 (7)	0 (0)
*2/*2	0 (0)	1 (6)
*2/*41	1 (4)	1 (6)
*2/*3	0 (0)	0 (0)
*2/*4	1 (4)	0 (0)
*2/*5	0 (0)	1 (6)
IM:		
*41/*4	2 (7)	0 (0)
*41xN/*4	0 (0)	1 (6)
PM:		
*3/*4	2 (7)	0 (0)
*4/*4	5 (18)	1 (6)
*4/*5	1 (4)	0 (0)
*5/*5	0 (0)	0 (0)

CYP2D6-Allelverteilung		
	28 UAW-Patienten n (%)	16 Nonresponder n (%)
*1	18 (64)	10 (62,5)
*2	6 (21)	13 (81)
*3	2 (7)	0 (0)
*4	20 (71)	6 (38)
*5	3 (11)	1 (6)
*6	0 (0)	0 (0)
*8	0 (0)	0 (0)
*10	1 (4)	0 (0)
*12	0 (0)	0 (0)
*14	0 (0)	0 (0)
*41	6 (21)	2 (13)

Tabelle 37: Häufigkeiten der *CYP2D6*-Genotypen und -Allele der Studienteilnehmer. Die Allele *CYP2D6**1 und *2 sind mit normaler Aktivität verbunden, *CYP2D6**3, *4, *5, *6, *8, *12 und *14 sind Null-Allele. Die Allele *CYP2D6**10 und *41 weisen eine reduzierte *CYP2D6*-Aktivität *in vivo* auf. Wenn keines der genannten Allele nachgewiesen wurde, ist von dem Vorhandensein des Allels *CYP2D6**1 ausgegangen worden.

3.3.1 *CYP2D6*-Genotyp-Verteilung der Patienten mit UAW

Acht der 28 UAW-Patienten (29%) wiesen zwei Null-Allele auf (*0/*0; zugeordneter Phänotyp: PM). Bei zwei Patienten (7%) lag ein *IM/*0 bzw. *IM/*IM-Genotyp vor (zugeordneter Phänotyp: IM) und bei 18 Patienten (64%) konnte mindestens ein voll funktionsfähiges Allel nachgewiesen werden (*EM/*0, *EM/*IM bzw. *EM/*EM). Letzteren Patienten wurde ein EM-Phänotyp zugewiesen. In dem Kollektiv der Patienten mit UAW wurde keine *CYP2D6*-Genduplikation detektiert. Die Häufigkeit von PM in der Gruppe der Patienten mit UAW war verglichen mit der allgemeinen deutschen Bevölkerung (7,2%, 33/456, Sachse et al. 1997; 7,7%, 15/195, Griese et al. 1998) ca. 4-fach erhöht ($p < 0,0001$, χ^2 -Test; Abbildung 10).

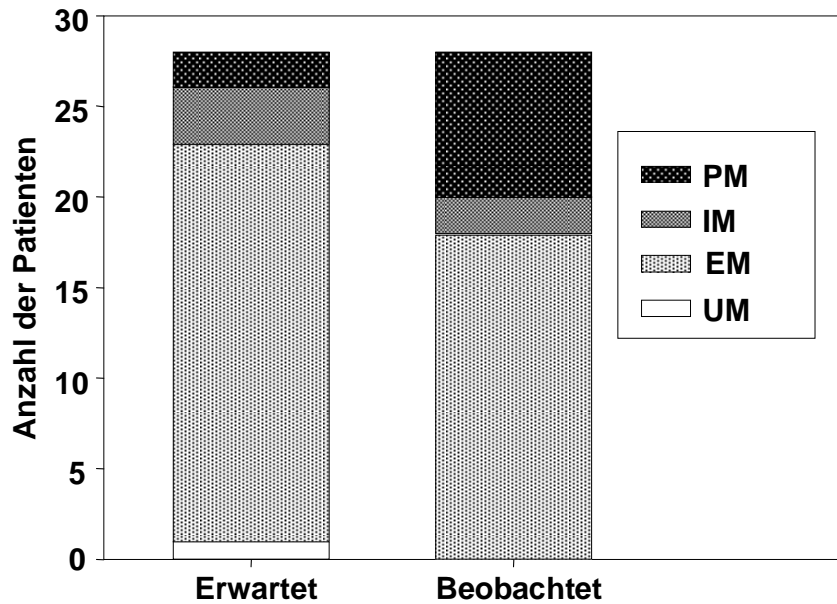


Abbildung 10: Erwartete und beobachtete Genotypverteilung bei Patienten mit UAW. Die erwartete Genotypverteilung wurde aufgrund der Allelfrequenz in der deutschen Bevölkerung errechnet. In einer Stichprobe von 28 Patienten sind statistisch nur 1,9 Patienten mit einem *poor metabolizer* (PM)-Genotyp zu erwarten. In dem Kollektiv der Patienten mit UAW der vorliegenden Studie wiesen jedoch 8 Patienten einen PM-Genotyp auf ($p < 0,0001$). IM, intermediate metabolizer; EM, extensive metabolizer; UM, ultrarapid metabolizer. Das Risiko der UAW-Patienten, einen PM-Genotyp zu besitzen war gegenüber den historischen Kontrollen 3,95-fach erhöht (95%-CI: 2,02 bis 7,7).

3.3.2 CYP2D6-Genotyp-Verteilung der Patienten mit Therapieversagen

Vier der 16 Patienten mit Therapieversagen (25%) wiesen eine CYP2D6-Genduplikation auf. Bei drei dieser Patienten lag ein $*2xN/*2$ Genotyp vor, was einem UM-Phänotyp entspricht. Bei dem verbleibenden Patienten wurde ein $*41xN/*4$ Genotyp festgestellt. Da die phänotypischen Konsequenzen dieser genetischen Konstellation unbekannt sind, wurde dieser Patient als EM-Phänotyp eingruppiert. Die Frequenz der ultraschnellen Metabolisierer, welche aus einer CYP2D6-Genamplifikation resultieren, liegt in der allgemeinen deutschen Bevölkerung bei 2-3,5%. Verglichen damit kam innerhalb der Patientengruppe mit Therapieversagen bei 18% aller Probanden eine CYP2D6-Genamplifikation vor. Somit waren Patienten mit einer Genamplifikation in der vorliegenden Studie im Vergleich zur allgemeinen deutschen Bevölkerung ca. 5-fach überrepräsentiert ($p < 0,0013$, χ^2 -Test; Abbildung 11).

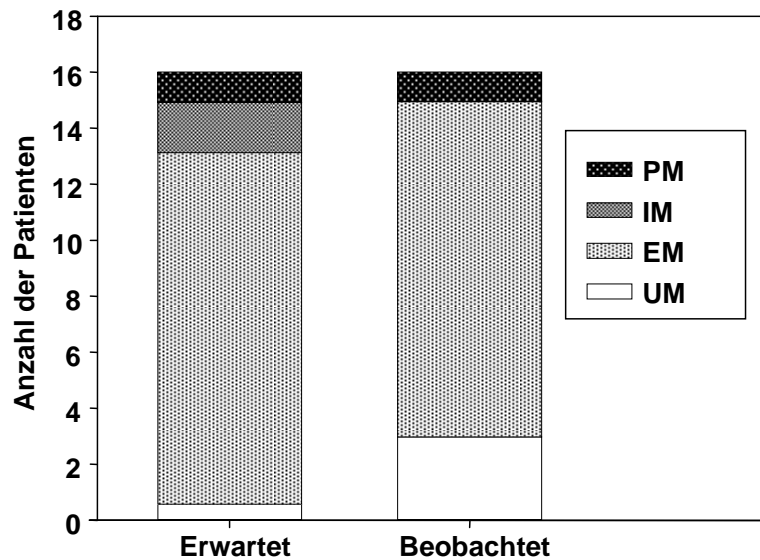


Abbildung 11: Erwartete und beobachtete Genotypverteilung bei Patienten mit Therapieversagen. Die erwartete Genotypverteilung wurde aufgrund der Allelfrequenz in der deutschen Bevölkerung errechnet. In einer Stichprobe von 16 Patienten sind statistisch nur 0,57 Patienten mit einem UM-Genotyp zu erwarten. In dem Kollektiv der Patienten mit Therapieversagen in der vorliegenden Studie wiesen jedoch 3 Patienten einen *ultrarapid-metabolizer* (UM)-Genotyp auf ($p=0,0013$).

3.4 Patienten mit unerwünschten Arzneimittelwirkungen unter Antidepressiva-Therapie: PM versus Non-PM

Im Folgenden wird innerhalb des Kollektivs der Patienten, die auf Antidepressiva-Therapie mit UAW reagiert haben, die Gruppe der PM der Gruppe der Non-PM gegenübergestellt.

3.4.1 Demographische Daten, Therapieindikationen und weitere Erkrankungen (PM versus Non-PM)

PM und Non-PM unterschieden sich hinsichtlich wesentlicher demographischer Daten und der Indikationen zur Antidepressiva-Therapie nicht voneinander (Tabelle 38 und 39).

Demographische Daten	8 PM	20 Non-PM
Geschlecht:		
Frauen	4 (50)	15 (75)
Alter (Jahre)	44 \pm 20	52 \pm 8
Körpergröße (cm)	170 \pm 7	169 \pm 7
Gewicht (kg)	72 \pm 12	75 \pm 18

Tabelle 38: Patientendaten. Beim Geschlecht ist die Anzahl der Patienten n (Prozent) angegeben, bei Alter, Körpergröße und Gewicht jeweils der Mittelwert \pm Standardabweichung.

Indikationen zur Antidepressiva-Therapie	8 PM n (%)	20 Non-PM n (%)
Depression (nicht näher erläutert)	4 (50)	9 (45)
Depression mit Angst- bzw. Panikstörung	1 (12,5)	4 (20)
Angststörung	0 (0)	1 (5)
Bipolare affektive Störung	1 (12,5)	0 (0)
Reaktive Depression	1 (12,5)	1 (5)
Dysthymie	0 (0)	1 (5)
Psychovegetatives Erschöpfungssyndrom	0 (0)	2 (10)
Postpartale Depression	1 ()	0 (0)
Schizoaffective Psychose	0 (0)	1 (5)
Insomnie	0 (0)	1 (5)

Tabelle 39: Indikationen zur Antidepressiva-Therapie bei Patienten mit UAW.

3.4.2 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen unter Antidepressiva-Therapie (PM versus Non-PM)

Tabelle 40 faßt alle UAW der PM und Non-PM zusammen, die auf den Fragebögen dokumentiert wurden. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen PM und Non-PM, bezüglich der Häufigkeit der einzelnen UAW betraf (Fisher's Exact Test). In Tabelle 41 werden die Ausprägungen der UAW von PM und Non-PM einander gegenüber gestellt.

Unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW)	8 PM n (%)	20 Non-PM n (%)
Anticholinerge Symptome:		
Mundtrockenheit	6 (75)	15 (75)
Akkommodationsstörung	1 (12,5)	2 (10)
Obstipation	5 (62,5)	8 (40)
Ileus	0 (0)	1 (5)
Miktionsbeschwerden	2 (25)	3 (15)
Tachykardie	1 (12,5)	7 (35)
Hyperhidrosis	1 (12,5)	7 (35)

Tabelle 40: UAW, die in der Gruppe der PM bzw. in der Gruppe der Non-PM unter der Therapie mit Antidepressiva auftraten. Angegeben ist jeweils die Anzahl der Patienten n (Prozent). Keiner der Unterschiede zwischen PM und Non-PM war statistisch signifikant.

Unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW)	8 PM n (%)	20 Non-PM n (%)
Herz-Kreislauf		
Hypertonie	0 (0)	1 (5)
Hypotonie	0 (0)	2 (10)
Orthostatische Störungen	4 (50)	5 (25)
Kopfschmerzen	4 (50)	6 (30)
Schwindel	3 (37,5)	9 (45)
Herzdruck	1 (12,5)	0 (0)
Rhythmusstörungen (1 Pat. Vorhofflimmern)	0 (0)	3 (15)
Tachykardie	1 (12,5)	7 (35)
Erregungsleitungsstörung (QT-Verlängerung)	0 (0)	1 (5)
ZNS		
EEG-Veränderungen	1 (12,5)	0 (0)
Schlafstörungen	5 (62,5)	6 (30)
Agitiertheit	2 (25)	10 (50)
Akathisie	0 (0)	2 (10)
Verwirrtheit	0 (0)	1 (5)
Angst	3 (37,5)	5 (25)
Tremor	2 (25)	8 (40)
Depression	4 (5)	4 (20)
Sedation	1 (12,5)	5 (25)
Müdigkeit	5 (62,5)	10 (50)
Sexuelle Funktionsstörungen	1 (12,5)	4 (20)
Libido vermindert	2 (25)	3 (15)
Amenorrhoe	1 (12,5)	0 (0)
Appetitsteigerung	2 (25)	5 (25)
Gastrointestinaltrakt		
Übelkeit	4 (50)	7 (35)
Erbrechen	1 (12,5)	1 (5)
Diarrhoe	0 (0)	2 (10)
Obstipation	5 (62,5)	8 (40)
Hauterscheinungen		
Erythem	0 (0)	1 (5)
Urtikaria	1 (12,5)	2 (10)
Labor		
Leberenzymerrhöhung	2 (25)	1 (5)
Sonstige		
Schwächegefühl	0 (0)	1 (5)
Hitzegefühl	1 (12,5)	2 (10)

Tabelle 40 (Forts.): UAW getrennt nach CYP2D6-Genotyp.

Ausprägung der UAW	8 PM n (%)	20 Non-PM n (%)
schwach	0 (0)	1 (5)
mittel	4 (50)	9 (45)
stark	4 (50)	10 (50)

Tabelle 41: Ausprägung der UAW in der Gruppe der PM verglichen mit der Gruppe der Non-PM. Statistisch zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,80$; χ^2 -Test).

Die folgende Tabelle 42 gibt einen Überblick über den Zeitpunkt, an dem erstmalig nach Behandlungsbeginn mit Antidepressiva UAW aufgetreten sind. Es wird wieder die Gruppe der PM mit der Gruppe der Non-PM verglichen, wobei sich statistisch kein signifikanter Unterschied zeigte ($p=0,57$; χ^2 -Test).

Auftreten der UAW	8 PM n (%)	20 Non-PM n (%)
ab dem 1. Einnahmetag	2 (25)	9 (45)
ab dem 2. Einnahmetag	2 (25)	2 (10)
ab dem 3. Einnahmetag	0 (0)	1 (5)
später	4 (50)	8 (40)

Tabelle 42: Zeit bis zum erstmaligen Auftreten von UAW unter Antidepressiva-Therapie in der Gruppe der PM verglichen mit der Gruppe der Non-PM.

3.4.3 Therapeutische Konsequenzen nach Auftreten der UAW unter Antidepressiva-Therapie (PM versus Non-PM)

Die Zeitspanne, nach der aufgrund von UAW die Antidepressiva-Dosis reduziert bzw. die Antidepressiva-Therapie abgebrochen wurde, betrug bei PM im Mittel 41 ± 11 Tage und bei Non-PM im Mittel 127 ± 38 Tage. Die Gruppe der PM unterschied sich nicht signifikant von der Gruppe der Non-PM, wenn man die Zeitspanne vergleicht, die verging, bis aufgrund von UAW therapeutische Konsequenzen gezogen wurden ($p=0,16$; Mantel Cox-Test). In Tabelle 43 sind die therapeutischen Maßnahmen, die aufgrund von UAW vorgenommen wurden, aufgelistet. Bei 3 Patienten wurde wegen der guten Wirksamkeit des Antidepressivums trotz UAW keine Dosisreduktion bzw. Therapieabbruch vorgenommen. Die UAW wurden teilweise medikamentös behandelt.

Therapeutische Konsequenzen	8 PM n (%)	20 Non-PM n (%)
Abbruch der Antidepressiva-Therapie aufgrund von UAW	7 (87,5)	15 (75)
Reduktion der Antidepressiva-Dosis ohne Therapieabbruch	1 (12,5)	2 (10)
Unveränderte Antidepressiva-Dosis	0 (0)	3 (15)

Tabelle 43: Auswirkungen der UAW auf die weitere Antidepressiva-Therapie.

3.4.4 Therapeutische Konsequenzen nach Auftreten der UAW unter Antidepressiva-Therapie (PM und IM versus EM)

Stellt man die Patienten mit einer Einschränkung des Metabolismus (PM und IM) den EM gegenüber, so ergibt sich, dass bei Extensive Metabolisern die AD-Therapie nach im Mittel 140 ± 41 und in der kombinierten PM/IM-Gruppe die AD-Therapie nach im Mittel 35 ± 9 Tagen abgebrochen, bzw. die Dosis reduziert worden ist ($p=0,03$; Mantel Cox-Test). In Tabelle 44 sind die therapeutischen Maßnahmen, die aufgrund von UAW vorgenommen wurden, aufgelistet.

Therapeutische Konsequenzen	10 PM + IM n (%)	18 EM n (%)
Abbruch der AD-Therapie aufgrund von UAW	9 (90)	13 (72)
Reduktion der AD-Dosis ohne Therapieabbruch	1 (10)	2 (11)
Unveränderte Antidepressiva-Dosis	0 (0)	3 (17)

Tabelle 44: Auswirkungen der UAW auf die weitere Antidepressiva-Therapie.

3.4.5 Begleitmedikation (PM versus Non-PM)

Neun Patienten (32%) nahmen neben dem Antidepressivum aus Tabelle 36 keine weiteren Psychopharmaka ein (Neuroleptika, Sedativa, zusätzl. Antidepressiva). Unter diesen neun Patienten wurden vier Patienten (Non-PM) mit keinem zusätzlichen Medikament behandelt. Patienten, die Medikamente mit wesentlichen pharmakokinetischen Interaktionen einnahmen, waren zuvor aus der Studie ausgeschlossen worden.

3.5 Patienten mit Therapieversagen unter Antidepressiva-Therapie: UM versus Non-UM

Im Folgenden wird innerhalb des Kollektivs der Patienten, die während der Antidepressiva-Behandlung keinen Therapieerfolg zeigten, die Gruppe der UM der Gruppe der Non-UM gegenübergestellt.

3.5.1 Demographische Daten, Therapieindikationen und weitere Erkrankungen (UM versus Non-UM)

UM und Non-UM unterschieden sich hinsichtlich wesentlicher demographischer Daten und der Indikationen zur Antidepressiva-Therapie nicht voneinander (Tabellen 45 und 46).

Demographische Daten	3 UM	13 Non-UM
Geschlecht:		
Frauen	2 (67)	11 (85)
Alter (Jahre)	49 ±2	42 ±12
Körpergröße (cm)	166 ±1	170 ±8
Gewicht (kg)	70 ±18	78 ±12

Tabelle 45: Patientendaten. Beim Geschlecht ist die Anzahl der Patienten n (Prozent) angegeben, bei Alter, Körpergröße und Gewicht jeweils der Mittelwert ± Standardabweichung.

Indikationen zur Antidepressiva-Therapie	3 UM n (%)	13 Non-UM n (%)
Depression (nicht näher erläutert)	1 (33,3)	3 (23)
Depression mit Angst- bzw. Panikstörung	1 (33,3)	2 (15)
Bipolare affektive Störung	1 (33,3)	2 (15)
Reaktive Depression	0 (0)	1 (8)
Dysthymie	0 (0)	1 (8)
Schwangerschaftspsychose	0 (0)	1 (8)
Postpartale Depression	0 (0)	1 (8)
Schizoaffektive Psychose	0 (0)	2 (15)

Tabelle 46: Indikationen zur Antidepressiva-Therapie in der Gruppe der Non-Responder, getrennt nach dem Vorliegen von Allelen mit funktionell wirksamer Duplikation.

3.5.2 Therapeutische Konsequenzen bei Therapieversagen unter Antidepressiva-Therapie (UM versus Non-UM)

Die Zeitspanne nach der aufgrund von Therapieversagen die Antidepressiva-Dosis erhöht bzw. die Antidepressiva-Therapie abgebrochen wurde, betrug bei UM im Mittel 73 Tage und bei Non-UM im Mittel 398 Tage. Der Unterschied des zeitlichen Verlaufs bis zur Reaktion auf das Therapieversagen kann zwischen den Patienten mit *CYP2D6*-Amplifikation und den übrigen Patienten aufgrund der kleinen Fallzahl nicht auf Signifikanz geprüft werden. In Tabelle 47 sind die therapeutischen Maßnahmen, die bei den Nonrespondern vorgenommen wurden, im Einzelnen

aufgelistet. Bei 4 Patienten wurde trotz Therapieversagens keine Dosiserhöhung, sondern nach einer Behandlungsdauer von mindestens 28 Tagen (Einschlusskriterium) ein Therapieabbruch vorgenommen. Bei drei dieser vier Patienten wurden aufgrund des Therapieversagens zusätzliche therapeutische Maßnahmen ergriffen. Tabelle 48 zeigt die zusätzlichen Maßnahmen, die aufgrund von Therapieversagen bei einigen Patienten eingeleitet wurden. Bei zwei Patienten wurden neben der Verordnung eines Zusatzmedikaments noch eine weitere therapeutische Maßnahme (Elektrokrampftherapie, transcranielle Magnetstimulation) durchgeführt.

Therapeutische Konsequenzen	3 UM n (%)	13 Non-UM n (%)
Erhöhung der Antidepressiva-Dosis	3 (100)	9 (69)
Unveränderte Antidepressiva-Dosis	0 (0)	4 (31)
Abbruch der Antidepressiva-Therapie	3 (100)	10 (77)
Kein Abbruch der Antidepressiva-Therapie	0 (0)	3 (23)

Tabelle 47: Auswirkungen des Therapieversagens auf die weitere Antidepressiva-Therapie.

Zusätzliche therapeutische Maßnahmen	UM	Non-UM
Zusatzmedikation (Sedativum, Neuroleptikum, zusätzl. Antidepressivum)	3	11
Elektrokrampftherapie (EKT)	0	1
Transcranielle Magnetstimulation	0	1
Psychosomatische Klinik	0	1
Keine weiteren Maßnahmen	0	1

Tabelle 48: Zusätzliche Maßnahmen aufgrund von Therapieversagen.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersuchte den Zusammenhang zwischen dem *CYP2D6*-Genotyp und dem Auftreten von UAW bzw. Therapieversagen aufgrund von Unwirksamkeit unter der Behandlung mit Antidepressiva, die überwiegend durch *CYP2D6* metabolisiert werden. Der ausgeprägte Polymorphismus des *CYP2D6*-Gens ist eine Ursache für die erheblichen interindividuellen Unterschiede in der Metabolisierungskapazität des *CYP2D6*-Enzyms. Das Spektrum der Metabolisierungskapazität reicht vom vollständigen Fehlen des *CYP2D6*-Enzyms (*poor metabolizer*, PM) bis zu einer Überexpression des *CYP2D6*-Enzyms (*ultrarapid metabolizer*, UM) aufgrund von Genamplifikationen.

Zahlreiche Medikamente werden über *CYP2D6* verstoffwechselt, darunter auch verschiedene Antidepressiva. Der Einfluß des *CYP2D6*-Genotyps auf die Pharmakokinetik zahlreicher Medikamente ist in vielen Studien belegt worden. So waren in einer Kohorten-Studie, die ebenfalls am Lehrstuhl für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität Erlangen-Nürnberg durchgeführt wurde, nach einer durchschnittlichen Therapiedauer von 13 Monaten mit einem *CYP2D6*-Substrat (Metoprolol) die Plasmakonzentrationen bei PM ca. 4- bis 5-fach höher als bei Patienten, die keinen PM-Genotyp aufwiesen (Rau et al. 2002).

Obwohl der Einfluß des *CYP2D6*-Genotyps und des daraus resultierenden Phänotyps auf die Pharmakokinetik intensiv untersucht wurde, sind die klinischen Konsequenzen nicht klar und hängen sicher auch von der therapeutischen Breite des jeweiligen Arzneimittels und dem Ausmaß der Konzentrationsveränderung durch den *CYP2D6*-Polymorphismus ab.

Die vorliegende Studie versuchte die Frage zu klären, inwieweit sich eine unterschiedliche Metabolisierungskapazität auf wichtige klinische Parameter, nämlich das Auftreten von UAW oder Therapieversagen unter der Therapie mit Antidepressiva, auswirken kann. Aus diesem Grund wurde in dieser Studie der Genotyp von Patienten bestimmt, die unter einer entsprechenden Therapie UAW entwickelten bzw. die keinen Therapieerfolg hatten, um zu prüfen, ob bei diesen Patienten häufiger bestimmte genetische Konstellationen zu finden sind als in der allgemeinen deutschen Bevölkerung.

Unter den Patienten mit UAW waren ca. 4-mal soviel PM wie man in einer Stichprobe dieser Größe der allgemeinen deutschen Bevölkerung erwarten dürfte (ca. 7% versus 29%). Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, daß ein Zusammenhang zwischen dem PM-Phänotyp und einer verstärkten Neigung zur Entwicklung von UAW unter Antidepressiva besteht.

Zwei Studien zeigten, dass genetisch bedingte PM, welche mit Antidepressiva und Neuroleptika behandelt wurden, eine deutlich stärkere Neigung hatten, UAW zu entwickeln und bei ihnen auch wesentlich mehr stationäre Aufenthalte in psychiatrischen Einrichtungen notwendig waren als bei EM (de Leon et al. 1998, Chou et al. 2000). Einer anderen Studie zufolge war kein Zusammenhang zwischen dem Genpolymorphismus des *CYP2D6*-Gens und UAW bei psychiatrischen Patienten (de Vries et al. 2002). Jedoch wurden in dieser Studie keine weiteren Einzelheiten über die verabreichten Medikamente angegeben, so dass es schwer abzuschätzen ist, wie relevant *CYP2D6* für den Metabolismus der untersuchten Pharmaka war.

Die vorliegende Studie hatte sich zum Ziel gesetzt, Patienten mit unerwünschten Arzneimittelwirkungen und Nonresponder unter klinischen Standardbedingungen zu untersuchen. Bei nahezu 80% der Patienten waren die UAW so stark ausgeprägt, dass sie zu einem Therapieabbruch führten. 60% der Patienten in der Gruppe mit unerwünschten Arzneimittelwirkungen waren mit trizyklischen Antidepressiva behandelt worden. Ca. 30% der UAW-Patienten waren mit selektiven Wiederaufnahmehemmern (SSRI) behandelt worden, was die gegenwärtige Verschreibungspraxis in Deutschland reflektiert (Lohse et al. 2003). Auf der anderen Seite ist zu bedenken, dass trizyklische Antidepressiva aufgrund ihres unspezifischen Rezeptorbindungsprofils häufiger UAW verursachen. Aufgrund des Studiendesigns kann zwischen diesen beiden Möglichkeiten der unterschiedlichen Gewichtung der beiden Substanzklassen bei den UAW-Patienten jedoch nicht unterschieden werden.

Ferner war wegen des retrospektiven Ansatzes der Studie eine Klassifikation und eine exakte Erhebung der UAW und des Therapieversagens anhand eines validierten Erfassungssystems nicht möglich. Unter den Patienten mit UAW kamen 4-mal soviel PM vor als von der Genotyp-Verteilung der allgemeinen deutschen Bevölkerung zu erwarten wäre (95%-Vertrauensintervall: 2,7- bis 5,6-fach).

Die Überrepräsentation der PM in der Gruppe der UAW-Patienten war mit einer Verminderung der Häufigkeit von Patienten mit EM-Genotyp verknüpft.

Obwohl mehrere IM-Allele (*9, *10 und das häufige *41-Allel) durch die gewählte Genotypisierungsstrategie nachgewiesen werden konnten, war kein häufigeres Auftreten von IM-Genotypen bei den UAW-Patienten in der vorliegenden Studie zu verzeichnen. Diese Allele waren zum Zeitpunkt der Studien von Leon et al. (1998) und Chou et al. (2000) noch nicht bekannt. Der Einfluss von IM-Allelen auf den Metabolismus des CYP2D6-Substrates Metoprolol und auf die Plasmakonzentration wurde kürzlich am Lehrstuhl für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität Erlangen-Nürnberg untersucht (Rau et al. 2002). In einer weiteren Studie waren IM-Genotypen bei Patienten, die während der Behandlung mit dem Antihypertensivum Metoprolol UAW entwickelten, ebenfalls nicht überrepräsentiert (Wuttke et al. 2002). Die phänotypische Variabilität in der Gruppe der IM ist stark ausgeprägt. Auch ist der Effekt eines IM-Genotyps deutlich vom Substrat abhängig. Das Ausmaß der metabolischen Einschränkung für die hier untersuchten Antidepressiva ist derzeit nicht im Detail bekannt.

Da die einzelnen Arzneistoffe in dieser Untersuchung nur selten vorkamen, ist es nicht möglich, das relative UAW-Risiko einzelner Antidepressiva abzuschätzen. Die Situation wurde zusätzlich noch dadurch erschwert, dass Paroxetin und Fluoxetin potente CYP2D6-Inhibitoren sind und somit die Fähigkeit haben, ihren eigenen Metabolismus zu beeinträchtigen. In zwei Studien wurde beobachtet, dass nach wiederholten Gaben von 30 mg Paroxetin, 25-fache interindividuelle Unterschiede in der Höhe der Plasmakonzentrationen zu verzeichnen waren (Sindrup et al. 1992). Diese Unterschiede wurden hauptsächlich durch die differierende CYP2D6-Ausgangskapazität erklärt. Zudem scheint das Ausmaß der CYP2D6-Inhibition durch Paroxetin bei verschiedenen EM zu variieren, so dass sogar unter *steady-state*-Bedingungen das Auftreten einer PM-Phänokopie nicht immer beobachtet wurde (Alfaro et al. 1999, Lam et al. 2002).

Durch die Einschränkung des Metabolismus bei PM und IM ist zu erwarten, dass es selbst bei Verabreichung relativ kleiner Dosen von CYP2D6-Substraten früh zu hohen Plasmakonzentrationen kommt. In Übereinstimmung damit legen unsere Daten nahe, dass bei Patienten mit verminderter Metabolisierungskapazität und UAW die Dosis früher reduziert wurde bzw. die Therapie eher abgebrochen wurde, was wiederum vermuten lässt, dass UAW bei diesen Patienten frühzeitiger

aufgetreten sind. Andererseits kann von der Art und Schwere der UAW nicht auf den *CYP2D6*-Genotyp geschlossen werden. Qualitativ unterschieden sich die UAW zwischen PM und EM nicht voneinander.

Von den 16 Nonrespondern wiesen 4 eine Duplikation des funktionellen Allels auf. Bei 3 Patienten wurde ein klassischer UM-Genotyp ($*2xN/*2$) detektiert. Ein Patient hatte einen $*41xN/*4$ -Genotyp. Da ihm schwer ein Phänotyp zugewiesen werden konnte, wurde dem Patienten in dieser Untersuchung ein EM-Phänotyp zugewiesen. Die Metabolisierungskapazität des *CYP2D6*-Enzyms hängt wahrscheinlich von der Anzahl der Gen-Kopien des funktionellen Allels ab. Die Häufigkeit von UM-Genotypen mit dem Vorliegen der Amplifikation funktioneller *CYP2D6*-Allele war in der vorliegenden Studie 5-mal höher als die UM-Frequenz in der allgemeinen deutschen Bevölkerung (18% gegenüber 2,0%-3,5%; $P = 0,0012$). Diese Daten legen nahe, dass es eine Assoziation zwischen dem *CYP2D6*-UM-Genotyp und der Neigung gibt, auf *CYP2D6*-abhängig metabolisierte Antidepressiva in Standarddosierung therapeutisch nicht anzusprechen.

Bemerkenswert sind eine kürzlich veröffentlichte prospektive Studie und eine Fall-Kontroll-Studie, bei denen die Auswirkung des *CYP2D6*-Genotyps bezüglich der Neigung UAW bzw. Therapieversagen unter der Behandlung mit Haloperidol und anderen Neuroleptika zu entwickeln, untersucht wurde (Brockmöller et al. 2002, Schillevoort et al. 2002). In Übereinstimmung mit unseren Daten über Antidepressiva hatten PM häufiger und schwerere für Antipsychotika typische UAW. Die Therapie von Patienten mit der Amplifikation funktioneller Allele war deutlich weniger effektiv als die Therapie von EM.

Die Aussagekraft der vorliegenden Studie ist naturgemäß durch die relativ niedrige Patientenanzahl eingeschränkt. Zusammengefasst legen unsere Daten jedoch nahe, dass der *CYP2D6*-Genotyp ein Faktor ist, welcher mit der Neigung assoziiert ist, UAW oder Therapieversagen unter der Behandlung mit *CYP2D6*-abhängig metabolisierten Antidepressiva zu entwickeln. Es muss jedoch in größeren prospektiven Studien überprüft werden, ob eine individualisierte Pharmakotherapie, die sich am *CYP2D6*-Genotyp der Patienten orientiert, tatsächlich dazu beiträgt, das Auftreten von UAW bzw. Therapieversagen bei Patienten zu vermindern und ob ein solches Konzept kosteneffektiv ist. Ein entsprechendes Vorgehen ist bereits von Kirchheiner et al. (2001) empfohlen worden. Allerdings basieren diese Empfehlungen auf relativ geringen Fallzahlen.

Zukünftige große und prospektive Studien werden klären müssen, ob eine prätherapeutische Genotypisierung tatsächlich zu einer relevanten Verbesserung der Effektivität und Sicherheit einer Therapie mit Antidepressiva beiträgt und kosteneffektiv ist.

5 Zusammenfassung

5.1 Hintergrund und Ziele

Aufgrund eines Polymorphismus des *CYP2D6*-Gens ist die genetisch determinierte Aktivität des hepatischen Enzyms Cytochrom P450 2D6 (*CYP2D6*) interindividuell sehr unterschiedlich.

Bei etwa 7% der deutschen Bevölkerung ist die Aktivität des Enzyms *CYP2D6* deutlich reduziert (*poor metabolizer*, PM), so dass es unter Einnahme zahlreicher Antidepressiva, welche vorwiegend über *CYP2D6* abgebaut werden, zu vielfach höheren Plasmakonzentrationen kommen kann, verglichen mit Personen, welche über eine normale Enzymaktivität verfügen. Diese erhöhten Plasmakonzentrationen könnten mit einem vermehrten Auftreten von unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW) verbunden sein.

Ca. 2% der deutschen Bevölkerung weisen eine Duplikation des intakten *CYP2D6*-Allels auf. Dies führt zu einer vermehrten Expression des *CYP2D6*-Enzyms, was zur Folge hat, dass die betreffenden Antidepressiva besonders schnell abgebaut werden (*ultrarapid metabolizer*, UM) und somit keine ausreichende Wirkstoffkonzentration im Blut erreicht werden kann. Eine zu niedrige Plasmakonzentration der Antidepressiva könnte mit Therapieversagen assoziiert sein.

Die Bedeutung des *CYP2D6*-Genpolymorphismus für die Therapiesicherheit und – Effektivität ist Gegenstand intensiver Forschungen. Die vorliegende Studie hat untersucht, ob in einem Kollektiv von Patienten, die mit UAW bzw. mit Therapieversagen auf *CYP2D6*-abhängig metabolisierte Antidepressiva reagiert haben, genetisch bedingte *poor metabolizer* bzw. *ultrarapid metabolizer* im Vergleich zur allgemeinen deutschen Bevölkerung überrepräsentiert sind.

5.2 Methoden

Die Analyse des *CYP2D6*-Genabschnittes erfolgte nach der DNA-Extraktion aus Vollblut mit unterschiedlichen Methoden für die verschiedenen Allele. Die Null-Allele *3, *4 und *6 wurden durch Allel-Differenzierung mit fluoreszenzmarkierten Sonden ermittelt. Die Deletion des gesamten *CYP2D6*-Gens (Null-Allel *5) wurde mit einer *Long-range*-PCR nachgewiesen, während die Null-Allele *8, *12 und *14, ebenso

die funktionellen Allele *2, *10 und *41 mit der konventionellen PCR-RFLP ermittelt wurden. Der Nachweis der Duplikation des *CYP2D6*-Gens erfolgte ebenfalls durch *Long-range*-PCR. Die unerwünschten Arzneimittelwirkungen und alle anderen erhobenen Daten wurden mittels eines standardisierten Fragebogens erfasst.

5.3 Ergebnisse und Beobachtungen

In die vorliegende Studie wurden 44 Patienten eingeschlossen. Von den 28 UAW-Patienten wiesen acht (29%) einen PM-Genotyp (*0/*0) auf. Bei zwei weiteren UAW-Patienten (7%) lag ein *IM/*0 bzw. *IM/*IM-Genotyp (IM-Phänotyp) vor, und bei den restlichen 18 UAW-Patienten (64%) konnte mindestens ein voll funktionsfähiges *CYP2D6*-Allel nachgewiesen werden (*EM/*0, *EM/*IM bzw. *EM/*EM; EM-Phänotyp). Die PM-Frequenz in der Gruppe der Patienten mit UAW war somit verglichen mit der allgemeinen deutschen Bevölkerung, in der 7,2-7,7% einen PM- Genotyp aufweisen, ca. 4-fach überrepräsentiert ($p < 0,0001$, χ^2 -Test).

In dem Kollektiv der 16 Nonresponder-Patienten wiesen vier Probanden (25%) eine *CYP2D6*-Genduplikation auf. Bei drei dieser Patienten lag ein *2xN/*2 Genotyp vor, was einem UM-Phänotyp entspricht. Bei dem verbleibenden Patient wurde ein *41xN/*4 Genotyp detektiert. Da das Wissen über die Metabolisierungskapazität dieser Genkonstellation gegenwärtig noch nicht als gesichert angesehen werden kann, wurde dieser Patient als EM eingruppiert. Verglichen mit der allgemeinen deutschen Bevölkerung, in der 2-3,5% eine *CYP2D6*-Genamplifikation aufweisen, lag die UM-Frequenz innerhalb der Patientengruppe mit Therapieversagen bei 18% und war somit ca. 5-fach überrepräsentiert ($p < 0,0001$, χ^2 -Test).

5.4 Praktische Schlussfolgerungen

Die vorliegenden Daten belegen, dass der PM-Genotyp bzw. der UM-Genotyp mit einer erhöhten Frequenz von UAW bzw. Therapieversagen unter der Therapie mit Antidepressiva assoziiert sind. Um daraus jedoch konkrete Schlussfolgerungen für die Therapie mit Antidepressiva ziehen zu können, müssen diese Ergebnisse in prospektiven Studien überprüft werden, da das absolute Risiko von PM, UAW zu entwickeln bzw. von UM, therapieresistent zu sein, aus der vorliegenden Untersuchung nicht abgeleitet werden kann.

6 Literaturverzeichnis

1. Alfaro CL, Lam YW, Simpson J, Ereshefsky L (1999) CYP2D6 status of extensive metabolizers after multiple-dose fluoxetine, fluvoxamine, paroxetine or sertraline. *J Clin Psychopharmacol* 19:155-63
2. Applied Biosystems (2000) Pre-Developed TaqMan Assay Reagents Allelic Discrimination Protocol. USA. Part Number 4312214B
3. Baumann P (1996) Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship of the selective serotonin reuptake inhibitors. *Clin Pharmacokinet*, 31(6):444-69
4. Benet LZ, Kroetz DL, Sheiner LB (1996) Pharmacokinetics. In : Hardman JG, Goodman Gilman A, Limbird LE (eds), Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 9th ed. McGraw-Hill, New York 3-27
5. Bertilsson L, Dahl ML (1996) Polymorphic drug oxidation: Relevance to the treatment of psychiatric disorders. *CNS Drugs* 5: 200-223
6. Bertz RJ, Granneman GR (1997) Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. *Clin Pharmacokinet* 32:210-258
7. Bock KW, Schrenk D, Froster A, Griese EU, Mörike K, Brockmeier D, Eichelbaum M (1994) The influence of environmental and genetic factors on CYP2D6, CYP1A2 and UDP-Glucuronosyltransferases in man using sparteine, caffeine and paracetamol as probes. *Pharmacogenetics*, 4:209-218
8. Brockmüller J, Cascorbi I, Kerb R, Roots I (1996) Combined analysis of inherited polymorphisms in arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1, microsomal epoxid hydrolase, and cytochrome P450 enzymes as modulators of bladder cancer risk. *Cancer Res*:56, 3915-3925
9. Brockmüller J, Kirchheiner J, Schmider J, Walter S, Sachse C, Mueller-Oerlinghausen B (2002) The impact of the CYP2D6 polymorphism on haloperidol pharmacokinetics and on the outcome of haloperidol treatment. *Clin Pharmacol Ther* 72:438-52
10. Broly F, Gaedigk A, Heim M, Eichelbaum M, Mörike K, Meyer UA (1991) Debrisoquine/sparteine hydroxylation genotype and phenotype: analysis of common mutations and alleles of CYP2D6 in a European population. *DNA Cell Biol* 10:545-558
11. Brøsen K, Hansen JG, Nielsen KK, Sindrup SH, Gram LF (1993) Inhibition by paroxetine of desipramine metabolism in extensive but not in poor metabolizers of sparteine. *Eur J Clin Pharmacol* 44(4):349-355
12. Brøsen K, Nielsen PN, Brusgaard K, Gram LF, Skjodt K (1994) CYP2D6 genotype determination in the Danish population. *Eur J Clin Pharmacol* 47:221-225

13. Brøsen K (2000) Antiarrhythmics. In: Levy RH, Thummel KE, Trager WF, Hansten PD, Eichelbaum M (Hrsg) *Metabolic Drug Interactions*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 603-614
14. Chen S, Chou WH, Blouin RA (1996) The cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) enzyme polymorphism: screening costs and influence on clinical outcomes in psychiatry. *Clin Pharmacol Ther* 60:522-534
15. Chou WH, Yan FX, de Leon J, Barnhill J, Rogers T, Cronin M (2000) Extension of a pilot study: impact from the cytochrome P450 2D6 polymorphism on outcome and costs associated with severe mental illness. *J Clin Psychopharmacol* 20:246-51
16. Crewe HK, Lennard MS, Tucker GT, Woods FR, Haddock RE (1992) The effect of selective serotonin re-uptake inhibitors on cytochrome P4502D6 (CYP2D6) activity in human liver microsomes. *Br J Clin Pharmacol* 34(3):262-265
17. Dahl ML, Johansson I, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M, Sjöqvist F (1995) Ultrarapid Hydroxylation of Debrisoquine in a Swedish Population. Analysis of the Molecular Genetic Basis. *JPET* 274:516-520
18. Dalen P, Dahl ML, Bernal Ruiz ML, Nordin J, Bertilsson L (1998) 10-Hydroxylation of nortriptyline in white persons with 0, 1, 2, 3, and 13 functional CYP2D6 genes. *Clin Pharmacol Ther* 63:444-52
19. Daly AK, Brockmüller J, Broly F, Eichelbaum M, Evans WE, Gonzalez FJ, Huang JD, Idle JR, Ingelman-Sundberg M, Ishizaki T, Jacqz-Aigrain E, Meyer UA, Nebert DW, Stehen VM, Wolf CR, Zanger UM (1996) Nomenclature for human CYP2D6 alleles. *Pharmacogenetics* 6: 193-201
20. De Leon J, Barnhill J, Rogers T, Boyle J, Chou WH, Wedlund PJ (1998) Pilot study of the cytochrome P450-2D6 genotype in a psychiatric state hospital. *Am J Psychiatry* 155:1278-80
21. De Vries EM, Pot HJ, Conemans JMH, Uges DRA (2002) The clinical relevance of routine genotyping of CYP2D6/2C19 null alleles of psychiatric patients (abstract). *Br J Clin Pharmacol*, 53:543P-59P.
22. Eichelbaum M, Spannbrucker N, Steincke B, Dengler HJ (1979) Defective N-oxidation of sparteine in man: a new pharmacogenetic defect. *Eur J Clin Pharmacol* 16: 183-187
23. Eichelbaum M, Mineshita S, Ohnhaus EE, Zekorn C (1986) The influence of enzyme induction on polymorphic sparteine oxidation. *Br J Clin Pharmacol* 22:49-53
24. Eichelbaum M, Baur MP, Dengler HJ (1987) Chromosomal assignment of human cytochrome P-450 (debrisoquine/sparteine type) to chromosome 22. *Br J Clin Pharmacol* 23:455-458
25. Eichelbaum M, Kroemer HK, Fromm MF (1997) Impact of P450 genetic polymorphism on the first-pass extraction of cardiovascular and neuroactive drugs, *Adv Drug Deliv Rev* 27:171-199

26. Evert B, Griese EU, Eichelbaum M (1994) A missense mutation in exon 6 of the CYP2D6 gene leading to a histidine 324 to proline exchange is associated with the poor metabolizer phenotype of sparteine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 350:434-439
27. Fichtl B, Eichelbaum M, Schwab M (2001) Wirkungen des Organismus auf Pharmaka: Allgemeine Pharmakokinetik. In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Förstermann U, Starke K (Hrsg), *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 8. Auflage, Urban & Fischer, München, Jena 26-56
28. Fjordstrand L, Jeppesen U, Eap CB, Powell K, Baumann P, Brøsen K (1999) The stereoselective metabolism of fluoxetine in poor and extensive metabolizers of sparteine. *Pharmacogenetics* 9(1):55-60
29. Flockhart DA (2002) Cytochrome P450 Drug Interaction Table. <http://medicine.iupui.edu/flockhart/>
30. Gleixner C, Müller M, Wirth S (2000) *Neurologie und Psychiatrie*, 2. Auflage, Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach 281-285
31. Göthert M, Bönisch H, Schlicker E, Bonn, Helmchen H (2001) Psychopharmaka: Pharmakotherapie psychischer Erkrankungen. In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Förstermann U, Starke K (Hrsg), *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 8. Auflage, Urban & Fischer, München Jena 295-300
32. Gonzalez FJ, Vilbois F, Hardwick JP, McBride OW, Nebert DW, Gelboin HV, Meyer UA (1988a) Human debrisoquine 4-hydroxylase (P450IID1): cDNA and deduced amino acid sequence and assignment of the CYP2D locus to chromosome 22, *Genomics* 2: 174-179
33. Gonzalez FJ, Skoda RC, Kimura S, Umeno M, Zanger UM, Nebert DW, Gelboin HV, Hardwick JP, Meyer UA. (1988b) Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature* 331:442-6
34. Gough AC, Smith CA, Howell SM, Wolf CR, Bryant SP, Spurr NK (1993) Localization of the CYP2D gene locus to human chromosome 22q13.1 by polymerase chain reaction, in situ hybridization, and linkage analysis. *Genomics* 15: 430-432
35. Gram LF, Guentert TW, Grange S, Vistisen K, Brøsen K (1995) Moclobemide, a substrate of CYP2C19 and an inhibitor of CYP2C19, CYP2D6, and CYP1A2: a panel study. *Clin Pharmacol Ther* 57(6):670-677
36. 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
37. Guidice JM, Marez D, Sabbagh N (1997) Evidence for CYP2D6 expression in human lung. *Biochem Biophys Res Commun* 8:79-85

38. Harvey AT, Preskorn SH (1996) Cytochrome P450 enzymes: interpretation of their interactions with selective serotonin reuptake inhibitors. Part I. *J Clin Psychopharmacol* 16:273-285
39. Hiemke C, Hartter S (2000) Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacol Ther* 85(1):11-28
40. Hogstedt S, Lindberg B, Rane A (1983) Increased oral clearance of metoprolol in pregnancy. *Eur J Clin Pharmacol* 24:217-220
41. Home Page of the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/>
42. Ingelman-Sundberg M (1999) Duplication, multiduplication, and amplification of genes encoding drug-metabolizing enzymes: evolutionary, toxicological and clinical pharmacological aspects. *Drug metabolism reviews* 31(2), 449-459
43. Johansson I, Lundqvist E, Bertilsson L, Dahl ML, Sjöqvist F, Ingelman-Sundberg M (1993) Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11825-11829
44. Johansson I, Lundqvist E, Dahl ML, Ingelman-Sundberg M (1996) PCR-based genotyping for duplicated and deleted CYP2D6 genes. *Pharmacogenetics*, 6, 351-355
45. Ketter TA, Flockhart DA, Post RM, Denicoff K, Pazzaglia PJ, Marangell LB, George MS, Callahan AM (1995) The emerging role of Cytochrome P450 3A in psychopharmacology. *J Clin Psychopharmacol* 15:387-398
46. Kimura S, Umeno M, Skoda RC, Meyer UA, Gonzalez FJ (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* 45:889-904
47. Kirchheiner J, Brøsen K, Dahl ML, Gram LF, Kasper S, Roots I, Sjöqvist F, Spina E, Brockmüller J (2001) CYP2D6 and CYP2C19 genotype-based dose recommendations for antidepressants: a first step towards subpopulation-specific dosages, *Acta Psychiatr Scand* 104: 173-192
48. Küttler T (1996) *Pharmakologie und Toxikologie*, 17. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 218-222
49. Lam YW, Gaedigk A, Ereshefsky L, Alfaro CL, Simpson J (2002) CYP2D6 inhibition by selective serotonin reuptake inhibitors: analysis of achievable steady-state plasma concentrations and the effect of ultrarapid metabolism at CYP2D6, *Pharmacotherapy* 22 :1001-6
50. Laux G (1995) Krankheiten: Affektive Störungen. In: Möller HJ, Laux G, Deister A, *Psychiatrie*, Hippokrates, Stuttgart 58-96
51. Leinonen E, Koponen HJ, Lepola U (1995) Paroxetine increases serum trimipramine concentration, *Hum Psychopharmacol* 10 :345-347

52. Leon AC, Portera L, Lowell K, Rheinheimer D (1998) A strategy to evaluate a covariate by group interaction in an analysis of covariance, *Psychopharmacol Bull* 34(4):805-9
53. Lohse MJ, Lorenzen A, Mueller-Oerlinghausen B (2002) Psychopharmaka. In: Schwabe U, Pfaffrath D (Hrsg.), *Arzneiverordnungsreport*, Springer, Berlin, 2003, 641-78
54. Løvlie R, Daly AK, Molven A, Idle JR, Stehen VM (1996) Ultrarapid metabolizers of debrisoquine: Characterization and PCR-based detection of alleles with duplication of the CYP2D6 gene. *FEBS Letters* 392, 30-34
55. Løvlie R, Daly AK, Matre GE, Molven A, Stehen VM (2001) Polymorphisms in CYP2D6 duplication-negative individuals with the ultrarapid metabolizer phenotype: a role for the CYP2D6*35 allele in ultrarapid metabolism? *Pharmacogenetics* 11: 45-55
56. Mahgoub A, Idle JR, Dring LG, Lancaster R, Smith RL (1977) Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man. *Lancet* 2: 584-586
57. McInnes GT, Brodie MJ (1988) Drug interaction that matter: a critical reappraisal. *Drugs* 36:83-110
58. Meyer UA, Zanger UM (1997) Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 269-296
59. Meyer UA (2000) Pharmacogenetics and adverse drug reactions. *Lancet* 356: 1667-1671
60. Möller HJ, Müller WE, Volz HP (2000) *Psychopharmakotherapie*, 2. Auflage, Kohlhammer, Stuttgart, 290
61. Mutschler E, Schäfer-Korting M (1996) *Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, 7. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1996, 152-159
62. Nebert DW, Nelson DR, Feyereisen R (1989) Evolution of the cytochrome P450 genes. *Xenobiotica* 19:1149-1160
63. Nelson D (2001) David Nelson's homepage for cytochrome P450 nomenclature: Cytochrome P450s in humans. <http://drnelson.utmem.edu/P450lect.html>
64. Nordin C, Bertilsson L (1995) Active hydroxymetabolites of antidepressants. Emphasis on E-10-hydroxy-nortriptyline. *Clin Pharmacokinet* 28:26-40
65. Otani K, Aoshima T (2000) Pharmacogenetics of Classical and New Antipsychotic Drugs. *Therapeutic Drug Monitoring* 22:118-121
66. Poulsen L, Brøsen K, Arendt-Nielsen L, Gram LF, Elbaek K, Sindrup SH (1996) Codeine and morphine in extensive and poor metabolizers of sparteine: pharmacokinetics, analgesic effect and side effects. *Eur J Clin Pharmacol* 51: 289-295

67. Preskorn SH, Beber JH, Faul JC, Hirschfeld RMA (1990) Serious adverse effects of combining fluoxetine and tricyclic antidepressants. *Am J Psychiatry* 147:532
68. Preskorn SH, Alderman J, Chung M, Harrison W, Messing M, Harris S (1994) Pharmacokinetics of desipramine coadministered with sertraline or fluoxetine. *J Clin Psychopharmacol* 14 :90-98
69. Prueksaritanont T, Dwyer LM, Cribb AE (1995) (+)-Bupropion 1'-hydroxylation activity in human and rhesus monkey intestine and liver. *Biochem Pharmacol* 50:1521-1525
70. Raimundo S, Fischer J, Eichelbaum M, Griese EU, Schwab M, Zanger UM (2000) Elucidation of the genetic basis of the common 'intermediate metabolizer' phenotype for drug oxidation by CYP2D6. *Pharmacogenetics* 10: 577-581
71. Rau T, Heide R, Bergmann K, Wuttke H, Werner U, Feifel N, Eschenhagen T (2002) Effect of the *CYP2D6* genotype on metoprolol metabolism persists during long-term treatment. *Pharmacogenetics* 12:465-72
72. Ring BJ, Wrighton SA (2000) Industrial Viewpoint: Application of *In Vitro* Drug Metabolism in Various Phases of Drug Development. In: Levy RH, Thummel KE, Trager WF, Hansten PD, Eichelbaum M (Hrsg), *Metabolic Drug Interactions*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 29-39
73. Sachse C, Brockmüller J, Bauer S, Roots I, (1997), Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet* 60: 284-295
74. Sachse C, Brockmüller J, Hildebrand M, Müller K, Roots I (1998) Correctness of prediction of the CYP2D6 phenotype confirmed by genotyping 47 intermediate and poor metabolizers of debrisoquine. *Pharmacogenetics* 8: 181-185
75. Sachse C (1999) Erbliche Polymorphismen von Cytochrom P450-2D6: Identifizierung, Populationshäufigkeit und Bedeutung für Arzneimittelwirkungen. Dissertation im Fach Biologie, Berlin, 34
76. Sallee FR, DeVane CL, Ferrell RE (2000) Fluoxetine-related death in a child with cytochrome P-450 2D6 genetic deficiency. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 10(1):27-34
77. Saxena R, Shaw GL, Relling MV, Frame JN, Moir DT, Evans WE (1994) Identification of a new variant CYP2D6 allele with a single base deletion in exon 3 and its association with the poor metabolizer phenotype. *Hum Mol Genet* 3:923-926
78. Schillevoort I, de Boer A, van der Weide J, Steijns LS, Roos RA, Jansen PA, (2002) Antipsychotic-induced extrapyramidal syndromes and cytochrome P450 2D6 genotype: a case-control study. *Pharmacogenetics* 12:235-40

79. Schönhöfer PS, Bremen, Schwabe U (1992) Heidelberg, Therapeutischer Einsatz von Psychopharmaka: Behandlung von Depressionen mit Antidepressiva. In: Fülgraff G, Palm D (Hrsg), Pharmakotherapie, Klinische Pharmakologie, 8. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 245-250
80. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengrich FP (1994) Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 japanese and 30 caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* 270:414-423
81. Sindrup SH, Brøsen K, Gram LF (1992) Pharmacokinetics of the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine: nonlinearity and relation to the sparteine oxidation polymorphism. *Clin Pharmacol Ther* 51:288-95
82. Sindrup SH, Brøsen K, Gram LF, Hallas J, Skjelbo E, Allen A (1992) The relationship between paroxetine and the sparteine oxidation polymorphism. *Clin Pharmacol Ther* 51:278-87
83. Sindrup SH, Brøsen K (1995) The pharmacogenetics of codeine hypoalgesia. *Pharmacogenetics* 5: 335-346
84. Skjelbo E., Brøsen K (1998) Interaction between paroxetine and clomipramine as a possible reason for admission to a department of internal medicine. *Ugeskr Laeger* 160(39): 5665-5666
85. Smith DA, Abel SM, Hyland R, Jones BC (1998) Human cytochrome P450s: selectivity and measurement in vivo. *Xenobiotica*, 28:1095-1128
86. Spina E, Pollicino AM, Avenoso A, Campo GM, Perucca E, Caputi AP (1993) Effect of fluvoxamine on the pharmacokinetics of imipramine and desipramine in healthy subjects. *Ther Drug Monit* 14:194-196
87. Sproule BA, Otton SV, Cheung SW, Zhong XH, Romach MK, Sellers EM (1997) CYP2D6 inhibition in patients treated with sertraline. *Clin Psychopharmacol* 17(2):102-106
88. Steen VM, Andreassen OA, Daly AK, Tefre T, Borresen AL, Idle JR, Gulbrandsen AK (1995) Detection of the poor metabolizer-associated CYP2D6(D) gene deletion allele by long-PCR technology. *Pharmacogenetics* 5: 215-223
89. Stüven T, Griese EU, Kroemer HK, Eichelbaum M, Zanger UM (1996) Rapid detection of CYP2D6 null alleles by long distance- and multiplex-polymerase chain reaction. *Pharmacogenetics* 6: 417-421
90. Tefre T, Daly AK, Armstrong M, Leathart JBS, Idle JR, Brogger A, Borresen AI (1994) Genotyping of the *CYP2D6* gene in Norwegian lung cancer patients and controls. *Pharmacogenetics* 4:47-57
91. Vandel S, Bertschy G, Bonin B, Netzlof S, Francois TH, Vandel B, Sechter D, Bizouard P (1992) Tricyclic antidepressant plasma levels after fluoxetine addition. *Neuropsychobiology* 25:202-207

92. Vaughan DA (1988) Interaction of fluoxetine with tricyclic antidepressants. *Am J Psychiatry* 145:1478-1478
93. Vogel F, Motulsky AG (1986) *Human Genetics. Problems and Approaches*. Second, completely revised edition. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo 682-692
94. Wadelius M, Darj E, Frenne G, Rane A (1997) Induction of CYP2D6 in pregnancy *Clin Pharmacol Ther* 62:400-407
95. Warner M, Gustafsson JA (1993) Extrahepatic microsomal forms: brain cytochrome P450. In: Schenkman JB, Greim H (Hrsg), *Cytochrome P450*, Springer, Berlin Heidelberg New York 387-397
96. Wellhöner H-H (1997) *Allgemeine und systematische Pharmakologie und Toxikologie*, 6. Auflage, Springer, Berlin 365-373
97. Westermeyer J (1991) Fluoxetine-induced tricyclic toxicity extent and duration. *J Clin Psychopharmacol* 11:388-392
98. Wilkinson GR (2001) Pharmacokinetics. In: Hardman JG, Limbird LE, Goodman Gilman A (Hrsg), *Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*. 10th edition. McGraw-Hill, New York 3-29
99. Wuttke H, Rau T, Heide R, Bergmann K, Bohm M, Weil J (2002) Increased frequency of cytochrome P450 2D6 poor metabolizers among patients with metoprolol-associated adverse effects. *Clin Pharmacol Ther* 72:429-37
100. Zanger UM, Fischer J, Raimundo S, Stuvén T, Evert BO, Schwab M, Eichelbaum M (2001) Comprehensive analysis of the genetic factors determining expression and function of hepatic CYP2D6. *Pharmacogenetics* 11: 573-585

7 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AD	Antidepressivum
Arg	Arginin, R
bp	Basenpaare
C	Cytosin oder Cystein
°C	Grad Celsius
del	Deletion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotid-5'-triphosphate
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz Dihydrat
EEG	Elektroenzephalogramm
EM	<i>Extensive metabolizer</i>
F	<i>Forward</i>
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
g	Gramm
G	Guanin oder Glycin
Gly	Glycin, G
h	Stunde
H	Histidin
HWZ	Halbwertszeit
IM	<i>Intermediate metabolizer</i>
ins	Insertion
IQR	Quartilsabstand, <i>interquartile range</i>
kb	Kilobasenpaare
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
mg	Milligramm
ml	Milliliter
Min.	Minute
Mg	Magnesium
MAO	Monoaminoxidase
MQ	metabolischer Quotient (MR, <i>Metabolic ratio</i>)

Mut	Mutation
n	Anzahl
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
NA	Noradrenalin
NARI	Noradrenalin-Reuptake-Inhibitoren
NTC	<i>No template control</i> , Wasser-Kontrolle
P	Prolin
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PM	<i>Poor metabolizer</i>
R	<i>Reverse</i> oder Arginin
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i> , Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
rpm	<i>Revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
S	Serin
Sek.	Sekunde
SSRI	Selektive Serotonin-Reuptake-Inhibitoren
T	Thymin oder Threonin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TDM	Therapeutisches Drug Monitoring
TZA	Trizyklisches Antidepressivum
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
U	Unit
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkung
UM	<i>Ultrarapid metabolizer</i>
UV	Ultraviolett
V.a.	Verdacht auf
Wt	Wildtyp
x	fach
Z.n.	Zustand nach
ZNS	Zentrales Nervensystem

8 Verzeichnis der Vorveröffentlichungen

1. Wuttke H, Wohlleben G, Rau T, Eschenhagen T (2001) Analyse des *CYP2D6*-Genotyps - Ein Weg zur individualisierten Pharmakotherapie? NeuroTransmitter, 7-8: 32-34
2. Wohlleben G, Wuttke H, Thürauf N, Eschenhagen T, Rau T (2003) Contribution of the *CYP2D6*-Genotype to the occurrence of side-effects and of therapeutic failure during treatment with antidepressants and neuroleptics. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 367(Suppl 1): R116
3. Rau T, Wohlleben G, Wuttke H, Thürauf N, Lunkenheimer J, Lanczik M, Eschenhagen T (2004) *CYP2D6* genotype: Impact on adverse effects and nonresponse during treatment with antidepressants – A pilot study. Clin Pharmacol Ther, 75:386-93

9 Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung und unter Leitung von Herrn Professor Dr. med. Thomas Eschenhagen, Direktor des Lehrstuhls für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität Hamburg-Eppendorf. Ich danke ihm sehr herzlich für die Überlassung des Themas und für die stets freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Studie.

Herrn Dr. med. Thomas Rau danke ich sehr für seine fachliche Betreuung und besonders für die Hilfestellungen bei der Auswertung und Aufarbeitung der Daten.

Mein ganz besonderer Dank gilt der wissenschaftlichen Mitarbeiterin, Frau Dr. med. Henrike Wuttke, die die vorliegende Arbeit in allen Phasen betreute und mir stets mit ihrem fachlichen Wissen hilfsbereit und geduldig zur Seite stand.

Frau Ingrid Schmidt möchte ich besonders für ihre freundliche Zusammenarbeit bei der Durchführung der labortechnischen Analysen danken.

Für die Rekrutierung von Patienten und die Bereitstellung von Patientendaten möchte ich vor allem Herrn Dr. med. Norbert Thürauf danken.

Im Weiteren möchte ich allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Klinische Pharmakologie der Universität Erlangen für ihre Hilfsbereitschaft danken.

10 Lebenslauf

Name	Gerlinde Sigrid Wohlleben
Geburtsdatum	02. Januar 1967
Geburtsort	Nürnberg
Eltern	Karin und Peter Wohlleben

Schul Ausbildung

1973 - 1977	Grundschule Peter-Vischer, Nürnberg
1977 - 1979	Volksschule, Nürnberg
1979 - 1983	Peter-Vischer-Realschule, Nürnberg
1983 - 1985	Berufsfachschule für Wirtschaft
1985 - 1986	Berufsaufbauschule (Wirtschaft)
1986 - 1988	Berufsoberschule (Wirtschaft)

Hochschulausbildung

1988 - 1990	Studium der Wirtschaftspädagogik an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
1991 - 1993	Studium der Geographie an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
Ab 05.1995	Studium der Medizin an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
09.1997	Physikum
08.1999	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09.2000	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10.2000 – 09.2001	Praktisches Jahr
10.2001	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufstätigkeit

12.2002 – 05.2004	Ärztin im Praktikum, Innere Medizin, St.- Theresien-Krankenhaus, Nürnberg
07.2005 – 03.2007	Assistenzärztin, Innere Medizin, St.- Theresien-Krankenhaus, Nürnberg
04.2007 – 03.2008	Assistenzärztin, Allgemeinarztpraxis Dr. Schmeußner, Dr. Schlatterbeck, Nürnberg
Seit 04.2008	Assistenzärztin, Unfallchirurgische Praxis Dr. Dittenhöfer, Dr. Hämmerer, Fürth

11 EIDESSTATTLICHE 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.

Unterschrift: Ort, Datum:

12 **Anhang: Fragebogen**

INSTITUT FÜR EXPERIMENTELLE UND KLINISCHE PHARMAKOLOGIE UND TOXIKOLOGIE

Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Lehrstuhl für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
Vorstand: Prof. Dr. med. Thomas Eschenhagen
e-mail: thomas.eschenhagen@pharmakologie.uni-erlangen.de
<http://www.rrze.uni-erlangen.de/pharmakologie/>
z. Hd. Frau G. Wohlleben

Fahrstr. 17
D-91054 Erlangen, FRG
Tel: +49-9131-85-22198 o. -22772
Fax: +49-9131-85-22773

Bedeutung des CYP2D6-Genpolymorphismus für die Therapiesicherheit und –effektivität von CYP2D6-abhängig metabolisierten Psychopharmaka

Fragebogen

1. Patientendaten

Nachname <input style="width: 150px;" type="text"/>	Datum <input style="width: 100px;" type="text"/>
Vorname <input style="width: 150px;" type="text"/>	Geschlecht <input type="radio"/> weiblich <input type="radio"/> männlich
Geburtsdatum <input style="width: 150px;" type="text"/>	Körpergröße <input style="width: 50px;" type="text"/> cm
	Körpergewicht <input style="width: 50px;" type="text"/> kg

Grund für die CYP2D6-Genanalyse: Überschießende unerwünschte Arzneimittelwirkungen
 Therapieversagen
 Kontroll-Patient

2. Medikation

Psychopharmakon, unter dem UAW aufgetreten sind oder das vermindert wirksam war:
(Nur CYP2D6-Substrate der beiliegenden Liste angeben !)

Beginn der Einnahme : Dosis zu Beginn der Einnahme:

Präparat

Dosisänderung	Datum	<input style="width: 80px;" type="text"/>	<input style="width: 80px;" type="text"/>	<input style="width: 80px;" type="text"/>
<input type="radio"/> Nein <input type="radio"/> Ja	Dosis mg/d	<input style="width: 80px;" type="text"/>	<input style="width: 80px;" type="text"/>	<input style="width: 80px;" type="text"/>

Therapieabbruch	Datum des Abbruchs:	Erstbehandlung:
<input type="radio"/> Nein <input type="radio"/> Ja	<input style="width: 100px;" type="text"/>	<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein

Indikation zur Therapie:

Sind nach Einleitung der Therapie unerwünschte klinische Reaktionen aufgetreten?

Nein ab 1. Tag ab 2. Tag ab 3. Tag später:

(Bitte geben Sie auf Seite 2 an, um welche UAW es sich gehandelt hat !)

War das Präparat unwirksam? Nein Ja Falls ja, bitte kurze Beschreibung:

Namenscode	Erste 3 Buchstaben Nachname	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Erste 2 Buchstaben Vorname	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Geburtsdatum	<input type="text"/>
-------------------	--------------------------------	----------------------	----------------------	----------------------	-------------------------------	----------------------	----------------------	---------------------	----------------------

3. Unerwünschte Arzneimittelwirkungen

Präparat:
Anticholinerge Symptome:

1. Mundtrockenheit Ja Nein
2. Akkommodationsstörung Ja Nein
3. Mydriasis Ja Nein
4. Glaukomanfall Ja Nein
5. Obstipation Ja Nein
6. Ileus Ja Nein
7. Miktionsbeschwerden Ja Nein
8. Tachykardie Ja Nein
9. Hyperhidrosis Ja Nein
10. Hyperthermie Ja Nein

Herz-Kreislauf:

1. Hypertonie Ja Nein
2. Hypotonie Ja Nein
3. Orthostatische Störungen Ja Nein
4. Schwindel Ja Nein
5. Kopfschmerzen Ja Nein
6. Kollaps Ja Nein
7. Rhythmusstörungen Ja Nein
8. Tachykardie Ja Nein
9. Erregungsleitungsstörung Ja Nein
10. Kammerflimmern Ja Nein

Extrapyramidal-motorische UAW's:

1. Dyskinesie Ja Nein
2. Parkinsonoid Ja Nein
3. Akathisie Ja Nein

Malignes neuroleptisches Syndrom:
 Ja Nein

Serotonin-Syndrom:
 Ja Nein

Symptome der Prolaktinerhöhung:

1. Galaktorrhoe Ja Nein
2. Amenorrhoe Ja Nein
3. Gynäkomastie Ja Nein
4. Libido vermindert Ja Nein

Labor:

1. Leberenzymhöhung Ja Nein
2. Leukozytopenie Ja Nein

ZNS:

1. Schlafstörungen Ja Nein
2. Agitiertheit Ja Nein
3. Delir Ja Nein
4. Angst Ja Nein
5. Tremor Ja Nein
6. Krampfanfall Ja Nein
7. Myoklonien Ja Nein
8. Depression Ja Nein
9. Sedation Ja Nein
10. Müdigkeit Ja Nein
11. Somnolenz Ja Nein
12. Koma Ja Nein
13. Atemdepression Ja Nein
14. Sexuelle Funktionsstörungen Ja Nein
15. Appetitsteigerung Ja Nein

Gastrointestinaltrakt:

1. Übelkeit Ja Nein
2. Erbrechen Ja Nein
3. Diarrhoe Ja Nein
4. Obstipation Ja Nein

Hauterscheinungen:

1. Exanthem Ja Nein
2. Erythem Ja Nein
3. Urtikaria Ja Nein

Sonstige Reaktionen:

Namenscode	Erste 3 Buchstaben	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Erste 2 Buchstaben	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Geburtsdatum	<input type="text"/>
	Nachname					Vorname			

4. Therapeutische Konsequenzen

1. Wie stark waren die unerwünschten Arzneimittelwirkungen ausgeprägt?
(Falls nur einige UAW stark ausgeprägt waren, unterstreichen Sie diese bitte auf Seite 2)

schwach mittel stark

2. Mußten aufgrund von UAW oder Therapieversagen weitere therapeutische Maßnahmen ergriffen werden?

Nein Ja

3. Die unerwünschten klinischen Reaktionen waren nach Durchführung der genannten Maßnahmen (inklusive Dosisreduzierung und Therapieabbruch !):

- Unverändert vorhanden
 Rückläufig, aber mit Residuen
 Vollständig rückläufig, keine Residuen

5. Weitere Medikation

Wurden weitere Medikamente zur selben Zeit wie das auf Seite 1 genannte Psychopharmakon eingenommen?

Nein Ja

Präparat	Zeitraum der Einnahme	Dosis mg/d	UAW	Therapieversagen
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein	<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein	<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein	<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein	<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein	<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein	<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein

Falls es sich bei einem der eben genannten Medikamente um ein CYP2D6-Substrat handelt und es darunter zu UAW gekommen ist, können Sie die 2. Seite kopieren und diese dort aufführen.

6. Nach Therapieabbruch

Wurden nach Therapieabbruch ein oder mehrere Ersatzpräparate verordnet? Nein Ja

Präparat	Zeitraum der Einnahme	Dosis mg/d	UAW	Therapieversagen
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein	<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein	<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein	<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein

Namenscode	Erste 3 Buchstaben	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Erste 2 Buchstaben	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Geburtsdatum	<input type="text"/>
	Nachname				Vorname				

7. Vorerkrankungen

Liegen beim Patienten weitere Erkrankungen vor? Nein Ja

Raucher	<input type="radio"/> Nein	<input type="radio"/> Früher	<input type="radio"/> Gelegentlich	<input type="radio"/> Täglich	Menge/Tag	<input type="text"/>
Alkoholkonsum	<input type="radio"/> Nein	<input type="radio"/> Früher	<input type="radio"/> Gelegentlich	<input type="radio"/> Täglich		<input type="text"/>

8. Bemerkungen / Kurze Verlaufsbeschreibung

9. Arzt

**HERZLICHEN
DANK FÜR
IHRE**

Name	<input type="text"/>
Straße	<input type="text"/>
PLZ, Ort	<input type="text"/>
Telefon	<input type="text"/>
Unterschrift	<input type="text"/>

Ansprechpartnerin: Frau G. Wohlleben, Tel: 09131/85-22780