

Massenspektrometrische Diagnostik von *CYP2B6* Polymorphismen: Phänotypische Ausprägung in Lebergewebe und klinische Bedeutung

Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik (IV)
der Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde eines Doktors
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

vorgelegt von

Julia Blievernicht

aus Stuttgart

Hauptberichter: Prof. Dr. R. Schmid
Mitberichter: Prof. Dr. U. M. Zanger
Mitberichter: Prof. Dr. J. Pleiss

Tag der mündlichen Prüfung:
24. Juli 2008

Dr. Margarete Fischer-Bosch Institut
für Klinische Pharmakologie Stuttgart
Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart
2008

Für meine Eltern Anette und Ulrich Blievernicht

INHALTSVERZEICHNIS

Danksagung.....	5
Abkürzungen.....	6
Zusammenfassung.....	8
Summary.....	10
1 EINLEITUNG.....	12
1.1 Arzneimittelmetabolismus.....	12
1.1.1 Pharmakokinetik und Pharmakodynamik (biologische Faktoren).....	12
1.1.2 Cytochrom P450 – Enzyme.....	14
1.1.3 Pharmakogenetik.....	17
1.2 Cytochrom P450 2B6.....	18
1.2.1 Klinische Relevanz.....	19
1.2.2 Methode der Genotypisierung und Bestimmung des Haplotyps.....	20
1.3 Ziele der Arbeit.....	22
2 MATERIAL UND METHODEN.....	24
2.1 Materialien.....	24
2.1.1 Chemikalien.....	24
2.1.2 Antikörper, Enzyme, Primer.....	25
2.1.3 Plasmide und Bakterienstämme.....	25
2.1.4 Geräte.....	26
2.1.5 Sonstige Materialien.....	26
2.1.6 Software.....	27
2.1.7 Datenbanken.....	27
2.1.8 Puffer, Lösungen und Nährmedien,.....	27
2.2 Methoden.....	31
2.2.1 DNA- und Leberproben aus der IKP148 Studie.....	31
2.2.2 MALDI-TOF Massenspektrometrie.....	31
2.2.3 Herstellung von Kontrollen.....	35
2.2.4 Sequenzierung.....	37
2.2.5 Molekulare und computergestützte Analyse von Haplotypen.....	39
2.2.6 Proteinanalytische Methoden.....	39
2.2.7 Messung der katalytischen CYP2B6 Aktivität mit Bupropion.....	41
2.2.8 Nomenklatur und Software.....	44
2.2.9 Statistik.....	44
3 ERGEBNISSE.....	46
3.1 Strategie zur Entwicklung eines MALDI-TOF MS Assays zur simultanen Genotypisierung von <i>CYP2B6</i>	46
3.1.1 Selektion der <i>CYP2B6</i> Varianten.....	46
3.1.2 MALDI-TOF MS Assay Entwicklung.....	48
3.1.3 MALDI-TOF MS Assay-Validierung.....	51
3.1.4 Genotypisierung einer Leberbank.....	51
3.2 Umfassende Genotyp-Phänotyp Analyse von CYP2B6 an einer Leberbank.....	53

3.2.1	Einfluss von nichtgenetischen Faktoren auf die Gesamtpopulation (Geschlecht, Alter, Medikamente, Nikotin)	54
3.2.2	Frequenz-Analyse der CYP2B6 Varianten.....	58
3.2.3	CYP2B6 Haplotypen	59
3.2.4	Genotyp-Phänotyp Korrelation.....	64
3.2.5	Zusammenfassung der statistischen Auswertung	69
3.3	Einfluss des CYP2B6 Genotyps bei Patienten mit Morbus Parkinson	73
3.3.1	Studienbeschreibung.....	73
3.3.2	Ergebnisse und Auswertung	73
3.4	Assoziation von CYP2B6 Polymorphismen und HIV-Therapie	76
3.4.1	Assoziation von CYP2B6 Genotypen und Efavirenz Plasmakonzentration	76
3.4.2	Prädiktivität des CYP2B6 Genotyps auf die Efavirenz Therapie (A5128)..	81
4	DISKUSSION	84
4.1	CYP2B6 Varianten.....	84
4.2	CYP2B6 MALDI-TOF MS Genotypisierung – Methodenentwicklung.....	85
4.3	CYP2B6 MALDI-TOF MS Genotypisierung – Evaluierung	87
4.4	Einfluss nicht-genetischer Faktoren auf die Expression und Funktion von CYP2B6..	89
4.5	Polymorphismen als Ursache für eine variable Expression und/oder Funktion von CYP2B6 ?.....	92
4.6	Prädiktivität der CYP2B6 Allele für die HIV-Therapie	94
4.7	CYP2B6 Polymorphismen und Morbus Parkinson (Umweltfaktoren).....	96
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	98
6	ANHÄNGE	107
6.1	CYP2B6 Allel Nomenklatur	107
6.2	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	113
7	PUBLIKATIONEN	115
7.1	Posterpräsentationen.....	115
7.2	Originalarbeiten.....	115

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Ulrich M. Zanger möchte ich mich herzlich für die Bereitstellung des interessanten Themas, für seine lektorische und diskussionsfreudige Unterstützung sowie für seine wertvollen Anregungen bedanken.

Herrn Prof. Dr. Rolf Schmid vom Institut für Technische Biochemie danke ich herzlich für seine Bereitschaft, die Arbeit zu betreuen und zu begutachten.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Michel Eichelbaum sowie Prof. Dr. Matthias Schwab für die Möglichkeit, die Doktorarbeit am Dr. Margarete Fischer-Bosch Institut für Klinische Pharmakologie anfertigen zu können.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Pleiss danke ich für die Bereitschaft, die Arbeit zu begutachten und als Mitberichter zu fungieren.

Frau Dr. Kathrin Klein danke ich sehr herzlich für die vielen wissenschaftlichen und persönlichen Diskussionen und Ratschläge, sowie die kritische und sorgfältige Durchsicht des Manuskriptes.

Frau Dr. Elke Schöffeler und Dr. Tanja Saussele danke ich für die wissenschaftliche Unterstützung, sowie für manchen kollegialen Rat.

Ich danke Frau Dr. Simone Popp von Herzen für Ihre unermüdliche Unterstützung bei der Durchsicht des Manuskriptes sowie ihr, Maike Sonnenberg, Ina Abele, Marco Hofmann, Dr. Heike Tegude (Pipettierroboter) und im Besonderen Monika Rick für ein immer offenes Ohr und wertvolle Gespräche.

Weiterhin danke ich Andrea Zwicker, Britta Klumpp und Igor Liebermann für die technische und sportliche Unterstützung im Labor.

Für eine gute Zusammenarbeit und eine tolle Arbeitsatmosphäre möchte ich mich herzlich bei allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Klinische Pharmakologie bedanken. Besonders hervorheben und meinen Dank aussprechen möchte ich in diesem Zusammenhang Tabea Peusser, Susanne Karner, Clint Melgar, Dr. Julia Beisner und Kerstin Willecke.

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
ANOVA	“ <i>Analysis of Variance</i> ”
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure (n)
ATP	Adenosin-Triphosphat
a.u.	arbitrary units (relative Einheiten)
bp	Basenpaar (e)
C	Cytosin
CTP	Cytosin-Triphosphat
CYP	Cytochrom P450
d	desoxy
Da	Dalton
dd	didesoxy
DME	„ <i>drug metabolizing enzyme (s)</i> “
	Arzneimittel verstoffwechselnde Enzyme
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5´-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N´,N´-tetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
g	Gramm
Gal	Galaktosidase
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	Stunde (n)
HIV	“ <i>Human immune deficiency virus</i> ” (AIDS)
HPLC	“ <i>high performance liquid chromatography</i> ”
HWE	Hardy-Weinberg-Equilibrium
IKP	Institut Für Klinische Pharmakologie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen(paare)
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
M	mol/Liter
min	Minute(n)
µg, µl	Mikrogramm, Mikroliter
MALDI-TOF MS	” <i>matrix-assisted laser desorption ionization – time-of-flight mass spectrometry</i> ”
ml	Milliliter
(m)M	(milli)molar
mRNA	messenger - Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinsäureamidadenindinucleotid
NADPH	Nicotinsäureamidadenindinucleotidphosphat

ng	Nanogramm
OD	Optische Dichte
OR	odds ratio
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEX	„ <i>primer extension</i> “ Reaktion
PBS	„ <i>phosphate buffered saline</i> “
Psi	„ <i>pound per square inch</i> “, 1 bar = 14,5 psi
RFLP	„ <i>restriction fragment length polymorphism</i> “
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SAP	„ <i>shrimp alkaline phosphatase</i> “
SDS	Natrium dodecylsulfat
SNP	„ <i>Single nucleotide polymorphism</i> “
SV	„ <i>splice</i> “ Variante
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> → Taq-Polymerase
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris buffered saline
TEAA	Tri-ethyl-ammoniumacetat
Temed	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Tyrosin-Triphosphat
U	Unit(s)
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
X-Gal	X-Galactose

Zusammenfassung

Für Fremdstoff- und Arzneimittelstoffwechsel sind hauptsächlich die Cytochrom P450 (CYP) Enzyme der Leber verantwortlich. Diese Superfamilie der Monooxygenasen ist fähig, Arzneimittel und andere potentiell toxische Fremdstoffe in hydrophilere und damit leichter eliminierbare Stoffwechselprodukte umzuwandeln. Das CYP Isoenzym CYP2B6, das im Zentrum dieser Arbeit steht, metabolisiert verschiedene klinisch verwendete Medikamente wie Cyclophosphamid (ein Zytostatikum), Bupropion (Raucherentwöhnungstherapie) oder den reversen Transkriptase Hemmer Efavirenz (HIV-Therapie). Expression und Aktivität dieses Enzyms sind interindividuell hochvariabel, was neben biologischen und Umwelt-Faktoren auch genetische Ursachen hat. Zu Beginn dieser Arbeit waren Ausmaß und Auswirkungen von „*single nucleotide polymorphisms*“ (SNPs) bislang nur unzureichend untersucht. Dies lag hauptsächlich daran, dass ein geeignetes analytisches Verfahren für die Detektion der immer größeren Zahl von neu entdeckten Varianten und deren phänotypische Korrelation fehlte. Die MALDI-TOF Massenspektrometrie ist ein effizientes und sensitives Hochdurchsatz-Verfahren zur gleichzeitigen Detektion mehrerer SNPs. Der Vorteil gegenüber anderen Verfahren beruht auf der simultanen Genotypisierung mit Hilfe allel-spezifischer Primer-Verlängerungen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf dieser Basis eine hocheffiziente Genotypisierungsmethode entwickelt, validiert und etabliert. Die Methode ermöglichte es, für große Probenzahlen viele Mutationen (n=19) des *CYP2B6* Gens in kurzer Zeit und mit großer Präzision zu detektieren, wie an einem ausführlichen Vergleichstest nachgewiesen wurde. Der zweite Teil der Arbeit konzentrierte sich auf die Untersuchung der möglichen klinischen Relevanz einzelner *CYP2B6* Polymorphismen und Allele durch veränderte Proteinexpression bzw. -aktivität, unter Berücksichtigung von nicht-genetischen Faktoren wie Geschlecht, Alter, Rauchverhalten, Kaffee- bzw. Grapefruitsaftgenuss und Medikation. Dies konnte anhand einer umfangreichen Leberbank (n=235) durchgeführt werden. Die Ergebnisse liefern erstmals deutliche Hinweise auf die Assoziation einiger Allele, hier sei das *CYP2B6**6 Allel hervorgehoben, mit einem niedrigen Protein-Gehalt und einer erniedrigten Enzymaktivität. Eine signifikante Beeinflussung der Proteinexpression oder der Enzymaktivität durch das Geschlecht, das Alter oder die Umweltfaktoren konnte dagegen nicht nachgewiesen werden. Allerdings wurde ein Induktionseffekt der CYP2B6 Expression bei Patienten beobachtet, die mit dem Antiepileptikum Carbamazepin oder dem Analgetikum Metamizol behandelt wurden.

Verschiedene Kooperationen zu klinischen Gruppen ermöglichten die Untersuchung von Polymorphismen des *CYP2B6* an Patientenkollektiven mit differentem Krankheitshintergrund.

CYP2B6 und Morbus Parkinson: Neurologisch wirksame Substanzen wie Selegilin (Parkinson-Therapie) und andere exogene Umweltstoffe (Nikotin) werden von *CYP2B6* metabolisiert. Das Protein ist zudem auch im Gehirn exprimiert. Eine mögliche Assoziation von *CYP2B6* mit der Parkinsonschen Krankheit wurde mit Hilfe der Genotypisierung der *CYP2B6* Polymorphismen an DNA-Proben einer „*case-control*“ Studie mit Parkinson Patienten untersucht, in der Polymorphismen in anderen Stoffwechsel-Enzymen als mögliche Risiko-Faktoren beschrieben wurden. Diese Analyse ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied der Frequenz der *CYP2B6* Genotypen zwischen Patienten und Kontrollgruppe. Dass *CYP2B6* für die Entstehung von Morbus Parkinson eine Rolle spielt, kann damit jedoch nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden. Denn möglicherweise wirkt sich der Polymorphismus nur in Zusammenhang mit bestimmten Noxen aus. Dies könnte in spezifischen Studien weiter untersucht werden.

CYP2B6 und HIV-Therapie: Neue und seltene *CYP2B6* Mutationen waren hinsichtlich ihrer funktionellen Bedeutung in der HIV-Therapie noch weitestgehend unbekannt. Die Ergebnisse der Genotypisierung von DNA-Proben verschiedener HIV-Populationen belegten eindrucksvoll die Assoziation der *CYP2B6* Variante *6 sowohl mit erniedrigter Proteinexpression und Efavirenz-Hydroxylierung *in vitro* als auch im klinischen Umfeld der Efavirenz-Therapie. Zum ersten Mal wurde hier eine umfassende Analyse durchgeführt, die neben dem *6-Allel auch seltenere „*loss-of-function*“ Allele mit einschloss. Dadurch konnte die Prädiktivität für unerwartet hohe Plasmaspiegel des HIV-Therapeutikums erheblich gesteigert werden.

Die technischen Entwicklungen und Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit können zukünftig helfen, die Arzneimitteltherapie mit *CYP2B6* Substraten zu optimieren. Sie unterstreichen den Wert der umfassenden prädiktiven *CYP2B6* Genotypisierung für eine Anpassung der Medikamentendosis, um Nebenwirkungen zu vermeiden und das Ansprechen zu verbessern.

Summary

Cytochrome P450 (CYP) enzymes of the liver are the most important enzymes in drug metabolism. This superfamily of monooxygenases is able to transform drugs and possible toxic xenobiotics into more hydrophilic products easier to eliminate. The CYP isoenzyme CYP2B6 as focus of this thesis metabolizes drugs like cyclophosphamide (cytostatic drug), Bupropion (smoking cessation) or the reverse transcriptase inhibitor Efavirenz used against HIV. The interindividual expression as well as the activity of this enzyme is highly variable, caused either by biological or environmental or genetic factors. The extent and mechanisms behind “*single nucleotide polymorphisms*” (SNPs) are not yet fully analyzed. This fact was mainly due to a missing suitable analytical technique for the detection of the rising new variants and their correlation to the phenotypes. MALDI-TOF mass spectrometry is a highly efficient, sensitive high-throughput technique for the simultaneous detection of several SNPs. One advantage of this method compared to other detection methods is that of allele-specific primer extensions. In this work, a highly efficient genotyping method was developed, validated and established, which can be used to detect a lot of mutations (n=19) in the *CYP2B6* gene for large study populations very precisely and in a real short time, as it is shown in this comprehensive and comparative analysis. The second part of this work concentrated on the analysis of the clinical relevance of several *CYP2B6* polymorphisms/alleles on protein expression and activity in relation to gender, age, smoking behaviour, coffee- and grapefruit consumption and medication in a large liverbank (n=235). For the first time, the results showed the association of some of the alleles, especially the *6 allele, with a reduced protein content and enzyme activity. A significant correlation of expression and activity influenced by age, gender or environmental factors was not observed. An effect due to induction of CYP2B6 expression was however observed in patients treated with the antiepileptic drug carbamazepine and the analgesic metamizol. The *CYP2B6* polymorphisms could be analyzed in different cooperations to clinical trials with several disease backgrounds.

CYP2B6 and Morbus Parkinson: Neurological substances as selegiline (in Parkinson therapy) and other xenobiotics (nicotine) are metabolized by CYP2B6, which is also expressed in the brain. A possible association analysis of *CYP2B6* polymorphisms and Parkinson’s disease was done in a case-control study, for which polymorphisms are described as risk factors in other drug-metabolizing enzymes. This genotype testing revealed no significant frequency difference between patients and healthy controls. An exclusion of an influence of *CYP2B6* in

the Parkinson's disease development can however not be postulated, because the effect of some polymorphisms can occur together with specific toxic substances. This can be analysed by more specific research.

CYP2B6 and HIV-therapy: Newly found and rare *CYP2B6* mutations were not described in their functional relevance for the HIV therapy. The genotyping results of DNA samples of several HIV populations impressively showed the association of the *6 allele both with reduced protein expression and Efavirenz hydroxylation *in vitro* and in the clinical Efavirenz therapy. For the first time, this was a large-scaled analysis of the *6 allele and also some seldom loss-of-function alleles, which extensively increase the predictivity for unexpected high plasma levels of this HIV drug.

The used techniques and results of this work can help to optimize drug therapy for *CYP2B6* substrates in the future. They underline the value of *CYP2B6* genotyping predictive for drug dependent dosage to prevent adverse events and improve therapy response.

1 EINLEITUNG

1.1 Arzneimittelmetabolismus

Fremdstoffe, sogenannte Xenobiotika, zu denen Nahrung, Gifte und Arzneimittel gehören, werden aus der Umwelt aufgenommen und im Körper metabolisiert bzw. wieder eliminiert. Dies kann auf zwei Arten erfolgen, renal über die Niere und hepatisch über die Leber. Die Umwandlungsprozesse dieser Xenobiotika, aber auch endogener Substanzen, werden als Biotransformation bezeichnet. Hauptsächlich werden dabei lipophile Substanzen in hydrophile und damit leichter ausscheidbare Stoffe umgewandelt. Amphiphile Stoffe werden durch beide Ausscheidungssysteme eliminiert. In der Niere werden vor allem die wasserlöslichen Substanzen verstoffwechselt, einige fettlösliche Stoffe können allerdings nach der glomerulären Filtration rückresorbiert werden und sich daher im Fettgewebe anreichern.

Ein Hauptort der Biotransformation ist die Leber, in der vor allem lipophile Stoffe über den „*First-Pass*“-Effekt (erste Passage der Leber) umgewandelt und dann über die Galle in den Darm ausgeschieden werden. Des Weiteren gibt es noch zu einem kleinen Teil die Ausscheidung über Muttermilch, Schweiß, Speichel und Lunge (hier zum Beispiel die Narkotika-Ausatmung). Nicht wieder rückresorbierte oder in Galle gebundene Stoffe verlassen den Körper im Kot. An den eigentlichen chemischen Umwandlungsreaktionen in den hepatischen Zellen sind Enzyme beteiligt, die entweder gebunden an die Membran des Endoplasmatischen Retikulums oder in löslicher Form vorliegen und meist eine geringe Substratspezifität aufweisen. Dadurch sind nicht einzelne Enzyme allein für einen Fremdstoff verantwortlich, sondern es können meist mehrere Enzyme mittels Überlappen der Substratspezifität an verschiedenen Stoffwechselprozessen teilhaben.

1.1.1 Pharmakokinetik und Pharmakodynamik (biologische Faktoren)

Die Pharmakokinetik beschreibt, wie rasch und in welchem Ausmaß ein Stoff nach der Aufnahme anschließend im Blutplasma zur Verfügung steht, dann in den verschiedenen Zielgeweben auftritt und wo bzw. wie er wieder ausgeschieden wird. Dabei kann die individuelle Kinetik je nach Beschaffenheit des Magens und des Darms, der Verteilung im Körper, des Transportes sowie in den Eliminationswegen sehr variieren, und somit wird die

Fremdstoffverfügbarkeit verändert. Die Pharmakodynamik beschreibt die Wirkung eines Stoffes auf den Organismus, auf den die Substanz wirkt. Dies betrifft vor allem das körpereigene Rezeptorverhalten (Stimulation, Blockade), die Enzymaktivität (Induktion, Inhibition), bestimmte Mechanismen an Zellkanälen (Öffnung, Blockade) und Transportmechanismen der Zelle. Bei beiden Teilgebieten wird die Variabilität unter den verschiedenen Individuen und Populationen von exogenen sowie endogenen Faktoren beeinflusst. Umweltfaktoren wie Ernährung, physiologische Gegebenheiten (Körperbau, Krankheiten), Konsumierung von Genussmitteln wie Zigaretten und Alkohol, sowie Medikamenteneinnahme, Alter, Geschlecht und genetische Disposition spielen bei der Biotransformation eine Rolle.

Biotransformationsreaktionen bestehen aus zwei Phasen, die als Funktionalisierungsreaktion (Phase I-Reaktion) und als Konjugierungsreaktion (Phase II-Reaktion) bezeichnet werden. Zu den Enzymen der Phase I gehört, neben Alkoholdehydrogenasen und Epoxidhydrasen, die Enzymgruppe der Monooxygenasen, zu der die Cytochrome P450-Enzyme gerechnet werden und die die größte Bedeutung für die Oxidation besitzen. Am Phase II-Metabolismus sind im wesentlichen Glucuronyltransferasen (assoziiert mit dem Gilbert-Syndrom), Glutathion-S-Transferasen und Sulfotransferasen, sowie Methyltransferasen (Thiopurin-S-Methyltransferase, TPMT) und Acetyltransferasen beteiligt, die die funktionalisierten Metabolite mit Sulfat, Aminosäuren (Glycinkonjugation an Hippursäure gilt als erstentdeckte Fremdstoffmetabolismus-Reaktion) oder S-Adenosylmethionin konjugieren. Die an den Phase I und II-Reaktionen beteiligten Enzyme sind dadurch fähig, strukturell sehr unterschiedliche Substanzen umzuwandeln. Obwohl das Biotransformationssystem im Allgemeinen dazu führt, dass toxische Stoffe in weniger toxische umgewandelt werden, also mit der Zeit unwirksam gemacht werden, ist es wichtig, darauf hinzuweisen, dass in bestimmten Fällen die Produkte der Biotransformation erst wirksam (Prinzip der „Prodrug“) sind, d.h. aktiviert werden und im ungünstigen Falle toxisch sein können.

Als dritte Phase bezeichnet man manchmal den Transport von Xenobiotika bzw. der konjugierten Metabolite aus der Zelle. Dabei gibt es im menschlichen Körper zwei Gruppen von Transportern: die Aufnahme-Transporter, die Substanzen aktiv in die Zelle transportieren. Dazu zählen zum Beispiel die OATPs (*organic anion transporting polypeptides*), die Thyroidhormone, Steroidhormone und deren Konjugate, Gallensäure, Peptide, Prostaglandine und zahlreiche Arzneimittel (Digoxin) transportieren. Zum anderen besitzt der Mensch sogenannte Efflux-Transporter, die Substanzen aktiv aus den Zellen in das Blut, den Darm oder die Niere schleusen und damit bioverfügbar machen. Darunter fallen die ATP-

abhängigen ABC-Transporter (*ATP binding cassette*), wie zum Beispiel das **P-Glykoprotein** (P-gp), welches vom Gen *mdr1* (*multidrug resistance-associated protein*) kodiert wird und für den Transport von Zytostatika aus Tumorzellen verantwortlich ist (Tumorresistenz).

1.1.2 Cytochrom P450-Enzyme

Die wichtigsten Enzyme der Phase I-Reaktion, der Funktionalisierungsreaktion, sind die Cytochrom P450-Enzyme, die ungefähr 60-80 % aller Arzneimittel metabolisieren (Clarke and Waskell, 2003). Der Name Cytochrom P450 bezeichnet einen „Zellfarbstoff“, der nach der Reduktion mit Natriumdithionit und Äquilibration mit CO Licht der Wellenlänge 450 nm absorbiert (Klingenberg, 1958; Garfinkel, 1958; Omura and Sato, 1964). Eukaryontische Cytochrom P450-Enzyme (CYP) sind Hämproteine, die entweder in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums oder in Mitochondrien lokalisiert sind. 90-95 % der gesamten CYPs des menschlichen Organismus sind in der Leber lokalisiert, wobei 60-65 % davon auf arzneimittelmetabolisierende CYPs entfallen (Shimada et al., 1994). Die CYP-Enzyme bestehen aus einer Polypeptidkette mit einer nicht-kovalent gebundenen Eisen-Protoporphyrin-IX-prothetischen Gruppe. Dabei ragt die in der Nähe des C-Terminus gelegene katalytische Domäne ins Cytoplasma, während N-terminal ein Membrananker lokalisiert ist (Abb. [I-1]). Bei der Oxidation eines Medikamentes durch ein mikrosomales Cytochrom P450-Enzym wird das Substrat zunächst an das katalytische Zentrum, das ein dreiwertiges Eisenion enthält, gebunden. Über eine Elektronenübertragungskette werden zwei Elektronen nacheinander von NADPH (Reduktionsäquivalente) über eine Oxidoreduktase (Cytochrom P450:NADPH-Reduktase aus der Familie der Flavoproteine) auf den Enzym-Substrat-Komplex übertragen. Dabei wird Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduziert und molekularer Sauerstoff gespalten. Ein Sauerstoffatom wird zu Wasser reduziert, während das andere in der Regel in das Substrat eingebaut wird (Abb. [I-2]). Man spricht auch von Monooxygenierung im Gegensatz zur Dioxygenierung, bei der z.B. Lipooxygenasen eine Rolle spielen.

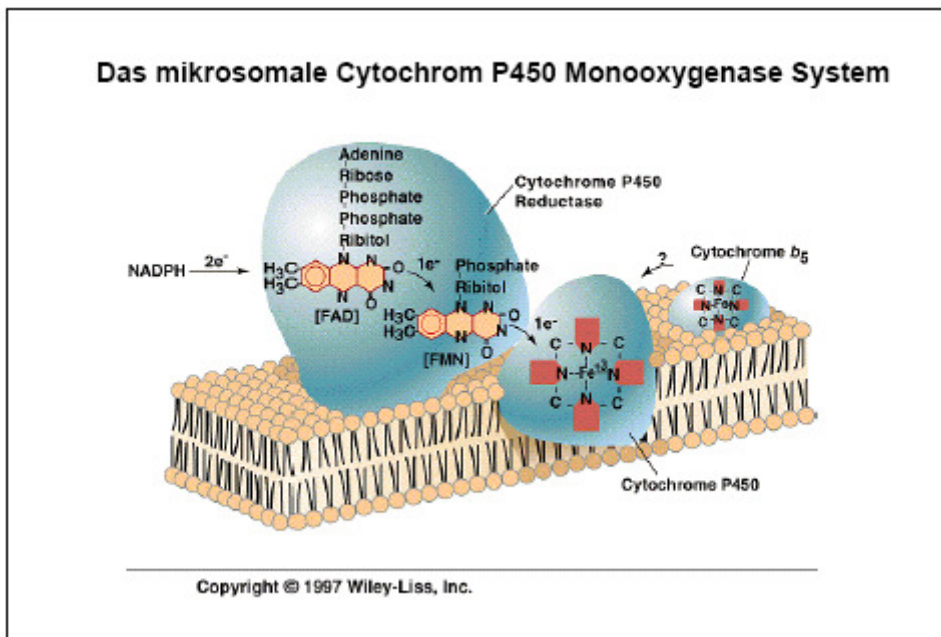


Abbildung 1-1: Elektronenübertragungskette des Cytochrom P450

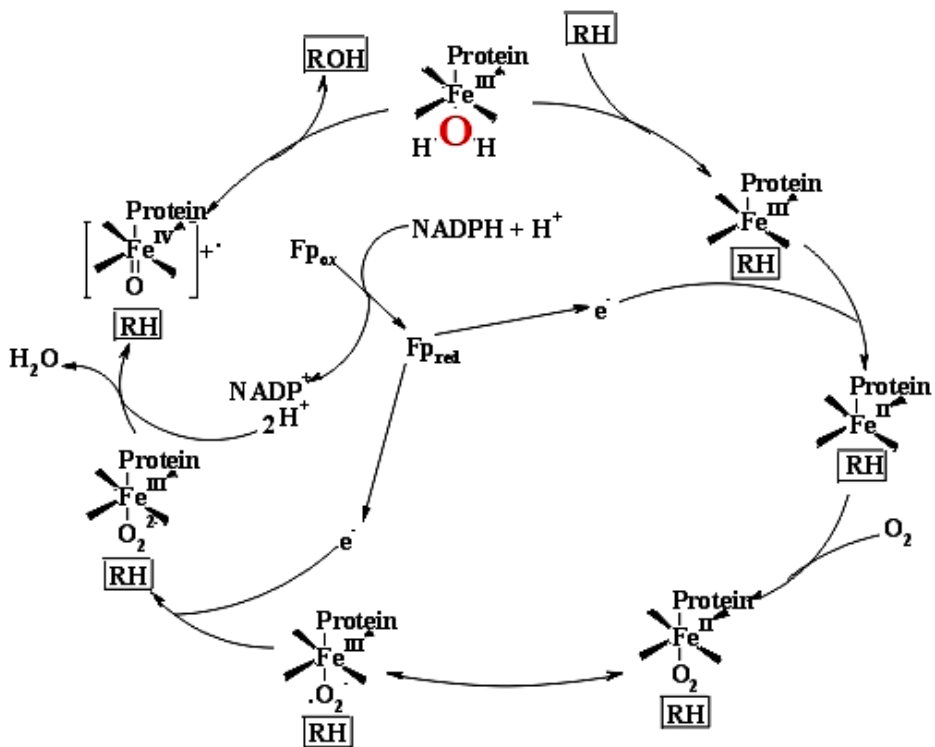


Abbildung 1-2: Katalytischer Zyklus des Cytochrom P450 nach Coon et al., 1992. Fe = Häm-Eisen im katalytischen Zentrum, Fp = Flaviprotein (NADPH-Cytochrom P450-Reduktase); RH = Substrat, ROH = monooxygeniertes Produkt

Die von CYP Monooxygenasen katalysierten Biotransformationswege sind vielfältig und umfassen außer der Hydroxylierung die Oxidation von Alkoholen, Aldehyden und aliphatischen Ketten, N- und O-Desalkylierung, N- und S-Oxidationen, Desaminierungen, Desulfurierungen und die Epoxidierung von Aromaten.

Nach Abschluss des Humangenomprojektes steht fest, dass das menschliche Genom 57 CYP-Gene enthält, die anhand ihrer Aminosäuresequenz in Familien eingeteilt werden können. Innerhalb dieser Familien ist die Proteinhomologie 40 % oder mehr (z.B. CYP2). Individuelle Genfamilien wurden weiter in Subfamilien unterteilt mit Homologien der einzelnen Isoenzyme von 70 % oder mehr auf Aminosäureebene (z.B. CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19). Inzwischen sind beim Menschen 27 Subfamilien mit insgesamt 57 Isoenzymen und 58 Pseudogenen identifiziert worden (<http://drnelson.utmem.edu/human.P450.table.html>). Die wichtigsten CYP-Enzyme für den Xenobiotikastoffwechsel wurden den Genfamilien CYP1, 2, 3 (und 4) zugeordnet. Die einzelnen Cytochrom P450 Enzyme weisen eine breite Substratspezifität auf und können somit jeweils eine sehr heterogene Gruppe von Substanzen metabolisieren. Da die Substratspezifität meist stark überlappend ist, gilt auch, dass fast alle Substanzen von mehreren CYP450 gleichzeitig metabolisiert werden können.

Die CYP3A Subfamilie stellt mit 30 % des hepatischen P450-Gehaltes den größten Anteil der humanen CYPs dar und metabolisiert etwa 50- 60 % aller Arzneimittel (Abb. [1-3]). Weitere, für den Arzneimittelmetabolismus relevante Isoenzyme sind die Enzyme der 2C Subfamilie, zu denen CYP2C9 gehört, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2D6 und CYP2E1.

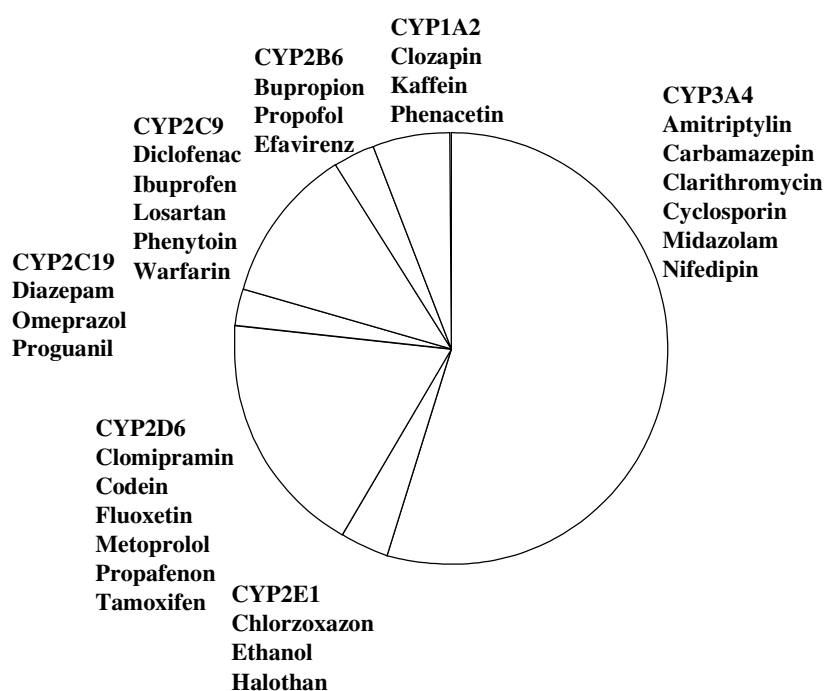


Abbildung 1-3: Anteil einer bestimmten CYP-Form am Metabolismus der in Anwendung befindlichen Arzneimittel (Rendic et al., 2002)

1.1.3 Pharmakogenetik

Die pharmakogenetische Diagnostik ist heutzutage ein vielversprechender Ansatz, um sowohl die Pharmakokinetik, als auch die Effekte und Nebenwirkungen eines Arzneimittels in einem Individuum vorherzusagen (Evans and Relling, 1999; Eichelbaum et al., 2006). Genetisch determinierte Variabilitäten im Arzneimittelstoffwechsel wurden erstmals im Fall des Succinylcholins entdeckt, eines Muskelrelaxans, bei dem einzelne Patienten eine extrem verlängerte Wirkdauer aufgrund eines genetischen Defekts im abbauenden Enzym Pseudocholinesterase aufwiesen (Neitlich 1966). Inzwischen ist bekannt, dass es sich dabei um einen genetischen Polymorphismus handelt. Hierunter versteht man nach der 1959 aufgestellten Definition des Humangenetiklers Friedrich Vogel, Mutationen, die zu mindestens zwei Phänotypen in der Bevölkerung führen, von denen keine eine Häufigkeit unter 1% zeigt (Ford 1971). Polymorphismen treten in verschiedenen ethnischen Gruppen oft mit unterschiedlicher Häufigkeit auf.

Als zwei frühzeitig erforschte, klinisch wichtige Beispiele für Enzym polymorphismen sind die N-Acetyltransferase (NAT) und die Thiopurin-S-Methyltransferase (TPMT) zu nennen. Die NAT II war das erste arzneimittelabbauende Enzym, für das genetisch bedingte Variationen beschrieben wurden. Etwa die Hälfte der europäischen und afrikanischen Bevölkerung sind sogenannte Langsam-Acetylierer („*poor metabolizer*“, defizienter Metabolismus), d.h. bestimmte Arzneistoffe, wie das Isoniazid, ein Tuberkostatikum, werden bei diesen Menschen langsamer abgebaut, woraus die Gefahr der Überdosierung und unerwünschter Nebenwirkungen besteht. Bei Verabreichung des Isoniazids kommt es somit häufiger zu einer Hepatitis. Bei Schnell-Acetylierern („*extensive metabolizer*“) werden Stoffe zu schnell abgebaut und haben somit eine geringere oder gar keine Wirksamkeit. Dies ist vor allem in den Ländern der dritten Welt relevant, bei denen das Isoniazid nur ein- bis zweimal wöchentlich verabreicht wird und dadurch die Therapie gegen Tuberkulose versagen kann.

Bei TPMT ist eine von ca. 200 (entspricht 0,5 %) Personen homozygot in Bezug auf einen Defekt dieses Enzyms, was zur Folge hat, dass Individuen unter Azathioprin-Therapie (akute lymphatische Leukämie; Morbus Crohn) lebensbedrohliche Panzytopenien entwickeln (Krynetski and Evans, 2003).

Für alle am Arzneimittelstoffwechsel beteiligten humanen Cytochrom P450 Enzyme sind mittlerweile genetische Polymorphismen beschrieben worden (<http://www.cypalleles.ki.se/>). Von wichtiger klinischer Bedeutung seien hier genetische Variationen des *CYP2D6*, *CYP2C19* und des *CYP2C9* (Meyer, 2000; Steimer et al., 2004; Zanger et al., 2004) genannt. Der erste Polymorphismus eines CYP – im *CYP2D6* – wurde 1976 anhand einer defizienten Spartein Oxidation entdeckt (Eichelbaum, 1976). Dieser ist von Bedeutung, da ein hoher Prozentsatz der europäischen Bevölkerung (5-10 %) von dem Polymorphismus („poor metabolizer“) betroffen ist und einige der häufig eingesetzten Arzneistoffe wie Antiarrhythmika, Antidepressiva und β -Blocker über dieses Enzym abgebaut werden (Zanger et al., 2004). Im Gegensatz dazu stehen die „ultrarapid metabolizer“, die Schnell-Metabolisierer, bei welchen ca. 20 % dieses Phänotyps durch Genduplikationen und eine dadurch erhöhte Enzymaktivität verursacht werden. Einer neueren Studie zufolge ist am Metabolismus von 50 bis 60 % der Medikamente, die unerwünschte Nebenwirkungen verursachen, mindestens ein polymorphes Enzym beteiligt (Phillips et al., 2001).

1.2 Cytochrom P450 2B6

Im Gegensatz zu den oben genannten gut untersuchten CYPs, wurde das *CYP2B6* lange Zeit vernachlässigt, da man in den 90er Jahren annahm, es mache nur einen sehr geringen Prozentsatz des hepatischen P450-Gehalts ausmachen (<1%; Mimura et al., 1993; Shimada et al., 1994). Mit Hilfe von sensitiveren Bestimmungsmethoden und spezifischeren Antikörpern konnte jedoch festgestellt werden, dass dieses Gen für ein hochvariables Enzym kodiert, was in seiner Variabilität durchaus von klinischer Bedeutung sein kann (Ekins et al., 1998; Yamano et al., 1989). In den letzten Jahren wurden viele klinisch relevante Arzneistoffe als Substrate des *CYP2B6* identifiziert (Turpeinen et al., 2007). Dazu gehören das Antidepressivum Bupropion (Faucette et al., 2000; Hesse et al., 2000; Kirchheiner et al., 2003), das Cytostatikum Cyclophosphamid (Chang et al., 1993; Roy et al., 1999), das Anästhetikum Propofol (Court MH et al., 2001), das Anti-Malariamittel Artemisinin (Svensson and Ashton, 1999), das Anti-Parkinsonmittel Selegilin (Hidestrand et al., 2001), Nikotin (Yamazaki et al., 1999), das endogene Substrat Testosteron (Hanna et al., 2000) und den nukleosidischen reverse Transkriptase Hemmer Efavirenz (Ward et al., 2003).

Das *CYP2B6*-Gen ist zusammen mit einem zugehörigen Pseudogen *CYP2B7P1* in einer *CYP2* Gengruppe auf Chromosom 19 lokalisiert, bestehend aus neun Exons und codierend für ein ca. 50kDa großes Protein. Es wurde von Miles et al. (1988) und Yamano et al. (1989)

identifiziert und charakterisiert und wird hauptsächlich in der Leber exprimiert, wurde aber auch in der Niere, Lunge, Gehirn, der Haut, dem Dünndarm und in Brusttumoren nachgewiesen (Gervot et al., 1999; Miksys et al., 2003; Wolf et al., 1992).

Die hohe Variabilität dieses Enzyms kann einerseits durch Induzierbarkeit über nukleäre Rezeptoren wie CAR („*constitutive androstane receptor*“) und PXR („*pregnane X receptor*“) erklärt werden (analog zum CYP2B1 der Ratte; Früh et al., 1997), andererseits durch genetische Polymorphismen. Solche Varianten konnten im Gegensatz zu anderen CYP Genen durch „*reverse genetics*“-Studien entdeckt werden, bei denen genetische Varianten durch Sequenzierung oder gezielte Variationssuche identifiziert werden und nachträglich funktionell charakterisiert werden (Ariyoshi et al., 2001; Jinno et al., 2003; Klein et al., 2005; Lamba et al., 2003; Lang et al., 2001; Lang et al., 2004; Solus et al., 2004; Wang et al., 2006; Zukunft et al., 2005).

Mittlerweile sind mehr als 100 DNA Variationen im *CYP2B6* Gen identifiziert, einschließlich zahlreicher nicht-synonymer Variationen, sowie sogenannte „stille“, Promotor- und intronische Veränderungen, von denen einige in einem ausgeprägten Kopplungsungleichgewicht stehen und dadurch verschiedene Haplotypen (aktuell n=29) darstellen (Ingelman-Sundberg; <http://www.cypalleles.ki.se/>). Das weite Spektrum der funktionellen Konsequenzen dieser Varianten beinhaltet auch Null-Allele, deren Genprodukt keiner messbaren Funktion und/oder Expression zugeordnet werden konnte. Dazu gehören die Allele *CYP2B6**8, *12, *15, *18, *21. Allele mit teilweise reduzierter Expression sind die Allele *CYP2B6**5, *6, *7, *11, *14, *19, *20, *21 (Klein et al., 2005; Lamba et al., 2003; Lang et al., 2004) und Allele mit verstärkter Expression (*CYP2B6**22; Zukunft et al., 2005). Einige dieser Varianten sind selten (< 1%), andere häufig mit Allelfrequenzen zwischen 10 % und beinahe 50 %, abhängig von der untersuchten Population (Klein et al., 2005; Solus et al., 2004).

1.2.1 Klinische Relevanz

Im Jahr 2003 zeigten Ward et al., dass das Medikament Efavirenz (EFV) hauptsächlich von CYP2B6 metabolisiert wird (Ward et al., 2003). Auf diese Entdeckung hin wurden mehrere pharmakogenetische Studien durchgeführt, jedoch wurde die klinische Relevanz der *CYP2B6* Variationen erst wirklich im Laufe dieser Arbeit gezeigt. Die allgemeingültige Praxis in der Klinik die gleiche Dosis an alle Patienten zu verabreichen, kann zu schwerwiegenden Unterschieden in den Plasma-Konzentrationen führen, die einen deutlichen Zusammenhang

zum Genotyp der Patienten zeigten (Haas et al., 2004; Rotger et al., 2005; Tsuchiya et al., 2004). Weitere Studien legten auch einen Zusammenhang der Genetik mit Plasmaspiegeln, intrazellulären Konzentrationen und neuropsychologischer Toxizität nahe (Haas et al., 2004; Rodriguez-Novoa et al., 2005; Rotger et al., 2005; Wang et al., 2006). Speziell wurde in der Studie von Tsuchiya et al. (2004) gezeigt, dass HIV-Patienten, die homozygote Träger des *6-Allels waren, signifikant erhöhte EFV Plasma-Konzentrationen und damit ein erhöhtes Nebenwirkungsrisiko haben. Patienten mit solch hohen Plasma-Konzentrationen sind dem Risiko ausgesetzt, konzentrationsabhängig Toxizitäten des zentralen Nervensystems zu entwickeln, zum Beispiel Müdigkeit, Schlaflosigkeit oder Kopfschmerzen, was eventuell zu einem Therapie-Abbruch führen kann. Darüber hinaus ist das *6 Allel sehr häufig in verschiedenen Populationen vertreten, von ungefähr 15 % in Asiaten über 25-35 % in Kaukasiern bis zu fast 50 % in Afro-Amerikanern und Afrikanern. Folglich könnte für ein Medikament wie EFV eine Dosis-Anpassung basierend auf einem häufigen Genotyp die Verabreichung von zu hohen Dosen und damit toxische Nebenwirkungen verhindern sowie die Sicherheit und Effizienz der Therapie erhöhen. Diese früheren Arbeiten haben jedoch alle nur das häufige *6 Allel berücksichtigt. Es war demnach unbekannt, inwieweit die vielen selteneren Einzelmutationen (SNPs von „*single nucleotide polymorphisms*“) eine funktionelle Rolle spielen und demnach in verschiedenen Populationen von klinischer Relevanz sind.

1.2.2 Methode der Genotypisierung und Bestimmung des Haplotyps

Zu Beginn der Arbeit waren die gängigen Genotypisierungsmethoden vor allem RFLP („*restriction fragment length polymorphism*“), DHPLC („*denaturing high performance liquid chromatography*“), TaqMan (Echt-Zeit PCR) oder Sequenzierung. Diese waren meist komplex, zeitaufwendig sowie für den Hochdurchsatz nicht geeignet. In jüngster Zeit hat sich die „*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*“ (MALDI-TOF MS) als eine mögliche Technologie für die Bestimmung von Einzelmutationen (SNPs) weiterentwickelt. Diese Methode hat einige Vorteile gegenüber anderen Methoden. Zum Beispiel eine hohe Genauigkeit, da in direkter Weise die molekularen Massen gemessen werden, eine hohe Sensitivität in der Detektion sowohl der homozygoten als auch der heterozygoten Basenaustausche, die Möglichkeit des Hochdurchsatzes und die kosteneffektive Möglichkeit des „Multiplexens“ (Bray et al., 2001; Ehrich et al., 2005; Gut et al., 2004; Nakai et al., 2002; Pusch et al., 2002; Ross et al., 1998; Stanssens et al., 2004; Tost et al., 2005; Buetow et al., 2001).

Obwohl individuelle SNPs mit Krankheiten oder Nebenwirkungen bei der Medikamententherapie assoziiert sein können, ist es die gesamte Gensequenz, d.h. der individuelle Haplotyp der chromosomalen Genkopie, der die Expression und Funktion eines Enzyms bestimmt. Grundlage für die Existenz unterschiedlicher Haplotypen ist das sogenannte Kopplungsungleichgewicht (Linkage Disequilibrium (LD)). Dies kann in verschiedenen Effekten resultieren, zum Beispiel einem Aminosäureaustausch, der zusammen mit intronischen und/oder Promotorvarianten Transkription, Splicing, Translation und Regulation beeinflussen kann. Zur genauen Bestimmung des molekularen Haplotyps werden molekularbiologische Methoden wie Klonierung, Zellhybrid-Konstrukte oder auch Standard Amplifikationen von kurzen Fragmenten, allelspezifische PCR, Einzelmolekül- und „*long range*“ PCR (Yan et al., 1999; Ruano et al., 1990; McDonald et al., 2002) angewendet. Ebenso ist die Analyse von Spermatozoen, die einen einfachen Chromosomensatz tragen, bei männlichen Individuen möglich (Li et al., 1990). Dennoch sind diese Methoden limitiert, da man sie nur auf relativ kurze genomische Bereiche von unter 3 Kilobasen anwenden kann und die Methoden sehr zeit- und arbeitsintensiv sind. Wegen dieser Schwierigkeiten werden Haplotyp-Bestimmungen üblicherweise mit Computeralgorithmen durchgeführt, die anhand der statistischen Häufigkeit des Auftretens von Kombinationen von SNPs in einer Population die Wahrscheinlichkeit eines Haplotyps rekonstruieren.

Ein neues Verfahren, entwickelt von Ding und Cantor im Jahre 2003 (Ding und Cantor, 2003) verknüpft diese Massenspektrometrie-Technik mit der Möglichkeit einsträngige DNA-Moleküle auf Nukleotid-Kopplungen zu untersuchen. Diese Technik basiert auf der Verdünnung der DNA auf theoretisch ein Molekül und ermöglicht somit die direkte molekulare Haplotypisierung von SNPs/Markern, die bis zu 24 Kilobasen voneinander entfernt lokalisiert sind. Mit Hilfe dieses Verfahrens können der Protein-Phänotyp, und damit die interindividuelle Variabilität sowie das klinische Endergebnis/Therapieansprechen besser vorhergesagt werden.

1.3 Ziele der Arbeit

Vorangehende Arbeiten haben gezeigt, dass im *CYP2B6* Gen viele funktionell relevante Allele auftreten, die eine Veränderung der Proteinexpression bzw. der Enzymaktivität zur Folge haben können (Klein et al., 2005; Lang et al., 2001; Lang et al., 2004), mit anderen Worten eine Assoziation zwischen Geno- und Phänotyp zeigten. Die klinische Relevanz der *CYP2B6* Variationen hatte sich insbesondere an dem Anti-HIV Medikament Efavirenz gezeigt, bei dem Patienten mit einem bestimmten *CYP2B6* Genotyp hohe Efavirenz Plasma Konzentrationen und in der Folge auch vermehrt auftretende Nebenwirkungen am zentralen Nervensystem aufwiesen. Eine stetig größer werdende Zahl von neu identifizierten Arzneimittelsubstraten für dieses Enzym ließ außerdem für den *CYP2B6* Polymorphismus eine in Zukunft zunehmende klinische Bedeutung erwarten. Jedoch waren alle bisherigen genetischen Arbeiten unvollständig im Hinblick auf die ebenfalls in immer größerer Zahl entdeckten neuen Varianten. Ein analytisches Verfahren zur Untersuchung möglichst aller relevanten *CYP2B6* Varianten war bei Beginn der Arbeit weder von der Arbeitsgruppe am Dr.Margarete Fischer-Bosch Institut für Klinische Pharmakologie, im Folgenden IKP genannt, noch von anderen Forschergruppen etabliert worden.

Die MALDI-TOF Massenspektrometrie ist ein effizientes, sensitives Hochdurchsatzverfahren für große Probenzahlen zur simultanen Detektion mehrerer Polymorphismen innerhalb einer Gensequenz als auch für mehrere Gene. Der Vorteil gegenüber anderen Verfahren beruht auf allel-spezifischen Primer-Verlängerungen durch Zugabe auf den jeweiligen SNP ausgerichteter Nukleotide und ist damit eine Kombination von Sensitivität, Spezifität und Hochdurchsatz.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher zunächst, anhand dieser Technologie eine Genotypisierung zur Detektion möglichst aller bisher bekannten und klinisch relevanten SNPs des *CYP2B6*-Gens zu entwickeln. Da die funktionellen Auswirkungen der einzelnen Polymorphismen noch nicht ausreichend untersucht waren, sollten anhand einer am IKP aufgebauten Lebergewebe-Sammlung mit guter klinischer Patienten-Dokumentation mögliche Assoziationen dieser SNPs mit verändertem Expressions- und Enzymaktivitäts-Verhalten von *CYP2B6* detailliert untersucht und dabei auch der Einfluss von nicht-genetischen Faktoren wie Geschlecht, Alter, oder Medikamentenexposition berücksichtigt werden. Da häufig nicht einzelne SNPs, sondern deren Kombinationen in bestimmten Allelen bzw. Haplotypen für den resultierenden Phänotyp verantwortlich sind, war weiterhin zu untersuchen, wie die Haplotyp-Strukturen in der Population aufgebaut sind und wie sie mit funktionellen Veränderungen

korreliert sind. Die Bestimmung von Kopplungen neuer und ungeklärter Allele in Haplotypen durch sogenanntes „*molecular haplotyping*“ sollte daher zur besseren Prädiktivität des Enzymverhaltens beitragen.

Durch mehrere Kooperationen mit klinischen Gruppen sollten im Lauf der Arbeit Patientenkollektive mit verschiedenen Grunderkrankungen für CYP2B6 genetisch analysiert werden. So sollten die pharmakologischen Effekte von CYP2B6 Polymorphismen sowie die klinische Relevanz in unterschiedlichen ethnischen Populationen mit Bezug zur HIV-Therapie mit Efavirenz, als auch in Assoziation zu Morbus Parkinson untersucht werden. Die Ergebnisse sollten einen Beitrag zum besseren Verständnis der CYP2B6-Medikation-Interaktion leisten.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

3-Hydroxypicolinsäure	Bruker Daltonik, Bremen
[² H ₃]-OH-Bupropion (int. Standard)	Dr. T. Mürdter, G. Heinkele, IKP
Acetonitril	Roth, Karlsruhe
Acrylamid/Bis (30:0,8)	Bio-Rad, München
Agarose	Invitrogen, Carlsbad
AG 50W-X8 Resin	Bio-Rad, München
Ammoniumacetat	Fluka, Deisenhofen
Ammoniumcitrat	Fluka, Deisenhofen
Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Bacto-Agar	Becton Dickinson, Heidelberg
Bacto-Tryptone	Becton Dickinson, Heidelberg
Bacto-Yeast	Becton Dickinson, Heidelberg
BSA	Bio-Rad, München
Bupropion-HCl	Dr. T. Mürdter, G. Heinkele, IKP
Bromphenolblau	Aldrich, Deisenhofen
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DMSO	Sigma, Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Essigsäure, konz.	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid (10mg/ml)	Sigma, München
Glucose-6-Phosphat	Roche Diagnostics, Mannheim
Glycin	Serva, Heidelberg
Harnstoff	Promega, Madison, USA
Hydroxy-Bupropion	Dr. T. Mürdter, G. Heinkele, IKP
IPTG	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
Long Ranger Solution (50 % Acrylamid Lsg.)	Cambrex, Rockland, Maine
Magermilchpulver	Fluka, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
NaCl	Merck, Darmstadt
NADPH	Fluka, Deisenhofen
NADP ⁺	Fluka, Deisenhofen

Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
PCR Puffer (10X)	Qiagen, Hilden
Ponceau S-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Protein-Molekulargewichtsmarker (Rainbow)	Amersham, Freiburg
QIAQuick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Rx-Puffer	Amersham, Freiburg
SDS (Natrium-Dodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
Sequenzierungspuffer	Applied Biosystems, Darmstadt
Stop-Solution loading dye (Sequenzierung)	Amersham, Freiburg
SuperSignal Dura Chemolumineszenz Substrat	Pierce, Rockford, USA
TEMED	Gibco BRL, Karlsruhe
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Tris-Base	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Aldrich, Deisenhofen
Tween 20	Merck, Darmstadt
X-Gal	Roth, Karlsruhe
Xylen	Sigma, Deisenhofen

2.1.2 Antikörper, Enzyme, Primer

Cytochrom P450 2B6 aus Lymphoblasten	Gentest, Frankfurt a.M.
Anti-human CYP2B6 (mouse)	BD Biosciences, Frankfurt a.M.
Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing RR100	Applied Biosystems, Darmstadt
DNA Standard 1kb/100bp	Invitrogen, Carlsbad
dNTP Mix	Bioline, Luckenwalde
dNTP Set	Amersham, Freiburg
ddNTPs	Biolog, Bremen
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	Roche Diagnostics, Mannheim
Goat Anti-Mouse IgG, Peroxidase-konjugiert	Oncogene, Manhasset, USA
iPLEX Gold Kit	Sequenom, Hamburg
Restriktionsendonukleasen:	
<i>EcoRI</i> , <i>SylI</i> , <i>ApaI</i>	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>PstI</i>	Metabion, Martinsried
<i>HindIII</i>	New England Biolabs, Frankfurt
Taq Polymerase	Qiagen, Hilden
HotStar Taq TM Master Mix Kit	Qiagen, Hilden
Oligo-Nukleotide/Primer	MWG Biotech, Ebersbach
	Metabion, Martinsried
SAP (shrimp alkaline phosphatase)	Amersham, Freiburg
Termipol Polymerase	Solis Biodyne, Tartu, Estland

2.1.3 Plasmide und Bakterienstämme

TOPO TA Cloning Vector	Invitrogen, Karlsruhe
TOP10 kompetente Zellen [<i>E. coli</i>]	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.4 Geräte

ABI Prism 310 Genetic Analyzer

Blotapparatur Fastblot B43

Bruker Ultraflex MALDI-TOF Massenspektrometer

Sequenom MALDI-TOF Massenspektrometer

DYADTM PCR thermal cycler (Tetrad PTC-200/225)

Elektrophoresekammer

SDS-PAGE Kammer Protean II xi cell

HPLC-Anlage HP 1100

Luminescent Image Analyzer LAS-1000

Massenspektrometer HP 1100 (1 Quadropol
mit LC-Kopplung und ESI)

Millipore-Anlage Milli Q

Nanodispenser Roboter

pH-Meter CG840

Puredisk Pipettierroboter

Schüttler (Western Blots)

Schüttler (384well Platten)

UV-Photokammer

Vortexer

Wasserbad WTE var 3185

Zentrifugen:

Biofuge pico

Zentrifuge 5417C

Hettich Universal 32

ThermoMegafuge

Ultrazentrifuge L5-65

Applied Biosystems,
Darmstadt

Biometra, Göttingen

Bruker Daltonik, Bremen

Bruker Sequenom, Hamburg

BioRad, München

Pharmacia Biotech, Freiburg

Bio-Rad, München

Agilent Technologies,

Waldbronn

Fuji Photo Film GmbH,

Düsseldorf

Agilent Technologies,

Waldronn

Millipore, Molsheim,

Frankreich

Sequenom, Hamburg

Schott, Mainz

Cybio, Jena

GFL, Wunstorf

Heidolph, Schwabach

LTF Labortechnik,

Wasserburg

Heidolph, Schwabach

Assistent, Sondheim

Heraeus, Hanau

Eppendorf, Hamburg

Hettich, Tuttlingen

Heraeus, Hanau

Beckman, München

2.1.5 Sonstige Materialien

Cy-Bi Tip Trays 25µl

Cellulosemembranen, regeneriert (Porengröße: 12 kDa)

Einmalküvetten

Faltenfilter 959 ½ (Ø270)

HPLC-Säule:

Prontosil-C18 AQ (150x3 mm I.D., 3 µM)

Mikropipetten

MTP Anchor Chip 400/384 TF

Nitrocellulose-Membran (Western Blot)

Sequenom Chip

Nitrocellulose

PCR-Film, adhesive

Cybio, Jena

Roth, Karlsruhe

Sarstedt, Nümbrecht

Schleicher&Schüll, Dassel

Bischoff, Leonberg

Eppendorf, Hamburg

Socorex, Hamburg

Bruker Daltonik, Bremen

Schleicher & Schüll, Dassel

Schleicher & Schuell, Dassel

Abgene, Epsom

Sterilfilter 0,2 µm Porengröße
Tape Pads
Thermo Fast 384/96 PCR plates

Schleicher & Schuell, Dassel
Qiagen, Hilden
Abgene, Epsom, UK

2.1.6 Software

AIDA 2.1
GaphPad Prism Version 4.0

Raytest, Straubenhardt
GraphPad Software, San Diego,
USA

Haploview 3.32
HP Chem 4.06
PHASE

Broad Institute, Cambridge, USA
Agilent, Waldbronn
Version 2.0.2
[http://www.stat.washington.edu/
Stephens/software.html](http://www.stat.washington.edu/Stephens/software.html)
Invitrogen, Karlsruhe

Vector NTI Advance 9

Sequenom, Hamburg

Sequenom Software
(Assay Editor 3.1.4, Plate Editor 3.1.4
Typer Analyzer 3.3.0, MassARRAY Workstation 3.3)

2.1.7 Datenbanken

Ensembl Genbank
DeFinetti program (HWE)
HapMap Project
Human CYPallele homepage
NCBI Genbank (Nucleotide, Pubmed)
SNP500 Cancer Database

<http://www.ensembl.org/index.html>
<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>
<http://www.hapmap.org/index.html>
<http://www.cypalleles.ki.se/>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
[http://snp500cancer.nci.nih.gov/
home_1.cfm](http://snp500cancer.nci.nih.gov/home_1.cfm)

2.1.8 Puffer, Lösungen und Nährmedien,

2.1.8.1 Sequenzierung

Sequenziergel

Harnstoff	21 g
10X TBE	5 ml
7 % Long Ranger Solution	6 ml
DMSO	500 µl
TEMED	50 µl
10 % APS	400 µl
ad 50 ml mit Millipore-Wasser	

10X TBE

Tris-Base	162 g
Borsäure	27,5 g
EDTA	9,3 g
ad 1 l mit Millipore-Wasser	

2.1.8.2 Medien für Bakterien

LB-Medium	Bacto-Tryptone	10 g
	Bacto-Yeast	5 g
	NaCl	5 g
	ad 1 l mit Millipore-Wasser	
	pH 7.0	
SOC-Medium	Bacto-Tryptone	20 g
	Bacto-Yeast	5 g
	NaCl	0,5 g
	KCl	2,5 ml
	ad 970 ml mit Millipore-Wasser	
	pH 7,0	
	1M MgCl ₂	10 ml
1M Glucose	20 ml	
Agar für Bakterienplatten	Bacto-Agar	15 g
	zu 1 l Flüssig-Medium	
	Ampicillin Stammlsg.	50 mg/ml
	X-Gal Stammlsg.	20 mg/ml

2.1.8.3 Puffer und Lösungen für SDS-Page und Western Blot

Ammoniumpersulfat 10 % (m/v)	Ammoniumpersulfat	1 g
	ad 10 ml mit Millipore-Wasser	
Auftragspuffer für SDS-Page (5X) (nach Laemmli)	Tris-HCl pH 6,8	60 mM
	Glycerol	24 %
	SDS	2 %
	2- Mercaptoethanol	14,4 mM
	Bromphenolblau	1 %
	Lagerung bei RT und jeweils frische Zugabe von 2-Mercaptoethanol	
Chemolumineszenz-Lösung (Pierce)	Super Signal Dura Kit	
	Lumino/Enhancer	7,5 ml
	Peroxid-Lösung	7,5 ml
Tankpuffer (10X)	Tris-Base	150 g
	Glycin	720 g
	20 % SDS	250 ml
	ad 5000 ml mit Millipore-Wasser	

Tankpuffer (1X)	Tankpuffer (10X)	500 ml ad 5000 ml mit Millipore-Wasser
Transferpuffer	Tris-Base	29 g
	Glycin	14,6 g
	20 % SDS	9,25 ml
	ad 4000 ml mit Millipore-Wasser	
	Methanol	ad 5000 ml
Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	Tris-Base	30 g
	Millipore-Wasser	ad 500 ml
	pH 6,8 mit HCl (konz.) einstellen; Lagerung bei 4°C	
Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	Tris-Base	90,75 g
	ad 500 ml mit Millipore-Wasser	
	pH 8,8 mit HCl (konz.) einstellen; Lagerung bei 4°C	
TBS (10X)	NaCl	400 g
	KCl	10 g
	Tris-Base	150 g
	ad 5000 ml mit Millipore-Wasser	
	pH 7,4 mit HCl (konz.) einstellen	
Waschpuffer TBST	TBS (10X)	500 ml
	50 % Tween 20 (v/v)	10 ml
	ad 5000 ml mit Millipore-Wasser	
Blocking-Lösung (5 %)	Magermilch	10 g
	TBST-Puffer	200 ml

2.1.8.4 Puffer und Lösungen für Cytochrom-P450-Aktivitätsbestimmungen

0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4:	Na ₂ HPO ₄	0,1 M
	mit 0,1M NaH ₂ PO ₄ auf pH 7,4 einstellen	
10x NADPH-Regenerierendes System: (NADPH-RS)	NADP ⁺	0,1 M
	Glucose-6-Phosphat	1 M
	MgCl ₂	1 M
	Glucose-6-Phosphat- Dehydrogenase	40 U/ml
	in 0,1M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 lösen	

denaturiertes mikrosomales Protein: Pool aus versch. humanen Lebermikrosomen (mittlere Proteinkonzentration: 3,5 mg/ml) bei 100 °C 5 min denaturiert Lagerung bei -20 °C

2.1.8.5 DNA Gelelektrophorese

Auftragspuffer für Agarose-Gel	Xylen	105 mg
	Bromphenolblau	105 mg
	Glycerin	21 ml
	EDTA 0,5M	21 ml
40X TAE-Puffer	Tris-Base	193,6 g
	Eisessig	45,7 ml
	EDTA 0,5M	80 ml
	Ad 1l mit Millipore-Wasser, pH 8,0	

2.2 Methoden

2.2.1 DNA- und Leberproben aus der IKP148 Studie

Von 1999 bis 2001 wurden in einer Kooperation mit dem Charité-Klinikum der Humboldt Universität Berlin Leberproben aus diversen chirurgischen Eingriffen gewonnen und am IKP in Stuttgart gesammelt. Die eingefrorenen Leberproben bestanden aus gesundem, Tumor umgebendem Gewebe. Ebenso wurden klinische Daten wie Alter, Geschlecht, Ethnizität (kaukasisch), Krankheits-Diagnose(n), Operationsart und regelmäßige Medikamenteneinnahme sowie Alltagsgewohnheiten wie Rauchverhalten, Alkoholkonsum und Ernährung erfasst. Von der Analyse ausgeschlossen wurden Patienten mit schweren Lebererkrankungen (Hepatitis, Zirrhose). Eine schriftliche Einverständniserklärung der Patienten lag vor. Die Studie war von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität Berlin genehmigt worden. Die Präparation der Lebermikrosomen wie auch die Gewinnung der genomischen DNA erfolgte nach Standardmethoden (Lang et al., 2001). Der mikrosomale Proteingehalt wurde mit dem Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, München) nach der Bradford-Methode mit Rinderserumalbumin (BSA) als Standardprotein bestimmt.

2.2.2 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Die *CYP2B6* Promotor Sequenz (AC24497632), Gensequenz (NG_000008.5 und AC023172) und die *CYP2B7* Pseudogen-Sequenz (AC008537) waren die Grundlage zur Entwicklung spezifischer *CYP2B6* Primer. Die Primer wurden mit Hilfe der AlignX Funktion des Vektor NTI Advance 9 Programms entwickelt. Alle beschriebenen Reaktionen wie PCR Amplifikation, „*shrimp alkaline phosphatase*“-Aufreinigung und die Primer-Extension Reaktion wurden in 384-well-Mikrotiterplatten (ABgene) mit Hilfe des Puredisk Pipettierroboters (Cybio) und in einem DYAD™ PCR Thermal-Cycler (MJ Research) durchgeführt. Es wurden in jeder Platte Wasser-Kontrollen mitgeführt, um Fremd-Kontaminationen zu erkennen bzw. auszuschließen. Die unterschiedlichen Proben-Gesamtzahlen der genotypisierten SNPs kamen durch die Verfügbarkeiten in den DNA-Isolierungen und der Limitierung der Methode für geringe Probenzahlen zustande.

2.2.2.1 Amplifikation

Die Amplifikation der untersuchten *CYP2B6*-Fragmente wurde in einem Endvolumen von 8 µl durchgeführt mit 50 ng DNA, 0,2 U HotStarTaq Polymerase (HotStarTaq Master Mix Kit, Qiagen), 1 mmol/l MgCl₂ (Qiagen) und den jeweiligen Primern (MWG Biotech AG, Metabion) in gewünschter Konzentration (Tabelle [2-1]). Jede Primersequenz enthielt eine zusätzliche „Tag“-Sequenz am 5'-Ende (ACGTTGGATG-), um besonders hohe oder niedrige Werte im relativen GC-Prozentgehalt auszugleichen (Ghebranious et al., 2005). Die Länge der Primer betrug 30 bp.

Tabelle 2-1: Primersequenzen und PCR-Bedingungen für die Präamplifikation von CYP2B6-Fragmenten

Primername	Länge	Sequenz	Lokation	Exon	Produkt (bp)	Konz. (µM)	Annealing Temperatur
2B6-Tag_Ex1F	30 bp	ACGTTGGATGCCACACATTCATTGCTCAC	5'UTR	1	744	0,1	60 °C
2B6-Tag_Ex1R	30 bp	ACGTTGGATGACCTCCTTTTCTGCCTGTA	Intr 1			0,1	60 °C
2B6-pTag_Ex2F	30 bp	ACGTTGGATGAGGAAGGATGAGGAAGGGGC	Ex2/Intr2	2	473	0,3	60 °C
2B6-pTag_Ex2R	30 bp	ACGTTGGATGGCTCTCACCATATCCCCGGA	Intr2			0,3	60 °C
2B6-pTag_Ex3F	30 bp	ACGTTGGATGCCTTCTTCCA ACTTCTTCTA	Intr3	3	231	0,3	60 °C
2B6-pTag_Ex3R	30 bp	ACGTTGGATGCTCTTCTTCTTCTATTCATCC	Intr3			0,3	60 °C
2B6-Tag_Ex4F	30 bp	ACGTTGGATGTCGGTCTGCCCATCTATAAA	Intr3	4	526	0,1	60 °C
2B6-Tag_Ex4R	30 bp	ACGTTGGATGTGATTCTTCACATGTCTGCG	Intr4			0,1	60 °C
2B6-Tag_Ex5F	30 bp	ACGTTGGATGACAGAAAGGATGAGGGAGGAA	Intr4	5	646	0,1	60 °C
2B6-Tag_Ex5R	30 bp	ACGTTGGATGCTCTCTCTCCTCTGTCTT	Intr5			0,1	60 °C
2B6-Tag_Ex7f	30 bp	ACGTTGGATGCCACCCACCTCAACCTCAA	Intr6	7	239	0,2	60 °C
2B6-pTag_Ex7R-2	30 bp	ACGTTGGATGCCCATGGGGAGAAAGTCCGA	Intr7			0,2	60 °C
2B6-Tag_Ex8F	30 bp	ACGTTGGATGTGTGGA GTGTGTGGA GGGTT	Intr7	8	242	0,2	60 °C
2B6-Tag_Ex8R-2	30 bp	ACGTTGGATGCTGGTGTCTGGGAAAGAAAT	Intr8			0,2	60 °C
2B6-Tag_Ex9F_2	30 bp	ACGTTGGATGACACTGGTGACCTTCTGTGT	Intr8	9	380	0,1	61 °C
2B6-Tag_C1459T-RV2	30 bp	ACGTTGGATGCCTGCACTCACTTGCATGT	3'UTR			0,1	61 °C

Die PCR-Bedingungen waren wie folgt: 95°C für 15 min (zur Aktivierung der HotStarTaq Polymerase), 45 Zyklen bei 95°C für 30 s, 60°C (Assay 1-4) bzw. 61°C (Assay 5) für 1 min Primeranlagerung), 72°C für 1 min (Verlängerung) und abschließend 10 min bei 72°C.

Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt wurde stichprobenartig je 1 µl aus zufällig ausgewählten Reaktionsansätzen mit 3 µl Wasser und 1 µl 5X DNA-Ladepuffer versetzt, auf einem 1 % Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf die korrekte Amplifikation und Größe der PCR Produkte überprüft.

2.2.2.2 Dephosphorylierung

Nach der PCR wurden überschüssige dNTPs entfernt. Dazu wurde der Ansatz mit 0,3 U „*shrimp alkaline phosphatase*“-Lösung (SAP) in 1X Rx-Puffer (0,17 µl; SAP-Kit) bei 37°C für 20 min, gefolgt von 10 min bei 85°C zur Inaktivierung des Enzyms und 1 s bei 20°C aufgereinigt. Die Reaktion fand in einem Gesamtvolumen von 10 µl statt (8 µl PCR-Ansatz plus 2 µl SAP-Ansatz).

2.2.2.3 „Primer Extension“-Reaktion (Homogenous MassExtend und iPLEX-Design)

Die Verlängerung der spezifisch lokalisierten Primer um die jeweiligen Nukleotide nach dem *homogenous MassExtend* (hME)-Prinzip fand in einem Volumen von 16 µl statt. Dieses enthielt 1 µl Puffer C (500 mmol/l Tris-HCl, pH 9,5; 100 mmol/l MgCl₂), 1 µl MgCl₂-Lösung (6 mmol/l) und 1 U Termipol DNA Polymerase I (Solis Biodyne), ebenso wie die „*Extension*“-Primer in optimierter Konzentration (MWG, Metabion; Tabelle [2-2]).

Tabelle 2-2: CYP2B6 Primersequenzen und Bedingungen für die „*Extension*“ Reaktion

Assay	SNP Position	Primer Orientierung	Masse Primer	Primer Sequenz	Verlängerung (wt/mut)	Masse Produkt 1 (wt)	Masse Produkt 2 (mut)	Konzentration (µM)	Annealing Temperatur
Assay 1	415A>G	forward	6957	TATGAGGGACTTCGGGATGGGA	dAddG/ddG	7897	7270	1,2	52 °C
	516G>T	reverse	6000	TGATGTTGGCGTAATGGA	ddC/dAddT	6274	6602	0,9	52 °C
	547G>A	forward	5127	ACATCATCTGCTCCATC	ddG/dAddT	5440	5728	0,3	52 °C
	1282C>A	forward	6186	AAAAGAMTGAAGCTTTTATC ^a	ddC/dAddC	6459	6772	0,9	52 °C
Assay 2	min82T<C	forward	6980	AGGTGGGGAATGGATGAAATTT	dT/dCddA	7268	7567	1,2	56 °C
	419G>A	reverse	6902	CCTGAATCCGCTCCTCCACTC	dCdd/ddT	7504	7190	1,2	56 °C
	785A>G	reverse	5328	AGGTGTCCGATGAGGTCC	dT/dCddT	5616	5905	0,9	56 °C
Assay 3	136A>G	reverse	6738	TTGAGTAGGCCTCTCTATCCA	dTdd/ddC	7315	7011	0,9	52 °C
	296G>A	reverse	5871	CTCGACCATGGCGATTTTT	ddC/dTddC	6145	6449	1,2	52 °C
	1172T>A	forward	5215	CACAGAAGTATTTCTCA	dTdd/ddA	5792	5512	0,3	52 °C
Assay 4	769G>A	forward	6182	AGAAGCACCGTGAAACCCCTG	dGddA/ddA	6808	6479	1,2	60 °C
	983T>C	reverse	7101	GATGTGGGCCAATCACCTGTTCA	ddA/dGddT	7398	7719	0,9	60 °C
	1006C>T	reverse	5337	ATGAAGCTCTGGAGGGC	dGddA/ddA	5964	5634	0,3	60 °C
Assay 5	1459C>T	reverse	7137	GCCCCTTCAGCGGGCAGGAAGC	dGdGddA/ddA	8093	7434	1,2	61 °C
	86G>C	reverse	6358	GGCGGGCCCTGGTGGGAGG	ddC/dGddT	6631	6975	1,2	61 °C

^a M bezeichnet eine sog. „wobble“ Position (A/C), die eingefügt wird, um eine Variation in umliegender Sequenz zu definieren (c.1268A>C; www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP).

Zu diesem Mix wurden Assay-spezifische Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs: dATP, dGTP, dTTP; Amersham) und Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs: ddA, ddC, ddG, ddT; BioLog) in einer Konzentration von 0,12 mmol/l hinzugegeben. In den Assays 1, 2, 3 und 5 wurden dCTP und dGTP (Amersham) in einer Konzentration von 0,25 mmol/l hinzugefügt. Die Reaktionsbedingungen waren wie folgt: 94°C für 4 min, gefolgt von 55

Zyklen bei 94°C für 30 s, 52°C (Assay 1 und 3), 56°C (Assay 2) oder 60°C (Assay 4 und 5) für 30 s, 72°C für 30 s und 2 min bei 72°C.

Die entstandenen Produkte wurden mit 10 µl Kationentauscher (AG[®] 50W-X8 Resin; BioRad; Endvolumen in der 384well Platte: 26µl) versetzt und 30 min über Kopf geschüttelt, um DNA-Addukte zu eliminieren. Danach wurde der Kationentauscher abzentrifugiert.

Zum Design des *iPLEX*-Assays wurde die Assay Design Software 3.0.0 (Sequenom) verwendet, bei der die Multiplex-Effizienz und Flexibilität dadurch gesteigert wurde, dass alle „*single base extension*“ (SBE) Produkte dieselben terminierenden Nukleotide verwenden (Terminations-Mix). Dadurch war eine sensitivere Massen-Auftrennung, d.h. die Detektion kleinerer Massenunterschiede, gegeben. Die *iPLEX* Reaktion fand in einem Volumen von 2 µl statt. Der Ansatz bestand aus 1,047 µl Wasser, 0,25 µl *iPLEX* Puffer (10X) und Terminations-Mix, 0,403 µl Primer Mix (Ausgangskonzentration: 500µM) und 0,05 µl *iPLEX* Enzym-Mix (Sequenom). Die Primer sind in Tabelle [2-3] aufgelistet und wurden bis zu einer Masse von 6000 Dalton in einem Volumen von je 0,0112 µl, ab einer Masse von 6000 Dalton von je 0,0224 µl verwendet.

Tabelle 2-3: *CYP2B6* Primersequenzen und Bedingungen für die „*Extension*“-Reaktion

Assay W1	SNP Position	Primer Richtung	Masse Primer	Primer Sequenz	Verlängerung (wt)	Masse Produkt 1 (wt)	Verlängerung (mut)	Masse Produkt 2 (mut)
	419G>A	reverse	4408.9	CGCTCCTCCACACTC	G	4656.1	A	4736.0
	136A>G	reverse	4792.1	AGGCCTCTTCTATCCA	A	5119.2	G	5039.3
	15582C>T	reverse	4988.3	TAGGAAGAAGCAGCAG	C	5275.5	T	5259.5
	296G>A	reverse	5176.4	CGACCATGGCGATTTT	G	5423.6	A	5503.5
	1006C>T	forward	5210.4	gaGTGATTGGCCACAT	C	5457.6	T	5537.5
	1459C>T	reverse	5334.5	gaAGCGGGGCAGGAAGC	C	5621.7	T	5605.7
	1282C>A	reverse	5572.6	GCTTACCTAAGGAGAA ^a GG	C	5859.9	A	5899.7
	min82T>C	reverse	5705.7	TGCCTCTGCACCCTGTTAT	T	5976.9	C	5992.9
	547G>A	reverse	5826.8	TGGAATCGTTTTCCAAAGA	G	6074.0	A	6153.9
	415A>G	forward	5932.9	aagtGACTTCGGGATGGGA	A	6204.1	G	6220.1
	1172T>A	forward	6703.4	ccGGACACAGAAGTATTTCTCA	A	6974.6	T	7030.5
Assay W2								
	983T>C	reverse	5130.4	GGCCAATCACCTGTTC	T	5401.6	C	5417.6
	785A>G	reverse	5266.4	AGGTGTCGATGAGGTCC	A	5593.5	G	5513.6
	769G>A	forward	5477.6	AAGCACCGTGAAACCCTG	G	5764.8	A	5748.8
	593T>C	reverse	5547.6	TGGTAGAACAAAGTTCAGC	T	5818.8	C	5834.8
	516G>T	reverse	5634.7	GATGTTGGCGTAATGGA	G	5881.9	T	5905.9
	1132C>T	forward	5950.9	TCACCCAACACACCAGCTTC	C	6198.1	T	6278.0
	86G>C	reverse	6625.3	GGGCGGGCCCTGGTGGGAGG	G	6872.5	C	6912.5
	min750T>C	reverse	7320.8	TCTGTACTAAAAACAAAAATTA	T	7592.0	C	7608.0

^a Die klein geschriebenen Basen dienen der Verlängerung einiger Primer zur Vergrößerung der Masse und einer gleichmäßigeren Verteilung aller Primer im Massenspektrum.

Die entstandenen Produkte wurden mit 6 mg Kationentauscher (Clean Resin; Sequenom) versetzt und 30 min über Kopf geschüttelt. Die Platte wurde dann 20 min abzentrifugiert und die Proben auf einen 384-well SpectroCHIP Bioarray gespottet und im Massenspektrometer nach unter Kapitel 2.2.2.4 beschriebenem Prinzip gemessen. Für die Platten- und Assay-

Zuordnung und die Verknüpfung der Daten mit dem Massenspektrometer wurden die Software-Versionen Assay Editor 3.1.4, Plate Editor 3.1.4, für die Daten-Analyse die Typer Analyzer 3.3.0 Software verwendet.

2.2.2.4 Bruker Daltonik MALDI-TOF Massenspektrometrie

Zur Vorbereitung für die Messung der Produkte wurde 1 µl 3-Hydroxypicolinsäure-Lösung (45 mmol/l mit 3 mmol/l Diammonium-hydrogencitrat-Lösung in Wasser) auf einen MTP Anchor Chip™ 400/384TF (Bruker Daltonik) aufgetropft und luftgetrocknet. Der Durchmesser der 384 Spots auf dieser Stahlplatte betrug 400 µm. Dann wurden 0,5 µl der Produkte aus der „*Extension*“ Reaktion auf die Matrix aufgetropft, luftgetrocknet und die Platte in einen Ultraflex MALDI-TOF Massenspektrometer (Bruker Daltonik) eingeführt. Jede Probe wurde mit 180 Schüssen aus einem Stickstoff-Laser beschossen und somit in die Gas- und Ionisierungsphase überführt. Der Detektionsbereich lag zwischen 4000 und 9000 Dalton. Die Auswertung der Genotypisierungsergebnisse erfolgte mit der GENOTOOLS Software (Bruker Daltonik). Nicht automatisch zugeordnete Genotypen wurden manuell anhand der Masse und der relativen Intensität des Spektrogramms bestimmt.

2.2.2.5 Sequenom MALDI-TOF Massenspektrometrie

Zum Auftragen der Proben auf den SpectroCHIP Bioarray wurde ein Nanodispenser Roboter (Sequenom, Samsung) verwendet. Die Messung im MALDI-TOF Massenspektrometer erfolgte mit Hilfe der MassARRAY Workstation Software Version 3.3. Das Prinzip der Messung entspricht jener von Bruker Daltonik (siehe 2.2.2.4).

2.2.3 Herstellung von Kontrollen

Zur Überprüfung der SNP-Detektion wurden Proben als Positiv-Kontrollen benötigt, die für jeden zu untersuchenden SNP in heterozygoter und homozygot mutanter Form vorlagen, um Artefakte wie DNA Fragmente und sogenannte „*pausing peaks*“, die aus unvollständiger Verlängerung der Primer (siehe 2.2.2.3 *Primer extension reaction (hME und iPLEX-Design)*) entstehen können, auszuschließen.

Die Kontrollproben homozygot mutanter DNA an den SNP-Positionen wurden mittels Klonierung oder Touch-Down PCR hergestellt, die im Folgenden näher erläutert werden.

Um eine an der betreffenden Gen-Stelle homozygot mutante Kontroll-DNA aus einer verfügbaren heterozygoten Probe herzustellen, wurde zunächst ein PCR-Produkt mit den

entsprechenden PCR-Primern generiert (siehe Tabelle [2-1] unter 2.2.2.1). Die zwei Allele eines heterozygoten DNA-Fragments wurden durch Subklonierung in *E.coli* TOP10 Zellen getrennt. Dies erfolgte für die *CYP2B6*-Varianten c.86G>C, c.136A>G, c.296G>A, c.415A>G, c.419G>A und c.547G>A.

Für die Klonierungen wurde der pCR[®]4-TOPO Vektor (Invitrogen) verwendet. Bei diesem handelt es sich um einen positiven Selektionsvektor, da er das Killer-Gen *ccdB* des bakteriellen F-Plasmids enthält (Bernard et al., 1994). Das Bakterienwachstum wird durch das *ccdB* Genprodukt verhindert. Wird jedoch durch den Einbau eines fremden DNA-Fragments das Gen ausgeschaltet, ist es den Bakterien möglich zu wachsen.

Die Ligation des jeweiligen PCR Produkts fand nach folgender Vorschrift statt: 4 µl PCR Produkt, 1 µl Salzpuffer und 1 µl pCR[®]4-TOPO Vektor (beides Invitrogen) wurden in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert, sanft gemischt, für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann auf Eis gestellt. Der gesamte Ligationsansatz wurde in ein 1ml Schraubdeckelgefäß mit kompetenten *E. coli* TOP10 Zellen zugegeben und sanft gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min wurden die Zellen für 30 s einem Hitze-Schock bei 42°C ausgesetzt (nicht geschüttelt) und dann sofort für 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 250 µl SOC Medium wurde das Gefäß gut verschlossen und bei 37°C für eine Stunde geschüttelt (200 rpm). Die Transformationsansätze wurden in 2 Verdünnungen (50 µl und restliches Volumen) auf vorgewärmten Ampicillin (50 µg/ml)-selektiven LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine Kontroll-Ligation ohne Zugabe des PCR-Produktes wurde jeweils mitgeführt. pUC18 DNA wurde mit 10 pg per 50 µl Zellen zur Kontrolle der Transformationseffizienz verwendet, welche meist zwischen 1,5 und 2 x 10⁸ cfu/µg DNA lag. Als Hintergrund-Kontrolle dienten die kompetenten Zellen ohne ligierten Vektor. Die Kolonien wurden gezählt und je Ansatz 10-20 Kolonien von der Platte in 3 ml LB-Medium (+Ampicillin) angeimpft. Nach Inkubation bei 37°C auf einem Schüttler (16 h) wurde nach Anleitung des Herstellers die Plasmid-DNA isoliert (Qiaprep Spin Miniprep Kit Protokoll, Qiagen). Über einen Restriktionsverdau wurde die Größe der in den Vektor ligierten PCR-Produkte überprüft. Der Vektor enthält im Polylinker beidseitig des Inserts eine *EcoRI* Schnittstelle. Durch die Behandlung mit *EcoRI* kann das PCR-Produkt aus dem Vektor ausgeschnitten werden. Meist wurde zur Überprüfung der Richtigkeit des Fragments und der Orientierung im Vektor Doppel-Restriktionen mit den Enzymen *ApaI*, *PstI* und *StyI* (kleinste Anzahl an Schnittstellen) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Restriktionsfragmente wurden dann in einem 1 %igen Agarose-Gel aufgetrennt.

Zur Kontrolle der klonierten Fragmente wurde die Mutationsstelle durch Sequenzierung nachgewiesen.

Seltene Mutationen, für die keine Probe mit heterozygotem Genotyp zur Verfügung stand, wurden in Wildtyp-DNA mittels *Touch-Down-PCR* (orts-spezifische Mutagenese) eingefügt. Dies geschah in der vorliegenden Arbeit für die *CYP2B6*-Varianten c.547G>A, c.769G>A, c.983T>C, c.1006C>T, c.1282C>A. Dazu wurden Mutagenese-Primer konstruiert, die im Bereich der zu amplifizierenden Region hybridisieren und in ihrer Sequenz die jeweilige Variation aufweisen. Die Schmelztemperatur liegt ungefähr 8°C über der der Amplifikationsprimer (Fischer et al., 2003).

Die Primersequenzen der Mutagenese-Primer lauten wie folgt, wobei die Mutationsstelle jeweils markiert ist:

2B6_547A_for: AACATCATCTGCTCCATCATCTTTGGAAAACGATTCA

2B6_769A_for: CCGTGAAACCCTGAACCCAGCGCCCC

2B6_983C_for:

CTGTACAGAGAGAGTCTACAGGGAGACTGAACAGGTGATTGGCCCACATCGCC

2B6_1006T_for: AACAGGTGATTGGCCCACATTGCCCTCCAGAGCTTCATGAC

2B6_1282A_for:

ACTGAAAAGACTGAAGCTTTTATCACCTTCTCCTTAGGTAAGCTGGACCC

Die Amplifikation mit den drei Primern pro Variation erfolgte bei einer Initiation von 95°C für 5 min, gefolgt von 12 Zyklen bei 95°C für 30 s, 65°C zu 60°C für 60 s, 72°C für 60 s und 30 Zyklen bei 92°C für 30 s, 50°C für 30 s, 70°C für 30 s. Die finale Elongationsreaktion erfolgte bei 70°C für 7 min und die Reaktionsansätze wurden dann auf 12°C gekühlt.

Auch hier wurde das Vorliegen der Mutationen mittels Sequenzierung überprüft.

2.2.4 Sequenzierung

Die Kontrollsequenzierungen wurden nach der Methode von Sanger (1977) entweder a) im Polyacrylamidgel mit Fluoreszenz-markierten Primern durchgeführt oder b) mittels Kapillar-Sequenzierung mit Fluoreszenz-markierten ddNTPs. Als Primer für letzteres wurden die Amplifikationsprimer der MALDI-TOF MS Genotypisierung (Tabelle [2-1]) verwendet.

a) Bei der Sequenzierung in einem Polyacrylamidgel wurde der „*Thermosequenase Fluorescent Labelled Primer Sequencing Kit* (mit 7-deaza-dGTP)“ (Amersham,

Buckinghamshire) verwendet. Die 5'-IRD800 Fluoreszenz-markierten Sequenzierprimer (beschrieben von Lang et al., 2001) stammen von MWG. Die Sequenzierreaktion besteht aus 10 µl gereinigtem PCR-Produkt, 1 µl DMSO, 2 µl markiertem Primer (2 pmol/µl) und 13 µl Millipore-Wasser. 4,5 µl dieses Mixes wurde zu je 1,5 µl A, C, G und T Reagenz hinzupipettiert und mit einem Tropfen Rotwachs überschichtet. Die Amplifikationsbedingungen waren eine 2-minütige Denaturierung bei 95°C, 30 Zyklen bei 95°C für 15 s, 57°C für 30 s und 70°C für 1 min, gefolgt von einem Kühlungsschritt bei 12°C. Nach der Amplifikation wurde die Reaktion mit 6 µl Formamid-Stop-Lösung (Amersham) abgestoppt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Die Elektrophorese der Sequenzierungs-Produkte erfolgte in einem 5 %-igen Polyacrylamidgel. Nach einem 30-minütigen Vorlauf zur gleichmäßigen Erwärmung des Gels auf 50°C wurde mit 1X TBE als Laufpuffer gestartet. Die Laufzeit betrug 9 h bei einer Spannung von 1.500 Volt und einer Stromstärke von 22 mA. Die Elektrophorese wurde in einem LiCor 400 DNA Sequencer, die Auswertung mit Hilfe des LiCor Image IR-Programms durchgeführt.

b) Für die Sequenzierreaktionen mit dem Kapillar-Sequenzierer wurde der ABI PRISM™ *Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems) verwendet. Für die Reaktion wurden 1 µl DNA (PCR-Produkt), 1 µl Primer (100 pmol/µl), 1 µl Big Dye Sequenzierungspuffer (5X), 2 µl Ready Reaction Terminator Mix (2,5X) und 15 µl Wasser eingesetzt. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte für 1 min bei 96°C, 24 Zyklen mit 10 s bei 96°C, 5 s bei 50°C und 4 min bei 60°C. Danach wurde auf 12°C gekühlt.

Anschließend wurden die Reaktionsprodukte (20 µl) durch Zugabe von 14 µl Wasser, 3 µl NaAc (pH 4,6) und 63 µl 100 %igem Ethanol gefällt. Dieser Ansatz wurde 20 min bei 14000rpm zentrifugiert und danach mit 250 µl 70 % igem Ethanol gewaschen, nochmals für 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert und luftgetrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 20 µl LiChrosolv Wasser (Applied Biosystems) gelöst und die Probe in einem ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer analysiert. Die Auswertung erfolgte mit dem ABI PRISM 310 Genetic Sequencing Analysis 3.3 Programm (Applied Biosystems).

Die Ergebnisse der Sequenzierungen wurden mit den Sequenzen aus der Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>: NG_000008.5, AC_023172 und AC_24497632) verglichen.

2.2.5 Molekulare und computergestützte Analyse von Haplotypen

Die Konzentration der zu untersuchenden genomischen DNA wurde bestimmt und dann entsprechend auf 3 pg – auf geschätzt eine DNA-Kopie – verdünnt. Mehrere Verdünnungsschritte zu 3 pg sowie Verdünnungen zu 6 pg und 9 pg DNA waren durchzuführen. Die Amplifikation, SAP-Aufreinigung und Primer Extension Reaktion erfolgte wie unter 2.2.2.1 und 2.2.2.3 beschrieben. Nähere Erläuterungen zu den jeweiligen Proben und den speziellen Fragestellungen finden sich im Ergebnisteil unter Kapitel 3.2.3. Bestimmte Haplotypen bzw. Allele wurden anhand des Genotyps, der Frequenzen und mit Hilfe des PHASE Haplotyp-Programms v.2.0.2 (Stephens, 2001; 2003) erfasst.

Das Linkage Disequilibrium wurde mit Hilfe des Haploview-Programms (v.3.32) des HapMap-Konsortiums bestimmt (<http://www.hapmap.org> oder <http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview>).

2.2.6 Proteinanalytische Methoden

2.2.6.1 Herstellung von Kalibrierlösungen für die Western Blot-Analyse

Zur Quantifizierung von Cytochrom P450 2B6 Protein mittels Western Blot wurde eine Stamm-Kalibrierlösung aus der mikrosomalen Fraktion von mit CYP2B6 transfizierten humanen Lymphoblasten (BD Biosciences) in einer Konzentration von 2000 fmol/25 µl hergestellt. Aus dieser Stamm-Lösung wurden weitere Verdünnungen zu 1000 fmol/25 µl, 500 fmol/25 µl, 250 fmol/25 µl und 125 fmol/25 µl durch Zugabe von Millipore-Wasser und 5X Laemmli-Puffer hergestellt (Endvolumen von 250 µl). Diese Standardproben wurden auf jedem SDS-Gel zur Quantifizierung mitgeführt.

Die Lebermikrosomen wurden jeweils mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,4 und 1/5 Volumen 5X Laemmli-Probenpuffer zu 1 mg/ml verdünnt. Nach Denaturierung der Proben für 3 min bei 100°C und Vortexen wurden sie bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

2.2.6.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mittels denaturierender Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE). Dabei werden durch die Anlagerung von anionischen SDS-Molekülen an die Proteine die unterschiedlichen Ladungen der Proteine ausgeglichen und die dreidimensionale Struktur der Proteine zerstört. Aufgrund dessen ist die

Laufgeschwindigkeit der Proteine im elektrischen Feld umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe (Laemmli, 1970; Weber und Osborn 1969). Es wurden 10 %ige Polyacrylamidgele mit einer Dicke von je 1,5 mm und einer Größe von je 16x18 cm verwendet und nach folgender Vorschrift gegossen:

Trenngel: 12 ml Aqua bidest, 10 ml Acrylamid/Bis (30:0,8), 7,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8, 0,3 ml 10 % SDS, 30 µl TEMED, 300 µl 10 % APS. Das Trenngel wurde mit Wasser überschichtet, um einen Luftabschluss (Trennlinie) zu erzielen. Das Auspolymerisieren erfolgt durch Ammoniumpersulfat als Polymerisationsstarter, das durch die Bildung freier Radikale das Acrylamid sozusagen „aktiviert“, und durch TEMED als Polymerisationskatalysator, was zu langen Acrylamid-Polymerketten führt. Nach Auspolymerisieren des Gels wurde das Wasser abgenommen, der Probenauftragskamm eingesetzt und mit dem Sammelgel überschichtet. Sammelgel: 6,1 ml Aqua bidest, 1,35 ml Acrylamid/Bis (30:0,8), 2,5 ml 0,5 M Tris pH 6,8, 100 µl 10 % SDS, 10 µl TEMED, 100 µl 10 % APS. Nach Auspolymerisieren des Sammelgels wurde das Gesamt-Gel in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt. Die Proben wurden in die Probentaschen pipettiert und zusätzlich ein Molekulargewichtsstandard (Rainbow-Marker, Amersham) aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in 1x SDS-Laufpuffer durch Anlegen einer konstanten Spannung von 40V über Nacht oder bei 170V für ca. 5 h bei Raumtemperatur.

2.2.6.3 Übertragung der Proteine auf Nitrocellulose

Die Übertragung der aufgetrennten Proteine aus dem Elektrophoresegel auf eine Trägermembran wird als Western Blotting bezeichnet. Dazu wurde eine Fastblot-Apparatur (Biometra) und Nitrocellulosemembran (Schleicher&Schüll) verwendet. Das Gel, Filterpapier und Nitrocellulose wurden zunächst einige Minuten in entsprechendem Transferpuffer äquilibriert. Die Anode wurde mit zwei Filterpapieren, der Nitrocellulosemembran, dem Gel und zwei weiteren Filterpapieren blasenfrei beladen.

Nach Aufsetzen der Kathode erfolgte der Protein-Transfer bei 400 mA für 15 min. Im Anschluss wurde zur Überprüfung der Transfereffizienz eine reversible Gesamtproteinfärbung (unspezifisch) durchgeführt, indem die Membran 5 min in PonceauS-Lösung inkubiert und anschließend mit H₂O gewaschen wurde. Dabei werden immobilisierte Proteine rot gefärbt. Eine erfolgreiche oder schlechte Übertragung der Proteine vom Gel auf die Nitrocellulose war somit frühzeitig gut zu erkennen.

2.2.6.4 Spezifischer Immun-Nachweis

Zur Absättigung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen wurde die Nitrocellulosemembran mind. 1h in 5 % (w/v) Magermilchpulver (Fluka) in 100 ml TBST unter leichter Bewegung auf einem Schüttler inkubiert. Danach folgte die Inkubation der Membran in 50 ml Primärantikörper-Lösung [mAB anti human CYP2B6 (BD Biosciences), 1:2000 in 1 % (w/v) Magermilchpulver/TBST] auf einem Schüttler bei 4°C über Nacht. Nach intensivem Waschen (4 x 15 min) der Membran mit TBST-Puffer folgte die Inkubation mit einer Meerrettichperoxidase (POD)-konjugierten Sekundärantikörper-Lösung [Goat-Anti-Mouse, 1:20000 (Oncogene) in 1 % (w/v) Magermilchpulver/TBST] für 30 min. Es folgten abschließende Waschschrte von zweimaligem kurzen Spülen und zweimal 10 min mit TBST, um den überschüssigen Sekundärantikörper zu entfernen. Alle Inkubationen erfolgten bei Raumtemperatur.

2.2.6.5 Detektion und Auswertung

Die Detektion der entsprechenden Antikörper erfolgte durch 5-minütige Inkubation der Membranen mit 14 ml Supersignal Dura (Pierce, Substrat:Starter 1:1) in Dunkelheit. Dabei wird das in der Substratlösung enthaltene Luminol durch die Peroxidase in einer lichterzeugenden Reaktion umgesetzt. Die Detektion des entstehenden Lichts erfolgte mit einer hochempfindlichen Digitalkamera (LAS-1000, Fuji) mit Flat-Frame Korrektur und Abzug des Dunkelbilds.

Die Auswertung der Chemilumineszenz-Signale erfolgte zweidimensional mit dem AIDA Programm 2.1 (Raytest). Um jede Signalbande wurde ein rechteckiges Messfeld gelegt und zum Abgleich des Hintergrundes ein signalfreies Messfeld definiert. Das Programm konnte über die mitgeführten Kalibrierproben eine Standardkurve erstellen und über die Signalstärke der einzelnen Banden den CYP2B6 Gehalt berechnen.

2.2.7 Messung der katalytischen CYP2B6 Aktivität mit Bupropion

Das Arzneimittel Bupropion wird gegen Depression und als Nikotinentwöhnungsmittel verabreicht. Im Jahre 2000 beschrieben Hesse et al. (Hesse et al., 2000), dass Bupropion spezifisch durch CYP2B6 metabolisiert wird. Dabei wird das Substrat Bupropion durch Hydroxylierung zu Hydroxy-Bupropion und zu einem geringeren Anteil zu Threohydrobupropion und Erythrohydrobupropion umgesetzt.

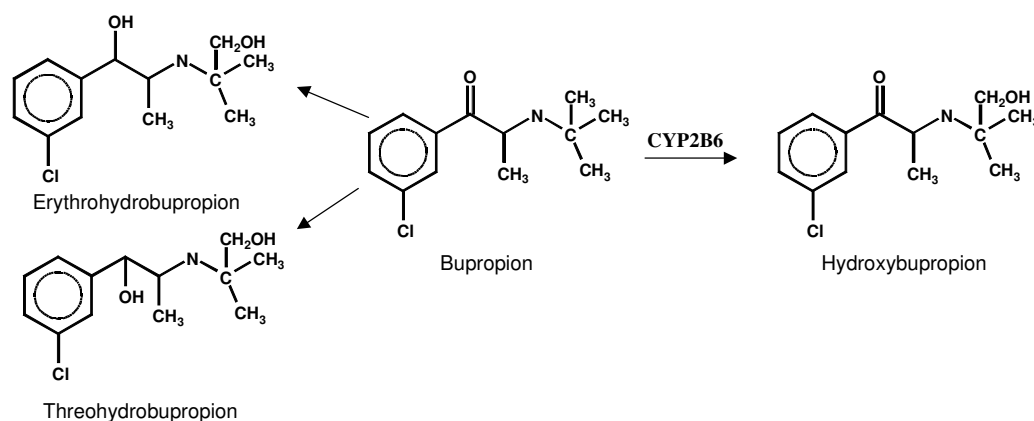


Abbildung 2-1: Metabolismus von Bupropion

Die Bildung von Hydroxy-Bupropion wird zur Bestimmung der spezifischen CYP2B6-Aktivität in Lebermikrosomen verwendet (Richter et al., 2004).

2.2.7.1 Substanzen und Lösungen

Bupropion-HCl (M: 276,2 g/mol), Hydroxybupropion-HCl (M: 292,2 g/mol) und der Interne Standard [$^2\text{H}_3$]-Hydroxybupropion (M: 295,2 g/mol) wurden von Dr. Thomas Mürdter und Georg Heinkele am IKP Stuttgart synthetisiert (Mehta und Raleigh, 1974).

Hydroxy-Bupropion und [$^2\text{H}_3$]-Hydroxybupropion (Reinsubstanzen) wurden in Methanol in einer (Stamm-)Konzentration von 1 mg/ml gelöst und bei 4°C gelagert. Bupropion-HCl wurde als 50 mM Stammlösung in 10 % Methanol gelöst. Die Arbeitslösungen wurden aus den Stammlösungen mit Millipore-Wasser verdünnt und bei 4°C gelagert.

Die mobilen Phasen der HPLC bestanden aus Millipore-Wasser + 1 % Essigsäure (v/v; Mobile Phase A) und Acetonitril + 1 % Essigsäure (v/v ; Mobile Phase B).

2.2.7.2 Kalibrierung

Zur Kalibrierung wurde aus der Hydroxybupropion-Stammlösung eine Lösung von 1000 pmol/25 µl (Kalibrierprobe 9) mit Millipore-Wasser hergestellt. Diese Lösung wurde mit Millipore-Wasser wie folgt weiter verdünnt:

500 pmol/25 µl (Kal.Pr.8), 250 pmol/25 µl (Kal.Pr.7), 100 pmol/25 µl (Kal.Pr.6), 50 pmol/25 µl (Kal.Pr.5), 25 pmol/25 µl (Kal.Pr.4), 10 pmol/25 µl (Kal.Pr.3), 5 pmol/25 µl (Kal.Pr.2), 1 pmol/25 µl (Kal.Pr.1). Die Kalibrierproben wurden folgendermaßen angesetzt:

25 µl der Kalibrierlösung wurden mit 25 µl NADPH-Regenerierendem System (1M MgCl₂, 1M Glucose-6-phosphat, 0,1M NADP⁺, 25U/50µl Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase in 0,1M Natriumphosphatpuffer pH7,4), 5 µl denaturiertem mikrosomalen Protein und 25 µl 500 µM Bupropion-Lösung versetzt. Die Proben wurden mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 auf 250 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 50 µl 1 N HCl und 25 µl internem Standard (100pmol [²H₃]-Hydroxybupropion) wurden die Proben gemischt und 5 min bei 16.000 g zentrifugiert. 10 µl des Überstandes wurden direkt in das HPLC-System injiziert.

Auf die gleiche Weise wurden separat Qualitätskontrollproben mit den Hydroxy-Bupropion Konzentrationen von 5 pmol/25µl, 50 pmol/25µl und 250 pmol/25µl hergestellt.

2.2.7.3 Probenvorbereitung

Die Enzymreaktion mit den Proben erfolgte in je 250 µl Ansätzen. 50 µg Mikrosomen wurden zunächst mit 50 µM Bupropion in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 3 min bei 37°C vorinkubiert. Durch Zugabe von 25 µl NADPH-Regenerierendem System wurde die Enzymreaktion gestartet. Nach der gewünschten Inkubationszeit von 15 min wurde die Reaktion durch 50 µl 1 N HCl gestoppt und nach Zugabe von 25 µl internem Standard (100 pmol [²H₃]-Hydroxybupropion) gut durchmischt. Eine anschließende Zentrifugation für 5min bei 16.000 g (Biofuge pico, Heraeus) dient der Abtrennung der denaturierten Proteine. 250 µl des Überstandes wurden direkt in ein LC-MS-Gläschen überführt, wovon 10 µl in das HPLC-System injiziert wurden.

2.2.7.4 HPLC-Messung

Die Chromatographie erfolgte in einem HP1100 (mit Entgaser, binärer Pumpe, Säulenschaltung, Autosampler, UV-Detektor bei 282 nm; Agilent Technologies). Die Detektion fand an einem HP1100 Detektor statt, einem einfachen Quadropol Massenspektrometer mit LC-Kopplung und Electronic Spray Ionisation (ESI; Agilent Technologies). Die Säule zur Substanz-Auftrennung war eine Prontosil-C18 AQ Säule, 150 x 3 mm lang mit 3 µm Partikelgröße (Bischoff). Die Säulentemperatur betrug 30°C, die Säulenschaltung 4 bis 11,5 min. Es wurde ein Acetonitril-Gradient verwendet. Die ersten 2min durchlief die Säule eine 84 % wässrige (H₂O + 1 % HOAc) Lösung mit 16 % organischer Phase (Acetonitril + 1 % HOAc). Ab diesem Zeitpunkt wurde ein linearer Gradient angelegt hin zu 55 % wässriger Phase und 45 % organischer Phase (Zeitverlauf: 9 min), bei dem die Substanzen mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min von der Säule

eluiert wurden. Durch Zugabe der 84%igen zu der 16%igen Lösung wurde nach 30 s die Ausgangskonzentration erreicht mit einer darauffolgenden Äquilibration der Säule für 2,5 min. Die gesamte Messzeit betrug 14 min. Während der Massenspektrometrie betrug die Gastemperatur 350°C, der Sprühdruk 30 psi, der Stickstoff Volumenstrom 10 l/min und die Kapillarspannung 1500 V. Der Messmodus wurde auf Single Ion Monitoring Mode (SIM) eingestellt mit einem Fragmentor bei 50 V.

Bupropion hat die Masse 256 m/z, [²H₃]-OH-Bupropion 259 m/z (Elution in beiden Fällen bei ca. 8,5 min). Die Quantifizierung erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse mit Wichtung (1/x) des Peakflächenverhältnisses [²H₃]-Hydroxybupropion/Hydroxybupropion. Die Berechnung erfolgte durch die Software HP Chem 4.06.

2.2.8 Nomenklatur und Software

Die Basen- und Allel-Nomenklatur basiert auf den herausgegebenen Empfehlungen des CYPAllel Nomenklatur Komitees (<http://www.cypalleles.ki.se/>). Die SNP-Positionen im *CYP2B6*-Gen sind bezogen auf die Wild-Typ cDNA Sequenz *CYP2B6*1* (Yamano et al., 1989). Zur Überprüfung der Genotyp-Frequenzen in Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg-Equilibrium wurde das DeFinetti-Programm verwendet (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Bestimmte Haplotypen bzw. Allele wurden anhand des Genotyps, der Frequenzen und mit Hilfe des PHASE Haplotypen-Programms v.2.0.2 (Stephens, 2001; 2003) erfasst. Des Weiteren wurde das Linkage Disequilibrium mit Hilfe des Haploview-Programms (v.3.32) des HapMap-Konsortiums bestimmt (<http://www.hapmap.org> oder <http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview>). Zusätzlich zur Frequenz jedes SNPs wurde das 95% Konfidenz-Intervall angegeben.

2.2.9 Statistik

Die statistische Berechnung der Unterschiede zweier Gruppen erfolgte an den Mittelwerten aus mindestens drei (Proteinexpression), bei den *CYP2B6*-Aktivitäten aus mindestens zwei Analysen. Für signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurde der Student's t-Test (Gruppen normalverteilt) bzw. Mann-Whitney-Test (Gruppen nicht normalverteilt) verwendet. Die Normalverteilung der Gruppen wurde anhand Kolmogorov und Smirnov berechnet. Als Programme wurden GraphPad Prism 3.0 und GraphPad InStat Version 3.05 verwendet. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen mehreren Gruppen wurden durch

eine *one-way analysis of variance* (ANOVA) mit einem Tukey post-Test durchgeführt. Als statistisch signifikant different wurde ein p-Wert $< 0,05$ definiert.

Bei Korrelationsberechnungen wurde bei normalverteilten Gruppen der Pearson-Korrelationskoeffizient r und bei nicht normalverteilten Gruppen der Rank-Korrelationskoeffizient von Spearman r_s angegeben.

3 ERGEBNISSE

3.1 Strategie zur Entwicklung eines MALDI-TOF MS Assays zur simultanen Genotypisierung von *CYP2B6*

Zur Entwicklung eines Genotypisierungs-Assays für Varianten des *CYP2B6*-Gens wurden folgende Vorüberlegungen hinsichtlich der zu erfüllenden Anforderungen angestellt:

Zum einen sollten alle bis dahin bekannten Varianten des *CYP2B6*-Gens detektiert werden können. Diese umfassten sowohl die in einer Population häufig auftretenden Polymorphismen, als auch seltenere, das Enzym verändernde oder bisher nicht charakterisierte Mutationen. Zum anderen war die von anderen *CYP* Genen, wie zum Beispiel *CYP2D6*, bekannte Problematik der hohen Homologie zu Pseudogenen zu berücksichtigen und zu lösen. Im Fall des *CYP2B6* existiert ein Pseudogen *CYP2B7*, dessen Sequenz zum *CYP2B6*-Gen zu beinahe 90 % homolog ist. Die dritte Anforderung an den Genotypisierungs-Assay bestand darin, dass neu entdeckte, d.h. zur Zeit der Assay-Entwicklung noch nicht bekannte SNPs möglichst gut zu einem späteren Zeitpunkt integriert werden konnten. Dieses Maß an Flexibilität, als auch Sensitivität, Robustheit, Zuverlässigkeit, Reproduzierbarkeit sowie Zeit- und Kosteneffektivität sollten diesen Assay kennzeichnen.

Zur Erfüllung dieser Anforderungen an den *CYP2B6*-SNP-Assay stand am IKP die MALDI-TOF („*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight*“) Massenspektrometrie (MS) als geeignete und innovative Technologie zur Verfügung. Das Prinzip der SNP-Detektion durch MALDI-TOF MS beruht auf der Verlängerung eines Allel-spezifischen Oligonukleotides (Primer), bei der auf den jeweiligen SNP angepasste Nukleotide zugegeben werden, wodurch eine spezifische, im Massenspektrometer unterscheidbare Masse entsteht. Obwohl MS an sich eine sequentielle Methode darstellt, ermöglichten neuere Entwicklungen in der Multiplex-Detektion die Nutzung dieser Technologie als eine effiziente und schnelle Methode für die simultane Bestimmung vieler Genvarianten an großen Probenzahlen. Im Hochdurchsatzverfahren können so mehrere hundert Proben am Tag gemessen werden.

3.1.1 Selektion der *CYP2B6*-Varianten

Im *CYP2B6*-Gen sind zahlreiche Polymorphismen beschrieben, die zum Teil zu einer reduzierten *CYP2B6* Enzymexpression/-funktion führen und sich darüber hinaus in der

Häufigkeit ihres Auftretens zwischen den ethnischen Bevölkerungsgruppen erheblich unterscheiden (siehe Anhang aus CYPAllel Homepage: <http://www.cypalleles.ki.se/>). Folgende SNPs wurden zunächst ausgewählt (Tabelle [3-1]):

Tabelle 3-1: Selektion der CYP2B6-Varianten

c. SNP	g. SNP	Referenz	Allel	Protein	Häufigkeit %	Relevanz
-82T>C	-82T>C	Zukunft et al., 2005	*22	2B6.1	1-5	Verstärkte Transkription
86G>C	86G>C	Klein et al., 2005	*17	R29P	5-10	Häufig bei Afro-Amerikanern
136A>G	136A>G	Lang et al., 2004	*11	M46V	<1	Phänotypisches Null Allel
296G>A	12820G>A	Lang et al., 2004	*12	G99E	<1	Phänotypisches Null Allel
415A>G	13072A>G	Lamba et al., 2003; Klein et al., 2005	*8, *13	K139E	<1	Phänotypisches Null Allel
419G>A	13076G>A	Lang et al., 2004	*14	R140Q	<1	Reduzierte Enzymaktivität
516G>T	15631G>T	Lang et al., 2001; Lamba et al., 2003	*6, *7, *9, *13, *19, *20	Q172H	25-50	Reduzierte Proteinexpression und Enzymaktivität
547G>A	15662G>A	neuer SNP	noch zu definieren	V183I		Nicht belegt
769G>A	18073G>A	Klein et al., 2005	noch zu definieren	D257N		Nicht belegt
785A>G	18053A>G	Lang et al., 2001	*4, *6, *7, *13, *16, *19, *20	K262R	25-50	Reduzierte Proteinexpression und Enzymaktivität
983T>C	21011T>C	Klein et al., 2005	*16, *18	I328T	5-10	Phänotypisches Null Allel
1006C>T	21034C>T	Klein et al., 2005	*19	R336C	1-5	Stark reduzierte Proteinexpression und Enzymaktivität
1172T>A	21388T>A	Lang et al., 2004	*15	I391N	<1	Phänotypisches Null Allel
1282C>A	21498C>A	Klein et al., 2005	*21	P428T	<1	Phänotypisches Null Allel
1459C>T	25505C>T	Lang et al., 2001	*5, *7	R487C	5-10	Reduzierte Proteinexpression und Enzymaktivität

- die zwei häufigsten Nukleotid- [Aminosäure] Austausch 516G>T [Q172H] und 785A<G [K262R] in Exon 4 und Exon 5
- die Variante 1459C>T [R487C] in Exon 9, welche mit einer geringeren Proteinexpression in humaner Leber assoziiert ist (Lang et al., 2001)
- die selteneren SNPs 136A>G [M46V], 296G>A [G99E], 415A>G [K139E] und 1172T>A [I391N] wurden gewählt, da sie als sogenannte phänotypische Null-Allele definiert waren, also Varianten, die keine Enzymfunktion mehr aufweisen
- des Weiteren wurde der 419G>A [R140Q] SNP aufgenommen, der die Proteinexpression und die Enzymaktivität ebenfalls stark reduzierend beeinflusst (Lang et al., 2004)

- die folgenden Aminosäure-Varianten, die für die ethnischen Gruppen von Afro-Amerikanern und Ghanesen beschrieben wurden und bei rekombinanter Expression nur noch wenig oder nicht messbares Restprotein aufzeigten, wurden ebenfalls in die SNP-Auswahl mit eingeschlossen: 86G>C [R29T], 769G>A [D257N], 983T>C [I328T], 1006C>T [R336C] und 12852C>A [P428T] (Klein et al., 2005)
- ein neu entdeckter und bis dato nicht publizierter SNP 547G>A [V183I], welcher bei einem Sequenzier-Projekt einer Ghana-Population gefunden wurde (IKP)
- sowie ein im Promotor lokalisierter SNP (-82T>C) wurden ebenfalls in die Assay-Entwicklung mit eingeschlossen (Blievernicht et al., 2007). Von diesem konnte gezeigt werden, dass er eine Verstärkung der Transkription durch eine Verschiebung des Transkriptionsstarts verursacht, was in einer erhöhten Proteinexpression resultiert (Zukunft et al., 2005).

Im Laufe der Arbeiten ergaben sich verschiedene Änderungen, die die MS-Technik wie auch die Relevanz der SNPs betrafen. Hier kam der Vorteil des Sequenom Systems (Verlängerung des Oligonukleotides nur um den jeweiligen SNP) gegenüber dem Bruker Daltonik System (siehe Material und Methoden Kapitel 2.2.2.3) zum Tragen. In diesem Sequenom System wurde der Assay um einen weiteren Promotor SNP (-750T>C), einen SNP in Intron 3 (genomische Position im *CYP2B6*-Gen: 15582C>T), sowie die neu identifizierten Aminosäure-Varianten 593T>C [M198T] und 1132C>T [R378stop] auf finale 19 SNPs erweitert, welche später noch ausführlicher behandelt werden.

3.1.2 MALDI-TOF MS Assay-Entwicklung

Für die spezifische Amplifikation einzelner Gen-Fragmente, die die zu untersuchenden SNP-Regionen enthielten, war es entscheidend, dass spezifische Primersequenzen ausgewählt wurden, die zwischen *CYP2B6* und seinem sehr homologen Pseudogen *CYP2B7* unterscheiden. Um „falsche“, d.h. unspezifische, Amplifikationen zu vermeiden, wurden die PCR-Primerpaare in Regionen mit geringer Homologie zu *CYP2B7* (mindestens mehr als zwei Nukleotiddifferenzen im 3'-Bereich) gewählt. Solche spezifischen Sequenzbereiche wurden vor allem in den Introns und den Exon/Intron - Übergängen gefunden (Abb. [3-1]).

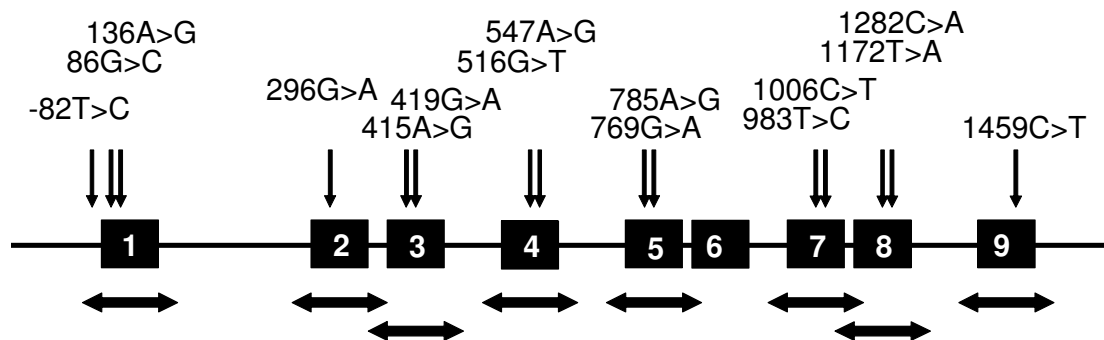


Abbildung 3-1: Zusammenstellung der selektierten SNPs, deren Lokation in den Exons des CYP2B6 und die Lage der Primer für die Präamplifikation

Des Weiteren wurden Parameter wie Schmelztemperatur, Salzkonzentration bzw. GC-Gehalt, sowie die Vermeidung von Dimer- und „Hairpinloop“-Bildung zwischen den Primern berücksichtigt. Mittels Agarose-Gelelektrophorese wurde festgestellt, dass sie in verschiedenen Kombinationen bis hin zu einer Multiplex-Amplifikation für alle acht Amplikons (Exons 1-5 und 7-9; in Exon 6 war keine funktionell relevante Variante identifiziert) in einem Reaktionsgefäß geeignet sind.

Da allerdings nicht alle darauffolgenden „Extension“-Reaktionen miteinander kompatibel waren, wurden für die Assays des Bruker Systems weniger PCR-Fragmente pro Reaktion amplifiziert (siehe auch Material und Methoden Kapitel 2.2.2.3). Die Vereinbarkeit der „Extension“-Primer ist durch ihre Sequenz, molekulare Masse und ihre Hybridisierungstemperatur stark eingeschränkt. Die einzelnen „Extension“-Primer wurden aus diesem Grund im Hinblick auf Sequenzlänge und Konzentration optimiert und mit Positiv-Kontrollen für alle drei Genotypen per SNP - Wildtyp, heterozygot und homozygot mutant - getestet. Als Kontrolle wurde entweder DNA aus bereits genotypisierten Proben verwendet oder mit Hilfe von Klonierung bzw. Touch-Down-PCR rekombinant hergestellt (siehe Kapitel 2.2.3).

Die finale Kombination der Primerpaare, die unter den oben genannten Bedingungen die besten Ergebnisse lieferten, führte schließlich im Bruker Daltonik System zu fünf Multiplex Assays (Tab. [3-2;A]).

Tabelle 3-2: Tabelle der Multiplex Assays des Bruker Daltonik Systems (15 SNPs; A) sowie des Sequenom Systems (19 SNPs; B)

A		B	
Assay 1	415A<G	Assay 1	Assay 2
	516G>T	-82T>C	-750T>C
	547G>A	136A>G	86G>C
	1282C>A	296G>A	516G>T
Assay 2	-82T>C	415A>G	593T>C
	419G>A	419G>A	785A>G
	785A>G	547G>A	769A>G
Assay 3	136A>G	I3-15582T>C	983T>C
	296G>A	1006C>T	1132T>C
	1172T>A	1172T>A	
Assay 4	769G>A	1282C>A	
	983T>C	1459C>T	
	1006C>T		
Assay 5	86G>C		
	1459C>T		

Im Laufe der Arbeit wurde das Bruker Daltonik System durch ein neues MALDI-TOF MS System der Firma Sequenom ersetzt. Der Unterschied zu dem vorher verwendeten hME („homogenous MassExtend“)-Assay besteht darin, dass alle „Extension“-Reaktionen bereits nach der Verlängerung um das jeweilige Nukleotid abbrechen („single base extension“, SBE). Dadurch werden größere Massenunterschiede und damit eine bessere Sensitivität und Spezifität erzielt (Kapitel 2.2.2.3). Außerdem ist mittels dieses als iPLEX-Assay bezeichneten Verfahrens ein höheres „Multiplexen“ möglich. Die vorangehende PCR-Amplifikation der spezifischen *CYP2B6*-Genabschnitte erfolgte nach dem gleichen Prinzip und mit den gleichen Primern wie im Bruker-Assay. Die optimierte Kombination der Primer zur *CYP2B6* Genotypisierung resultierte im Sequenom System in zwei Multiplex Assays (Tab. [3-2;B]). Diese enthielten die 15 SNPs aus dem Bruker Daltonik-Assay, sowie die vier zusätzlichen SNP-Positionen, die erst im Laufe der Arbeit als interessant erschienen (Tab. [3-2];B).

3.1.3 MALDI-TOF MS Assay-Validierung

Zur Validierung des *CYP2B6* MALDI-TOF MS Genotypisierungs-Assays wurde die genomische DNA von 114 Individuen kaukasischen Ursprungs (IKP148-Studie) analysiert, für die bereits mit anderen Methoden wie TaqMan, RFLP, MicroArray und/oder Sequenzierung *CYP2B6*-Genotypisierungsdaten generiert worden waren. In nur neun Fällen (0,4 %) unterschied sich das MALDI-TOF MS Ergebnis von diesen Genotypen. Eine retrospektive Analyse ergab, dass für alle diese neun diskrepanten Proben PCR-RFLP Assays als Genotypisierungsmethode verwendet worden waren, bei denen die Fragment-Profile nicht eindeutig bestimmbar bzw. schwierig zu interpretieren waren. Nachdem eine Sequenzierung dieser Bereiche durchgeführt wurde, bestätigte sich in allen neun Fällen das MALDI-TOF MS Ergebnis. Als zusätzliche Validierungstests wurden ausgewählte Proben unterschiedlicher Genotypen mehrfach (3-6fach) bestimmt.

In dieser umfangreichen Validierung erwiesen sich die neu entwickelten MALDI-TOF MS Assays als spezifisch, zuverlässig und reproduzierbar.

3.1.4 Genotypisierung einer Leberbank

Nach Abschluss der Validierung wurde dann mit der MALDI-TOF MS Methode die komplette Leberbank (n=287) genotypisiert. In Abb. [3-2] sind Beispiele für die vier häufigsten Varianten die relativen Intensitäten der Massensignale für jede Position entsprechend ihrer beiden Produkte gezeigt. Diese Darstellung verdeutlicht die Ermittlung des Genotyps anhand der beiden vorhandenen Allele an jeder Position.

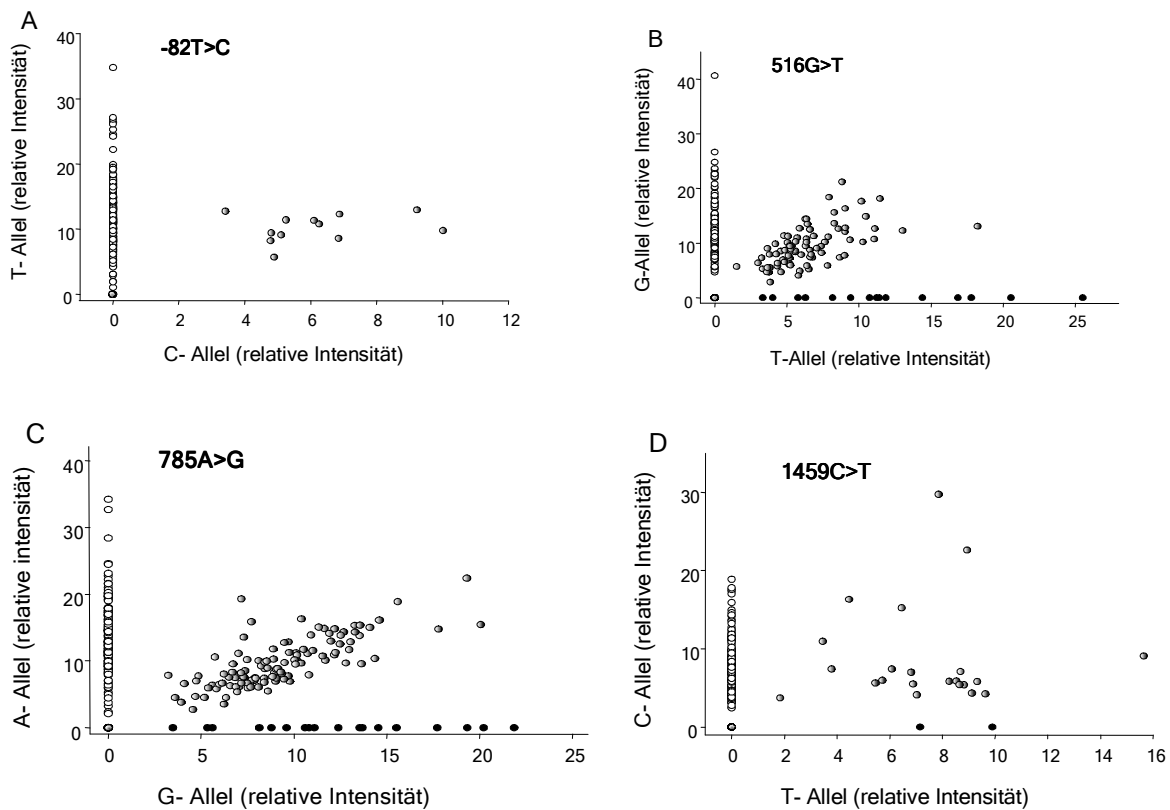


Abbildung 3-2: Genotyp-Bestimmung für die häufigsten CYP2B6 Polymorphismen. Für jeden analysierten SNP wurden die relativen Intensitäten beider Allel-Signale angegeben (GENOTOOL Software) und gegeneinander aufgetragen. Die Punkte entlang der x-Achse zeigen die homozygot mutierten Fälle, die der y-Achse die Wildtyp-Proben, die Heterozygoten finden sich auf der Diagonalen. Die Kontrollen (ohne DNA) zeigten nur ein geringes bzw. kein detektierbares Signal und kommen um den Null-Punkt zu liegen

Es sind drei Gruppen klar definierbar, wobei sich die homozygoten Fälle Wild-Typ (wt/wt) und Mutant (mut/mut) entlang der x bzw. der y-Achse finden lassen, die heterozygoten (wt/mut) dazwischen. Die Kontaminationskontrollen wurden stets mit einer relativen Signalintensität nahe „0“ angezeigt.

Im Folgenden sind außerdem typische MALDI-TOF Massenspektren für einzelne CYP2B6 Genotypen gezeigt, die die Spezifität und Sensitivität der Detektion der SNPs verdeutlichen (Abb. [3-3]).

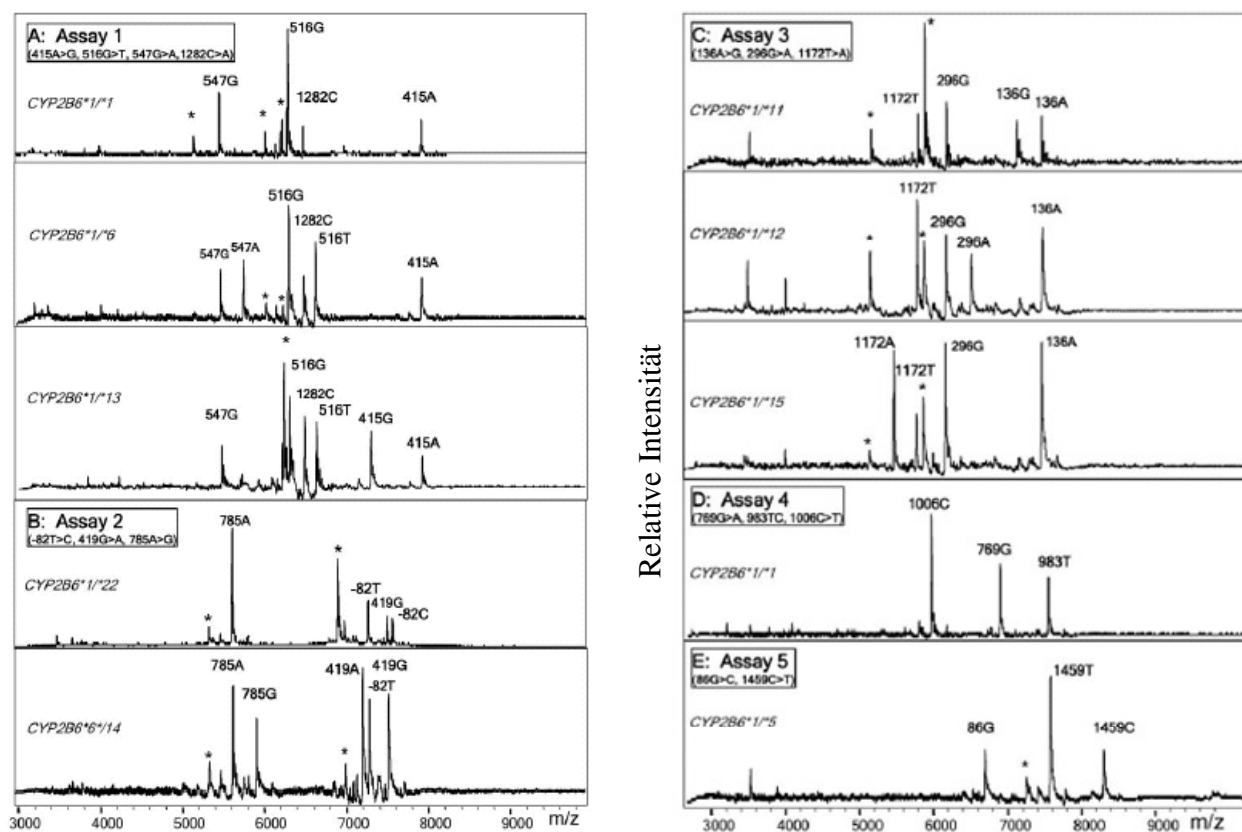


Abbildung 3-3: MALDI-TOF MS Spektren für die fünf Multiplex-Assays (A-E) mit den jeweils detektierten CYP2B6 Allelen. Nicht verlängerte Primer sind mit einem Stern markiert und jedes Produkt ist mit dem entsprechenden Nukleotid gekennzeichnet. Der Genotyp jeder Probe ist angegeben

3.2 Umfassende Genotyp-Phänotyp Analyse von CYP2B6 an einer Leberbank

Für die in dieser Arbeit verwendete IKP148-Studie (Leberbank) war jeweils eine ausführliche klinische Dokumentation der Patienten, die sich einer Leber-Operation unterzogen hatten, verfügbar. Diese umfasste Alter, Geschlecht, Medikation, Alkohol-Konsum und Rauchverhalten. Proben von Patienten mit Krankheiten wie Hepatitis, Alkoholismus oder Zirrhose wurden von der Analyse ausgeschlossen. Die bereits an 114 Proben generierten mikrosomalen CYP2B6 Expressions- sowie Aktivitätsdaten wurden auf 287 Proben erhöht und damit für die Leberbank komplettiert. Die Enzym-Aktivität wurde mittels der Umsetzung von Bupropion (Antidepressivum, Nikotinentwöhnungsmittel) zu Hydroxy-Bupropion als spezifischem Substrat für CYP2B6 bestimmt.

Die kompletten Daten zu Genotyp, Proteinexpression und Enzym-Aktivität waren nach Abschluss der Arbeit für 235 Proben verfügbar. Dieser Datensatz ermöglichte nun eine umfassende Auswertung aller Ergebnisse und Dokumentationen.

Die erwartungsgemäße Korrelation zwischen dem CYP2B6 Proteingehalt mit der Bupropion-Hydroxylierungs-Aktivität ergab eine statistische Signifikanz ($P < 0,0001$; Spearman Rank Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten $r_s = 0,59$; 49,2 % - 66,6 %; siehe Abb. [3-4]).

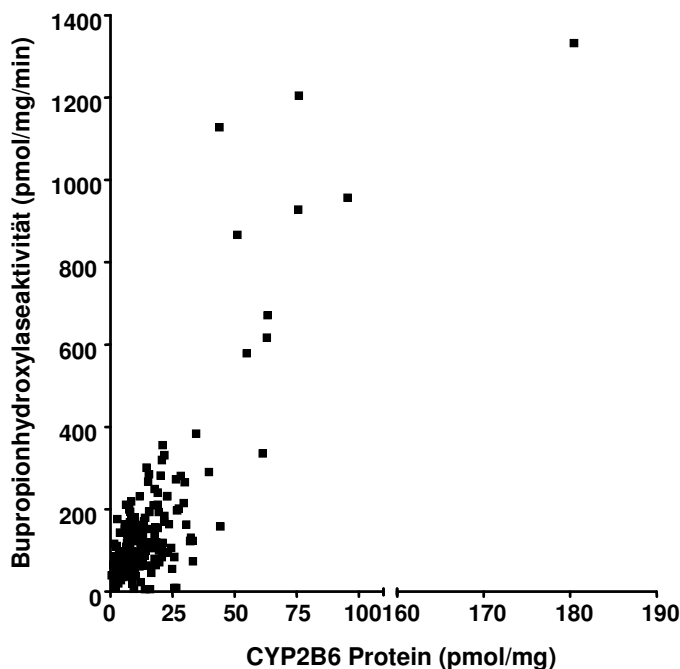


Abbildung 3-4: Korrelation zwischen der CYP2B6-Proteinexpression und der Bupropionhydroxylaseaktivität humaner Lebermikrosomen ($n=235$)

Der Proteingehalt zeigte eine 360-fache Variabilität in der CYP2B6 Expression von 0,5 bis 180 pmol/mg. Entsprechend konnte auf Aktivitätsebene eine 245-fache interindividuelle Variabilität von 5,6 bis 1370 pmol/mg/min in der Bupropion-Hydroxylierung gezeigt werden.

3.2.1 Einfluss von nichtgenetischen Faktoren auf die Gesamtpopulation (Geschlecht, Alter, Medikamente, Nikotin)

Biologische Faktoren (Alter, Geschlecht) und Umweltfaktoren können als sogenannte „confounding factors“ die Expression des Proteins bzw. sein Enzymverhalten und damit die Prädiktivität eines Genotyps erheblich beeinflussen. Es ist daher wichtig zu wissen, welche

Faktoren die Funktion/Expression eines Proteins verändern. Im Folgenden wurde für alle 235 Proben, für die alle Daten zur CYP2B6-Expression und -Aktivität zur Verfügung standen, Geschlechts- und Altersabhängigkeit, Rauch- und Alkoholverhalten sowie der Einfluss von Medikation untersucht.

Bei der Geschlechtsanalyse war die mittlere CYP2B6 Expression mit 8,6 pmol/mg Protein in Männern (n=118) nicht signifikant different von der der Frauen (n=117) mit 9,7 pmol/mg mikrosomales Protein (P=0,08). Um den Einfluss von Medikamenten (die Frauen in dieser Population nahmen wesentlich mehr Medikamente ein) auf die Proteinexpression auszuschließen, wurde eine statistische Analyse einer Subgruppe von Proben (Kontrollen; n=71) durchgeführt, bei denen die Patienten keine präoperativen Medikamente einnahmen. Diese Analyse ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den Geschlechtern (P=0,75 bei 37 Männern und 34 Frauen, siehe Abb. [3-5]).

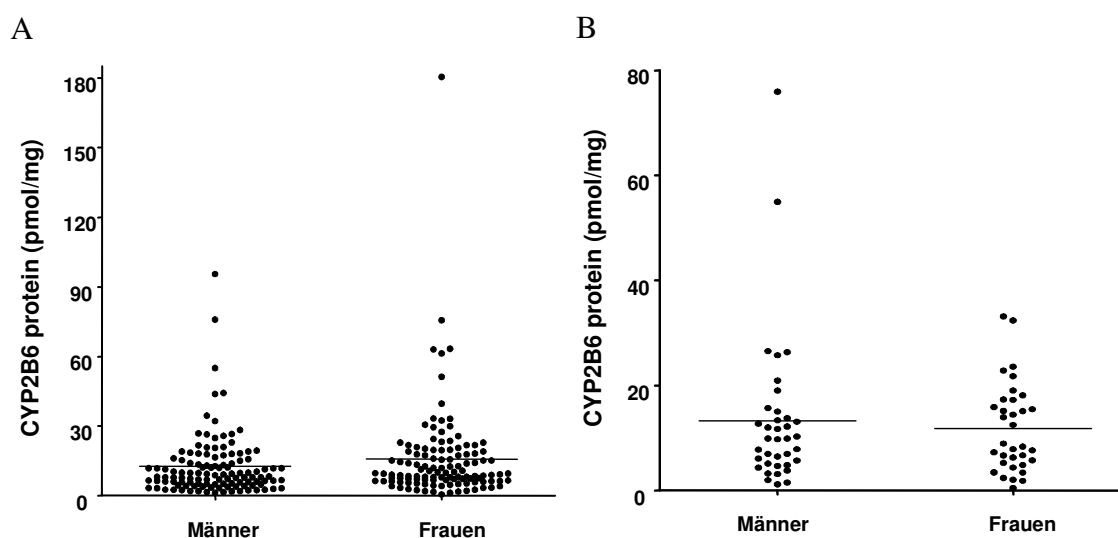


Abbildung 3-5: Analyse der geschlechtsabhängigen CYP2B6-Proteinexpression in humanen Lebermikrosomen für die gesamte Population (A) als auch für Individuen ohne Arzneimittel-Exposition (B)

Die Bestimmung der geschlechtsabhängigen Bupropion-Hydroxylierungs-Aktivität von CYP2B6 ergab ebenfalls keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Männern und Frauen sowohl in der Gesamtgruppe (medianer Mittelwert: Männer: 92,7 pmol/mg/min; Frauen: 97,2 pmol/mg/min; P=0,30) als auch in der Subgruppe ohne Medikation (medianer Mittelwert: 92,7 pmol/mg/min; Frauen: 97,1 pmol/mg/min; P=0,93; Abb. [3-6]).

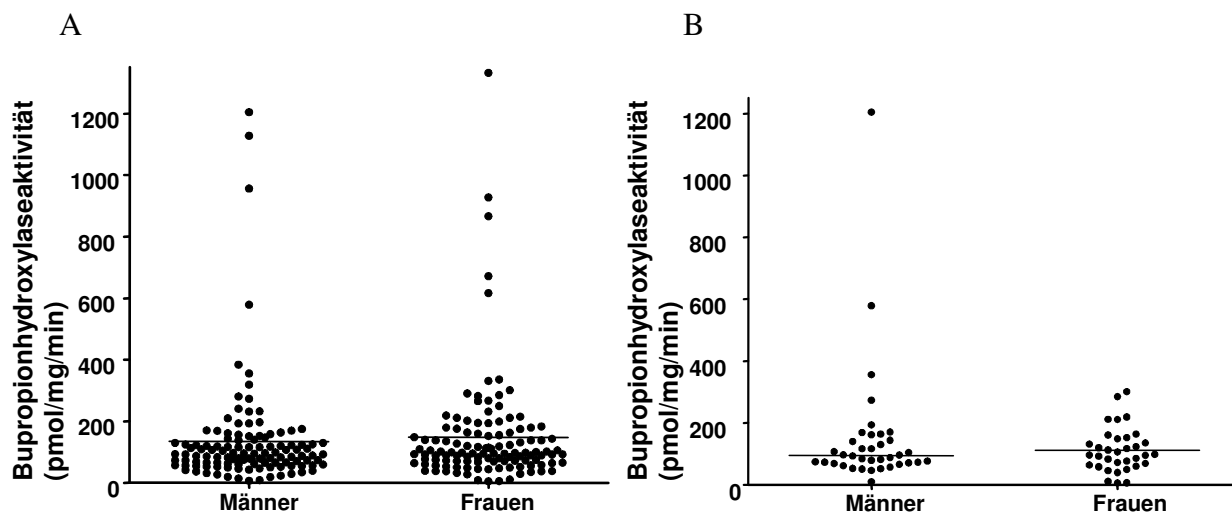


Abbildung 3-6: Analyse der geschlechtsabhängigen CYP2B6-Bupropionhydroxylaseaktivität in humanen Lebermikrosomen für die gesamte Population (A) als auch für Kontrollen (B)

Eine Untersuchung der Altersabhängigkeit der CYP2B6 Funktion/Expression beruhte auf einer insgesamt vorhandenen Altersspanne von 3 bis 85 Jahren, wobei ältere Personen (>50 Jahre) in dieser Population deutlich häufiger vertreten waren (n=183). Der Zusammenhang zwischen Alter und CYP2B6 Expression/Funktion wurde mittels Korrelationsanalyse untersucht. Da die Daten nicht normalverteilt waren, wurde der Spearman-Rank Korrelationskoeffizient berechnet. Zwischen dem Alter und dem Proteingehalt bzw. der Bupropionhydroxylaseaktivität bestand bei der Gesamtgruppe (P=0,96 bzw. P=0,48) keine signifikante Korrelation (Abb. [3-7]). Wurden nur Proben der Kontrollgruppe analysiert, war ebenso kein Alterseinfluss nachzuweisen (Proteingehalt: r: -0,2/P=0,08; Bupropionhydroxylaseaktivität: r: -0,05/P=0,67).

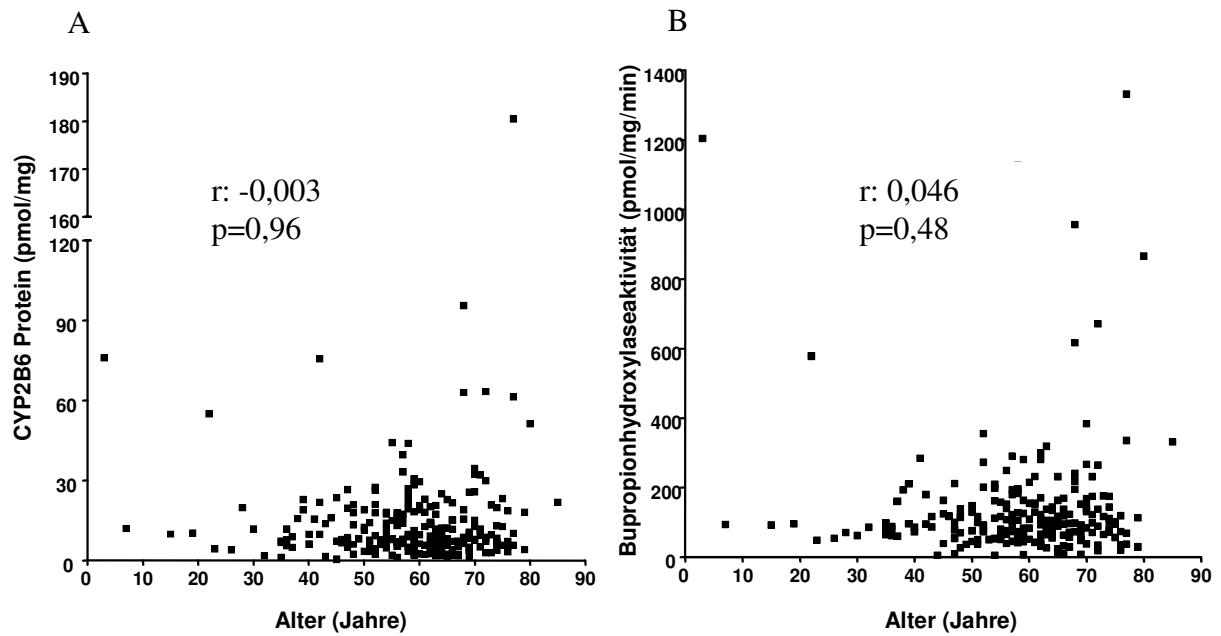


Abbildung 3-7: Analyse der altersabhängigen CYP2B6-Expression (A) und Bupropionhydroxylaseaktivität (B) bei Patienten

Als Umweltfaktoren standen Daten zum Alkoholkonsum (mind. 1 alkoholisches Getränk pro Tag) oder Zigarettenkonsum (mehr als 3 Zigaretten pro Tag) und Kaffeegenuss bzw. das Trinken von Grapefruitsaft (wie bei CYP3A4 beschrieben; Lin et al., 2005) zur Verfügung. Ein Vergleich der Mediane (ANOVA) ergab keine veränderte CYP2B6-Expression und Bupropionhydroxylaseaktivität im Hinblick auf diese Kriterien und die Kontrollgruppe (Hoffmann et al., 2008).

3.2.2 Frequenz-Analyse der CYP2B6 Varianten

Die Allel- und Genotyp-Frequenzen der analysierten kaukasischen Population sind in Tabelle [3-3] zusammengefasst.

Tabelle 3-3: CYP2B6 SNP- und Genotyp- Frequenzen in den Proben der Leberbank. Die Position der SNPs erfolgte nach der cDNA Nomenklatur (c.) oder der genomischen DNA (g.). WT= Wildtyp, MT= Mutante, HWE= Hardy-Weinberg-Equilibrium, n.a.= nicht anwendbar

c. SNP	g. SNP	SNP Frequenz,			HWE, χ^2 (p-Wert)	
		% (95% CI)	WT / WT, % (n)	WT / MT, %		MT / MT, %
-750T>C	-750T>C	59,8 (54,1 - 65,4)	12,5 (36)	55,4 (n=159)	32,1 (n=92)	6,62 (0,01)
-82T>C	-82T>C	2,1 (0,4 - 3,7)	95,8 (277)	4,2 (12)	0,0	0,13 (0,72)
86G>C	86G>C	0,0	100,0 (291)	0,0	0,0	n.a.
136A>G	136A>G	0,3 (0,0 - 1,0)	99,3 (287)	0,7 (2)	0,0	0,004 (0,95)
296G>A	12820G>A	0,2 (0,0 - 0,7)	99,7 (288)	0,3 (1)	0,0	0,001 (0,98)
415A>G	13072A>G	0,5 (0,0 - 1,3)	99,0 (286)	1,0 (3)	0,0	0,008 (0,93)
419G>A	13076G>A	0,5 (0,0 - 1,3)	99,0 (286)	1,0 (3)	0,0	0,008 (0,93)
485-18C>T	15582C>T	31,1 (25,7 - 36,4)	47,3 (135)	43,2 (123)	9,5 (27)	0,02 (0,89)
516G>T	15631G>T	25,4 (20,4 - 30,4)	55,3 (161)	38,5 (112)	6,2 (18)	0,06 (0,8)
547G>A	15662G>A	0,7 (0,0 - 1,69)	98,6 (286)	1,4 (4)	0,0	0,01 (0,91)
593T>C	15708T>C	0,0	100,0 (291)	0,0	0,0	n.a.
769G>A	18073G>A	0,0	100,0 (291)	0,0	0,0	n.a.
785A>G	18053A>G	27,8 (22,6 - 32,9)	51,7 (150)	41,0 (119)	7,2 (21)	0,16 (0,69)
983T>C	21011T>C	0,0	100,0 (291)	0,0	0,0	n.a.
1006C>T	21034C>T	0,0	100,0 (289)	0,0	0,0	n.a.
1132C>T	21348C>T	0,0	100,0 (283)	0,0	0,0	n.a.
1172T>A	21388T>A	0,7 (0,0 - 1,69)	98,6 (285)	1,4 (4)	0,0	0,01 (0,91)
1282C>A	21498C>A	0,0	100,0 (290)	0,0	0,0	n.a.
1459C>T	25505C>T	9,8 (6,4 - 13,2)	81,1 (236)	18,2 (53)	0,7 (2)	0,3 (0,6)

Mit Ausnahme des Promotor SNPs -750T>C lagen alle Mutationsfrequenzen im Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE). Zur Überprüfung der Genotypisierungs-Ergebnisse der Position -750T>C wurden einige Proben stichprobenartig sequenziert. Die Sequenzierung bestätigte jeweils den über MALDI-TOF MS bestimmten Genotyp. Da die Abweichung vom HWE nicht sehr stark war und außerdem bei Anwendung der statistischen Korrektur für multiples Testen (Bonferroni) keine signifikante Abweichung mehr vorlag, wurde diesem Befund keine weitere Aufmerksamkeit geschenkt.

Sieben Varianten (86C [29T], 593C [198T], 769A [257N], 983C [328T], 1006T [336C], 1132T [378X], 1282A [428T]), die bisher nur in Personen afrikanischen oder afrikanisch-amerikanischen Ursprungs beobachtet worden waren, wurden in diesem kaukasischen Proben-Set erwartungsgemäß nicht detektiert. Die häufigsten Varianten waren der Promotor SNP -750C (59,8 %), 15582T in Intron 3 (31,1 %), die Proteinvarianten 262R (785G; 27,8 %), 172H (516T; 25,4 %) und 487C (1459T; 9,8 %). Der SNP -82C hatte eine Frequenz von

2,1 %. Die Varianten 136G [46V], 296A [99E], 415G [139E], 419A [140Q], 547A [183I] und 1172A [391N] wurden mit einer Frequenz unter 1 % beobachtet.

3.2.3 *CYP2B6* Haplotypen

SNPs oder Mutationen können nicht nur allein für eine veränderte Enzymfunktion oder einen vollständigen Funktionsverlust verantwortlich sein, sondern auch zu sogenannten Haplotypen zusammengeslossen sein. Die Haplotyp-Struktur auf einem Chromosomen-Strang kann manchmal der bestimmende Faktor für phänotypische Konsequenzen sein, wenn einzelne Varianten den kausalen Zusammenhang zu einer komplexen Krankheit nicht vollständig herstellen können.

Die Bestimmung solcher SNP-Kombinationen ist deshalb sinnvoll bzw. notwendig, um die Prädiktivität von Phänotyp/Enzymfunktion zu erhöhen.

Hinsichtlich der Definitionen von Haplotypen gibt es bei *CYP2B6* noch einige Unstimmigkeiten (siehe Anhang aus der CYPAllele Homepage: <http://www.cypalleles.ki.se>). Es seien hier zwei SNPs genannt, 516G>T und 785A>G, die in einem heterozygoten Fall entweder als **1/*6*, also einem Allel zugehörig oder als **4/*9*, jeweils auf einem Chromosomenstrang einzeln vorliegend interpretiert werden können. Weitere solche Genotypen sind **1/*13* (**6/*8*) als auch der **1G/*6A* (**1/*6C*) Haplotyp, der den Promotor SNP -750T>C beinhaltet. Ein weiteres wichtiges Beispiel betrifft die Zuordnung von 516G>T, 785A>G und 1459C>T zu den *CYP2B6*1/*7*- oder *CYP2B6*5/*6*-Haplotypen. Beide Kombinationen wurden von Lang et al., 2001 und Hesse et al., 2004 beschrieben (siehe auch Kapitel 1.2), jedoch konnte bisher nie eindeutig eine Haplotyp-Zuordnung für alle 3 SNPs getroffen werden.

3.2.3.1 “*in silico* haplotyping”

Durch eine computergestützte, mit den unter Kapitel 3.2.2 gewonnenen Genotypdaten durchgeführte Haplotyp-Analyse dieses Proben-Sets (PHASE Programm 2.0, siehe Material und Methoden Kapitel 2.2.5) ließen sich Haplotypen ableiten, die mit bereits definierten Allelen weitgehend übereinstimmten (Abb. [3-8] und siehe Anhang; <http://www.cypalleles.ki.se>). Die am häufigsten vorkommenden Haplotypen (HT) waren in dieser Studie eine SNP-Kombination aus -750T>C und Intron3 15582C>T (HT11) mit einer statistischen Häufigkeit von 30% im Wildtyp-Kontext (der 19 analysierten SNPs). Weitere Haplotypen, der Häufigkeit nach geordnet, waren HT1 (wt-Allel **1*; 27,8 %) und der HT9 (**6*

Allel; 23,5 %). Andere *CYP2B6* Haplotypen waren HT2 (*5; 9,3 %), HT16 (*22; 2,1 %), HT3 (*4; 1,5 %), HT5 (*14; 0,5 %), und HT6 und 7 (*11 und *12; beide 0,2 %). Die Allele *17, *18, *19 und *21 wurden in der IKP148-Studie nicht beobachtet, was auf die kaukasische Ethnizität der hier untersuchten Proben zurückzuführen ist.

Allel	Haplotyp	-750T>C	-82T>C	136A>G	296A>G	415A<G	419G>A	13-15582C>T	516G>T	547G>A	785A<G	1172T>A	1459C>T	Häufigkeit (%)
	11	■						■						30,0
*1	1													27,8
*6C	9	■							■		■			23,5
*5	2												■	9,3
*1G	8	■												2,0
*22	16	■	■											2,0
*4	3													1,5
	12	■						■				■		0,7
	13	■												0,7
	4													0,5
*14	5													0,5
	10	■												0,5
	14	■				■			■		■			0,5
*12	6				■									0,2
*11	7			■										0,2
	15	■		■										0,2

Abbildung 3-8: Haplotypanalyse von 287 kaukasischen Leberproben mit prozentualen Häufigkeiten >0,2 % (PHASE Programm). Es sind nur die SNPs gezeigt, die in der IKP148-Studie auftraten. Die Sortierung erfolgte nach Häufigkeit

Die hier benannten SNPs liegen jedoch nicht immer im gleichen Haplotyp, d.h. nicht notwendigerweise auf dem gleichen Chromosom. Sie können auch unabhängig voneinander auftreten, also innerhalb einer Population in einer statistisch nicht zu erwartenden Kombination und Häufigkeit. Dieses Phänomen nennt man Linkage Disequilibrium (LD) oder auch Kopplungsungleichgewicht. Das internationale HapMap Projekt (<http://www.hapmap.org>) stellt für solche Studien ein Programm (Haploview; siehe Material und Methoden Kapitel 2.2.8) zur Verfügung, in welchem die Daten dieses Konsortiums sowie anderer SNP-Datenbanken enthalten sind, sowie auch Analysen mit eigenen Daten durchgeführt werden können. Für die hier verwendete Studie wurde nun mit diesem Programm die nicht-zufällige Kopplung anhand der SNPs (n=12), die in der Population mindestens einmal vorkamen, untersucht. Das Ergebnis ist in Abb. [3-9] als LD-Plot dargestellt.

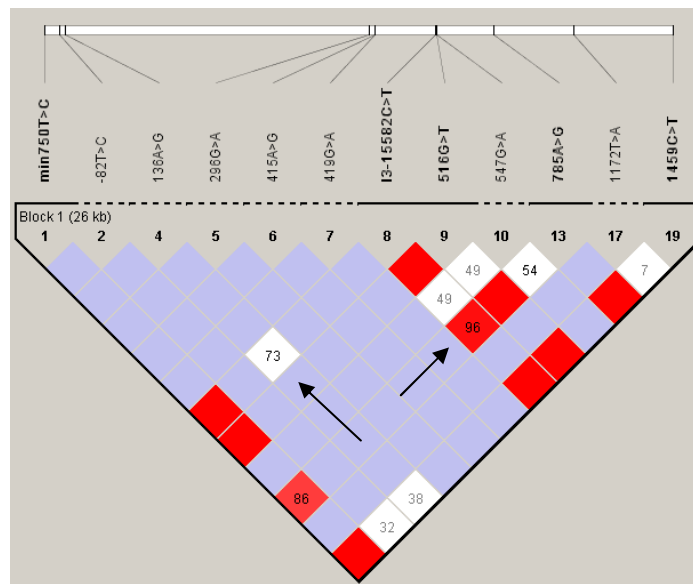


Abbildung 3-9: Linkage Disequilibrium (LD) von 287 humanen Leberproben (Haploview 3.32). Die Pfeile symbolisieren Beispiele, die im Text näher erläutert werden.

Der Triangel-Plot wurde so konstruiert, dass jedes SNP-Paar entlang der Linien im 45° Winkel zur Horizontal-Linie angeordnet ist. Die Farbcodierung entspricht dem Grad des LD (rot>blau>weiß). Die schwarzen Zahlen benennen den D'-Wert, ein weiterer restriktiver Algorithmus, der zusätzlich zum LD einen Richtwert der Kopplung angibt (D'=1 bedeutet einen Grad an Kopplung von 100 %). Die weißen Felder mit grauen Zahlen deuten einen D'-Wert an, der unter 50 % Kopplung liegt.

Es lässt sich anhand des Plots eine Kopplung zum Beispiel zwischen folgenden *CYP2B6* SNP-Positionen ableiten: I3-15582C>T mit 785A>G mit einer 100 %-igen Kopplung (rote Unterlegung). Oder 136A>G mit I3-15582C>T mit einem eher geringen D'-Wert (weiße Unterlegung) und 73 %-iger Kopplung (siehe Pfeile in Abb. [3-9]). Aus diesen Daten lassen sich ebenfalls bereits definierte Allele ableiten: *6A, *6C, *5B und *7B. Neben den bekannten *5 und *6 Allelen wurde hier auch das *7B Allel berechnet, was jedoch bei der PHASE-Analyse mit einer weitaus geringeren Frequenz (0,02 %) erhalten wurde.

Eine genaue Bestimmung von solchen Haplotypen bzw. Kopplungsereignissen erlaubt in Korrelations-Analysen die Identifikation spezifischer Marker-SNPs (tag-SNPs), wodurch die Anzahl der in Zukunft zu testenden SNPs verringert werden kann.

3.2.3.2 „molecular haplotyping“

Die Schwierigkeit mit der „in silico“- Haplotypisierung besteht darin, dass es sich trotz der arithmetischen Kontrollen und Wahrscheinlichkeitsberechnungen um eine theoretische Analyse handelt, die nicht den tatsächlichen Ist-Zustand einer DNA-Probe erfassen kann. Zur molekularen Haplotyp-Analyse der verschiedenen Allel-Kombinationen des *CYP2B6* Gens wurde deshalb versucht, einen Assay auf der Basis der MALDI-TOF MS zu etablieren. Es wurden die Proben der IKP148-Studie verwendet, deren Allel-Kombinationen aufgrund ihrer Heterozygotität nicht eindeutig geklärt waren. Eine solche Methode war bereits 2003 von Ding und Cantor entwickelt worden. Sie beruht auf der Basis der Verdünnung der DNA auf ein einziges DNA-Molekül, in welchem dann die jeweilige SNP-Kombination durch die MALDI-TOF MS bestimmt wird. Mit ihrer Hilfe sollte es möglich sein, SNPs in Abständen von bis zu 24kb zu analysieren (Ding und Cantor, 2003).

In dem unter 3.2.3 erwähnten Beispiel der *5/*6 bzw. *1/*7- Allelzuordnung wären zwei „homozygote“ Massenspektren, entsprechend für jeden Chromosomenstrang, zu erwarten (Abb. [3-10]).

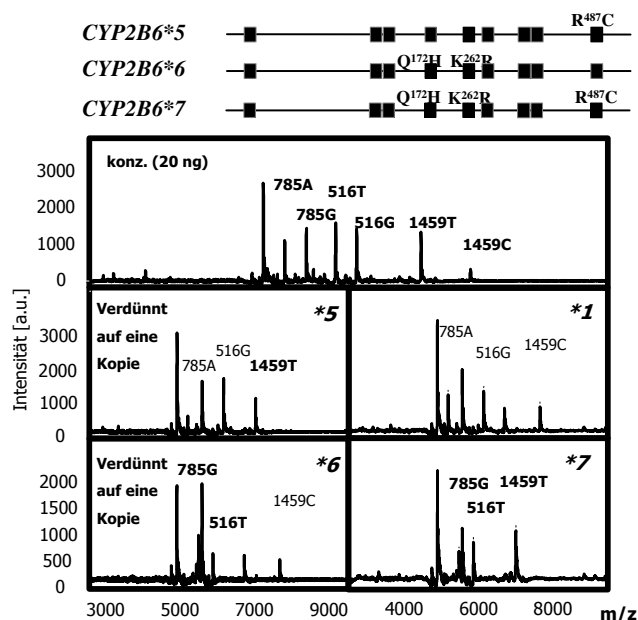


Abbildung 3-10: Beispiel der Massenspektren aus einer heterozygoten Probe für den *5/*6 Haplotyp (links) sowie für den *1/*7 Haplotyp (rechts). Die fett geschriebenen Zahlen bezeichnen die mutierte Form eines SNPs, die „normal“ geschriebenen die Wildtyp-Form

Für die Entwicklung der verschiedenen *CYP2B6* Haplotyp-Assays wurden viele Parameter evaluiert. Zum einen sind verschiedene Verdünnungen der DNA-Probe vonnöten, da sich aufgrund der biologischen Diversität bzw. Ungenauigkeit der Konzentrationsbestimmung (Verdünnungsreihe) nicht genau eine DNA-Kopie aus einer bestimmten Ausgangskonzentration vorherberechnen lässt. Die Integrität (Unversehrtheit) der DNA bei der Isolierung ist für diese Art der Haplotypenbestimmung ein wichtiger Parameter, der den Erfolg erheblich beeinflusst. Die Verdünnung bei einer Ausgangskonzentration von z.B. 100ng/µl wurde in ca. vier Verdünnungsschritten von 1:20, 1:20, 1:20, 1:12,5 zu 3 pg/µl hergestellt, was nach theoretischer Berechnung ungefähr einem einzelnen DNA-Molekül entspricht (Ding und Cantor 2003). Der letzte Verdünnungsschritt wurde für jede Probe zu 1:10 und 1:5 variiert bzw. zugunsten des nächsthöheren Verdünnungsschrittes weggelassen. Mit dieser Technik ließ sich diejenige Verdünnung ermitteln, bei dem die zu untersuchenden SNPs als heterozygot bestimmt wurden, also wieder zwei oder mehr DNA-Kopien in der Probe vorhanden waren. Anhand dieser Experimente wurde jedoch festgestellt, dass durch die Viskosität der DNA und der biologischen Randparameter (Reinheit, Puffer) die geeignete Verdünnungsstufe nicht vorhergesagt werden konnte.

Da die Qualität der DNA einen großen Einfluss auf die Ergebnisse haben kann, wurden verschiedene Isolate verglichen. Zum einen war DNA aus Blut gewonnen worden, da dieses im Allgemeinen besser verfügbar war, sowie aus korrespondierendem Lebergewebe. Die Kontrolle der Integrität im Agarose-Gel ergab zwar eine stärkere Fragmentierung der aus Blut isolierten DNA. Für die Genotypisierungseffizienz war jedoch kein deutlicher Unterschied nachweisbar.

Für die Analyse wurden für jeden SNP beide Genotypisierungs-Plattformen verwendet und verglichen (Kapitel 2.2.2.3). Demnach wurden mindestens zwei unterschiedliche Primersequenzen für die letzte „*Primer Extension*“-Reaktion verwendet. Dabei wurden auch verschiedene Primerkombinationen unter Berücksichtigung der jeweiligen speziellen Allel-Kombinationen und Verwendung einer geringeren Anzahl an Primern eingesetzt, wodurch die Sensitivität der Detektion im Massenspektrometer erhöht werden sollte. Die Anwendung und der Vergleich beider Systeme waren jedoch nicht reproduzierbar und lieferten keine eindeutigen Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

Ein weiterer Gesichtspunkt bei der Evaluierung waren die Bedingungen der Amplifikations- und „*Primer-Extension*“-Reaktion. Da die *CYP2B6* Assays hinsichtlich Primer- und Pufferkonzentrationen bereits optimiert waren, wurden für die Haplotyp-Assays verschiedene Temperaturen sowohl bei der PCR als auch bei der nachfolgenden Verlängerungsreaktion

verwendet. Dadurch sollte die Effizienz sowohl der Amplifikation als auch die der allelspezifischen Verlängerung erhöht werden. Die Variation der Temperatur ergab jedoch keine deutliche Verbesserung der Amplifikationseffizienz.

Als Ergebnis konnten mit dieser Methode für drei Proben der IKP148-Studie der Genotyp **1/*7* ausgeschlossen und demnach als **5/*6* Allelkombination eindeutig klassifiziert werden. Für alle weiteren Proben führte diese Haplotypisierungsmethode zu keinem eindeutigen Ergebnis.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es auch durch die Optimierung verschiedener Parameter (DNA-Qualität, Temperatur, Sensitivität der MALDI-TOF MS Plattformen) nicht möglich war, diese vielversprechende Methode der Haplotyp-Detektion auf das *CYP2B6* Gen zu übertragen.

Für die folgenden Genotyp-Phänotyp-Korrelationen wurden daher die mittels „*in silico haplotyping*“ ermittelten Haplotypen verwendet.

3.2.4 Genotyp-Phänotyp Korrelation

Zur Analyse des Genotyp-Einflusses auf die Proteinexpression und die Enzymaktivität wurden nur solche Genotypen eingeschlossen, die in mindestens 3 Proben auftraten.

Nach Genotyp stratifiziert, unterschied sich der *CYP2B6*-Proteingehalt bei Trägern bestimmter Mutationen signifikant von dem homozygoter Wildtyp-Allelträger (**1/*1*; n=60; medianer Mittelwert: 11,32 pmol/mg; Abb. [3-11]).

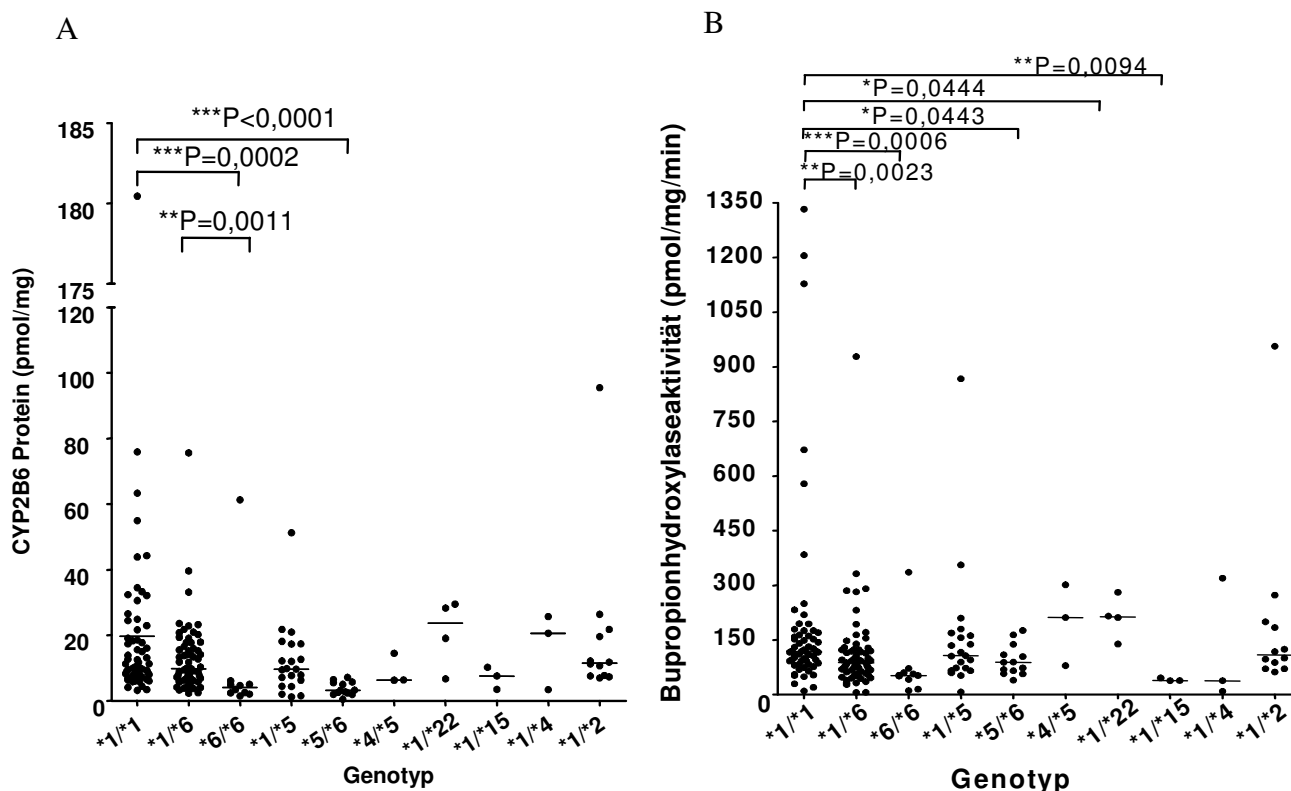


Abbildung 3-11: CYP2B6- Proteinexpression (A) und Bupropionhydroxylaseaktivitäten (B) in humanen Lebermikrosomen mit unterschiedlichen Genotypen. Die unterschiedlichen Genotypgruppen wurden mit dem Wildtyp (*1/*1) verglichen (t-Test)

Die beiden Genotyp-Gruppen *CYP2B6**6/*6 (n=10; medianer Mittelwert: 4,08 pmol/mg) und *5/*6 (n=13; medianer Mittelwert: 3,17 pmol/mg) hatten einen statistisch signifikant niedrigeren Proteingehalt (beide: ***P < 0.0001). Das *6 Allel beinhaltet die Mutationen 516G>T und 785A>G, während das Allel *5 zusätzlich einen SNP in Exon 9 beinhaltet (1459C>T [R487C]).

Auch auf Aktivitätsebene konnten Unterschiede zwischen der Wildtyp-Aktivität (117,7pmol/mg/min) und einigen Genotypen aufgezeigt werden (Abb. [3-11]). Im Vergleich zu *1/*1-Proben wurden von *5- (*P=0,04 heterozygot mit *6) und *6- (**P=0,0023 heterozygot mit *1 und ***P=0,0006 homozygot) Genotypträgern differente Aktivitäten gezeigt. Erstere Gruppe hatte im medianen Mittel 88,4 pmol/mg/min, die folgenden 87,4 und 52,2 pmol/mg/min mikrosomale Bupropionhydroxylaseaktivität. Zusätzlich waren einige seltenere Allele mit veränderter CYP2B6 Aktivität assoziiert. So hatte *CYP2B6**15

(c: 1172T>A) im heterozygoten Kontext mit *1 eine signifikant niedrigere Aktivität als die Träger von zwei Wildtyp-Allelen (38,5 pmol/mg/min; **P= 0,0094). *22 (-82T>C) dagegen zeigte eine signifikant höhere Bupropionhydroxylaseaktivität (heterozygot mit *1: 213,2pmol/mg/min; *P=0,04) in Übereinstimmung mit einer früheren Analyse dieses Allels

(Zukunft et al., 2005). In der Wildtyp-Gruppe sind einige Proben mit besonders hoher Aktivität zu beobachten. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass einige Patienten, von denen die Proben stammen, Medikamente erhielten, die als Induktoren des CYP2B6-Enzyms bekannt sind, wie Carbamazepin (Faucette et al., 2004; Faucette et al., 2007) oder Metamizol (Saussele et al., 2007). Ein Ausschluss dieser Proben hatte keinen Einfluss auf die genotypabhängige Variabilität. Diese Proben wurden daher für weitere Analysen nicht ausgeschlossen. Da eine Induktion bzw. Inhibition von CYP2B6 durch weitere eingenommene Medikamente nicht belegt war, wurden auch solche Proben nicht von den Analysen ausgeschlossen.

Werden die spezifischen Bupropionhydroxylaseaktivitäten der Lebermikrosomen bezogen auf den CYP2B6-Proteingehalt betrachtet, zeigten die Träger des Genotyps *5/*6 sowie *4/*5 eine signifikant höhere spezifische CYP2B6-Aktivität als die Wildtyp-Gruppe (***P<0,0001 bzw. *P=0,0472; Abb. [3-12]).

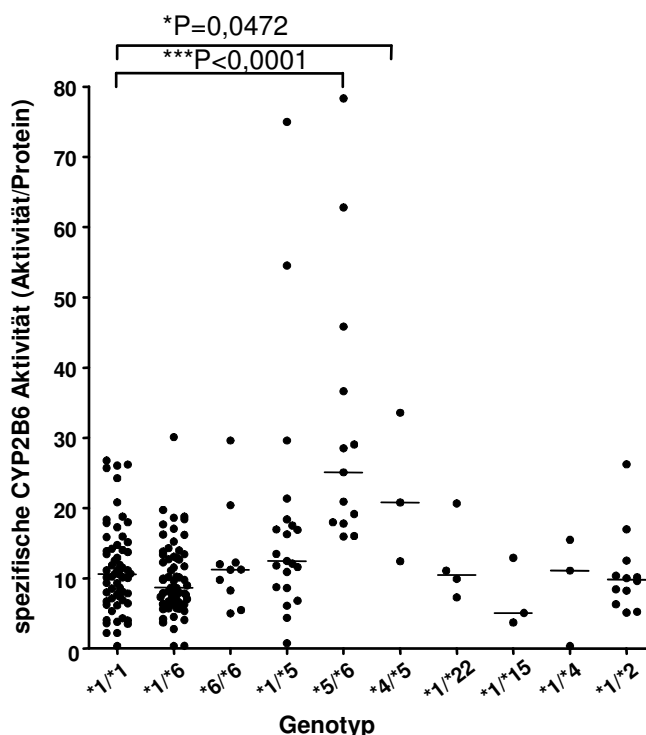


Abbildung 3-12: Spezifische Aktivität berechnet als Aktivität normiert auf den spezifischen CYP2B6 Proteingehalt stratifiziert nach den CYP2B6 Genotypen. Die unterschiedlichen Genotypgruppen wurden mit dem Wildtyp (*1/*1) verglichen (t-Test)

Die spezifischen CYP2B6-Enzymaktivitäten der anderen Genotypen unterschieden sich nicht signifikant vom Wildtyp. Da auch für das *6 Allel die spezifische Aktivität im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert war, konnte abgeleitet werden, dass die beiden Aminosäure-Austausche [Q172H und K262R] keinen markanten Einfluss auf die Enzym-Funktion haben.

3.2.4.1 Einfluss der Promotor Mutation -750T>C im Haplotyp-Kontext

Die oben beschriebene Genotyp-basierte Analyse des CYP2B6 in den humanen Leberproben zeigte eine signifikant erniedrigte Proteinexpression sowie Aktivität in Assoziation zu einem oder zwei *6 Allelen (siehe 3.2.4; Abb. [3-11; A; B]). Interessanterweise war jedoch die spezifische Aktivität, die sich auf die Menge spezifisches CYP2B6 Apoprotein bezieht, nicht signifikant different zum Wildtyp, sondern bei dem Allel *5/*6 sogar noch erhöht (Abb. [3-12]). Die Aminosäure-Austausche waren daher nicht hauptsächlich für die erniedrigte Enzymfunktion verantwortlich. Andererseits war die Proteinexpression dieser Allele erniedrigt, was entweder durch die Aminosäure-Austausche oder durch den Einfluss eines anderen SNPs auf prätranslationaler Ebene verursacht sein konnte.

Im Promotor wurde ein SNP -750T>C bereits als Komponente des *6B und *6C Haplotyp beschrieben (Hesse et al., 2004) und hat als potentielle Bindestelle für Transkriptionsfaktoren möglicherweise Auswirkung auf den CYP2B6 Phänotyp. Um dies zu untersuchen, wurde der SNP, als Single-Plex, für alle IKP148 Proben genotypisiert. Es wurde zusätzlich sichergestellt, dass er auch im Multiplex-Verfahren detektierbar war. Wie bei früheren Studien (Hesse et al., 2004) konnte gezeigt werden, dass das C-Allel zu dem *6-Allel hochfrequent gekoppelt ist, jedoch nicht spezifisch, da auch in der *1 -Gruppe Träger identifiziert wurden (Daten nicht gezeigt). Verglichen wurden zum einen *1/*1-Allelträger mit -750CC oder TT-Trägern (siehe Abb. [3-13]). Dies ergab keine signifikanten Unterschiede. Der Unterschied *1/*6 blieb dagegen signifikant bestehen, wenn die Genotypen nach -750C/T stratifiziert wurden (Abb. [3-13]-A: *1/-750CC gegenüber *6/-750CC: $P=0.0046$; *1/*6 + -750TC gegenüber *6/*6 + -750CC: $P=0.0018$). Auf der Ebene der Enzymaktivität zeigte sich der gleiche Effekt (Abb. [3-13]-B: *1/*1 + -750TT gegenüber *1/*6 + -750CC: $**P=0,0011$; *1/*1 + -750TT gegenüber *6/*6 + -750CC: $**P=0,0046$; *1/*1 + -750CC gegenüber *1/*6 + -750CC: $**P=0,006$; *1/*1 + -750CC gegenüber *6/*6 + -750CC: $**P=0,0042$; *1/*6 + -750TC gegenüber *1/*6 + -750CC: $***P=0,0006$; *1/*6 + -750TC gegenüber *6/*6 + -750CC: $**P=0,0058$).

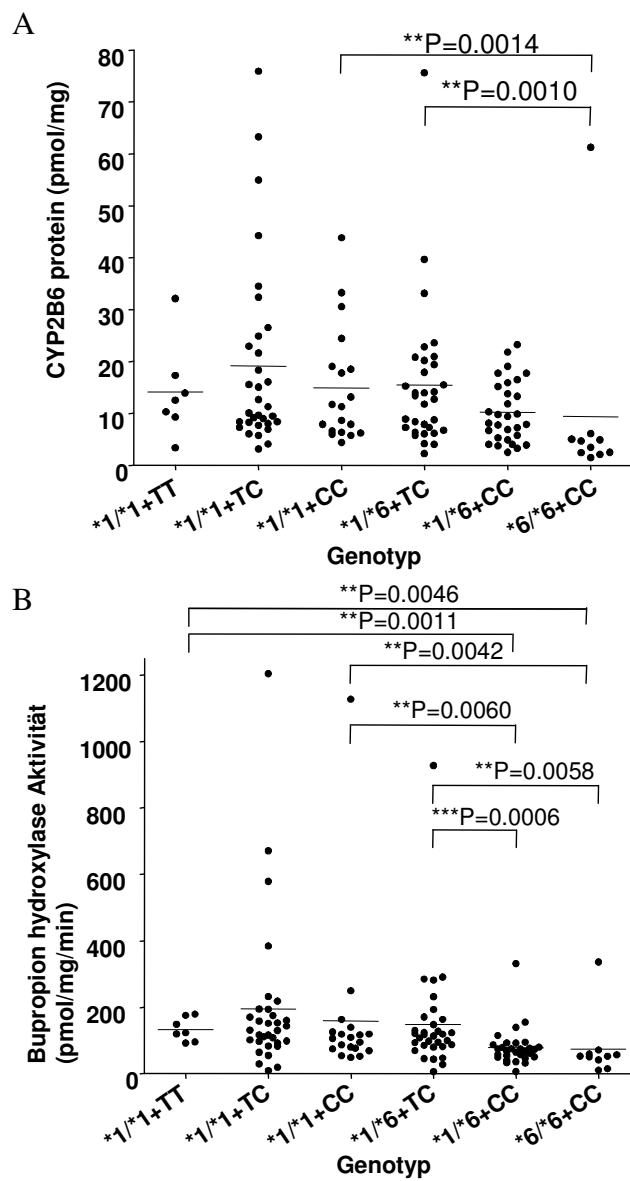


Abbildung 3-13: Einfluss des Promotor SNPs -750T>C im Wildtyp- sowie im *6 Kontext auf Proteinexpression (A) und Bupropionhydroxylaseaktivität (B)

3.2.4.2 Einfluss der Intron 3 Mutation 15582C>T

Eine weitere Mutation in Intron 3 (15582C>T) wurde als mögliche Verstärkung einer Splice Variante (SV1; Lamba et al., 2003) in Zusammenhang mit dem *6 Allel an den Leberproben analysiert. Die Haplotyp-Analyse zeigte, dass der SNP 15582C>T in Proben mit homozygotem *6 Hintergrund nicht präsent war, wohl aber in Proben mit den Genotypen *1C, *13B und *15 (Daten nicht gezeigt). In Proben mit Wildtyp-Kontext ergab dieser SNP keinen signifikanten Beitrag zur Erklärung der verminderten Expression des CYP2B6*6 Allels (Hofmann et al., 2008 und Dissertation Marco Hofmann 2008: „*Microarray and Molecular Genetic Analysis of Aberrant Splicing in Human Drug Metabolizing Cytochromes P450 CYP2D6 und CYP2B6*“).

3.2.5 Zusammenfassung der statistischen Auswertung

Tabellarisch sind hier noch einmal alle statistischen Daten, die unter dem Gesamtabschnitt 3.2 beschrieben wurden, zusammengefasst. Tabelle [3-4]-A erfasst die Assoziationen und die Korrelationen der Proteinexpression sowie der Bupropion-Hydroxylase Aktivität mit den klinischen Daten wie Geschlecht, Alter, Rauchverhalten, Alkohol-, Kaffee- und Grapefruitsaft-Konsum. Tabelle [3-4]-B behandelt die Proteinexpressions- und Bupropion-Hydroxylase Aktivitäten in Stratifikation zum Genotyp. Tabelle [3-4]-C zeigt die statistischen Auswertungen hinsichtlich der proteinbiochemischen Analysen, stratifiziert nach *1/*1 und *1/*6- Genotyp in Hinblick auf den Promotor SNP -750T>C.

*Tabelle 3-4 A bis C: Statistische Auswertung aller klinischen, proteinbiochemischen und genetischen Daten zur Leberbank. Die unterschiedlichen Genotypen wurden mit dem Wildtyp (*1/*1) verglichen (t-Test). Somit beziehen sich im jeweiligen ersten Tabellenabschnitt die Werte immer auf den *1/*1-Fall, die darauffolgenden sind in Zweiergruppen miteinander verglichen und angeordnet*

A

Faktoren CYP2B6	mean ± SD	median	25%	75%	min	max	Korrelations-		
							Koeffizient	95% Konfidenz	P-Wert
Proteinexpression	14,2±17,2	9,3	5,8	17,8	0,5	180,5	0,6	49,2 bis 66,6	<0,0001
Enzymaktivität	141,3±177,5	94,9	64,5	151,9	5,6	1332,0			
Proteinexpression Männer	12,6±13,5	8,6	4,9	15,9	1,2	95,5			0,08
Proteinexpression Frauen	15,8±20,3	9,7	6,3	19,4	0,5	180,5			
Proteinexpression Männer ohne Medikation	13,3±14,5	9,9	5	14,4	1,2	75,9			0,75
Proteinexpression Frauen ohne Medikation	11,9±8,4	8,7	5,1	17,3	0,5	33,2			
Bupropion-Hydroxylase Aktivität Männer	134,6±176,2	92,7	61,6	139,3	7,1	1205			0,3
Bupropion-Hydroxylase Aktivität Frauen	147,9±179,4	97,2	68,5	163,5	5,6	1332			
Bupropion-Hydroxylase Aktivität Männer ohne Medikation	150,7±204,8	92,7	69,8	152,7	9,4	1205			0,93
Bupropion-Hydroxylase Aktivität Frauen ohne Medikation	111,7±71,3	97,1	61,7	150,4	5,6	301,1			
Alter	58,3±13,2	60	52	68	3	85	-0,003	-0,14 bis 0,13	0,96
Proteinexpression	14,2±17,2	9,3	5,8	17,8	0,5	180,5	-0,2	-0,43 bis 0,03	0,08
Alter ohne Medikation	51,48±14,4	54	43	62	3	77			
Proteinexpression ohne Medikation	12,6±11,9	9,8	5,2	15,7	0,5	75,9	0,046	-0,09 bis 0,18	0,48
Alter	58,3±13,2	60	52	68	3	85			
Bupropion-hydroxylase Aktivität	141,3±177,5	94,9	64,5	151,9	5,6	1332	-0,05	-0,28 bis 0,19	0,67
Alter ohne Medikation	51,48±14,4	54	43	62	3	77			
Bupropion-hydroxylase Aktivität ohne Medikation	132±156,1	95,8	68,7	148,6	5,6	1205			
Proteinexpression Raucher	12,2±10,4	7,3	4,4	20,6	2	43,9			0,66
Proteinexpression Nichtraucher	14,1±18,4	9	6	15,9	0,5	180,5			
Bupropion-hydroxylase Aktivität Raucher	133±213,5	75,2	49,1	110,4	6	1128			0,12
Bupropion-hydroxylase Aktivität Nichtraucher	140,5±178,8	94,8	64,9	145,5	5,6	1332			
Proteinexpression Alkohol	10,9±7,7	9,5	4,1	17,4	2	27,5			0,71
Proteinexpression kein Alkohol	13,9±19,0	8,9	6,1	15,2	0,5	180,5			
Bupropion-hydroxylase Aktivität Alkohol	146±164,9	99,6	74,7	163,8	6	1128			0,42
Bupropion-hydroxylase Aktivität kein Alkohol	99,6±63,2	89	51,8	151,9	7,1	232,5			
Proteinexpression Kaffee	14,8±19,2	9,5	6	19,1	1,2	180,5			0,43
Proteinexpression kein Kaffee	13,4±14,5	9,3	5,6	14,2	0,5	75,9			
Bupropion-hydroxylase Aktivität Kaffee	140,5±175,3	95,9	66,7	154,9	6	1332			0,51
Bupropion-hydroxylase Aktivität kein Kaffee	142,2±181,2	93,1	60,7	135,7	5,6	1205			
Proteinexpression Grapefruitsaft	11,6±10,2	8	5,3	14,7	2,8	43,9			0,63
Proteinexpression kein Grapefruitsaft	14,4±17,7	9,5	5,8	18	0,5	180,5			
Bupropion-hydroxylase Aktivität Grapefruitsaft	154,3±251	93,8	45,6	141,2	19,6	1128			0,53
Bupropion-hydroxylase Aktivität kein Grapefruitsaft	140,2±170,8	95,2	65,6	152,3	5,6	1332			

B

Faktoren CYP2B6	mean ± SD	median	25%	75%	min	max	P-Wert
Proteinexpression *1/*1	19,8±25,8	11,3	7,9	22,3	3,2	180,5	0,09
Proteinexpression *1/*6	12,9±10,9	9,8	6,3	16,5	2,3	75,6	
Proteinexpression *6/*6	9,4±18,3	4,1	2,3	5,6	1,5	61,3	0,0002
Proteinexpression *1/*5	12,2±10,9	9,7	5,4	17,4	1,2	51,3	0,15
Proteinexpression *5/*6	3,7±2,0	3,2	2,2	5,6	0,5	7,2	<0,0001
Proteinexpression *4/*5	9,1±4,7	6,4			6,3	14,5	0,27
Proteinexpression *1/*22	20,9±10,5	23,7	12,9	28,9	6,7	29,5	0,37
Proteinexpression *1/*15	7,1±3,4	7,6			3,5	10,2	0,13
Proteinexpression *1/*4	16,6±11,7	20,6			3,4	25,7	0,94
Proteinexpression *1/*2	19,9±24,6	11,5	7,7	20,7	7	95,5	0,89
Proteinexpression *1/*6	12,9±10,9	9,8	6,3	16,5	2,3	75,6	0,001
Proteinexpression *6/*6	9,4±18,3	4,1	2,3	5,6	1,5	61,3	
Bupropion-Hydroxylase Aktivität *1/*1	193,4±262,4	117,7	89,1	166,6	9,4	1332	0,002
Bupropion-Hydroxylase Aktivität *1/*6	114,4±123,8	87,4	58	123,2	5,6	928	
Bupropion-Hydroxylase Aktivität *6/*6	74,5±93,7	52,3	28,1	65,8	10,5	335,6	0,0006
Bupropion-Hydroxylase Aktivität *1/*5	156,2±178,4	106,6	69,2	165,3	7,1	866,7	0,51
Bupropion-Hydroxylase Aktivität *5/*6	94,4±42,4	88,4	61,1	123,5	39,2	176,1	0,04
Bupropion-Hydroxylase Aktivität *4/*5	197,3±111,6	211,5			79,2	301,1	0,41
Bupropion-Hydroxylase Aktivität *1/*22	211,4±58,1	213,2	174,8	248	139	280,7	0,04
Bupropion-Hydroxylase Aktivität *1/*15	40,5±4,1	38,5			37,8	45,3	0,009
Bupropion-Hydroxylase Aktivität *1/*4	122,1±171,6	37,7			9	319,5	0,29
Bupropion-Hydroxylase Aktivität *1/*2	195,2±247,8	108,9	79,4	191,6	61,6	956,4	0,97
spezifische Aktivität *1/*1	11,4±6,3	10,6	7,1	14,5	0,4	26,7	0,22
spezifische Aktivität *1/*6	10,0±5,2	8,6	6,3	13,1	0,4	30,1	
spezifische Aktivität *6/*6	12,5±7,4	11,2	6,9	16,3	5	29,6	0,68
spezifische Aktivität *1/*5	17,8±17,1	12,5	8,7	17,9	0,8	75	0,1
spezifische Aktivität *5/*6	31,9±19,5	25,1	17,9	41,2	15,9	78,3	<0,0001
spezifische Aktivität *4/*5	22,3±10,7	20,8			12,4	33,6	0,05
spezifische Aktivität *1/*22	12,2±5,8	10,5	8,6	15,9	7,3	20,7	0,86
spezifische Aktivität *1/*15	7,2±5,0	5,1			3,7	12,9	0,25
spezifische Aktivität *1/*4	9,0±7,8	11,1			0,3	15,5	0,73
spezifische Aktivität *1/*2	10,8±5,9	9,8	7,3	11,4	5,1	26,2	0,61

C

Faktoren CYP2B6	mean ± SD	median	25%	75%	min	max	P-Wert
Proteinexpression *1/*1+[-750TT]	14,1±9,0	12,5	9,3	17,4	3,4	32,1	0,99
Proteinexpression *1/*1+[-750TC]	19,1±17,9	10,7	8,2	23,9	3,2	75,9	
Proteinexpression *1/*1+[-750CC]	14,9±11,1	11,3	6,3	19,1	4,4	43,9	0,87
Proteinexpression *1/*6+[-750TC]	15,5±13,9	13,1	7	19,8	2,3	75,6	0,98
Proteinexpression *1/*6+[-750CC]	10,3±5,9	8,8	5,1	15,6	2,5	23,3	0,29
Proteinexpression *6/*6+[-750CC]	9,4±18,3	4,1	2,3	5,6	1,5	61,3	0,03
Proteinexpression *1/*6+[-750TC]	15,5±13,9	13,1	7	19,8	2,3	75,6	0,09
Proteinexpression *1/*6+[-750CC]	10,3±5,9	8,8	5,1	15,6	2,5	23,3	
Proteinexpression *1/*1+[-750CC]	14,9±11,1	11,3	6,3	19,1	4,4	43,9	0,001
Proteinexpression *6/*6+[-750CC]	9,4±18,3	4,1	2,3	5,6	1,5	61,3	
Proteinexpression *1/*6+[-750TC]	15,5±13,9	13,1	7	19,8	2,3	75,6	0,001
Proteinexpression *6/*6+[-750CC]	9,4±18,3	4,1	2,3	5,6	1,5	61,3	
Proteinexpression *1/*1+[-750CC]	14,9±11,1	11,3	6,3	19,1	4,4	43,9	0,16
Proteinexpression *1/*6+[-750CC]	10,3±5,9	8,8	5,1	15,6	2,5	23,3	
Bupropion-Hydroxylase Aktivität *1/*1+[-750TT]	133,3±35,4	122,7	95,8	175,3	91,9	179,3	0,98
Bupropion-Hydroxylase Aktivität *1/*1+[-750TC]	194,9±232,1	130,6	94,7	184,6	9,4	1205	
Bupropion-Hydroxylase Aktivität *1/*1+[-750CC]	158,5±239,3	105,9	74,1	125,6	49,1	1128	0,11
Bupropion-Hydroxylase Aktivität *1/*6+[-750TC]	147,8±158,9	115	83,5	155,7	5,6	928	0,41
Bupropion-Hydroxylase Aktivität *1/*6+[-750CC]	78,6±56,8	70,4	50	89,7	6	331,5	0,001
Bupropion-Hydroxylase Aktivität *6/*6+[-750CC]	74,5±93,7	52,3	28,1	65,8	10,1	335,6	0,005
Bupropion-Hydroxylase Aktivität *1/*6+[-750TC]	147,8±158,9	115	83,5	155,7	5,6	928	0,0006
Bupropion-Hydroxylase Aktivität *1/*6+[-750CC]	78,6±56,8	70,4	50	89,7	6	331,5	
Bupropion-Hydroxylase Aktivität *1/*1+[-750CC]	158,5±239,3	105,9	74,1	125,6	49,1	1128	0,004
Bupropion-Hydroxylase Aktivität *6/*6+[-750CC]	74,5±93,7	52,3	28,1	65,8	10,1	335,6	
Bupropion-Hydroxylase Aktivität *1/*6+[-750TC]	147,8±158,9	115	83,5	155,7	5,6	928	0,006
Bupropion-Hydroxylase Aktivität *6/*6+[-750CC]	74,5±93,7	52,3	28,1	65,8	10,1	335,6	
Bupropion-Hydroxylase Aktivität *1/*1+[-750CC]	158,5±239,3	105,9	74,1	125,6	49,1	1128	0,006
Bupropion-Hydroxylase Aktivität *1/*6+[-750CC]	78,6±56,8	70,4	50	89,7	6	331,5	

3.3 Einfluss des *CYP2B6* Genotyps bei Patienten mit Morbus Parkinson

Wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben, können viele Naturstoffe und andere Substanzen aus der Umwelt (Xenobiotika) von *CYP2B6* metabolisiert werden bzw. dessen phänotypisches Verhalten beeinflussen. So werden zum Beispiel neurologisch wirksame Substanzen wie Selegilin (Hidestrand et al., 2001), ein MAO-B Inhibitor, der in der Anti-Parkinson Therapie verabreicht wird, als auch Nikotin (Quik, 2004; Yamazaki et al., 1999) als neuroprotektive Substanz, sowie viele andere exogene Umweltstoffe von *CYP2B6* metabolisiert. Da *CYP2B6* zudem im Gehirn exprimiert wird (Miksys et al., 2003), stellte sich die Frage, ob eine Assoziation zwischen *CYP2B6* SNPs und Parkinsonscher Krankheit (PD, „*Parkinsons Disease*“) existiert.

3.3.1 Studienbeschreibung

Zur Untersuchung der Assoziation des *CYP2B6* Genotyps mit PD wurde eine Gruppe von 95 idiopathischen, unverwandten, italienischen Parkinson Patienten sowie 106 gesunden Kontrollen herangezogen, die bereits seit 1996 am IKP vorlagen und im Hinblick auf Polymorphismen im *MDR1* Gen untersucht worden waren (Furuno et al., 2002). Die Patientengruppe wurde weiter in PD des frühen Stadiums (**early-onset Parkinson Disease**; EOPD) und des späten Stadiums (**late-onset Parkinson Disease**; LOPD) unterteilt. Die Genotypisierung wurde mit dem *CYP2B6* Genotypisierungs-Assay aus Kapitel 2.2.2.3 am Bruker Daltonik System durchgeführt (Blievernicht et al., 2007).

3.3.2 Ergebnisse und Auswertung

Aufgrund der schlechten Qualität mancher DNA-Proben, vermutlich wegen ihres Alters, konnten insgesamt 16 Proben (Patienten- und Kontroll-DNA) nicht analysiert werden. Von den verbliebenen 87 PD Proben gehörten 24 zur EOPD Gruppe, die aus 18 Männern und 6 Frauen bestand. Das Alter rangierte zwischen 31 und 65 Jahren. 63 Patienten kamen aus der Gruppe der LOPD mit 35 Männern und 27 Frauen, mit einem Alter zwischen 51 und 84 Jahren. Für eine Probe (Alter 64 Jahre) war das Geschlecht nicht bekannt. Die Kontrollgruppe beinhaltete nach Ausschluss der nicht genotypisierbaren Proben die DNA von 98 unverwandten Individuen, die aus demselben geographischen Gebiet kamen wie die Patienten und keine Medikamente eingenommen hatten. Die Studie war von dem Ethik Komitee der Universität Pavia genehmigt und alle Patienten hatten ihr Einverständnis gegeben. Allerdings

wurden die Patienten und Kontrollen nicht ans Alter angepasst ausgesucht, weshalb das mittlere Alter in der Gruppe mit Parkinson höher war als in der Kontrollgruppe ($61,1 \pm 9,9$ Jahre zu $52,1 \pm 14,7$ Jahre; $p < 0,0001$). Die Resultate der einzelnen Gruppen sind daher nur bedingt vergleichbar.

Die individuellen SNP Frequenzen sind in Tabelle [3-5] zusammengefasst.

Tabelle 3-5: SNP Frequenzen der CYP2B6 Polymorphismen in Patienten mit PD (n=87; stratifiziert nach EOPD und LOPD) und Kontrollen (n=98). Die Position der SNPs erfolgte nach der cDNA Nomenklatur (c.) oder genomischer DNA (g.)

SNP	PD (N=87)		EOPD (N=24)		LOPD (N=63)		Kontrollen (N=98)	
	N (%)	SNP Frequenz % (CI)	N (%)	SNP Frequenz % (CI)	N (%)	SNP Frequenz % (CI)	N (%)	SNP Frequenz % (CI)
-82T>C								
TT	85 (97.7)		24 (100)		61 (96.8)		98 (100)	
TC	2 (2.3)	1.1 (0.1- 4.1)	0	0.0	2 (3.2)	1.6 (0.2-5.6)	0	0.0
CC	0		0		0		0	
86G>C								
GG	87 (100)		24 (100)		63 (100)		98 (100)	
GC	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
CC	0		0		0		0	
136A>G								
AA	86 (98.9)		23 (95.8)		63 (100)		97 (99)	
AG	1 (1.1)	0.6 (0.0-3.2)	1 (4.2)	2.1 (0.1-11.1)	0	0.0	1 (1)	0.5 (0.0-2.8)
GG	0		0		0		0	
296G>A								
GG	87 (100)		24 (100)		63 (100)		98 (100)	
GA	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
AA	0		0		0		0	
415A>G								
AA	85 (97.7)		24 (100)		61 (96.8)		97 (99)	
AG	2 (2.3)	1.1 (0.1- 4.1)	0	0.0	2 (3.2)	1.6 (0.2-5.6)	1 (1)	0.5 (0.0-2.8)
GG	0		0		0		0	
419G>A								
GG	86 (98.9)		24 (100)		62 (98.4)		97 (99)	
GA	1 (1.1)	0.6 (0.0-3.2)	0	0.0	1 (1.6)	0.8 (0.0-4.3)	1 (1)	0.5 (0.0-2.8)
AA	0		0		0		0	
516G>T								
GG	50 (57.5)		15 (62.5)		35 (55.6)		51 (52)	
GT	31 (35.6)	24.7 (18.5-31.8)	7 (29.2)	22.9 (12.3-37.3)	24 (38.1)	25.4 (18.1-33.9)	41 (41.8)	27.0 (21.0-33.8)
TT	6 (6.9)		2 (8.3)		4 (6.3)		6 (6.1)	
547G>A								
GG	87 (100)		24 (100)		63 (100)		96 (98)	
GA	0	0.0	0	0.0	0	0.0	2 (2)	1.0 (0.1-3.6)
AA	0		0		0		0	
769G>A								
GG	87 (100)		24 (100)		63 (100)		98 (100)	
GA	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
AA	0		0		0		0	
785A>G								
AA	49 (56.3)		15 (62.5)		34 (54)		50 (51)	
AG	31 (35.6)	25.9(19.5-33.0)	7 (29.2)	22.9 (12.0-34.7)	24 (38.1)	27.0 (19.5-35.6)	41 (41.8)	28.1 (21.9-34.9)
GG	7 (8)		2 (8.3)		5 (7.9)		7 (7.1)	
983T>C								
TT	87 (100)		24 (100)		63 (100)		98 (100)	
TC	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
CC	0		0		0		0	
1006C>T								
CC	87 (100)		24 (100)		63 (100)		98 (100)	
CT	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
TT	0		0		0		0	
1172T>A								
TT	86 (98.9)		24 (100)		62 (98.4)		97 (99)	
TA	1 (1.1)	0.6 (0.0-3.2)	0	0.0	1 (1.6)	0.8 (0.0-4.3)	1 (1)	0.5 (0.0-2.8)
AA	0		0		0		0	
1282C>A								
CC	87 (100)		24 (100)		63 (100)		98 (100)	
CA	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
AA	0		0		0		0	
1459C>T								
CC	72 (82.8)		19 (79.2)		53 (84.1)		82 (83.7)	
CT	15 (17.2)	8.6 (4.9-13.8)	5 (20.8)	10.4 (3.5-22.7)	10 (15.9)	7.9 (3.9-14.1)	16 (16.3)	8.2 (4.7-12.9)
TT	0		0		0		0	

Keiner der einzelnen SNPs war verglichen mit der Kontrollgruppe statistisch signifikant in einer der Patientengruppen über- oder unterrepräsentiert. Alle Frequenzen lagen im Hardy-Weinberg-Equilibrium. Haplotypen wurden anhand der definierten Allelstrukturen bestimmt und ihre Frequenzen waren in Übereinstimmung mit publizierten Daten von kaukasischen Populationen (www.cypalleles.ki.se).

Aus Tabelle [3-6] ist ersichtlich, dass das Wildtyp Allel sowohl in Patienten als auch in Kontrollen am häufigsten auftrat (ca. 65 und 63 %), gefolgt vom *6 (ca. 23 und 26 %) und dem *5 Allel (ca. 8 %). Sämtliche andere Varianten sind in den Gruppen mit einer Frequenz von weniger als 2 % vertreten.

Tabelle 3-6: Allelfrequenzen der Genotypisierung mit MALDI-TOF MS in Patienten mit Parkinson (n=87, stratifiziert nach EOPD und LOPD) und Kontrollen (n=98)

Allel	PD % (N=174)	EOPD % (N=48)	LOPD % (N=126)	Kontrollen % (N=196)
2B6*1	64.9	66.7	64.3	62.8
2B6*4	1.1	0.0	1.6	1.0
2B6*5	8.6	10.4	7.9	8.2
2B6*6	23.0	20.8	23.8	26.5
2B6*11	0.6	2.1	0.0	0.5
2B6*13	1.1	0.0	1.6	0.5
2B6*14	0.6	0.0	0.8	0.5
2B6*15	0.6	0.0	0.8	0.5
2B6*22	1.1	0.0	1.6	0.0

Generell war keine Verschiebung der Häufigkeiten einzelner SNPs oder Allele in Individuen mit Parkinson im Vergleich zu den Kontroll-Individuen zu beobachten, woraus geschlossen wurde, dass *CYP2B6*-Genotypen in der hier untersuchten Studie möglicherweise keinen direkten Zusammenhang mit Morbus Parkinson aufweisen.

3.4 Assoziation von *CYP2B6* Polymorphismen und HIV-Therapie

Das Medikament Efavirenz, ein Nicht-Nukleosidischer Reverse Transkriptase Inhibitor (NNRTI), ist heute Bestandteil fast aller Anti-HIV Therapien und wird als Standarddosis von 600 mg/d verschrieben. Studien haben gezeigt, dass es bei Efavirenz-Gabe sowohl zu individuellen als auch interethnischen Unterschieden in den Plasma-Konzentrationen unter dieser Standardtherapie kommen kann. Efavirenz Plasma-Konzentrationen, die Unterdrückung der HI Virus-Replikation sowie auch ZNS-Toxizität sind direkt miteinander assoziiert. Für die Therapie wäre daher eine individualisierte Dosisanpassung vorteilhaft, damit eine ausreichend hohe Efavirenz-Konzentration mit einer effizienten Unterdrückung der HIV-Replikation gegeben ist, aber gleichzeitig zentralnervöse Nebenwirkungen vermindert werden können (Rotger et al., 2007; Telenti and Zanger, 2007; Tsuchiya et al., 2004; Ward et al., 2003).

Efavirenz wird hauptsächlich von *CYP2B6* metabolisiert (Tsuchiya et al., 2004; Ward et al., 2003) und die unter 1.2 beschriebenen Polymorphismen, die zu einer veränderten Proteinexpression und -aktivität führen können, unterscheiden sich sehr in ihrer Frequenz zwischen den verschiedenen Ethnizitäten (Klein et al., 2005; Lang et al., 2001; Lang et al., 2004; Mehlotra et al., 2006). Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden in Kooperation mit verschiedenen Arbeitsgruppen zu mehreren Assoziations-Studien an Patienten unter HIV-Therapie Genotypisierungen und Auswertungen bezüglich *CYP2B6* Polymorphismen durchgeführt.

3.4.1 Assoziation von *CYP2B6* Genotypen und Efavirenz Plasmakonzentration

In einer Zusammenarbeit mit der Swiss HIV Cohort Study und Prof. Dr. Amalio Telenti wurden uns DNA-Proben von 169 HIV-Patienten, die unter Efavirenz-Therapie standen, zur Verfügung gestellt. Für die Patienten lagen umfangreiche klinische Daten zu Efavirenz-Plasmaspiegeln vor. Diese Proben wurden für die 15 *CYP2B6* SNPs genotypisiert (Blievernicht et al., 2007). Während der Analyse der DNA-Proben stellte sich heraus, dass die Proben stark fragmentiert waren. Daher musste für alle Proben die erste PCR in Single-Plexen durchgeführt werden, die dann anschließend für die PEX-Reaktion zusammengeführt wurden.

3.4.1.1 Genotyp -Frequenz in Subpopulationen unterschiedlicher Ethnizität

Die Häufigkeiten aller SNP Positionen lagen im Hardy-Weinberg-Equilibrium. Die beobachteten Frequenzen der bekannten SNPs waren übereinstimmend zu anderen bereits publizierten Daten (Klein et al., 2005; Lang et al., 2001; Lang et al., 2004) und finden sich in Tab. [3-7].

Tabelle 3-7: Frequenz der CYP2B6 Genotypen in Subpopulationen verschiedener Ethnizitäten. Die individuelle Genotypfrequenz wurde basierend auf der Anzahl der Individuen ermittelt, deren Genotypisierung erfolgreich verlief. Die Position der SNPs erfolgte nach der cDNA Nomenklatur (c.) oder der genomischen DNA (g.); SNPs 296G>A, 415A>G, 419G>A, 769G>A, 1006C>T und 1282C>A waren in diesen Populationen nicht vertreten. c.593T>C und c.1132C>T wurden in einem zusätzlichen Probenstet von 61 Individuen getestet

SNP	Anzahl Proben (n)	Alle Individuen (%) (n)	Kaukasier (%) (n)	Afro-Amerikaner/		
				Afrikaner (%) (n)	Hispanics (%) (n)	Asiaten (%) (n)
g.-82T>C	167					
TT		97,0 (162)	97,2 (137)	92,2 (13)	100 (7)	100 (5)
TC		3,0 (5)	2,8 (4)	7,1 (1)	0 (0)	0 (0)
CC		0,0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
c.86G>C g.86	169					
GG		98,8 (167)	100 (141)	85,5 (14)	100 (7)	100 (5)
GC		1,2 (2)	0 (0)	12,5 (2)	0 (0)	0 (0)
CC		0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
c.136A>G g.136	169					
AA		98,2 (166)	97,9 (138)	100 (16)	100 (7)	100 (5)
AG		1,8 (3)	2,1 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
GG		0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
c.516G>T g.15631	169					
GG		56,2 (95)	60,3 (85)	31,25 (5)	57,1 (4)	20,0 (1)
GT		33,7 (57)	29,8 (42)	62,5 (10)	42,9 (3)	40,0 (2)
TT		10,1 (17)	9,9 (14)	6,25 (1)	0 (0)	40,0 (2)
c.547G>A g.15662	169					
GG		97,6 (165)	97,2 (137)	100 (16)	100 (7)	100 (5)
GA		2,4 (4)	2,8 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
AA		0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
c.593T>C g.15708	169+61					
TT		99,6 (229)	100 (141)	98,7 (76)	100 (7)	100 (5)
TC		0,4 (1)	0 (0)	1,3 (1)	0 (0)	0 (0)
CC		0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
c.785A>G g.18053	169					
AA		49,1 (83)	53,2 (75)	31,25 (5)	28,6 (2)	20,0 (1)
AG		40,2 (68)	36,2 (51)	62,5 (10)	71,4 (5)	40,0 (2)
GG		10,7 (18)	10,6 (15)	6,25 (1)	0 (0)	40,0 (2)
c.983T>C g.21011	169					
TT		98,2 (166)	100 (141)	81,25 (13)	100 (7)	100 (5)
TC		1,8 (3)	0 (0)	18,75 (3)	0 (0)	0 (0)
CC		0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
c.1132C>T g.21160	167+61					
CC		99,6 (227)	100 (139)	98,7 (76)	100 (7)	100 (5)
CT		0,4 (1)	0 (0)	1,3 (1)	0 (0)	0 (0)
TT		0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
c.1172T>A g.21388	169					
TT		99,4 (168)	99,3 (140)	100 (16)	100 (7)	100 (5)
TA		0,6 (1)	0,7 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
AA		0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
c.1459C>T g.25505	168					
CC		79,2 (133)	77,1 (108)	93,75 (15)	85,7 (6)	80,0 (4)
CT		19,6 (33)	21,4 (30)	6,25 (1)	14,3 (1)	20,0 (1)
TT		1,2 (2)	1,4 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Aus Tab. [3-8] geht hervor, dass auch in dieser Probensammlung neben *1 die zwei häufigsten Polymorphismen 516G>T und 785A>G waren, die zusammen als *6 Allel definiert sind und das in Individuen afro-amerikanischer/afrikanischer Herkunft häufiger auftrat als in Kaukasiern.

*Tabelle 3-8: CYP2B6 Allelfrequenzen. Die Alleldefinitionen wurden anhand der 15 genotypisierten SNPs getroffen. *27 und *28 waren neue Allele, zusätzlich analysiert in einem zusätzlichen Probenset von 61 farbigen Individuen. Die Prozentangaben beziehen sich nicht notwendigerweise auf 100 %, da die Allele *2 und *3 nicht in die Analyse mit eingeschlossen wurden (nach Resequenzierung von 24 ausgewählten Individuen)*

Allel	Anzahl Proben (%) (n=338)	Afro- Amerikaner/			
		Kaukasier (%) (n=282)	Afrikaner (%) (n=32)	Hispanics (%) (n=14)	Asiaten (%) (n=10)
*1	52,6	55,6	31,3	57,1	30
*4	3,8	3,9	0	14,3	0
*5	10,9	12,1	3,1	7,1	10
*6	26,9	24,8	37,5	21,4	60
*11	0,6	1,1	0	0	0
*15	0,3	0,4	0	0	0
*17	0,6	0	6,3	0	0
*18	0,9	0	9,4	0	0
*22	1,5	1,4	3,1	0	0
*27	0,2	0	0,6	0	0
*28	0,2	0	0,6	0	0

*CYP2B6**5 (1459C>T, R487C) war das zweithäufigste Allel und, verglichen zu anderen Ethnizitäten, in kaukasischen Patienten häufiger vertreten. Die ungewöhnlich hohe Frequenz der Allele (*5 und *6) in der asiatischen Population könnte sich durch die geringe Individuenzahl (n=5) erklären. Das *CYP2B6**4 (785A>G einzeln) Allel trat am häufigsten in Hispanics auf, wie auch schon bei Lamba et al. (2003) beschrieben wurde. Die Promotor Variante *22 konnte sowohl in afro-amerikanischen/afrikanischen als auch in kaukasischen Individuen identifiziert werden. In Übereinstimmung mit früheren Studien wurden einige der selteneren Varianten entweder ausschließlich in Kaukasiern [*11 und *15] oder in afro-amerikanischen/afrikanischen Patienten [*17 und *18] beobachtet. Vier Individuen, alle kaukasischen Ursprungs, waren heterozygot für die in Blievernicht et al. (2007) beschriebene Mutation 547G>A [V183I]. In zwei der vier Patienten erschien dieser SNP im homozygoten *6 oder *1 Kontext und war somit Bestandteil unterschiedlicher Haplotypen. Zwei weitere Proben waren heterozygot für die SNPs 516G>T, 785A>G und 983T>C und wurden als

*6/*18 Träger bestimmt. Wang et al. beschrieben 2006 das *16 Allel, welches als Kombination der SNPs 785A>G und 983T>C auf einem Allel definiert wurde. Demnach könnten diese zwei Proben auch als *9/*16 definiert werden. Eine molekulare Haplotyp-Analyse (siehe Kapitel 3.2.3.2) konnte aufgrund der schlechten DNA Qualität mit diesen Proben nicht durchgeführt werden. Jedoch wurde in dieser Population kein Träger des alleinigen 516G>T SNPs (*CYP2B6**9) identifiziert und somit zeigte auch eine computergestützte PHASE Analyse hier keine Existenz dieses Allels. Es scheint, als ob beide Allele, *9 und *16, äußerst selten sind. Die *CYP2B6**2 (64C>T, R22C) und *CYP2B6**3 (777C>A, S259R) Allele wurden nicht analysiert, da frühere Studien keinen Effekt dieser SNPs auf die Expression oder Funktion des Proteins assoziieren konnten (Jinno et al., 2003; Lang et al., 2001). Es wurden keine Träger der weiteren *loss-of-function* Allele *8, *12, *14, *19 und *21 in dieser Population beobachtet.

3.4.1.2 Analyse von Patienten mit abnormalen Efavirenz Plasmakonzentrationen

CYP2B6 Genvarianten, die in ihrer resultierenden Proteinfunktion einschränkend wirken, sollten die Efavirenz (EFV)-Plasmaspiegel entsprechend beeinflussen. Deshalb wurden die von der Kooperationsgruppe in der Schweiz gemessenen Plasmaspiegel der Patienten gemäß ihrer Genotypen stratifiziert und die EFV Plasma „*area under the curve*“ (AUC) verglichen. Die Resultate der Genotyp - EFV AUC Korrelation sind in Abbildung [3-14] dargestellt.

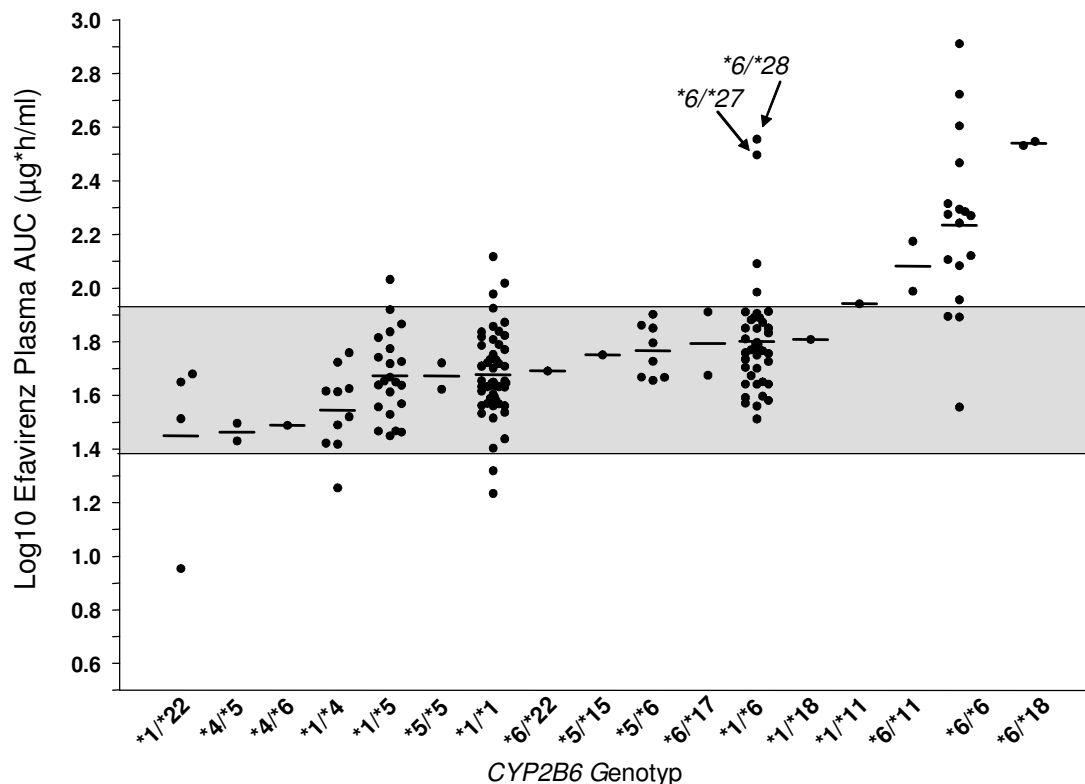


Abbildung 3-14 : Einfluss des CYP2B6 Genotyps auf den Efavirenz (EFV) Plasmaspiegel. Log₁₀-umgewandelte Werte der EFV Plasma AUC sind in aufsteigender Reihenfolge des Mittelwertes in Relation zum CYP2B6 Genotyp angeordnet. Die schwarzen Pfeile zeigen die Individuen an, die resequenziert wurden. Das graue Intervall stellt die Schwellenwerte von 85µg h/ml und 25µg h/ml dar, über oder unter denen die AUC von der Normalverteilung abweichen

Der mediane AUC Wert lag für homozygote Individuen der Referenz-Sequenz bei 44,5µg*h/ml (n=52). Statistisch signifikant erhöhte AUC Werte wurden in Proben festgestellt, die heterozygot für das *6 Allel im Wildtyp-Kontext (58,9 µg h/ml, P=0,01; n=41) genotypisiert wurden und lagen im Mittel in homozygoten *6 Trägern bei 186,4 µg h/ml (P<0,0001; n=17). Interessanterweise wurden signifikant erniedrigte EFV AUC Werte bei *1/*4 Heterozygoten beobachtet (37,1 µg h/ml, P=0,04; n=10). Kein Unterschied zu der Wildtypgruppe wurde bei Trägern des *1/*5 Allels (44,9 µg h/ml; n=22), des *1/*22 Allels (38,6 µg h/ml; n=4) und bei der Mutation 547G>A [V183I] festgestellt (Daten nicht gezeigt). Für die Analyse wurde letztere Mutation in die Genotypgruppen ihres Auftretens (*1/*1, *1/*6, *6/*6) eingeschlossen.

Eine Resequenzierung von 27 Proben mit stark erhöhten oder erniedrigten AUCs, die von der Kooperationsgruppe in der Schweiz durchgeführt wurde, identifizierte fünf neue SNPs in zwei afro-amerikanischen/afrikanischen Individuen mit *1/*6 Genotyp. Ein Individuum wies

einen nicht-synonymen SNP in Exon 5 auf (c.593T>C, g.15708, M198T), während der zweite Patient neben zwei intronischen und einem weiteren nicht-synonymen Aminosäureaustausch (917C>G, g. 18783, T306S) einen SNP in Exon 8 aufwies, der für ein Stop-Codon kodiert und damit in einer Verkürzung der Proteinelänge ab Arginin 378 resultiert (1132C>T, g.21160). Daraufhin wurde versucht, diese SNPs in den Genotypisierungs-Assay des Bruker Daltonik Systems zu integrieren, um dann die Gesamtpopulation mit dem MALDI-TOF MS System zu genotypisieren. Der SNP 593T>C wurde erfolgreich integriert, die anderen beiden Varianten lagen außerhalb der PCR-Fragmente und wurden vom Kooperationspartner mittels RFLP analysiert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass bei HIV-Patienten der EFV Plasmaspiegel hauptsächlich durch das *6 Allel bestimmt wird. Zusätzlich wurden drei neue nicht-synonyme *CYP2B6* Varianten identifiziert, die in Kombination mit intronischen SNPs zwei neue Allele definierten, *27 und *28, die mit stark erhöhten EFV-Plasmaspiegeln assoziiert waren. Darüber hinaus kann man schlussfolgern, dass in dieser Kohorte 92 % der Patienten mit erhöhten EFV Plasmawerten Träger mindestens eines *CYP2B6* „*loss-of-function*“ Allels sind (Rotger et al., 2007).

3.4.2 Prädiktivität des *CYP2B6* Genotyps auf die Efavirenz Therapie (A5128)

Um den prädiktiven Wert einer *CYP2B6* Genotypisierung an einem größeren Patientenkollektiv mit Efavirenz Therapie zu analysieren, wurde in einer anderen Kooperation mit der Vanderbilt Universität, im Namen der NIAID's AIDS Clinical Trials Group und unter Dr. David Haas die *CYP2B6* Genotypisierung an einer repräsentativen HIV-Kohorte von 504 Patienten durchgeführt (ACTG protocols 384 und A5097s). An dieser Population waren bereits Untersuchungen zu Genotypen und EFV Plasmaspiegeln durchgeführt worden, jedoch nur anhand zweier SNPs des *CYP2B6* Gens (516G>T und 1459C>T). Hier war die Plasma Exposition zu Efavirenz und Nelfinavir in jeder Population mit dem SNP 516G>T [Q172H] assoziiert. Die zentrale Hypothese dieser Kooperation war, dass zusätzliche Polymorphismen, Haplotypen und/oder zusammengesetzte Genotypen des *CYP2B6* Gens die Plasma Exposition für Efavirenz besser vorhersagen können als ein SNP allein. Tabelle [3-9] zeigt die durch die Genotypisierung erhaltenen Frequenzen der jeweiligen ethnischen Gruppe unter Efavirenz-Therapie.

Tabelle 3-9: Allelfrequenzen anhand der Genotypisierung von 16 CYP2B6 SNPs

SNP	Nukleotid	Alle Individuen (%)	Kaukasier Afro-Amerikaner/ Nicht- Afrikaner		
			Hispanics (%) (n)	Nicht-Hispanics (%) (n)	Hispanics (%) (n)
-82T>C	T	98,6	99,2	98,1	97,3
	C	1,4	0,8	1,9	2,7
86G>C	G	99,1	100	97,2	100
	C	0,9		2,8	
136A>G	A	99,8	99,8	99,7	100
	G	<0,5	<0,5	<0,5	
296G>A	G	100	100	100	100
415A>G	A	99,4	99,4	99,7	98,6
	G	0,6	0,6	<0,5	1,4
419G>A	G	99,8	99,8	100	99,3
	A	<0,5	<0,5		0,7
516G>T	G	71,2	75,5	65,8	67,8
	T	28,8	24,5	34,2	32,2
547G>A	G	99,8	99,6	100	100
	A	<0,5	<0,5		
593T>C	T	99,9	100	99,7	100
	C	<0,5		<0,5	
769G>A	G	99,6	100	98,8	100
	A	<0,5		1,2	
785A>G	A	69,2	72,7	65,2	65,3
	G	30,8	27,3	34,8	34,7
983T>C	T	97,2	99,8	92,5	98,6
	C	2,8	<0,5	7,5	1,4
1006C>T	C	99,8	100	99,4	100
	T	<0,5		0,6	
1172T>A	T	99,4	98,8	100	100
	A	0,6	1,2		
1282C>A	C	100	100	100	100
1459C>T	C	91,4	88	96,3	92,5
	T	8,6	12	3,7	7,5

Der 516G>T und der 785A>G SNP waren in allen Populationen, am häufigsten jedoch in Afro-Amerikanern/Afrikanern vertreten, gefolgt vom Exon 9 SNP [1459C>T], der am häufigsten in der kaukasischen Population beobachtet wurde. Die SNPs 86G>C sowie 983T>C waren mit heterozygotem bzw. homozygotem Genotyp nur in Afro-Amerikanern/Afrikanern vertreten, wobei letzterer in zwei hispanischen Patienten nur heterozygot auftrat.

In den Allelfrequenzen war die Häufigkeitsabfolge in allen Ethnizitäten wie folgt: 785G>516T>1459T>983C. Alle weiteren SNPs wurden unter 1% in allen Gruppen beobachtet. Aufgetrennt nach Ethnizität waren die Häufigkeiten, angegeben mit den zugehörigen Allelen wie folgt:

Kaukasische Nicht-Spanier: 785G (*4) > 516T (*9) > 1459T (*5) > 1172A (*15)

Afro-Amerikaner/Afrikaner: 785G (*4) > 516T (*9) > 983C (*18) > 1459T (*5) > 86C (*17) > -82C (*22) > 769A

Hispanics: 785G (*4) > 516T (*9) > 1459T (*5) > -82C (*22) > 415G (*8) = 983C (*18)

Alle weiteren Allele wurden unter 1% beobachtet.

Die Daten dieser Genotypisierung wurden dem Kooperationspartner zur Auswertung bezüglich der Efavirenz-Plasmakonzentrationen zur Verfügung gestellt. Die Analysen waren bei Abgabe dieser Dissertation noch nicht abgeschlossen.

4 DISKUSSION

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, für genetische Polymorphismen des *CYP2B6* Gens, eine effiziente Genotypisierungstechnik zu entwickeln und diese in verschiedenen Studien anzuwenden. Dadurch sollten Assoziationen zu Phänotyp, also Proteinexpression und Enzymfunktion, sowie pharmakokinetische Parameter aufgeklärt werden. Dazu stand in erster Linie eine Sammlung von 235 individuellen Leberproben zur Verfügung. Die Anwendung der Genotypisierungstechnik fand außerdem an klinischen Studien zu Morbus Parkinson und Efavirenz (HIV)-Therapie statt.

Im Verlauf der Dissertation wurden die folgenden Resultate erarbeitet:

- eine effiziente, robuste und reproduzierbare *CYP2B6* Genotypisierungsmethode auf der Basis der MALDI-TOF MS Technologie wurde entwickelt
- eine signifikante Korrelation zwischen dem *CYP2B6* Genotyp und der *CYP2B6* Proteinmenge, sowie der Aktivität wurde nachgewiesen
- eine hypothetische Assoziation zwischen dem *CYP2B6* Genotyp und der Parkinson Krankheit konnte nicht nachgewiesen werden
- statistisch signifikante Unterschiede in den Efavirenz-Plasmaspiegeln und dem *CYP2B6* Genotyp wurden in Abhängigkeit von „*loss-of-function*“-Allelen gefunden

Im Folgenden werden die Resultate im Einzelnen diskutiert.

4.1 *CYP2B6* Varianten

Mutationen im *CYP2B6* Gen waren zu Beginn dieser Arbeit erst seit kurzem bekannt (überwiegend durch Arbeiten der IKP Pharmakogenetik Gruppe) und ihre Bedeutung für die vorhergesagte klinische Antwort bzw. Medikamententherapie war noch weitgehend unerforscht. Die klinischen Anwendungen der *CYP2B6* Metabolisierung betreffen häufig verschriebene Medikamente wie Bupropion (Lerman et al., 2002), Cyclophosphamid (Takada et al., 2004; Xie et al., 2006), sowie Efavirenz (Tsuchiya et al., 2004; Haas et al., 2004; Rotger et al., 2005). Im Besonderen heben die konsistenten Resultate der zahlreichen Studien zur HIV Pharmakogenetik das Potential der *CYP2B6* Variationen als prädiktiven Faktor für die interindividuell variablen Nebenwirkungen, dem Ansprechen und der Medikamenten-

Toxizität hervor. Bis dato waren nur die häufigsten Variationen des *CYP2B6* in diesen Studien untersucht worden, zum Teil auch weil kein geeigneter Genotypisierungs-Assay verfügbar war (Zanger et al., 2004; Jacob et al., 2004; Futatsugawa et al., 2004).

In dieser Arbeit wurde ein Multiplex-Assay entwickelt, der alle neu entdeckten und auch weniger häufigen SNPs mit einschloss, die ausgeprägte Effekte auf die Expression/Funktion zeigten und welche insgesamt zwischen 5 und 10 % der funktionell relevanten Allele ausmachen (abhängig von der Ethnizität; Klein et al., 2005; Lamba et al., 2003; Lang et al., 2004; Wang et al., 2006). Ihre Bestimmung im Hinblick auf klinische Studien sollte hilfreich sein, um das Verständnis der Genotyp-Phänotyp Assoziation zu verbessern und den prädiktiven Wert der *CYP2B6* Genotypisierung zu steigern. Die *CYP2B6* SNP Frequenzen, die in dieser für die MALDI-TOF MS Evaluierung herangezogenen Studie beobachtet wurden, bestätigten und erweiterten das bisherige Wissen über *CYP2B6* Variationen in einer mittleren europäischen Population.

4.2 *CYP2B6* MALDI-TOF MS Genotypisierung – Methodenentwicklung

Die bisher im Labor verwendeten Genotypisierungstechniken wie PCR, RFLP oder Sequenzierung zur Detektion von Polymorphismen an großen Studienpopulationen waren sehr zeitaufwendig und kostenintensiv. In der vorliegenden Arbeit sollte die am IKP vorhandene MALDI-TOF MS Technologie als eine innovative Genotypisierungstechnik für *CYP2B6* entwickelt und etabliert werden. Hierzu standen DNA-Proben zur Verfügung, die mit den früher verwendeten Techniken bereits genotypisiert waren und daher als Positiv-Kontrollen dienten. Die MALDI-TOF MS ist eine sensitive, genaue und reproduzierbare Methode für die Detektion von Oligonukleotiden. Im Gegensatz zu anderen Genotypisierungstechnologien, die auf Hybridisierung basieren, misst die MALDI-TOF MS direkt das Molekulargewicht von den Oligonukleotiden und hat demnach verschiedene prinzipielle und methodische Vorteile (Pusch et al, 2002; Wise et al., 2003; Gut et al., 2004; Tost et al., 2005). Ein Vorteil dieser Methode besteht zum einen in der Möglichkeit des „*Multiplex*“-Verfahrens, bei dem gleichzeitig für eine Probe mehrere Mutationen simultan in einer Reaktion nachgewiesen werden können. Zum anderen liegen die Vorteile gegenüber anderen Methoden in der Möglichkeit der Automatisierung und in der Einfachheit der Entwicklung der Multiplex Assays, was folglich in einer effektiven Reduktion der Arbeitszeit (5-10 s pro Probe) und der Kosten bei gleichzeitiger Erhöhung der messbaren Probenzahl resultiert.

Im Laufe der Arbeit wurden zwei MALDI-TOF MS Systeme (Bruker und Sequenom) verwendet, die zwar auf der gleichen Massenspektrometrie-Plattform beruhen, jedoch vom methodischen Prinzip unterschiedlich sind. Während das Bruker-System hinsichtlich der Sensitivität und der Multiplex-Fähigkeit Schwächen aufzeigt, bot das Sequenom-System durch die Verlängerung der Primer allein um das variable Nukleotid eine höhere Massengenauigkeit sowie eine genauere Massenauftrennung und eine daraus resultierende höhere Multiplex-Fähigkeit. Das System hat den weiteren Vorteil gegenüber dem Bruker System, dass die Messung für 384 Proben im Spektrometer in einem kürzeren Zeitraum (40 min statt 3h) erfolgt (2 Teil-Assays für 19 SNPs).

Ähnlich zu anderen bekannten Cytochrome P450 Genen, erforderte das *CYP2B6* Gen im Hinblick auf die Spezifität der PCRs sehr detaillierte Planungen in der Entwicklung dieser ersten Reaktion. Wie beim *CYP2D6* existiert auch beim *CYP2B6* ein Pseudogen *CYP7BP1* (Nelson et al., 2004), was zum *CYP2B6* hoch homolog ist. Da in diesem Pseudogen bisher keine Variantenanalyse durchgeführt wurde, konnte der Einfluss von *CYP2B7P1*-Nukleotiden auf die *CYP2B6* Amplifikation nicht vorhergesagt werden. Es wurden deshalb in den Introns lokalisierte Primer entwickelt, die mindestens eine Nukleotid-Differenz zur Pseudogen-Sequenz aufwiesen. Jedes Amplikon wurde auf dessen *CYP2B6*-Spezifität durch Sequenzierung überprüft. Diese spezifische Präamplifikation von Abschnitten des zu untersuchenden Gens wird durchgeführt, um zu verhindern, dass benachbarte hoch sequenzhomologe Pseudogene, als auch sequenzähnliche Bereiche auf anderen DNA-Abschnitten ebenfalls mit amplifiziert und somit zu falsch positiven Ergebnissen führen. Einem möglichen Auftreten von Kontaminationen wurde mit veränderten PCR Bedingungen entgegen getreten, um die Spezifität zu verbessern. Es ist somit unabdingbar, beim Verwenden dieses oder Entwickeln ähnlicher Assays solche Kontrollen durchzuführen. Eine Tag-Sequenz am 5'-Ende der Amplifikationsprimer wurde als vorteilhaft angesehen, um den unterschiedlichen GC-Gehalt der Fragmente im Multiplex anzugleichen (Ghebraniou et al., 2005). Nach der Optimierung ergaben alle Primerpaare in einer kompatiblen Multiplex-Amplifikation zufriedenstellende Resultate. Die erhaltenen Präamplifikate dienen in einer zweiten PCR als DNA-Vorlage zum allel-spezifischen Nachweis von Mutationen.

Ein weiterer kritischer Aspekt der Entwicklung war die Kombination der verschiedenen Reaktionen in Multiplex-Assays, wobei zur Positionierung der dafür benötigten Primer (PEX-Primer) eine geeignete softwaregestützte Hilfe empfohlen wird. In die Entwicklung eingeschlossen wurden verschiedene Parameter, wie zum Beispiel GC Gehalt, molekulare Masse, Primer-Anlagerungstemperatur, Dimer- und Hairpin-Loop-Bildung. Um die höchsten

Multiplexe zu erreichen, wurden viele Primer-Kombinationen ausgetestet, was letztendlich zu einem Assay-Design für das Bruker System aus fünf Multiplex Assays führte. Mehr als vier „*Extension*“-Primer konnten nicht in einer Reaktion kombiniert werden, hauptsächlich aufgrund von Kreuzbindungsreaktionen und verschiedener Nukleotidverlängerungen zur Detektion der 15 SNPs (siehe Material und Methoden Kapitel 2.2.2.3). Die Umwandlung der unverlängerten Primer in das allelspezifische Produkt wurde entweder durch Kontroll-DNA von bereits sequenzierten/genotypisierten Proben oder rekombinant hergestellten Kontrollen getestet.

Auch wenn beide Systeme gut geeignete MALDI-TOF MS Techniken sind, kann dies in dem Sinne einen Nachteil darstellen, dass die Methode für deutlich weniger als 384 oder einzelne Proben nicht geeignet ist. Der Materialverbrauch, sowie die Effektivität der Methode sind unter diesen Bedingungen limitierende Faktoren, da die Analyse fehlerhaft und in hohem Maß kontaminationsgefährdet ist. Zusätzlich sollte an dieser Stelle angemerkt werden, dass es obwohl es firmenspezifische Unterschiede in den Software-Systemen gibt, die Problematik eventueller Pseudogen-Homologie bei beiden Versionen nicht berücksichtigt wird, weshalb weitere aufwendige Vorarbeiten nötig waren.

4.3 *CYP2B6* MALDI-TOF MS Genotypisierung – Evaluierung

Für die Evaluierung des *CYP2B6* Assays wurden alle 15 SNPs in 287 Proben genomischer DNA europäischer Herkunft analysiert. Wie in Abbildung [3-2] im Ergebnis-Teil anhand der häufigsten *CYP2B6* Variationen zu erkennen ist, waren die drei möglichen Genotypen (Wildtyp, mutiert und heterozygot) in den MALDI-TOF MS Daten klar in drei Gruppen strukturiert. Im Durchschnitt wurden ca. 5 % (das entspricht 14 Proben) nicht automatisch identifiziert und mussten manuell bestimmt werden, was eine automatische Signalrate von >95 % für alle 15 SNPs zur Folge hatte. Die MALDI-TOF MS Ergebnisse konnten in allen Fällen mittels Sequenzierung bestätigt werden.

Somit konnte mit diesen Assays eine zuverlässige Genotypisierung der *CYP2B6* Variationen erreicht werden. Ein Vergleich der MALDI-TOF MS Resultate mit durch andere Methoden erhaltenen Daten, zeigte dennoch einige diskrepante Ergebnisse. Retrospektiv konnte gezeigt werden, dass sie aufgrund fehlerhafter Dateninterpretation von RFLP Ergebnissen zustande kamen.

Nach Vervollständigung der massenspektrometrischen Analyse blieben neun Genotypen, das entspricht ca. 0,2 % der insgesamt 4305 SNP Analysen, auch nach drei Wiederholungen

unbestimmbar. Der Grund dafür blieb bis zuletzt unklar. Da nur vier verschiedene SNPs betroffen waren und da die PCR in jedem dieser Fälle erfolgreich durchgeführt werden konnte, wurden unbekannte Variationen innerhalb der Primerhybridisierungssequenz vermutet, die ein Binden bzw. deren Verlängerung verhindern. Die Gesamt-Genotypisierungsrate für 287 Proben lag folglich über 99 % in drei von fünf Assays und war sogar 100 % in zwei Assays, was die hohe technische Zuverlässigkeit bestätigte (Meyer et al., 2004).

Eine ebenfalls untersuchte Anwendung der MALDI-TOF MS Analyse ist die molekulare Haplotyp-Analyse. Hinsichtlich der Definitionen von Haplotypen gab es bei *CYP2B6* noch gewisse Unklarheiten. Das Beispiel der alternativ möglichen Allel-Kombinationen *1/*7 oder *5/*6 bei einem heterozygoten Fall für drei SNPs (516G>T, 785A>G und 1459C>T) veranschaulicht dies.

Die Homologie zum Pseudogen stellte sich für die unter Kapitel 2.2.5 und 3.2.3 beschriebene Technik als problematisch dar, da es das *CYP2B6* zu großen PCR Fragmenten „zwingt“, die zwar in 50 % der getesteten Proben im Agarose-Gel sichtbar waren, dennoch aber in der Primerverlängerungsreaktion zu inkonsistenten Resultaten führten. Das bedeutet, dass innerhalb einer Probe beide unstimmgigen Haplotyp-Fälle auftreten konnten und die Ergebnisse damit nicht reproduzierbar waren. Oder dass bei der Identifikation eines Haplotyps das bestätigende Pendant nicht detektiert werden konnte. Bei dem Beispiel *5/*6 würde das zum einen *5 auf dem einen Allel und *6 auf dem anderen Allel darstellen, wofür die betreffenden SNPs in homozygoten Massenspektren als gegenseitige Kontrolle auftreten sollten. Es wurden außerdem hohe Ausfallraten innerhalb der Replikate beobachtet. Aufgrund der hohen Verdünnung und dem daraus resultierenden kleinen Konzentrationsfenster zur Detektion von SNPs eines einzigen DNA-Moleküls waren meist weniger als ein Drittel der Proben korrekt bestimmbar. Dies lässt sich möglicherweise auf die biologische Variabilität, zum Beispiel auf die Viskosität der DNA zurückführen. Eine Ausfallrate von bis zu 10 %, als auch eine „*haplotyping*“ Effizienz zwischen 40 und 45 % wurde auch schon bei anderen Arbeitsgruppen festgestellt (Ding und Cantor, 2003). Jedoch wurden hier nur Amplifikationsfragmente von ~100 bp generiert, was die Wahrscheinlichkeit von Strangbrüchen in der DNA erheblich verringert. Das Design der Amplifikationen in dieser Arbeit war auf die höchste Spezifität für das *CYP2B6*-Gen ausgerichtet. Deshalb ist es möglich, dass sich durch die im Vergleich großen Fragmente (bis zu 744 bp) die

Wahrscheinlichkeit der Strangbrüche erhöhten und damit die Amplifikation und die Detektion verfälschten bzw. verhinderten.

4.4 Einfluss nicht-genetischer Faktoren auf die Expression und Funktion von CYP2B6

Der Beitrag nicht-genetischer Faktoren, also der Einfluss von Alter, Geschlecht, Medikation etc. auf die interindividuelle Variabilität in der CYP2B6 Expression als auch der der Enzymaktivität war in wenigen vorherigen Arbeiten untersucht und diskutiert worden (Hesse et al., 2004; Lamba et al., 2003). Die in dieser Arbeit für Assoziations-Analysen eingeschlossenen Proben wiesen keine Krankheiten wie Leberzirrhose, virale Hepatitis oder Hepatome auf, was die Stoffwechselfähigkeit der Leber verändern könnte. Anhand dieser histologisch „normalen“ Gewebeproben konnte die relative Proteinquantifizierung sowie die Enzymaktivität als Bupropion-Hydroxylierung auf insgesamt 235 Proben vervollständigt werden, für die dann alle Geno- und Phänotypdaten vorlagen. Die zum Teil wiederholten Analysen stimmten mit früheren Resultaten (Lang et al., 2001; Saussele et al., 2007) gut überein. An diesem größten bisher untersuchten Probenset ergab sich eine 360fache Variabilität in der Expression (0,5 bis 180 pmol CYP2B6/mg mikrosomales Protein) und eine 245fache Variabilität in der Enzymaktivität (5,6 bis 1370 pmol/mg/min). Die Variabilität für CYP2B6 liegt damit wesentlich höher als bisher angenommen (Gervot et al., 1999; Stresser et al., 1999). In dieser Arbeit wurde jedoch eine größere Population untersucht (Erhöhung der Variabilität) sowie methodisch andere (monoklonale) Antikörper, sensitivere Detektionsverfahren und spezifischere Substrate verwendet, die diesen Unterschied mit erklären können.

Männer und Frauen unterscheiden sich in Bezug auf Körpergröße, Fettanteil und Muskelmasse deutlich voneinander, was auf geschlechtsspezifische Unterschiede im metabolischen System hindeutet. Im Falle des CYP3A4 konnte dies in einer erhöhten Expression bei Frauen im Vergleich zu Männern beobachtet werden (Wolbold et al., 2003). Lamba et al. beschrieben anhand einer *in vitro*-Studie im Jahr 2003 eine augenscheinlich ethnisch-abhängige Geschlechtsassoziation mit einer 1,6fach erhöhten CYP2B6-Expression und einer 1,7fach erhöhten S-Mephenytoin-N-Demethylaseaktivität bei Frauen (Lamba et al., 2003). In dieser Arbeit wurde in Bezug auf CYP2B6 zwar eine ca. 20 %-ige Erhöhung in der Expression und Enzymaktivität bei Frauen beobachtet, jedoch ergab diese Beobachtung keine

statistische Signifikanz. Dieser Effekt kommt durch die sehr hohe Variabilität innerhalb der zu vergleichenden Gruppen zustande.

Dieser Gegensatz zu den dort beschriebenen Daten zeigt sich schon in der Art der Aktivitätsmessung, für die in dieser Arbeit das selektivere und spezifischere Substrat Bupropion für die CYP2B6 Enzymaktivität verwendet wurde. Außerdem wurde hier nach gesunden Kontrollen stratifiziert. Diese Daten stimmen mit Arbeiten von Hesse et al. (2004) und Lang et al. (2001) überein, in der die Expression von CYP2B6 und die Bupropion-Hydroxylaseaktivität in humanen Lebermikrosomen untersucht wurden und in denen ebenfalls kein Unterschied zwischen Männern und Frauen beobachtet wurde (Hesse et al., 2004; Lang et al., 2001).

Es ist bekannt, dass die hepatische Aktivität sich mit dem Alter verändert und bei Kindern zwischen einem und vier Jahren erhöht ist (Hoody et al., 2003). Belegt werden kann dies durch die ebenfalls erhöhte *Clearance* mancher CYP Substrate wie Warfarin (Takahashi et al., 2000), Antipyrin (Murry et al., 1995), Nelfinavir (Bergshoeff et al., 2003; Floren et al., 2003) oder Efavirenz (Saitoh et al., 2007). Dafür sprechen auch Daten, bei denen eine Verringerung der Bupropion-*Clearance* um 20 % in älteren Patienten im Vergleich zu jungen beobachtet wurde (Sweet et al., 1995), was sich durch eine Verminderung der Stoffwechselfunktion (häufigeres Auftreten von Niereninsuffizienz) in dieser Altersgruppe erklären lässt.

Bezüglich des Alters und dessen Einfluss auf die CYP2B6 Expression stehen aus früheren Studien kaum Daten zur Verfügung. Eine altersabhängige Analyse in dieser Arbeit zeigte eine Ungleichverteilung der Altersgruppen hin zu älteren Individuen (das mittlere Alter lag bei 58 Jahren), was eine auf eine ideale homogene Population ausgerichtete Analyse schwierig machte. Die Mehrzahl der Individuen war zwischen 60 und 70 Jahre alt, jüngere Patienten unter 10 Jahren waren nur zu 1,6 % vertreten. Unter Einschluss aller Proben sowie bei Stratifikation nach Kontrollen (ohne Medikation und Wildtyp-Genotyp) war in dieser Arbeit keine Altersabhängigkeit des CYP2B6 Phänotyps zu beobachten.

Ein Einfluss von verschiedenen Nahrungsergänzungen wie Nikotin, Alkohol, Kaffee oder ähnlichem konnte in dieser Studie ebenso nicht festgestellt werden (Hoffmann et al., 2008). Diese Ergebnisse stehen in Kontrast zu zwei Arbeiten von Miksys et al. (2003) und Hesse et al. (2004). Hier wurde zwar eine Korrelation zwischen dem CYP2B6 Gehalt und dem Konsum von Zigaretten sowie Alkohol beschrieben, jedoch war dieser Effekt bei beiden Studien auch nur geringfügig. Von Miksys et al. (2003) wurden höhere CYP2B6 Proteinwerte im Gehirn in Assoziation mit Alkoholmissbrauch festgestellt, jedoch wurde auch eine

Überlappung zwischen Alkohol- und Zigarettenkonsum beschrieben, sowie nur zwei Proben als Kontrolle verwendet. Hesse et al., zeigten den Einfluss von Nikotin nur auf CYP2B6 mRNA-Ebene, nicht auf den Proteingehalt oder die Bupropion-Hydroxylierung. Somit konnte ein Effekt von Nahrungsergänzungen auf die CYP2B6 Expression als auch die Aktivität nur im Hinblick auf Alkoholgebrauch und hier eher bei Missbrauch (mehr als 14 Drinks/Tag) beschrieben werden.

Eine Medikamenteneinnahme kann ebenso den CYP2B6 Phänotyp verändern. Medikamenteninteraktionen aufgrund der Induktion von CYP2B6 sind bislang wenig beschrieben. CYP2B6 kann durch unterschiedliche Medikamente induziert werden, was teilweise über die nukleären Rezeptoren PXR („*pregnane X receptor*“) oder CAR („*constitutive androstane receptor*“) vermittelt wird (Wang et al., 2003). Eine im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Kooperation mit der Genotypisierung als Grundlage ermöglichte die Korrelation pharmakokinetischer Daten zu Bupropion (und seiner Metabolite) mit spezifischen CYP2B6 Allelen und einem möglichen Induktionseffekt durch Rifampin. Es konnte hier zum einen eine erhöhte Bupropion-Clearance durch die Gabe von Rifampin an gesunden Freiwilligen gezeigt werden. Zum anderen wurden Unterschiede sowohl in der Bupropion-Clearance als auch im Verhältnis Hydroxy-Bupropion AUC zu Bupropion AUC in Stratifikation zum Genotyp beobachtet (*6/*6; *1/*4; Loboz et al., 2006). Diese Daten müssen jedoch als vorläufige Beobachtungen interpretiert werden, da die Gruppe der Studienteilnehmer mit verschiedenen Genotypen insgesamt relativ klein war (n=18).

Für andere ebenfalls in Kooperation untersuchten Patientenproben konnte außerdem ein Effekt des Induktors Carbamazepin auf die CYP2B6 Expression beobachtet werden (Desta et al., 2007). Dieser Effekt konnte auch an der hier untersuchten Probensammlung gezeigt werden. Zwei Proben zeigten eine mediane Proteinexpression von 85 pmol/mg Protein, die im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant erhöht waren (P=0,017) sowie eine Bupropion-Hydroxylaseaktivität von 942 pmol/mg/min (P=0,078). In der Literatur wurde bereits 1995 von Ketter et al. beschrieben, dass das Antiepileptikum Carbamazepin den Metabolismus von Bupropion induziert und die Spitzen-Plasma-Konzentrationen von Bupropion um 87 % reduziert. Der Einfluss des Carbamazepins wird über den PXR/CAR-Weg postuliert (Wang et al., 2003) und war schon oft nützlich, um Arzneimittelinteraktionen mit unerwartet hoher Aktivität zu erklären. Klinische Beweise belegen zudem, dass solche Medikamente (Carbamazepin, Phenytoin, Rifampin) die Elimination anderer Arzneistoffe (wie zum Beispiel Efavirenz in der Anti-HIV Therapie) verstärken (Lopez-Cortes et al., 2002; Robertson et al., 2005).

Ein weiterer Induktionseffekt konnte in neun mit dem Analgetikum Metamizol behandelten Patienten beobachtet werden. Die Proteinexpression war hier im Vergleich zum Wildtyp 3,8fach, die Enzymaktivität 2,9fach erhöht ($P < 0,001$ und $P < 0,01$). Mit Hilfe der Genotypisierung dieser Leberproben und dann auch primärer Hepatozyten wurde bei Individuen mit zwei Wildtyp-Allelen eine 2,5fach bzw. 3,5fach erhöhte Proteinexpression und Bupropion-Hydroxylaseaktivität im Vergleich zu Proben mit einem (oder zwei) proteinverändernden Allelen (*5 und *6) festgestellt. Die mutierten Proben mit geringer basaler RNA Expression zeigten im Vergleich zum Wildtyp eine 2fach erhöhte relative Induktion der RNA Expression durch Metamizol, was darauf hindeutet, dass der Genotyp die Induzierbarkeit nicht in verändernder Weise beeinflusst. Zusätzlich konnte mit Hilfe von Reporter-Gen-Assays postuliert werden, dass Metamizol als nicht-direkter PXR/CAR-Ligand fungiert (Saussele et al., 2007). Der genaue Mechanismus der Induktion durch Metamizol ist allerdings noch nicht vollständig geklärt.

4.5 Polymorphismen als Ursache für eine variable Expression und/oder Funktion von CYP2B6 ?

Ein Ziel dieser Arbeit war, den Einfluss von genetischen Varianten des *CYP2B6* auf die Enzymfunktion zu beziehen. Seit der ersten Identifikation von solchen genetischen Varianten im Jahre 2001 (Lang et al., 2001; Ariyoshi et al., 2001) wurden viele weitere Polymorphismen, die die *CYP2B6* Expression und/oder Funktion beeinflussen, gefunden. Dies führte zu verbesserten Genotyp-Phänotyp Assoziationen. Die Analyse des hier verwendeten Probensets steigerte im Vergleich zu früheren Arbeiten mit geringeren Probenzahlen die statistische Aussagekraft für einzelne Genotypen und Allele. Zudem bestätigte sie einen signifikant reduzierten Proteingehalt und Enzymaktivität in Individuen mit *6/*6-Genotyp verglichen zum Wildtyp (publiziert in Desta et al., 2007). Das *CYP2B6**6 Allel ist höchst relevant, da es mit einer hohen Frequenz in verschiedenen Populationen auftritt; von 14 % in Koreanern über ~25 % in Kaukasiern, 40 % in West Afrikanern und Chinesen bis hin zu 62 % bei den Einwohnern von Papua Neu Guinea (Cho et al., 2004; Lang et al., 2001; Lamba et al., 2003; Klein et al., 2005; Mehlotra et al., 2006). In der ersten Studie, die die Existenz dieses Allels beschrieb, waren die in die Analyse eingeschlossenen drei homozygoten *6/*6 Proben mit signifikant erniedrigter S-Mephenytoin N-Demethylase-Aktivität, nicht jedoch mit einer Veränderung der Proteinexpression assoziiert, möglicherweise aufgrund der geringen Probenanzahl (Lang et al., 2001). Eine ähnliche

Beobachtung wurde von Hesse et al. (2004) gemacht, bei der ebenfalls eine erhöhte Frequenz des *6B Allels in Trägern mit geringer Aktivität festgestellt wurde, jedoch zeigte sich hier keine Auswirkung auf die *CYP2B6* mRNA oder das resultierende Protein. Eine im Jahr 2006 veröffentlichte *in vivo* Studie stellte eine Beziehung zwischen dem *CYP2B6* Genotyp und der Bupropionkinetik in gesunden Probanden her. Im Allgemeinen ließen sich keine Unterschiede in der Bupropion-Clearance und dem Verhältnis der AUCs von Hydroxy-Bupropion zu Bupropion in einzelnen Proben im Hinblick auf den Genotyp zeigen. Es war also kein signifikanter Effekt des *6 Allels auf die Bupropionkinetik nachweisbar, auch wenn ein Trend hin zu niedriger Aktivität zu verzeichnen war. Es sollte allerdings berücksichtigt werden, dass hier nur eine sehr geringe Zahl an Individuen mit unterschiedlichen Genotypen untersucht wurden (n=18; Loboz et al., 2006).

Die hier vorgestellten Daten stehen im Gegensatz zu den bisher genannten Studien, jedoch in Einklang mit anderen Arbeiten, die bereits einen Trend hin zu einem Einfluss dieses Allels auf die Proteinexpression darstellen konnten (Xie et al., 2003). Ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit war der hier erstmals beschriebene Einfluss des *6 Allels auf die Proteinexpression bis zu vierfach weniger Protein in homozygoten wie heterozygoten Trägern im Vergleich zu Trägern des Referenz-Allels. Die Analysen mit der Gesamtzahl von 235 Proben dieser Studie (IKP148) zeigten jedoch interessanterweise keine Veränderung der spezifischen Aktivität der Bupropion-Hydroxylierung in Individuen mit *1/*6 und *6/*6 Genotyp, was zu der Annahme führte, dass die Aminosäure-Austausche [Q172H und K262R] nicht den Haupteinfluss auf die *CYP2B6* Enzymfunktion ausüben. Es konnte in der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass der hepatische mRNA Gehalt bei *6 Trägern ebenfalls signifikant reduziert war, was einen prätranslationalen Mechanismus hinter dieser verminderten Expression vermuten ließ (Hofmann et al., 2008). Daher wurde die Möglichkeit eines Einflusses des Promotor SNP -750T>C am Probenkollektiv untersucht. Dieser SNP ist in einem Kopplungsungleichgewicht mit dem *6 Allel verbunden, aber auch in vielen anderen wie das des Wildtyp (*1)-Allels. Es wurde bereits 2003 postuliert, dass er möglicherweise eine HNF1 α -Bindestelle zerstört und deshalb zu einer verminderten Expression führt (Lamba et al., 2003). Jedoch wurden auch mit dem in dieser Arbeit verwendeten größeren Probenset keine signifikanten Unterschiede in der Expression in Bezug auf den -750T>C Polymorphismus gefunden. Dieses Ergebnis stimmte mit dem einer früheren Untersuchung des *6B Haplotyps mittels Reporter-gen-Konstrukten überein, der zusätzlich den SNP -1456C>T beinhaltet und mit dem keine funktionelle Veränderung in Ratten- bzw. humanen Hepatozyten gegenüber dem Wildtyp assoziiert werden konnte. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass -750T>C keinen Einfluss auf die

Transkription hat. Die erst kürzlich publizierte Beobachtung einer japanischen Arbeitsgruppe, dass ein Haplotyp mit dem -750T>C Polymorphismus (nicht aber mit dem *6 Allel) mit erniedrigter Cyclophosphamid-4-Hydroxylierung in Krebspatienten assoziiert war, könnte mit bislang unbekanntem Polymorphismen in japanischen Individuen in Verbindung gebracht werden, die in *Linkage Disequilibrium* mit -750T>C stehen (Nakayama et al., 2007).

Weitere Analysen unserer Arbeitsgruppe trugen mit Hilfe von „*Minigene*“-Konstrukten, die in eukaryotische Zelllinien transfiziert wurden, letztendlich zur Klärung des Mechanismus des *6 Allels bei. Der kausale Polymorphismus im *6-Allel ist 516G>T. Er ist verantwortlich für eine starke Zunahme des „abnormalen Splicens“, bei dem hauptsächlich eine bestimmte „*Splice*“ Variante (SV1) entsteht, der die Exons vier bis sechs komplett fehlen. Dies führt letztendlich zu einer reduzierten Menge funktioneller mRNA, Protein und Aktivität (Hofmann et al., 2008). Die in dieser Arbeit durchgeführte Genotypisierung und Phänotypisierung der Leberbank stellte die Grundlage für die weiterführenden Untersuchungen dar (Hoffmann et al., 2008).

Eine merkliche Reduzierung der CYP2B6 Funktion wurde außerdem in Individuen beobachtet, die die seltene Variante *15 trugen (Genotyp *1/*15 und *5/*15). Diese Variante war bereits durch rekombinante Expression als phänotypisches Nullallel charakterisiert worden (Lang et al., 2004). Darüber hinaus waren auch Träger des *5 Allels sowohl mit einer reduzierten CYP2B6 Expression als auch Funktion assoziiert, was ebenfalls in Übereinstimmung mit früher publizierten Analysen war (Lang et al., 2001). Im Gegensatz dazu stand das *22 Allel (Promotorpolymorphismus -82T>C), für das eine signifikante Erhöhung der Bupropionhydroxylaseaktivität nachweisbar war. Dies stimmt mit den Daten von Zukunft et al. überein, die mit diesem Polymorphismus eine gesteigerte Transkription durch Nutzung einer alternativen TATA-Box verbanden (Zukunft et al., 2005).

4.6 Prädiktivität der CYP2B6 Allele für die HIV-Therapie

Entsprechend zum Bupropion konnte bereits von Tsuchiya et al. (2004) in einer der ersten Studien mit HIV-Patienten (n=35) gezeigt werden, dass homozygote Träger der *6-Mutation signifikant erhöhte Plasmaspiegel des Reverse-Transkriptase-Hemmers Efavirenz hatten, welches durch CYP2B6 metabolisiert wird. Demnach muss eine genotyp-basierte Assoziation zum Efavirenz-Metabolismus bestehen. Seitdem wurden mehrere Studien mit diesem Hintergrund durchgeführt, die alle ein ähnliches Ergebnis aufzeigten (Zanger et al., 2007).

In einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Desta et al. wurden 87 humane Lebermikrosomen-Proben (IKP148) dahingehend untersucht. Der hauptsächliche Metabolisierungsschritt der 8-Hydroxylierung von Efavirenz korrelierte signifikant mit der CYP2B6 Proteinexpression (Desta et al., 2007). Stratifiziert nach den *CYP2B6* Genotypen, war sowohl die Proteinexpression als auch die Aktivität und die Efavirenz-8-Hydroxylierung in Proben mit einem oder zwei *6 Allelen signifikant niedriger als in Proben mit dem *1 Genotyp. Diese Resultate erklären damit die beobachtete *in vivo*- Korrelation zwischen dem *6 Allel und erhöhten Efavirenz Plasmaspiegeln (Haas et al., 2004; Rotger et al., 2005; Wang et al., 2006).

Die umfassende Genotypisierung des *CYP2B6* ermöglichte in Kooperation mit der Swiss HIV Arbeitsgruppe eine Folgestudie zu HIV-Patienten, die Efavirenz als Therapie erhielten und deren Genotyp in Korrelation zu Plasmaspiegeln analysiert wurde. Zum ersten Mal wurde eine umfassende Analyse durchgeführt, die neben dem *6-Allel auch seltenere „*loss-of-function*“ Allele mit einschloss, die die Prädiktivität für unerwartet hohe EFV Plasmaspiegel erheblich erhöhen (Rotger et al., 2007). In deren Verlauf konnte zum Beispiel eine erhöhte Efavirenz-Konzentration durch das *18 Allel [983T>C] erklärt werden, das mit einer Frequenz von 4-10 % in Individuen afrikanischer und türkischer Herkunft identifiziert wurde (Klein et al., 2005; Wang et al., 2006; Mehlotra et al., 2007). Zwei durch Resequenzierung neu entdeckte Allele [*27 und *28] des *CYP2B6* Gens konnten zusätzlich dazu beitragen, den erhöhten Medikamentenpegel in einzelnen Patienten mit hohen Efavirenzkonzentrationen zu erklären. Ebenso war ein Trend zu niedrigeren Plasmaspiegeln in Assoziation mit den Allelen *4 und *22 zu beobachten, was die Fälle von Patienten, deren Therapie versagte, erklären könnte (Rotger et al., 2007).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zur Assoziation mit der *CYP2B6* Variante *6 sowohl mit erniedrigter Proteinexpression und Efavirenz-Hydroxylierung *in vitro* (Desta et al., 2007) als auch im klinischen Umfeld der Efavirenz-Therapie (Rotger et al., 2007) eindrucksvoll belegen. Zusätzlich kristallisierten sich hier bekannte, seltene und neu identifizierte Allele heraus, die ebenfalls zu einem veränderten *CYP2B6* Phänotyp und damit zu einem veränderten Therapieansprechen führen können. Solche prädiktiven Daten unterstreichen den Wert der umfassenden *CYP2B6* Genotypisierung für eine Anpassung der Medikamentendosis, um Nebenwirkungen und gleichzeitig den Ausbruch von AIDS zu vermeiden (Gatanaga et al., 2007).

4.7 *CYP2B6* Polymorphismen und Morbus Parkinson (Umweltfaktoren)

CYP2B6 metabolisiert eine Reihe von Medikamenten, aber auch in der Umwelt vorkommende chemische Substanzen, die in Bezug auf neurotoxische Wirkungen relevant sein können. Zum Beispiel wurde das Nikotin als Schutz gegen dopaminerge neuronale Degeneration beschrieben (Quik et al., 2004). Da es bekannt ist, dass Morbus Parkinson durch Umwelteinflüsse verursacht oder zumindest verstärkt werden kann, könnte *CYP2B6* in diesem Zusammenhang ein modulierender Faktor in der Entwicklung von Morbus Parkinson sein (Hodgson et al., 2007).

In dieser Arbeit wurde eine große Population von 185 italienischen Patienten und Kontrollen für die relevanten *CYP2B6* SNPs analysiert und auf eine mögliche Frequenzverschiebung einzelner Varianten untersucht. Die hier beschriebene Untersuchung hinsichtlich der Allel- und Genotypfrequenzen der *CYP2B6* Polymorphismen an dieser Probenammlung war vergleichbar mit denen anderer europäischer Populationen (Lang et al., 2004). Die Frequenzdaten im Vergleich von Patienten und Kontrollen zeigten leichte Erhöhungen der Odds Ratio (ORs; Chancen-Verhältnisse) bei einigen SNPs, doch diese Tendenzen waren statistisch nicht signifikant. Ein Anstieg der OR (zum Beispiel bei der 136G Variante), zeigten zwar einen Trend zu einem höheren Risiko, früher an PD zu erkranken, jedoch lassen sich diese Resultate meist durch die kleine Probenanzahl der „*early-onset*“ PD Gruppe (PD <50 Jahren), erklären. Eine gegenteilige Assoziation zu einem geringeren Risiko, man könnte fast sagen hin zu einer gewissen Protektivität durch einen SNP in Exon 3 (415G) konnte in der Gruppe der früh Erkrankten gezeigt werden. Jedoch hielten diese Ergebnisse einem Vergleich zwischen der gesamten Patientengruppe und den Kontrollen nicht stand. Ebenso veränderte sich die Frequenz des *6 Allels nicht zwischen den Gruppen. Trotz der Kenntnis, dass in früheren Studien signifikante Assoziationen zwischen Polymorphismen in Enzymen des Arzneimittelstoffwechsels und PD festgestellt wurden (zum Beispiel *CYP2D6*; Herraiz et al., 2007), waren diese Assoziationsstudien zwischen *CYP2B6* Polymorphismen und PD insgesamt negativ. Es ist eindeutig, dass *CYP2B6* wichtig im Stoffwechsel von vielen potentiell neurotoxischen Substanzen ist und es lag daher nahe, enzymverändernde Variationen im verantwortlichen Gen zu untersuchen. Doch bevor weitere solcher Untersuchungen begonnen werden, sollten in einer entsprechenden Studie detaillierte klinische Dokumentationen gesammelt werden. Spezielle zusätzliche Informationen, die einen möglichen Kontakt mit Chemikalien der Industrie, der Landwirtschaft und den

Schmutzstoffen des täglichen Lebens belegen, könnten in Kombination mit dem Genotyp die Analyse der Prädisposition zu der Krankheit ermöglichen.

Zusammenfassend kann zu dieser Arbeit gesagt werden, dass eine hochdurchsatzfähige, sensitive und hochspezifische MALDI-TOF MS Genotypisierungsmethode für alle bekannten, häufigen und funktionell relevanten Polymorphismen des *CYP2B6* Gens entwickelt und etabliert wurde. Diese Basis ermöglichte die Genotypisierung großer Studienpopulationen, sowie die Erweiterung des Kenntnisstandes zu Polymorphismus-Frequenzen, enzymmodulierenden Faktoren und phänotypischen Auswirkungen. Verschiedene Studien mit klinischem Hintergrund konnten die Prädiktivität des Phänotyps durch Korrelation auch mit seltenen und neuen Genvarianten erhöhen. Solche Informationen sind für die klinische Zukunft essentiell, um die Pharmakotherapie zu verbessern und Medikamente gezielter einzusetzen.

5 LITERATURVERZEICHNIS

Ariyoshi,N., Miyazaki,M., Toide,K., Sawamura,Y., and Kamataki,T. (2001). A single nucleotide polymorphism of CYP2b6 found in Japanese enhances catalytic activity by autoactivation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 1256-1260.

Bergshoeff,A.S., Fraaij,P.L., van Rossum,A.M., Wolfs,T.F., Geelen,S.P., de Groot,R., Burger,D.M. (2003). Pharmacokinetics of nelfinavir in children: influencing factors and dose implications. *Antivir Ther.* 8, 215-22.

Bernard,P., Gabant,P., Bahassi,E.M., Couturier,M. (1994). Positive-selection vectors using the F plasmid ccdB killer gene. *Gene.* 148, 71-4.

Blievernicht,J.K., Schaeffeler,E., Klein,K., Eichelbaum,M., Schwab,M., and Zanger,U.M. (2007). MALDI-TOF mass spectrometry for multiplex genotyping of *CYP2B6* single-nucleotide polymorphisms. *Clin Chem* 53, 24-33.

Bray,M.S., Boerwinkle,E., Doris,P.A. (2001). High-throughput multiplex SNP genotyping with MALDI-TOF mass spectrometry: practice, problems and promise. *17*, 296-304.

Buetow,K.H., Edmonson,M., MacDonald,R., Clifford,R., Yip,P., Kelley,J. (2001). High-throughput development and characterization of a genomewide collection of gene-based single-nucleotide polymorphism markers by chip-based matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98, 581-4.

Chang,T.K., Weber,G.F., Crespi,C.L., and Waxman,D.J. (1993). Differential activation of cyclophosphamide and ifosfamide by cytochromes P-450 2B and 3A in human liver microsomes. *Cancer Res.* 53, 5629-5637.

Cho,J.Y., Lim,H.S., Chung,J.Y., Yu,K.S., Kim, J.R., Shin,S.G., Jang,I.J. (2004). Haplotype structure and allele frequencies of CYP2B6 in a Korean population. *Drug Metab Dispos.* 32, 1341-4.

Clarke,T.A. and Waskell,L.A. (2003). The metabolism of clopidogrel is catalyzed by human cytochrome P450 3A and is inhibited by atorvastatin. *Drug Metab Dispos.* 31, 53-59.

Court MH, Duan,S.X., Hesse,L.M., Venkatakrishnan,K., and Greenblatt,D.J. (2001). Cytochrome P-450 2B6 is responsible for interindividual variability of propofol hydroxylation by human liver microsomes. *Anesthesiology* 94, 110-119.

Desta,Z. Saussele,T., Ward,B.A., Blievernicht,J., Li,L. (2007). Impact of *CYP2B6* polymorphism on hepatic efavirenz metabolism in vitro. *Pharmacogenomics.* 8, 547-58.

Ding,C., Cantor,C.R. (2003). Direct molecular haplotyping of long-range genomic DNA with M1-PCR. *PNAS* 13, 7449-7453.

Ehrich,M., Böcker,S., van den Boom,D. (2005). Multiplexed discovery of sequence polymorphisms using base-specific cleavage and MALDI-TOF MS. *Nucleic Acid Res.* 33, e38.

Eichelbaum,M. (1976). Drug metabolism in thyroid disease. *Clin Pharmacokinet* 1, 339-350.

- Eichelbaum,M., Ingelman-Sundberg,M., and Evans,W.E. (2006). Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annu. Rev Med* 57, 119-137.
- Ekins,S., VandenBranden,M., Ring,B.J., Gillespie,J.S., Yang,T.J., Gelboin,H.V., and Wrighton,S.A. (1998). Further characterization of the expression in liver and catalytic activity of CYP2B6. *J Pharmacol Exp. Ther.* 286, 1253-1259.
- Evans,W.E. and Relling,M.V. (1999). Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 286, 487-491.
- Faucette,S.R., Hawke,R.L., LeCluyse,E.L., Shord,S.S., Yan,B., Laethem,R.M., and Lindley,C.M. (2000). Validation of bupropion hydroxylation as a selective marker of human cytochrome P450 2B6 catalytic activity. *Drug Metab Dispos.* 28, 1222-1230.
- Faucette,S.R., Wang,H., Hamilton,G.A., Jolley,S.L., Gilbert,D., Lindley,C., Yan,B., Negishi,M., and LeCluyse,E.L. (2004). Regulation of CYP2B6 in primary human hepatocytes by prototypical inducers. *Drug Metab Dispos.* 32, 348-358.
- Faucette,S.R., Zhang,T.C., Moore,R., Sueyoshi,T., Omiecinski,C.J., LeCluyse,E.L., Negishi,M., and Wang,H. (2007). Relative activation of human pregnane X receptor versus constitutive androstane receptor defines distinct classes of CYP2B6 and CYP3A4 inducers. *J Pharmacol Exp Ther* 320, 72-80.
- Fischer,J., Schwab,M., Eichelbaum,M., Zanger,U.M. (2003). Mutational analysis of the human dihydropyrimidine dehydrogenase gene by denaturing high-performance liquid chromatography. *Genet Test* 7, 97-105.
- Floren,L.C., Wiznia,A., Hayashi,S., Jayewardene,A., Stanley,K., Johnson,G., Nachman,S., Krogstad,P., Aweeka,F.T., Pediatric AIDS Clinical Trials Group 377 Protocol Team. (2003) Nelfinavir pharmacokinetics in stable human immunodeficiency virus-positive children: Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 377. *Pediatrics.* 112, e220-7.
- Ford,G.E., Sensitivity of chi-square testing for incidence of a criterion in biology (1971). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 65, 400-2.
- Furuno,T., Landi,M.T., Ceroni,M., Caporaso,N., Bernucci,I., Nappi,G., Martignoni,E., Schaeffeler,E., Eichelbaum,M., Schwab,M., Zanger,U.M. (2002). Expression polymorphism of the blood-brain barrier component P-glycoprotein (MDR1) in relation to Parkinson's disease. *Pharmacogenetics.* 12,529-34.
- Futatsugawa,Y., Kubota,T., Ishiguro,A., Suzuki,H., Ishikawa,H., Iga,T. (2004). PCR-based haplotype determination to distinguish CYP2B6*1/*7 and *5/*6. *Clin Chem.* 50,1472-3.
- Garfinkel,D. (1958). Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch Biochem Biophys.* 77, 493-509.
- Gatanaga,H., Hayashida,T., Tsuchiya,K., Yoshino,M., Kuwahara,T., Tsukada,H., Fujimoto,K., Sato,I., Ueda,M., Horiba,M., Hamaguchi,M., Yamamoto,M., Takata,N., Kimura,A., Koike,T., Gejyo,F., Matsushita,S., Shirasaka,M., Kimura,S., Oka,S. (2007). Successful Efavirenz dose reduction in HIV Type 1-infected individuals with Cytochrome P450 2B6*6 and *26. *Clin Inf Dis,* 45, 1230-7.

- Gervot,L., Rochat,B., Gautier,J.C., Bohnenstengel,F., Kroemer,H., de,B., V, Martin,H., Beaune,P., and de,W., I (1999). Human CYP2B6: expression, inducibility and catalytic activities. *Pharmacogenetics* 9, 295-306.
- Ghebranious,N., Ivacic,L., Mallum,J., Dokken,C. (2005). Detection of ApoE E2, E3 and E4 alleles using MALDI-TOF mass spectrometry and the homogenous mass-extend technology. *Nucleic Acid Re.*33, e149.
- Gut,I.G. (2004). DNA analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Hum Mutat*, 23, 437-41.
- Haas,D.W., Ribaldo,H.J., Kim,R.B., Tierney,C., Wilkinson,G.R., Gulick,R.M., Clifford,D.B., Hulgán,T., Marzolini,C., and Acosta,E.P. (2004). Pharmacogenetics of efavirenz and central nervous system side effects: an Adult AIDS Clinical Trials Group study. *AIDS* 18, 2391-2400.
- Hanna,I.H., Reed,J.R., Guengerich,F.P., and Hollenberg,P.F. (2000). Expression of human cytochrome P450 2B6 in Escherichia coli: characterization of catalytic activity and expression levels in human liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 376, 206-216.
- Herraiz,T., Guillén,H., Galisteo,J. (2007). N-methyltetrahydro-beta-carboline analogs of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) neurotoxin are oxidized to neurotoxic beta-carbolinium cations by heme peroxidases. *Biochem Biophys Res Commun.* 356, 118-23.
- Hesse,L.M., Venkatakrisnan,K., Court MH, von Moltke,L.L., Duan,S.X., Shader,R.I., and Greenblatt,D.J. (2000). CYP2B6 mediates the in vitro hydroxylation of bupropion: potential drug interactions with other antidepressants. *Drug Metab Dispos.* 28, 1176-1183.
- Hesse,L.M., He,P., Krishnaswamy,S., Hao,Q., Hogan,K., von Moltke,L.L., Greenblatt,D.J., and Court MH (2004). Pharmacogenetic determinants of interindividual variability in bupropion hydroxylation by cytochrome P450 2B6 in human liver microsomes. *Pharmacogenetics* 14, 225-238.
- Hidestrand,M., Oscarson,M., Salonen,J.S., Nyman,L., Pelkonen,O., Turpeinen,M., and Ingelman-Sundberg,M. (2001). CYP2B6 and CYP2C19 as the major enzymes responsible for the metabolism of selegiline, a drug used in the treatment of Parkinson's disease, as revealed from experiments with recombinant enzymes. *Drug Metab Dispos.* 29, 1480-1484.
- Hodgson,E., Rose,R.L. (2007). The importance of cytochrome P450 2B6 in the human metabolism of environmental chemicals. *Pharmacol Ther.* 113, 420-8.
- Hofmann,M.H., Blievernicht,J.K., Klein,K., Saussele,T., Schäffeler,E., Schwab,M., Zanger,U.M. (2008). Aberrant Splicing Caused by Single Nucleotide Polymorphism c.516G>T [Q172H], a Marker of CYP2B6*6 and increased Efavirenz Plasma Concentration in HIV Patients. *Journal Pharmacol Exp Ther.* [Epub ahead of print].
- Hofmann,M.H. (2008): Dissertation at the University of Stuttgart: Microarray and Molecular Genetic Analysis of Aberrant Splicing in Human Drug Metabolizing Cytochromes P450 CYP2D6 und CYP2B6, eingereicht.

- Hoody,D.W., Fletcher,C.V. (2003). Pharmacology considerations for antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus (HIV)-infected children. *Semin Pediatr Infect Dis.* *14*, 286-94.
- Jacob,R.M., Johnstone,E.C., Neville,M.J., Walton,R.T. (2004). Identification of CYP2B6 sequence variants by use of multiplex PCR with allele-specific genotyping. *Clin Chem.* *50*,1372-7.
- Jinno,H., Tanaka-Kagawa,T., Ohno,A., Makino,Y., Matsushima,E., Hanioka,N., and Ando,M. (2003). Functional characterization of cytochrome P450 2B6 allelic variants. *Drug Metab Dispos.* *31*, 398-403.
- Ketter,T.A., Jenkins,J.B., Schroeder,D.H., Pazzaglia,P.J., Marangeli,L.B., George,M.S., Callahan,A.M., Hinton,M.L., Chao,J., Post,R.M. (1995). Carbamazepine but not valproate induces bupropion metabolism. *J Clin Psychopharmacol* *15*, 327-33.
- Kirchheiner,J., Klein,C., Meineke,I., Sasse,J., Zanger,U.M., Murdter,T.E., Roots,I., and Brockmoller,J. (2003). Bupropion and 4-OH-bupropion pharmacokinetics in relation to genetic polymorphisms in CYP2B6. *Pharmacogenetics* *13*, 619-626.
- Klein,K., Lang,T., Saussele,T., Barbosa-Sicard,E., Schunck,W.H., Eichelbaum,M., Schwab,M., and Zanger,U.M. (2005). Genetic variability of CYP2B6 in populations of African and Asian origin: allele frequencies, novel functional variants, and possible implications for anti-HIV therapy with efavirenz. *Pharmacogenet. Genomics* *15*, 861-873.
- Klingenberg,M. (1958). Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys.* *75*, 376-386.
- Krynetski,E. and Evans,W.E. (2003). Drug methylation in cancer therapy: lessons from the TPMT polymorphism. *Oncogene* *22*, 7403-7413.
- Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* *227*, 680-5.
- Lamba,V., Lamba,J., Yasuda,K., Strom,S., Davila,J., Hancock,M.L., Fackenthal,J.D., Rogan,P.K., Ring,B., Wrighton,S.A., and Schuetz,E.G. (2003). Hepatic CYP2B6 expression: gender and ethnic differences and relationship to CYP2B6 genotype and CAR (constitutive androstane receptor) expression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *307*, 906-922.
- Lang,T., Klein,K., Fischer,J., Nussler,A.K., Neuhaus,P., Hofmann,U., Eichelbaum,M., Schwab,M., and Zanger,U.M. (2001). Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver. *Pharmacogenetics* *11*, 399-415.
- Lang,T., Klein,K., Richter,T., Zibat,A., Kerb,R., Eichelbaum,M., Schwab,M., and Zanger,U.M. (2004). Multiple novel nonsynonymous CYP2B6 gene polymorphisms in Caucasians: demonstration of phenotypic null alleles. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *311*, 34-43.
- Lerman,C., Shields,P.G., Wileyto,E.P., Audrian,J., Pinto,A., Hawk,L. (2002). Pharmacogenetic investigation of smoking cessation treatment. *Pharmacogenetics.* *12*, 627-34.

- Li,H., Cui,X., Arnheim,N. (1990). Direct electrophoretic detection of the allelic state of single DNA molecules in human sperm by using the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87, 4580-4.
- Lin,H.L., Kent,U.M., and Hollenberg,P.F. (2005). The grapefruit juice effect is not limited to cytochrome P450 (P450) 3A4: evidence for bergamottin-dependent inactivation, heme destruction, and covalent binding to protein in P450s 2B6 and 3A5. *J Pharmacol Exp Ther* 313, 154-164.
- Loboz,K.K., Gross,A.S., Williams,K.M., Liauw,W.S., Day,R.O., Blievernicht,J.K., Zanger,U.M., McLachlan,A.J. (2006). Cytochrome P450 2B6 activity as measured Bupropion hydroxylation: Effect of induction by rifampin and ethnicity. *Clin Pharmacol Ther* 80, 75-84.
- López-Cortés,L.F., Ruiz-Valderas,R., Viciano,P., Alarcón-González,A., Gómez-Mateos,J., León-Jimenez,E., Sarasanacenta,M., López-Pua,Y., Pachón,J.. (2002). Pharmacokinetic interactions between efavirenz and rifampicin in HIV-infected patients with tuberculosis. *Clin Pharmacokinet.* 41, 681-90.
- McDonald,O.G., Krynetski,E.Y., Evans,W.E. (2002). Molecular haplotyping of genomic DNA for multiple single-nucleotide polymorphisms located kilobases apart using long-range polymerase chain reaction and intramolecular ligation. *Pharmacogenetics.* 12, 93-9.
- Mehlotra,R.K., Ziats,M.N., Bockarie,M.J., and Zimmerman,P.A. (2006). Prevalence of CYP2B6 alleles in malaria-endemic populations of West Africa and Papua New Guinea. *Eur J Clin Pharmacol* 62, 267-275.
- Mehlotra,R.K., Bockarie,M.J., and Zimmerman,P.A. (2007). CYP2B6 983T>C polymorphism is prevalent in West Africa but absent in Papua New Guinea: implications for HIV/AIDS treatment. *Br J Clin Pharmacol.* 64, 391-5.
- Mehta,N.B., Raleigh,N.C. (1974). Inventors, Burroughs Wellcome (now GlaxoSmithKline), assignee.Meta chloro substituted-a-butylaminopropiophenones. U.S. patent 3, 816, 709.
- Meyer,U.A. (2000). Pharmacogenetics and adverse drug reactions. *Lancet* 356, 1667-1671.
- Miksys,S., Lerman,C., Shields,P.G., Mash,D.C., and Tyndale,R.F. (2003). Smoking, alcoholism and genetic polymorphisms alter CYP2B6 levels in human brain. *Neuropharmacology* 45, 122-132.
- Miles,J.S., Spurr,N.K., Gough,A.C., Jowett,T., McLaren,A.W., Brook,J.D., and Wolf,C.R. (1988). A novel human cytochrome P450 gene (P450IIB): chromosomal localization and evidence for alternative splicing. *Nucleic Acids Res* 16, 5783-5795.
- Mimura,M., Baba,T., Yamazaki,H., Ohmori,S., Inui,Y., Gonzalez,F.J., Guengerich,F.P., and Shimada,T. (1993). Characterization of cytochrome P-450 2B6 in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* 21, 1048-1056.
- Murry,D.J., Crom,W.R., Reddick,W.E., Bhargava,R., Evans,W.E. (1995). Liver volume as a determinant of drug clearance in children and adolescents. *Drug Metab Dispos.* 23, 1110-6.

- Nakai,K., Habano,W., Fujita,T., Nakai,K., Schnackenberg,J., Kawazoe,K. (2002). Highly multiplexed genotyping of coronary disease-associated SNPs using MALDI-TOF mass spectrometry. *Hum Mutat.* 20, 133-8.
- Nakajima,M., Komagata,S., Fujiki,Y., Kanada,Y., Ebi,H., Itoh,K., Mukai,H., Yokoi,T., Minami,H. (2007). Genetic polymorphisms of CYP2B6 affect the pharmacokinetics/pharmacodynamics of cyclophosphamide in Japanese cancer patients. *Pharmacogenet Genomics.* 17, 431-45.
- Neitlich,H.W. (1966). Increased plasma cholinesterase activity and succinylcholine resistance: a genetic variant. *J Clin Invest.* 45, 380-7.
- Nelson,D.R., Zeldin,D.C., Hoffman,S.M., Maltais,L.J., Wain,H.M., Nebert,D.W. (2004). Comparison of Cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse und human genomes, including nomenclature recommendation for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics.* 14, 1-18.
- Omura,T. and Sato,R. (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver Microsomes. I. evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 239, 2370-2378.
- Phillips,K.A., Veenstra,D.L., Oren,E., Lee,J.K., and Sadee,W. (2001). Potential role of pharmacogenomics in reducing adverse drug reactions: a systematic review. *JAMA* 286, 2270-2279.
- Pusch,W., Wurmbach,J.H., Thiele,H., Kostrzewa,M. (2002). MALDI-TOF mass spectrometry-based SNP genotyping. *Pharmacogenomics,* 3, 537-48.
- Quik,M. (2004). Smoking, nicotine and Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 27, 561-568.
- Rendic,S. (2002). Summary on information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metab Rev.* 34, 83-448.
- Richter,T., Murdter,T.E., Heinkele,G., Pleiss,J., Tatzel,S., Schwab,M., Eichelbaum,M., and Zanger,U.M. (2004). Potent mechanism-based inhibition of human CYP2B6 by clopidogrel and ticlopidine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308, 189-197.
- Robertson,S.M., Penzak,S.R., Lane,J., Pau,A.K., Mican,J.M. (2005). A potentially significant interaction between efavirenz and phenytoin: a case report and review of the literature. *Clin Infect Dis.* 41, e15-8.
- Rodriguez-Novoa,S., Barreiro,P., Jimenez-Nacher,I., Rendon,A., and Soriano,V. (2005). Pharmacogenetics in HIV therapy. *AIDS Rev* 7, 103-112.
- Ross,P., Hall,L., Smirnov,I., Haff,L. (1998). High level multiplex genotyping by MALDI-TOF mass spectrometry. *Nat Biotechnol,* 16, 1347-51.
- Rotger,M., Colombo,S., Furrer,H., Bleiber,G., Buclin,T., Lee,B.L., Keiser,O., Biollaz,J., Decosterd,L., and Telenti,A. (2005). Influence of CYP2B6 polymorphism on plasma and intracellular concentrations and toxicity of efavirenz and nevirapine in HIV-infected patients. *Pharmacogenet. Genomics* 15, 1-5.

- Rotger,M., Tegude,H., Colombo,S., Cavassini,M., Furrer,H., Decosterd,L., Bliedernicht,J., Saussele,T., Gunthard,H.F., Schwab,M., Eichelbaum,M., Telenti,A., and Zanger,U.M. (2007). Predictive value of known and novel alleles of CYP2B6 for efavirenz plasma concentrations in HIV-infected individuals. *Clin Pharmacol Ther* 81, 557-566.
- Roy,P., Yu,L.J., Crespi,C.L., and Waxman,D.J. (1999). Development of a substrate-activity based approach to identify the major human liver P-450 catalysts of cyclophosphamide and ifosfamide activation based on cDNA-expressed activities and liver microsomal P-450 profiles. *Drug Metab Dispos* 27, 655-66.
- Ruano,G., Kidd,K.K., Stephens,J.C. (1990). Haplotype of multiple polymorphisms resolved by enzymatic amplification of single DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87, 6296-300.
- Saitoh,A., Fletcher,C.V., Brundage,R., Alvero,C., Fenton,T., Hsia,K., Spector,S.A. (2007). Efavirenz pharmacokinetics in HIV-1-infected children are associated with CYP2B6-G516T polymorphism. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 45, 280-5.
- Saussele,T., Burk,O., Bliedernicht,J.K., Klein,K., Nussler,A., Nussler,N., Hengstler,J.G., Eichelbaum,M., Schwab,M., and Zanger,U.M. (2007). Selective Induction of Human Hepatic Cytochromes P450 2B6 and 3A4 by Metamizole. *Clin Pharmacol Ther*.
- Shimada,T., Yamazaki,H., Mimura,M., Inui,Y., and Guengerich,F.P. (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.
- Solus,J.F., Arietta,B.J., Harris,J.R., Sexton,D.P., Steward,J.Q., McMunn,C., Ihrle,P., Mehall,J.M., Edwards,T.L., and Dawson,E.P. (2004). Genetic variation in eleven phase I drug metabolism genes in an ethnically diverse population. *Pharmacogenomics*. 5, 895-931.
- Stanssens,P., Zabeau,M., Meersseman,G., Remes,G., Gansemans,Y., Storm,N. (2004). High-throughput MALDI-TOF discovery of genomic sequence polymorphisms. *Genome Res*. 14, 126-33.
- Steimer,W., Zopf,K., von,A.S., Pfeiffer,H., Bachofer,J., Popp,J., Messner,B., Kissling,W., and Leucht,S. (2004). Allele-specific change of concentration and functional gene dose for the prediction of steady-state serum concentrations of amitriptyline and nortriptyline in CYP2C19 and CYP2D6 extensive and intermediate metabolizers. *Clin Chem* 50, 1623-1633.
- Stephens,M., Smith,H.J., Donnelly,P. (2001). A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet*, 68, 978-89.
- Stephens,M., Donnelly,P. (2003). A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction. *Am J Hum Genet*, 73, 1162-9.
- Stresser,D.M., Kupfer,D. (1999). Monospecific antipeptide antibody to cytochrome P-450 2B6. *Drug Metab Dispos*, 27, 517-25.
- Svensson,U.S. and Ashton,M. (1999). Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the in vitro metabolism of artemisinin. *Br. J Clin Pharmacol* 48, 528-535.

- Sweet,R.A., Pollock,B.G., Kirshner,M., Wright,B., Altieri,L.P., DeVane,C.L.(1995). Pharmacokinetics of single- and multiple-dose bupropion in elderly patients with depression. *J Clin Pharmacol.* 35, 876-84.
- Takahashi,H., Ishikawa,S., Nomoto,S., Nishigaki,Y., Ando,F., Kashima,T., Kimura,S., Kanamori,M., Echizen,H. (2000). Developmental changes in pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin enantiomers in Japanese children. *Clin Pharmacol Ther.* 68, 541-55.
- Takada,K., Arefayene,M., Desta,Z., Yarboro,C.H., Boumpas,D.T., Balow,J.E. (2004). Cytochrome P450 pharmacogenetics as a predictor of toxicity and clinical response to pulse cyclophosphamide in lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* 50, 2202-10.
- Telenti,A. and Zanger,U.M. (2007). Pharmacogenetics of Anti-HIV Drugs. *Annu. Rev Pharmacol Toxicol.*
- Tost,J., Gut,I.G. (2005). Genotyping single nucleotide polymorphisms by MALDI-TOF mass spectrometry in clinical applications. *Clin Biochem,* 38, 335-50.
- Tsuchiya,K., Gatanaga,H., Tachikawa,N., Teruya,K., Kikuchi,Y., Yoshino,M., Kuwahara,T., Shirasaka,T., Kimura,S., and Oka,S. (2004). Homozygous CYP2B6 *6 (Q172H and K262R) correlates with high plasma efavirenz concentrations in HIV-1 patients treated with standard efavirenz-containing regimens. *Biochem Biophys. Res Commun.* 319, 1322-1326.
- Turpeinen,M., Ghiciuc,C., Opritoui,M., Tursas,L., Pelkonen,O., Pasanen,M. (2007). Predictive value of animal models for human cytochrome P450 (CYP)-mediated metabolism: a comparative study in vitro. *Xenobiotika.* 37, 1367-77.
- Wang,H., Lecluyse,E.L. (2003). Role of orphan nuclear receptors in the regulation of drug-metabolizing enzymes. *Clin Pharmacokinet.* 42, 1331-1357.
- Wang,J., Sonnerborg,A., Rane,A., Josephson,F., Lundgren,S., Stahle,L., and Ingelman-Sundberg,M. (2006). Identification of a novel specific CYP2B6 allele in Africans causing impaired metabolism of the HIV drug efavirenz. *Pharmacogenet. Genomics* 16, 191-198.
- Ward,B.A., Gorski,J.C., Jones,D.R., Hall,S.D., Flockhart,D.A., and Desta,Z. (2003). The cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) is the main catalyst of efavirenz primary and secondary metabolism: implication for HIV/AIDS therapy and utility of efavirenz as a substrate marker of CYP2B6 catalytic activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306, 287-300.
- Weber,K., Osborn,M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem.* 244, 4406-12.
- Wise,C.A., Paris,M., Morar,B., Wang,W., Kalaydjive,L., Bittles,A.H. (2003). A standard protocol for single nucleotide primer extension in the human genome using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 17, 1195-202.
- Wolbold,R., Klein,K., Burk,O., Nussler,A.K., Neuhaus,P., Eichelbaum,M., Schwab,M., Zanger,U.M. (2003). Sex is a major determinant of CYP3A4 expression in human liver. *Hepatology,* 38, 978-88.

- Wolf,C.R., Smith,C.A., Smith,G., Gough,A.C., Bryant,S., Spurr,N.K., and Harrison,D.J. (1992). Molecular genetics of the human cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Tohoku J Exp Med* 168, 73-81.
- Xie,H.J., Yasar,U., Lundgren,S., Griskevicius,L., Terelius,Y., Hassan, M., Rane,A. (2003). Role of polymorphic human CYP2B6 in cyclophosphamide bioactivation. *Pharmacogenomics J.* 3, 53-61.
- Xie,H., Griskevicius,L., Stahle,L., Hassan, Z., Yasar,U., Rane,A. (2006). Pharmacogenetics of cyclophosphamide in patients with haematological malignancies. *Eur J Pharm Sci.* 27, 54-61.
- Yamano,S., Nhamburo,P.T., Aoyama,T., Meyer,U.A., Inaba,T., Kalow,W., Gelboin,H.V., McBride,O.W., and Gonzalez,F.J. (1989). cDNA cloning and sequence and cDNA-directed expression of human P450 IIB1: identification of a normal and two variant cDNAs derived from the CYP2B locus on chromosome 19 and differential expression of the IIB mRNAs in human liver. *Biochemistry* 28, 7340-7348.
- Yamazaki,H., Inoue,K., Hashimoto,M., and Shimada,T. (1999). Roles of CYP2A6 and CYP2B6 in nicotine C-oxidation by human liver microsomes. *Arch. Toxicol.* 73, 65-70.
- Yan,B., Matoney,L., Yang,D. (1999). Human carboxylesterases in term placentae: enzymatic characterization, molecular cloning and evidence for the existence of multiple forms. *Placenta.* 20:599-607.
- Zanger,U.M., Raimundo,S., and Eichelbaum,M. (2004). Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol* 369, 23-37.
- Zanger,U.M., Klein,K., Saussele,T., Blievernicht,J., Hoffmann,M.H., Schwab,M. (2007). Polymorphic CYP2B6: molecular mechanisms and emerging clinical significance. *Pharmacogenomics.* 8, 743-59. Review
- Zukunft,J., Lang,T., Richter,T., Hirsch-Ernst,K.I., Nussler,A.K., Klein,K., Schwab,M., Eichelbaum,M., and Zanger,U.M. (2005). A natural CYP2B6 TATA box polymorphism (-82T--> C) leading to enhanced transcription and relocation of the transcriptional start site. *Mol. Pharmacol.* 67, 1772-1782.

6 ANHÄNGE

6.1

CYP2B6 Allel Nomenklatur (direkter Auszug)

Allele	Protein	Nucleotide changes		Effect	Enzyme activity		References
		<u>cDNA</u>	<u>Gene</u>		In vivo	In vitro	
CYP2B6*1A	CYP2B6.1				Normal	Normal	Yamano et al., 1989
CYP2B6*1B	CYP2B6.1		-2320T>C				Lamba et al., 2003
CYP2B6*1C	CYP2B6.1		-2320T>C; 14593C>G; 15582C>T				Lamba et al., 2003
CYP2B6*1D	CYP2B6.1		-1778A>G; -1186C>G; 12917A>T				Lamba et al., 2003
CYP2B6*1E	CYP2B6.1		-1578C>T; -757C>T				Lamba et al., 2003
CYP2B6*1F	CYP2B6.1		-1224A>G				Lamba et al., 2003
CYP2B6*1G	CYP2B6.1		-750T>C				Lamba et al., 2003
CYP2B6*1H	CYP2B6.1		-2320T>C; -750T>C				Hesse et al., 2004
CYP2B6*1J	CYP2B6.1		-2320T>C; -1778A>G; - 1186C>G; -750T>C				Hesse et al., 2004
CYP2B6*1K	CYP2B6.1		-1972C>T; -1578C>T; -750T>C				Hesse et al., 2004
CYP2B6*1L	CYP2B6.1		-1578C>T; -750T>C				Hesse et al., 2004

<i>CYP2B6*1M</i>	CYP2B6.1		-1578C>T				Hesse et al., 2004
<i>CYP2B6*1N</i>	CYP2B6.1		-1456T>C; -750T>C				Hesse et al., 2004
<i>CYP2B6*2A</i>	CYP2B6.2	64C>T	64C>T	R22C			Lang et al., 2001
<i>CYP2B6*2B</i>	CYP2B6.2	64C>T ; 216G>C	64C>T ; 12740G>C	R22C			Lamba et al., 2003
<i>CYP2B6*3</i>	CYP2B6.3	777C>A	18045C>A	S259R			Lang et al., 2001
<i>CYP2B6*4A</i>	CYP2B6.4	785A>G	18053A>G	K262R	Incr.		Lang et al., 2001 Kirchheiner et al., 2003
<i>CYP2B6*4B</i>	CYP2B6.4	785A>G	-2320T>C; -1778A>G; -1186C>G; -750T>C; 18053A>G	K262R			Hesse et al., 2004
<i>CYP2B6*4C</i>	CYP2B6.4	785A>G	18053A>G ; 12917A>T	K262R			Jacob et al., 2004
<i>CYP2B6*4D</i>	CYP2B6.4	785A>G	-1456T>C; -750T>C; 18053A>G	K262R			Zukunft et al., 2005
<i>CYP2B6*5A</i>	CYP2B6.5	1459C>T	25505C>T	R487C			Lang et al., 2001
<i>CYP2B6*5B</i>	CYP2B6.5	1459C>T	-2320T>C; -750T>C; 25505C>T	R487C			Hesse et al., 2004
<i>CYP2B6*5C</i>	CYP2B6.5	1459C>T	-591A>G; 25505C>T	R487C			Zukunft et al., 2005
<i>CYP2B6*6A</i>	CYP2B6.6	516G>T ; 785A>G	15631G>T ; 18053A>G	Q172H ; K262R	Decr.		Lang et al., 2001 Tsuchiya et al., 2004
<i>CYP2B6*6B</i>	CYP2B6.6	516G>T ; 785A>G	-1456T>C; -750T>C; 15631G>T ; 18053A>G	Q172H ; K262R			Hesse et al., 2004
<i>CYP2B6*6C</i>	CYP2B6.6	516G>T ; 785A>G	-750T>C; 15631G>T ; 18053A>G	Q172H ; K262R			Zukunft et al., 2005
<i>CYP2B6*7A</i>	CYP2B6.7	516G>T ; 785A>G 1459C>T	15631G>T ; 18053A>G ; 25505C>T	Q172H ; K262R ; R487C			Lang et al., 2001

<i>CYP2B6*7B</i>	CYP2B6.7	516G>T ; 785A>G 1459C>T	-1456 T>C; -750T>C; 15631G>T ; 18053A>G ; 25505C>T	Q172H ; K262R ; R487C			Hesse et al., 2004
<i>CYP2B6*8</i>	CYP2B6.8	415A>G	13072A>G	K139E		Decr. expr.	Lamba et al., 2003 Lang et al., 2004
<i>CYP2B6*9</i>	CYP2B6.9	516G>T	-1456T>C; 15631G>T ; 21563C>T	Q172H			Lamba et al., 2003
<i>CYP2B6*10</i>	CYP2B6.10	62A>T ; 64C>T ; 216G>C	62A>T ; 64C>T ; 12740G>C	Q21L ; R22C			Lang et al., 2004
<i>CYP2B6*11A</i>	CYP2B6.11	136A>G	136A>G	M46V		Decr. expr.	Lang et al., 2004
<i>CYP2B6*11B</i>	CYP2B6.11	136A>G	136A>G ; 18273G>A	M46V		Decr. expr.	Lang et al., 2004
<i>CYP2B6*12</i> <i>Tentative</i> <i>allele</i>	CYP2B6.12	296G>A	12820G>A ; 18273G>A	G99E		Decr. expr.	Lang et al., 2004
<i>CYP2B6*13A</i>	CYP2B6.13	415A>G ; 516G>T ; 785A>G	13072A>G ; 15631G>T ; 18053A>G ; 18273G>A; 21563C>T	K139E ; Q172H ; K262R		Decr.?	Lang et al., 2004
<i>CYP2B6*13B</i>	CYP2B6.13	415A>G ; 516G>T ; 785A>G	13072A>G ; 15582C>T; 15631G>T ; 18053A>G ; 18273G>A; 21563C>T	K139E ; Q172H ; K262R		Decr.?	Lang et al., 2004
<i>CYP2B6*14</i> <i>Tentative</i> <i>allele</i>	CYP2B6.14	419G>A	13076G>A ; 18273G>A	R140Q		Decr. act.	Lang et al., 2004
<i>CYP2B6*15A</i>	CYP2B6.15	1172T>A	15582C>T; 21388T>A	I391N		Decr.	Lang et al., 2004

						expr.	
<i>CYP2B6*15B</i>	CYP2B6.15	1172T>A	15582C>T; 18273G>A; 21388T>A	I391N		Decr. expr.	Lang et al., 2004
<i>CYP2B6*16</i>	CYP2B6.16	785A>G ; 983T>C	18053A>G , 21011T>C	K262R ; I328T	Decr.	Decr. expr.	Wang et al., 2006
<i>CYP2B6*17A</i>	CYP2B6.17	76A>T ; 83A>G ; 85C>A ; 86G>C; 933C>T	76A>T ; 83A>G ; 85C>A ; 86G>C; 18273G>A; 18799C>T	T26S ; D28G ; R29T			Klein et al., 2005
<i>CYP2B6*17B</i>	CYP2B6.17	76A>T ; 83A>G ; 85C>A ; 86G>C	76A>T ; 83A>G ; 85C>A; 86G>C; 18273G>A	T26S ; D28G ; R29T			Klein et al., 2005
<i>CYP2B6*18</i>	CYP2B6.18	983T>C	17897C>T; 18273G>A; 18627G>A; 21011T>C	I328T		Decr. expr.	Klein et al., 2005
<i>CYP2B6*19</i>	CYP2B6.19	516G>T ; 785A>G ; 1006C>T	15631G>T ; 18053A>G ; 18273G>A; 21034C>T ; 21563C>T	Q172H ; K262R ; R336C		Decr. expr.	Klein et al., 2005
<i>CYP2B6*20</i>	CYP2B6.20	503C>T ; 516G>T ; 785A>G ;	15618C>T ; 15631G>T ; 18053A>G ; 18273G>A	T168I ; Q172H ; K262R		Decr. expr.	Klein et al., 2005
<i>CYP2B6*21</i>	CYP2B6.21	1282C>A	18273G>A; 21498C>A	P428T		Decr. expr.	Klein et al., 2005
<i>CYP2B6*22</i>	CYP2B6.1		-1848C>A; -801G>T; -750T>C, - 82T>C	Incr. transcr.		Incr. expr.	Zukunft et al., 2005
<i>CYP2B6*23</i>	CYP2B6.23	1375A>G	25421A>G	M459V			Hiratsuka et al., 2004
<i>CYP2B6*24</i>	CYP2B6.24	1427G>A	25473G>A	G476D			Hiratsuka et al., 2004

<i>CYP2B6</i> *25	CYP2B6.25	1454A>T	25500A>T	Q485L			Hiratsuka et al., 2004
<i>CYP2B6</i> *26	CYP2B6.26	499C>G ; 5161G>T ; 785A>G	15614C>G ; 15631G>T ; 18053A>G	P167A ; Q172H ; K262R	Decr.		Gatanaga et al., 2007
<i>CYP2B6</i> *27	CYP2B6.27	593T>C	15708T>C ; 18273G>A	M198T		Decr	Rotger et al., 2007a
<i>CYP2B6</i> *28		917C>G ; 1132C>T	-1456T>C; -750T>C; 15837C>T; 18273G>A; 18627G>A; 18783C>G ; 18912G>C; 21160C>T	T306S ; R378X		None	Rotger et al., 2007a
<i>CYP2B6</i> *29	CYP2B6.29	<i>CYP2B7/CYP2B6</i> hybrid (crossover in intron 4) 6A>G; 42A>C; 66C>T; 76A>T ; 83A>G ; 85C>A ; 86G>C; 123A>G; 141T>C; 264T>G; 273G>C; 305C>T; 309G>C; 310G>A; 312C>G; 319T>G; 323T>A; 326G>A; 336T>C; 337G>A; 340A>C; 393T>C; 444G>C; 468G>A; 486G>A; 493A>G; 516G>T ; 547G>A; 561A>C; 593T>C ; 608A>G; 614C>G; 618T>C; 620C>T; 634G>A; 638T>C;	<i>CYP2B7/CYP2B6</i> hybrid (crossover in intron 4) 6A>G; 42A>C; 66C>T; 76A>T ; 83A>G ; 85C>A; 86G>C; 123A>G; 141T>C; 12788T>G; 12797G>C; 12829C>T; 12833G>C; 12834G>A; 12836C>G; 12843T>G; 12847T>A; 12850G>A; 12993T>C; 12994G>A; 12997A>C; 13050T>C; 13101G>C; 13125G>A; 15601G>A; 15608A>G; 15631G>T ; 15662G>A; 15676A>C; 15708T>C ; 15723A>G; 15729C>G; 15733T>C; 15735C>T; 15749G>A; 15753T>C; 15755G>A	T26S ; D28G ; R29T ; K91N; A102V; M103I; V104M; F107V; F108Y; R109Q; V113M; I114L; E148D; M165V; Q172H ; V183I; M198T ; Y203C; T205S; S207L; V212I;			Rotger et al., 2007b

		640G>A		F213S; G214S			
<i>Additional SNPs, where the haplotype has not yet been determined</i>							
			18000C>T				Lang et al., 2001
			17808G>A; 18273A>G; 18604G>A				Saito et al., 2003
			297C>T; 365T>A; 12940delAG; 13198T>A; 15290T>G; 15414G>A; 15415C>A; 15482C>T; 15577C>G; 15794G>A; 17522A>T; 17670G>A; 17755G>C; 18166G>C; 18674C>T; 25548G>A; 25660C>A; 25866T>A; 25867A>G; 25883A>G; 26147C>G; 26594G>T; 26777G>A; 26921A>C; 26922G>A				Solus et al., 2004

Changes made since the last update (8-Oct-2007) are marked in **red**.

Allele frequencies: [Solus et al., 2004](#)

Links to the [NCBI dbSNP](#) homepage are available for functional SNPs when present in NCBI's database.

Nucleotide variations in **bold** are the major SNPs/alterations responsible for the phenotype of the corresponding allele.

[OMIM GeneCards](#)

6.2 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

<i>Tabelle 2-1: Primersequenzen und PCR-Bedingungen für die Präamplifikation von CYP2B6-Fragmenten</i>	32
<i>Tabelle 2-2: CYP2B6 Primersequenzen und Bedingungen für die „Extension“ Reaktion</i>	33
<i>Tabelle 2-3: CYP2B6 Primersequenzen und Bedingungen für die „Extension“-Reaktion</i>	34
<i>Tabelle 3-1: Selektion der CYP2B6-Varianten</i>	47
<i>Tabelle 3-2: Tabelle der Multiplex Assays des Bruker Daltonik Systems (15 SNPs; A) sowie des Sequenom Systems (19 SNPs; B)</i>	50
<i>Tabelle 3-3: CYP2B6 SNP- und Genotyp- Frequenzen in den Proben der Leberbank. Die Position der SNPs erfolgte nach der cDNA Nomenklatur (c.) oder der genomischen DNA (g.). WT= Wildtyp, MT= Mutante, HWE= Hardy-Weinberg-Equilibrium, n.a.= nicht anwendbar</i>	58
<i>Tabelle 3-4 A bis C: Statistische Auswertung aller klinischen, proteinbiochemischen und genetischen Daten zur Leberbank. Die unterschiedlichen Genotypen wurden mit dem Wildtyp (*1/*1) verglichen (t-Test). Somit beziehen sich im jeweiligen ersten Tabellenabschnitt die Werte immer auf den *1/*1-Fall, die darauffolgenden sind in Zweiergruppen miteinander verglichen und angeordnet</i>	69
<i>Tabelle 3-5: SNP Frequenzen der CYP2B6 Polymorphismen in Patienten mit PD (n=87; stratifiziert nach EOPD und LOPD) und Kontrollen (n=98). Die Position der SNPs erfolgte nach der cDNA Nomenklatur (c.) oder genomischer DNA (g.)</i>	74
<i>Tabelle 3-6: Allelfrequenzen der Genotypisierung mit MALDI-TOF MS in Patienten mit Parkinson (n=87, stratifiziert nach EOPD und LOPD) und Kontrollen (n=98)</i>	75
<i>Tabelle 3-7: Frequenz der CYP2B6 Genotypen in Subpopulationen verschiedener Ethnizitäten. Die individuelle Genotypfrequenz wurde basierend auf der Anzahl der Individuen ermittelt, deren Genotypisierung erfolgreich verlief. Die Position der SNPs erfolgte nach der cDNA Nomenklatur (c.) oder der genomischen DNA (g.); SNPs 296G>A, 415A>G, 419G>A, 769G>A, 1006C>T und 1282C>A waren in diesen Populationen nicht vertreten. c.593T>C und c.1132C>T wurden in einem zusätzlichen Probenstet von 61 Individuen getestet</i>	77
<i>Tabelle 3-8: CYP2B6 Allelfrequenzen. Die Alleldefinitionen wurden anhand der 15 genotypisierten SNPs getroffen. *27 und *28 waren neue Allele, zusätzlich analysiert in einem zusätzlichen Probenstet von 61 farbigen Individuen. Die Prozentangaben beziehen sich nicht notwendigerweise auf 100 %, da die Allele *2 und *3 nicht in die Analyse mit eingeschlossen wurden (nach Resequenzierung von 24 ausgewählten Individuen)</i>	78
<i>Tabelle 3-9: Allelfrequenzen anhand der Genotypisierung von 16 CYP2B6 SNPs</i>	82
<i>Abbildung 1-1: Elektronenübertragungskette des Cytochrom P450</i>	15
<i>Abbildung 2-1: Metabolismus von Bupropion</i>	42
<i>Abbildung 3-1: Zusammenstellung der selektierten SNPs, deren Lokation in den Exons des CYP2B6 und die Lage der Primer für die Präamplifikation</i>	49
<i>Abbildung 3-2: Genotyp-Bestimmung für die häufigsten CYP2B6 Polymorphismen. Für jeden analysierten SNP wurden die relativen Intensitäten beider Allel-Signale angegeben (GENOTOOL Software) und gegeneinander aufgetragen. Die Punkte entlang der x-Achse zeigen die homozygot mutierten Fälle, die der y-Achse die Wildtyp-Proben, die Heterozygoten finden sich auf der Diagonalen. Die Kontrollen (ohne DNA) zeigten nur ein geringes bzw. kein detektierbares Signal und kommen um den Null-Punkt zu liegen</i>	52
<i>Abbildung 3-3: MALDI-TOF MS Spektren für die fünf Multiplex-Assays (A-E) mit den jeweils detektierten CYP2B6 Allelen. Nicht verlängerte Primer sind mit einem Stern markiert und</i>	

<i>jedes Produkt ist mit dem entsprechenden Nukleotid gekennzeichnet. Der Genotyp jeder Probe ist angegeben.....</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 3-4: Korrelation zwischen der CYP2B6-Proteinexpression und der Bupropionhydroxylaseaktivität humaner Lebermikrosomen (n=235).....</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 3-5: Analyse der geschlechtsabhängigen CYP2B6-Proteinexpression in humanen Lebermikrosomen für die gesamte Population (A) als auch für Individuen ohne Arzneimittel-Exposition (B).....</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 3-6: Analyse der geschlechtsabhängigen CYP2B6-Bupropionhydroxylaseaktivität in humanen Lebermikrosomen für die gesamte Population (A) als auch für Kontrollen (B)..</i>	<i>56</i>
<i>Abbildung 3-7: Analyse der altersabhängigen CYP2B6-Expression (A) und Bupropionhydroxylaseaktivität (B) bei Patienten.....</i>	<i>57</i>
<i>Abbildung 3-8: Haplotypanalyse von 287 kaukasischen Leberproben mit prozentualen Häufigkeiten >0,2 % (PHASE Programm). Es sind nur die SNPs gezeigt, die in der IKP148-Studie auftraten. Die Sortierung erfolgte nach Häufigkeit</i>	<i>60</i>
<i>Abbildung 3-9: Linkage Disequilibrium (LD) von 287 humanen Leberproben (Haploview 3.32). Die Pfeile symbolisieren Beispiele, die im Text näher erläutert werden.</i>	<i>61</i>
<i>Abbildung 3-10: Beispiel der Massenspektren aus einer heterozygoten Probe für den *5/*6 Haplotyp (links) sowie für den *1/*7 Haplotyp (rechts). Die fett geschriebenen Zahlen bezeichnen die mutierte Form eines SNPs, die „normal“ geschriebenen die Wildtyp-Form..</i>	<i>62</i>
<i>Abbildung 3-11: CYP2B6- Proteinexpression (A) und Bupropionhydroxylaseaktivitäten (B) in humanen Lebermikrosomen mit unterschiedlichen Genotypen. Die unterschiedlichen Genotypgruppen wurden mit dem Wildtyp (*1/*1) verglichen (t-Test)</i>	<i>65</i>
<i>Abbildung 3-12: Spezifische Aktivität berechnet als Aktivität normiert auf den spezifischen CYP2B6 Proteingehalt stratifiziert nach den CYP2B6 Genotypen. Die unterschiedlichen Genotypgruppen wurden mit dem Wildtyp (*1/*1) verglichen (t-Test)</i>	<i>66</i>
<i>Abbildung 3-13: Einfluss des Promotor SNPs -750T>C im Wildtyp- sowie im *6 Kontext auf Proteinexpression (A) und Bupropionhydroxylaseaktivität (B).....</i>	<i>68</i>
<i>Abbildung 3-14 : Einfluss des CYP2B6 Genotyps auf den Efavirenz (EFV) Plasmaspiegel. Log10-umgewandelte Werte der EFV Plasma AUC sind in aufsteigender Reihenfolge des Mittelwertes in Relation zum CYP2B6 Genotyp angeordnet. Die schwarzen Pfeile zeigen die Individuen an, die resequenziert wurden. Das graue Intervall stellt die Schwellenwerte von 85µg h/ml und 25µg h/ml dar, über oder unter denen die AUC von der Normalverteilung abweichen.....</i>	<i>80</i>

7 PUBLIKATIONEN

7.1 Posterpräsentationen

Julia Blievernicht, Elke Schäffeler, Kathrin Klein, Michel Eichelbaum, Matthias Schwab, Ulrich M. Zanger. Molecular Haplotyping of *CYP2B6* Genotypes Based On MALDI-TOF Mass Spectrometry. Poster presentation at the ESF-UB Conference in Biomedicine, Pharmacogenetics and Pharmacogenomics (ESF 2007) held at St. Feliu de Guixols, Spain

Julia Blievernicht, Elke Schäffeler, Kathrin Klein, Tanja Saussele, Michel Eichelbaum, Matthias Schwab, Ulrich M. Zanger: Anwendungen einer auf MALDI-TOF Massenspektrometrie basierenden Genotypisierungsmethode für *CYP2B6* (Applications of a MALDI-TOF Mass Spectrometric Genotyping Method for *CYP2B6*). Poster presentation at the German Association for Pharmacology and Toxicology (DGPT 2007), Mainz, Germany.

Julia Blievernicht, Elke Schäffeler, Kathrin Klein, Tanja Saussele, Michel Eichelbaum, Matthias Schwab, Ulrich M. Zanger: Applications Of A MALDI-TOF Mass Spectrometric Genotyping Method For *CYP2B6*. Poster presentation at the 16th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations (MDO 2006), Budapest, Ungarn.

Julia Blievernicht, Elke Schäffeler, Kathrin Klein, Matthias Schwab, Michel Eichelbaum, Ulrich M. Zanger: A High-Throughput Genotyping Method For *CYP2B6* SNPs Based On MALDI-TOF Mass Spectrometry. Talk at the Pharmacogenomics Meeting of the Joint Cold Spring Harbor Laboratory / Wellcome Trust Conference (CSHL 2005), Hinxton, England.

7.2 Originalarbeiten

Schwab M, Zanger UM, Marx C, Schäffeler, Klein K, Dippon J, Kerb R, Blievernicht J, Fischer J, Hofmann U, Bokemeyer C, Eichelbaum M, for the German 5-FU Toxicity Study Group. The role of genetic and non-genetic factors for 5-Fluorouracil treatment related severe toxicity: a prospective clinical trial. *Journal of Clinical Oncology* 2008; 26 (13): 2131-8. Epub 2008 Feb 25.

Hofmann MH, Blievernicht JK, Klein K, Saussele T, Schäffeler E, Schwab M, Zanger UM. Aberrant Splicing Caused by Single Nucleotide Polymorphism c.516G>T [Q172H], a Marker of *CYP2B6**6 and increased Efavirenz Plasma Concentration in HIV Patients. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2008; 325 (1): 284-92.

Zanger UM, Klein K, Saussele T, Blievernicht J, Hofmann MH, Schwab M. Polymorphic *CYP2B6*: molecular mechanisms and emerging clinical significance. *Pharmacogenomics* 2007; 8(7): 743-59. Review.

Desta Z, Saussele T, Ward B, Blievernicht J, Li L, Klein K, Flockhart DA, Zanger UM. Impact of *CYP2B6* polymorphism on hepatic efavirenz metabolism in vitro. *Pharmacogenomics* 2007; 8(6): 547-558.

Saussele T, Burk O, Blievernicht JK, Klein K, Nüssler A, Nüssler N, Hengstler JG, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM. Selective induction of human hepatic Cytochromes P450 2B6 and 3A4 by Metamizole. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2007; 82(3): 265-74.

Rotger M, Tegude H, Colombo S, Cavassini M, Furrer H, Décosterd L, Blievernicht J, Saussele T, Günthard HF, Schwab M, Eichelbaum M, Telenti A, Zanger UM and the Swiss Cohort Study: Predictive value of known and novel Alleles of *CYP2B6* for Efavirenz Plasma Concentrations in HIV-infected individuals. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2007; 81(4): 557-66.

Blievernicht JK, Schäffeler E, Klein K, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM: MALDI-TOF mass spectrometry for multiplex genotyping of *CYP2B6* single nucleotide polymorphisms. *Clinical Chemistry* 2007; 53:1, 24-33.

Loboz KK, Gross AS, Williams KM, Liauw WS, Day RO, Blievernicht JK, Zanger UM, McLachlan AJ: Cytochrome P450 2B6 activity as measured by Bupropion hydroxylation: Effect of induction by rifampin and ethnicity. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2006; 80(1): 75-84.

Toscano C, Klein K, Blievernicht J, Schäffeler E, Saussele T, Raimundo S, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM: Impaired expression of *CYP2D6* in intermediate metabolizers carrying the *41 allele caused by the intronic SNP 2988G>A: evidence for modulation of splicing events. *Pharmacogenetics and Genomics* 2006, 16:755-766.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Julia Blievernicht
Stuttgart, den 29.07.2008