

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Ludwig-Maximilian-Universität
Vorstand: Prof. Dr. med. Wolfgang Eisenmenger

Einfluss des Cytochrom P450 Enzyms CYP2D6 auf den Metabolismus von Methadon

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilian-Universität München

vorgelegt von
Dagmar Schmid
aus
Dachau

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang Eisenmenger

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Harald Steiner

Priv. Doz. Dr. Cornelius Stadtland

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Katja Anslinger und PD Dr. Burkhardt Rolf

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR

Tag der mündlichen

Prüfung: 21.11.2008

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung.....	2
2.1 Pharmakogenetik.....	2
2.2 Metabolismus.....	3
2.3 Cytochrom P450 Familie.....	4
2.3.1 CYP2D6.....	7
2.3.1.1 CYP2D6 Substrate	7
2.3.1.2 CYP2D6 Polymorphismen.....	9
2.3.1.2.1 Der PM Phänotyp.....	10
2.3.1.2.2 Der IM Phänotyp.....	11
2.3.1.2.3 Der EM Phänotyp.....	13
2.3.1.2.4 Der UM Phänotyp.....	13
2.4 Methadon.....	16
2.5 Zielsetzung der Arbeit.....	18
3 Material.....	19
3.1 Abkürzungen.....	19
3.2 Geräte.....	20
3.3 Chemikalien.....	21
3.4 Verbrauchsmaterial.....	22
3.5 Verwendete „Kits“.....	22
3.6 Verwendete Software.....	22
3.7 Enzyme.....	23
3.7.1 Restriktionsenzyme.....	23
3.7.2 Weitere verwendete Enzyme.....	23
3.8 Längenstandard.....	23
3.9 Oligonukleotide.....	24
3.9.1 Oligonukleotide für Fragmentlängenanalysen.....	24
3.9.2 Oligonukleotide für Allelspezifische PCRs.....	24
3.9.3 Oligonukleotide für Sequenzierung bzw. Restriktionsverdau.....	25

3.9.4 Oligonukleotide für XL-PCRs.....	25
3.9.5 Oligonukleotide für Real-Time PCR.....	26
3.10 Untersuchungskollektiv.....	26
4 Methoden.....	27
4.1 Präparation von „Buffy Coat“.....	27
4.2 Isolierung genomischer DNA.....	27
4.2.1 DNA-Isolierung mittels Chelex.....	28
4.2.2 DNA-Isolierung mittels Phenol Chloroform.....	28
4.2.3 DNA-Isolierung mittels <i>QIAamp® DNA Mini Kit</i>	29
4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	29
4.3.1 Allelspezifische PCR (AS-PCR).....	32
4.3.2 Multiplex-PCR.....	33
4.3.3 PCR von langen Fragmenten (XL-PCR) mittels <i>GeneAmp® XL PCR Kit</i> ...34	
4.4 Sequenzierung.....	35
4.4.1 Aufreinigung von PCR-Produkten mittels <i>QIAquick® PCR PurifikationKit</i>	35
4.4.2 Sequenzierung mittels <i>BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit</i>	36
4.4.3 Aufreinigung der Sequenzierprodukte mittels <i>Centri•Sep™</i>	37
4.5 Enzymatische Restriktion von DNA.....	37
4.6 Elektrophoretische Auftrennung von DNA.....	37
4.6.1 Agarose-Gelelektrophorese.....	38
4.6.2 Kapillar-Gelelektrophorese.....	39
4.6.2.1 Sequenzanalyse mittels Kapillar-Gelelektrophorese.....	39
4.6.2.2 DNA-Fragmentanalyse mittels Kapillar-Gelelektrophorese.....	40
4.7 Real Time PCR.....	40
4.7.1 Bestimmung der Menge an humaner DNA mittels <i>Quantifiler Human DNA Quantification Kit</i>	41
4.7.2 Bestimmung der Kopienzahl des <i>CYP2D6</i> Gens.....	41
4.8 Bestimmung des Methadonspiegels mit Blut.....	42
4.9 Statistische Beurteilung.....	42

5 Ergebnisse.....	43
5.1 Genotypisierung der Methadonpatienten und der Referenzgruppe.....	43
5.1.1 Entwicklung einer Multiplex-PCR zur Detektion der Nullallele <i>CYP2D6</i> *3, *4 und *6 sowie der Punktmutation -1584C>G.....	43
5.1.1.1 Wahl der Oligonukleotid-Primer.....	43
5.1.1.1.1 Oligonukleotid-Primer zum Nachweis von 2549A>del (<i>CYP2D6</i> *3) und 1707Tdel (<i>CYP2D6</i> *6).....	44
5.1.1.1.2 Oligonukleotid-Primer zum Nachweis von 1846G>A (<i>CYP2D6</i> *4) und -1584C>G.....	45
5.1.1.2 Etablierung der Multiplex-PCR-Bedingungen.....	47
5.1.2 Nachweis der Deletion (<i>CYP2D6</i> *5) des <i>CYP2D6</i> Gens.....	49
5.1.3 Nachweis der Duplikation des <i>CYP2D6</i> Gens.....	50
5.1.4 Genotypen und Allelhäufigkeiten der Untersuchungskollektive.....	52
5.2 Einfluss des <i>CYP2D6</i> Genotyps auf den Metabolismus von Methadon.....	55
5.2.1 Auswirkung des <i>CYP2D6</i> Genotyps auf die Dosierung von Methadon.....	55
5.2.1.1 Dosierung von Methadon.....	55
5.2.1.2 Vergleich: Dosierung von (<i>R</i>)-Methadon und <i>CYP2D6</i> Genotyp.....	59
5.2.2 Auswirkung des <i>CYP2D6</i> Genotyps auf den Methadonspiegel im Blut.....	63
5.2.2.1 Messung des Methadonspiegels.....	63
5.2.2.2 Prozentualer Anteil an (<i>R</i>)-Methadon.....	66
5.2.2.3 Vergleich: (<i>R</i>)-Methadonspiegel und <i>CYP2D6</i> Genotyp.....	67
5.2.2.4 Vergleich: Anteil an (<i>R</i>)-Methadon am Gesamtspiegel und <i>CYP2D6</i> Genotyp.....	70
5.2.3 Auswirkung des <i>CYP2D6</i> Genotyps auf das Verhältnis zwischen Dosis und Spiegel von Methadon.....	72
5.2.3.1 Korrelation zwischen verabreichter Dosis und gemessenem Spiegel von Methadon.....	72
5.2.3.2 Quotient aus verabreichter Dosis und gemessenem Spiegel von Methadon.....	74
5.2.3.3 Vergleich: Quotient aus Dosis und Spiegel von (<i>R</i>)-Methadon und <i>CYP2D6</i> Genotyp.....	78

6 Diskussion.....	81
6.1 Genotypisierung.....	81
6.1.1 Nachweis der Allele <i>CYP2D6</i> *3, *4 und *6 sowie der Mutation -1584C>G.....	81
6.1.2 Nachweis der Deletion (<i>CYP2D6</i> *5) sowie der Duplikation des <i>CYP2D6</i> Gens.....	83
6.2 Allelhäufigkeiten.....	85
6.2.1 PM Genotyp.....	85
6.2.2 IM Genotyp.....	86
6.2.3 UM Genotyp.....	88
6.2.4 EM Genotyp.....	89
6.3 Dosierung, Spiegel bzw. Verhältnis von Dosis zu Spiegel von Methadon.....	90
6.4 Einfluss von <i>CYP2D6</i> auf Dosierung, Spiegel bzw. Verhältnis von Dosis zu Spiegel von Methadon.....	91
6.5 Schlussfolgerung.....	96
6.6 Ausblick.....	101
7 Anhang.....	103
7.1 Sequenzen.....	103
7.1.1 Tdel in Exon 3 (<i>CYP2D6</i> *6).....	103
7.1.2 1846G→A zwischen Intron 3 und Exon 4 (<i>CYP2D6</i> *4).....	104
7.1.3 2549 Adel in Exon 5 (<i>CYP2D6</i> *3).....	105
7.1.4 -1584C→G im regulatorischen Bereich von <i>CYP2D6</i>	106
7.1.5 5'- und 3'-Bereich des <i>CYP2D6</i> Gens.....	107
7.1.6 Exon 9 von <i>CYP2D6</i>	109
7.2 Methadonpatienten.....	110
8 Literaturverzeichnis.....	112

1 Zusammenfassung

Bei einer Behandlung mit Methadon findet man eine sehr ausgeprägte interindividuelle Variabilität in der Pharmakokinetik. Aus diesem Grund muss die Dosierung dieses Medikaments auf jeden Patienten individuell abgestimmt werden. Ein Teil dieser Variabilität ist vermutlich auf Unterschiede im Metabolismus von Methadon und in diesem Zusammenhang auf Polymorphismen in den Genen der abbauenden Enzyme zurückzuführen. Der Literatur zufolge gibt es sieben Cytochrom P450 Enzyme, die in der Lage sind Methadon abzubauen: CYP3A4, CYP2D6, CYP2C8, CYP1A2, CYP2C9, CYP2B6 und CYP2C19.

Das Gen für CYP2D6 ist hoch polymorph. Es wurden bereits mehr als 70 verschiedene Allele charakterisiert, wovon einige nachweislich die Enzymaktivität beeinflussen. Man kann bezüglich der Enzymaktivität von CYP2D6 zwischen vier Hauptphänotypen unterscheiden: Die „Poor Metabolizer“ (PM) haben keine oder nahezu keine Enzymaktivität, „Intermediate Metabolizer“ (IM) eine verringerte Aktivität, „Extensive Metabolizer“ (EM) eine normale und „Ultra Rapid Metabolizer“ (UM) eine erhöhte Enzymaktivität.

In dieser Arbeit sollte festgestellt werden, in wie weit die häufigsten Polymorphismen im Gen für CYP2D6 den Metabolismus von Methadon beeinflussen. Hierfür wurden 96 Probanden, denen im Rahmen eines Substitutionsprogramms Methadon verabreicht wird, auf die Nullallele *CYP2D6**3, *4, *5, *6, die Duplikation des Gens und die Mutation im regulatorischen Bereich -1584C>G hin untersucht. Die Detektion der Mutationen der Allele *CYP2D6**3, *4 und *6 sowie der Mutation -1584C>G erfolgte über eine neu entwickelte Multiplex-PCR, Duplikation und Deletion (*CYP2D6**5) des gesamten *CYP2D6* Gens wurden über verschiedene PCRs mit anschließender Fragmentlängenbestimmung bzw. über einen Real-Time PCR Assay nachgewiesen. Außerdem wurden die Spiegel von (*R*)- und (*S*)-Methadon im Blut dieser Patienten ermittelt.

Bei dem Vergleich der verabreichten Dosis sowie dem gemessenen Spiegel von Methadon der einzelnen Patienten mit den zugehörigen Genotypen konnte keine offensichtliche Korrelation zwischen den untersuchten Polymorphismen im *CYP2D6* Gen und dem Metabolismus von Methadon festgestellt werden. Es hat den Anschein, dass Gendefekte einzelner Enzyme durch die Aktivität der anderen am Metabolismus beteiligten Cytochrom P450 Enzyme kompensiert werden. Allerdings war die Auswertung der Ergebnisse durch den vielfältigen Beikonsum anderer Medikamente und möglicherweise auch von zusätzlichem Methadon der einzelnen Patienten, äußerst schwierig.

2 Einleitung

2.1 Pharmakogenetik

Die Pharmakogenetik beschäftigt sich mit dem Einfluss individueller genetischer Unterschiede auf die Wirkung einzelner Medikamente. Es werden aber auch Determinanten für suchterzeugendes Verhalten, und in der onkologischen molekularen Epidemiologie, Verbindungen zwischen der Prädisposition für bestimmte Krebsarten und der spezifischen Enzymausstattung untersucht [Tribut *et al.*, 2002].

In den meisten Fällen einer medikamentösen Behandlung wird die gewünschte Arzneimittelwirkung erreicht, jedoch kommt es in Ausnahmefällen dazu, dass kein therapeutischer Effekt eintritt oder, dass unerwünschte Nebenwirkungen auftreten. Dies wird beeinflusst durch das Alter, Gewicht und Geschlecht des Patienten, durch die zu behandelnde Krankheit und Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten. Die Effizienz einer medikamentösen Behandlung und die Wahrscheinlichkeit einer negativen Reaktion kann aber auch durch genetische Faktoren beeinflusst werden. Durch die Untersuchung genetischer Variationen bei Proteinen, insbesondere Enzymen, die mit Arzneimittelwirkstoffen interagieren, erhofft man sich einen besseren Einblick in die interindividuellen Unterschiede bei medikamentösen Behandlungen zu bekommen und zukünftig durch eine Genotypisierung der einzelnen Patienten im Vorfeld die bestmögliche Behandlung im Sinne von Wahl bzw. Dosierung des Medikaments zu bestimmen [Weinshilboum, 2003].

Nach der Verabreichung eines Medikaments wird es zunächst absorbiert und zum entsprechenden Ziel transportiert, wo es dann seine Wirkung entfaltet. Nach der Interaktion mit dem Ziel wird das Medikament abgebaut und ausgeschieden. Bei Individuen, die nicht auf die gewohnte Weise auf ein Medikament reagieren, findet man häufig eine Abweichung im Abbau des Arzneimittelwirkstoffes, verursacht durch Unterschiede in der Aktivität der daran beteiligten Enzyme [Weinshilboum, 2003]. Die Identifizierung von Individuen, die auf Grund ihres Genprofils und der daraus resultierenden Enzymausstattung Variationen in der Reaktion auf Arzneimittelwirkstoffe aufweisen, erfolgt üblicher Weise über eine Phänotypisierung, wobei die Plasmakonzentration des jeweiligen Medikaments oder die Urinkonzentration der Abbauprodukte gemessen wird. Dies liefert zwar eine qualitative und quantitative Information, dennoch unterliegt dieser Ansatz einer Einschränkung. Bei dieser Untersuchungsmethode wird lediglich eine Momentaufnahme der Aktivität der jeweiligen Enzyme gemacht. Da allerdings

der Prozess auch durch andere Variablen, wie Hemmung und Induktion beeinflusst sein kann, ist es oft nicht möglich eine pauschale Aussage über die Funktion der beteiligten Enzyme zu treffen [Streetman *et al.*, 2000; Zaigler *et al.*, 2000]. Durch die Identifizierung der individuellen Enzymausstattung und den zugrunde liegenden Genen besteht die Möglichkeit, ein Genprofil des zu behandelnden Patienten zu erstellen, um die Wahl des Arzneimittelwirkstoffes und dessen Dosis zu optimieren. Diese Genotypisierung kann über verschiedene molekularbiologische Methoden, wie PCR (polymerase chain reaction), RFLP (restriction fragment length polymorphism), SSCP (single-strand conformation polymorphism), TGGE/DGGE (temperature or denaturing gradient gel electrophoresis) und Sequenzierung erfolgen.

Es wurden bereits zahlreiche Enzyme und deren Gene identifiziert, die am Metabolismus von endogenen und exogenen Stoffen beteiligt sind. Einige dieser Enzyme weisen Variationen auf genetischer Ebene, so genannte Polymorphismen auf. Dabei wird ein Gen ausschließlich dann als funktionell polymorph bezeichnet, wenn stabile Varianten mit veränderter Proteinaktivität mit einer Frequenz größer 1 % in einer Population auftreten. Polymorphismen von Genen metabolisierender Enzyme können oftmals die individuelle Variabilität bei medikamentösen Behandlungen erklären [Tribut *et al.*, 2002].

2.2 Metabolismus

Viele körpereigene Substanzen (z.B. Steroide, Fettsäuren aber auch Proteine) bzw. Verbindungen die dem Körper zugeführt werden (z.B. Medikamente, Insektizide, polycyclische Kohlenwasserstoff-Verbindungen und bestimmte Nahrungsmittel) müssen in der Regel, bevor sie ausgeschieden werden können, einen für die Substanz spezifischen Metabolismus durchlaufen. Bei diesen endo- und exogenen Stoffen handelt es sich meist um Substanzen, die auf Grund ihrer Fettlöslichkeit nicht ausgeschieden werden können. Würden diese Verbindungen nicht in der Leber zu hydrophilen Produkten abgebaut werden, könnten sich diese oftmals giftigen Verbindungen im Fettgewebe und lipophilen Membranen anreichern und somit erhebliche Schäden verursachen. Bei der regelmäßigen Einnahme von Medikamenten kann es außerdem bei einem Nichtabbau des Arzneimittelwirkstoffes zu Reaktionen kommen, die einer Überdosierung gleichen, da sich bei jeder wiederholten Einnahme des Medikaments die Konzentration des Wirkstoffes im Körper erhöht.

Der Prozess der Entgiftung läuft in der Regel in zwei Schritten ab. Bei der Phase I Reaktion werden die funktionellen Gruppen, zum Beispiel durch aliphatische Hydroxylierung, Epoxi-

dierung, Entschwefelung, aromatische Hydroxylierung, Dealkylierung, Deaminierung oder Dehalogenierung modifiziert und ein reaktives Zwischenprodukt wird gebildet. Während der Phase II Reaktionen erfolgt eine Konjugation mit einer endogenen Verbindung über Acetylierung, Konjugation mit Glutathion, Glucuronidierung, Sulfatierung oder Methylierung, wodurch die Substanz wasserlöslicher wird und renal oder biliär ausgeschieden werden kann [Nebert und Gonzalez, 1987; Weinshilboum, 2003].

Beide Reaktionstypen des Metabolismus sind enzymvermittelt. Die Enzyme werden entsprechend der von ihnen katalysierten Reaktionen in Phase I Enzyme (Cytochrom P450 Enzyme, Xanthinoxidasen, Monoaminoxidasen, Diaminoxidasen, Flavinmonooxygenasen, Reduktasen, Esterasen, Dehydrogenasen und die Epoxidhydrolase) und Phase II Enzyme (GSTM1, GSTT1, NAT2, TPMT, die UDP-Glucuronosyltransferase und Sulfotransferasen) eingeteilt. Für beide Kategorien wurden mittlerweile Enzym polymorphismen beschrieben, die eine veränderte Aktivität, aber auch vollständige Inaktivität zur Folge haben. Eine Schlüsselrolle bei Variationen im Metabolismus spielen die Hauptenzyme der Phase I Reaktionen, die P450 Cytochrome [Daly, 2003].

2.3 Cytochrom P450 Familie

Bei den P450 Cytochromen handelt es sich um eine Superfamilie enzymatischer Hämproteine, die bei allen bisher untersuchten lebenden Organismen, unter anderem auch bei Prokaryoten vorkommen. Sie katalysieren endogene Biosynthesewege und den oxidativen Abbau von Xenobiotika.

Die P450 Cytochrome sind die wichtigsten Enzyme in der Phase I des Metabolismus von vielen endogenen und exogenen Stoffen. Beim Menschen findet man sie in sehr hoher Konzentration in der Leber, aber auch in der Lunge und im Darm konnten diese Enzyme nachgewiesen werden. Auf subzellulärer Ebene sind sie über eine membrandurchspannende N-terminale Helix und der pre-A und F-G Schleife in der Membran des endoplasmatischen Retikulums und der inneren Membran der Mitochondrien verankert. Sie bestehen aus einem bis zu 500 Aminosäuren großen Flavoprotein, das mit einer Hämgruppe assoziiert ist. Hierbei liegt die sogenannte I-Helix, die das Rückrat aller P450 Cytochrome bildet, direkt über der Häm-Tasche (Abb. 1). Es wird angenommen, dass die Sequenz der I-Helix bei den verschiedenen Enzymen die Substratspezifität bestimmt [Tribut *et al.*, 2002; Werck-Reichhart und Feyereisen, 2000].

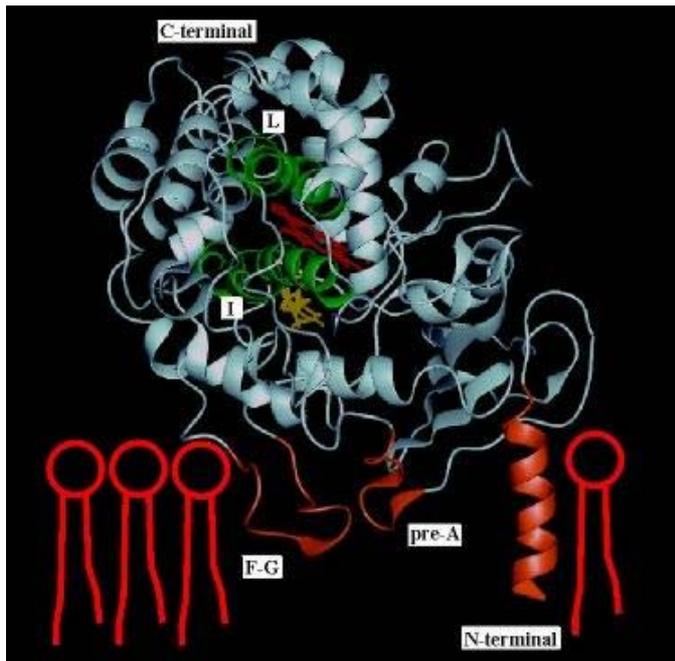


Abb. 1: Molekularstruktur eines Cytochrom P450 Enzyms: Das Enzym ist über die N-terminale Helix sowie der pre-A und F-G Schleife (rot) in der Lipidschicht der Membran verankert. Die Hämgruppe befindet sich zwischen der L- und I-Helix (grün), wobei die I-Helix das Rückrat bei jedem P450 Cytochrome bildet. (Abbildung entnommen aus: <http://ccr.cancer.gov>)

Das Absorptionsmaximum des membrangebundenen reduzierten Cytochrom P450 • CO Komplex liegt *in vitro* bei 450 nm, woraus auch der Name P (Pigment) 450 resultiert. Die ungewöhnlichen spektralen Eigenschaften dieser Enzyme im reduzierten Zustand sind auf ein Thiolat zurückzuführen, das an der fünften Koordinationsstelle am Hämeisen gebunden ist [Klingenberg, 1958; Garfinkel, 1958, Omura und Sato, 1964].

Bezeichnet werden die Enzyme mit CYP, gefolgt von einer arabischen Ziffer für die entsprechende Familie. Anschließend folgt ein Buchstabe für die Subfamilie (A-F) und eine weitere arabische Nummer, die das Isoenzym angibt. Nach einem „*“ folgt schließlich die Bezifferung der allelen Variante [Daly *et al.*, 1996(1); Tribut *et al.*, 2002].

Die P450 Cytochrome sind sog. Monooxygenasen (mischfunktionelle Oxygenasen) und das letzte Glied einer Elektronentransportkette. Ihre Funktion besteht in der Hydroxylierung von Substraten, wobei das Enzym in Kombination mit atmosphärischem Sauerstoff und dem abzubauenem Substrat einen trimolekularen Komplex bildet. Über mehrere Schritte werden dann energiereiche Elektronen vom Reduktionsäquivalent NADPH auf das Enzym übertragen, wodurch der gebundene Sauerstoff aktiviert wird. Anschließend wird ein Sauerstoffatom zu Wasser reduziert und das zweite auf das Substrat übertragen. Es entsteht somit ein hydroxyliertes Produkt, das in der Phase II des Metabolismus weiter abgebaut und schließlich ausgeschieden werden kann [White und Coon, 1980; Black und Coon, 1987].

Als Substrate dienen den P450 Cytochromen lipophile Stoffe, wie Fettsäuren, Retinoide, Prostagladine, biogene Amine, sowie Pheromone, Pflanzenmetabolite und Xenobiotika, wie unzählige Medikamente, chemische Karzinogene, Mutagene und andere umweltbedingte Kontaminanten. Des Weiteren spielen diese Enzyme auch eine wichtige Rolle im Metabolis-

mus von Cholesterin, Vitamin D, Gallensäure und Steroidhormonen [Nebert und Gonzalez, 1987; Nelson, 1999].

Bei dieser Fülle von körpereigenen Verbindungen und Xenobiotika ist vor allem die unterschiedliche molekulare Größe der verschiedenen Substrate bemerkenswert (angefangen von anorganischen Chromaten, Ethanol bis hin zu Steroiden und 5-Ring polycyclischen aromatischen Hydrocarbonaten). Deshalb ist es durchaus verständlich, dass sich im Laufe der Evolution die verschiedenen Subfamilien der P450 Cytochrome entwickelt haben. Bei den Säugern findet man zehn verschiedene Genfamilien, die für mehr als 100 Gene codieren [Nebert und Gonzalez, 1987].

Die Familien 1, 2 und 3 sind dabei hauptsächlich für die Biotransformation körperfremder Substanzen, wie z.B. Medikamente verantwortlich. Da viele Medikamente und andere xenobiotische Stoffe von Pflanzen stammen, oder chemisch pflanzlichen Metaboliten (Phytoalexine) sehr ähnlich sind, wird angenommen, dass sich diese Genfamilien in den verschiedenen Organismen durch den Kontakt bei der Aufnahme von Pflanzen innerhalb einer Zeitspanne von 1,5 Billionen Jahren divergent entwickelt haben [Nebert und Gonzalez, 1987].

Unter den P450 Cytochromen findet man einen sehr großen Grad an überlappender Substratspezifität. Außerdem ist jedes Isoenzyme in der Lage, eine ganze Reihe spezifischer Substrate abzubauen, was hinsichtlich des breiten Spektrums an exogenen Stoffen nicht verwunderlich ist [Nebert und Gonzalez, 1987]. Die Xenobiotika metabolisierenden Enzyme (außer CYP2D6) sind induzierbar, wobei die Induktion dosisabhängig und reversibel ist. Die entsprechenden Gene werden dabei durch die, für die codierten Enzyme spezifischen Substrate induziert und deren Expression wird um mehr als das 100fache gesteigert. Darüber hinaus kann ein Substrat auf verschiedene Isoenzyme sowohl aktivierend als auch hemmend wirken [Tribut *et al.*, 2002].

Aus diesem Grund muss bei einer medikamentösen Behandlung darauf geachtet werden, dass sich die verschiedenen Arzneimittelwirkstoffe nicht gegenseitig beeinflussen. Sei es, weil sie von demselben Isoenzym abgebaut werden, wodurch eine Konkurrenzsituation bei der Bindung ans Enzym entsteht, oder weil ein Wirkstoff das oder die abbauenden Enzyme des anderen inhibiert. Durch diese Wechselwirkungen und eine Fülle von weiteren Interaktionen mit induzierenden und hemmenden Agenzien, sowie der verschiedenen Substrate untereinander kann die Wirkung eines Medikaments nachteilig beeinflusst werden. Außerdem ist die Wirkungskdauer der Medikamente davon abhängig, wie schnell die Enzyme des P450 Systems aktiviert werden und den Arzneimittelwirkstoff durch dessen Abbau inaktivieren [Tribut *et al.*, 2002].

2.3.1 CYP2D6

Ende der 80er Jahre wurde das erste Gen für eines der Cytochrom P450 Enzyme, die Spar-
tein/Debrisoquin Hydroxylase (CYP2D6), kloniert und charakterisiert [Tribut *et al.*, 2002].
Das *CYP2D6* Gen liegt auf Chromosom 22 (22q13.1) im so genannten *CYP2D* Gencluster.
Dieses Gencluster beinhaltet neben *CYP2D6* auch zwei nicht funktionelle Kopien dieses
Gens, die Pseudogene *CYP2D7P* und *CYP2D8P* [Kimura *et al.*, 1989]. Das gesamte Gen um-
fasst 5kb und besteht aus neun Exons. Die daraus resultierende mRNA ist 1655 Basenpaaren
groß und codiert für ein Protein mit 497 Aminosäuren (55,84kDa). Bei der von CYP2D6 kataly-
sierten Metabolisierungsreaktion handelt es sich um eine Demethylierung, wobei abhängig
vom Substrat eine O- bzw. N-Demethylierung stattfinden kann. Das Enzym CYP2D6 macht
lediglich 1-2 % der Gesamtmenge an Cytochrom P450 Enzymen in der Leber aus [Shimada *et al.*, 1994].
Dennoch ist es am Metabolismus von über 40 Medikamenten beteiligt und somit
eines der wichtigsten Mitglieder der Gruppe der Phase I Enzyme [Daly, 1995; Kroemer und
Eichelbaum, 1995].

2.3.1.1 CYP2D6 Substrate

Die Substrate für CYP2D6 sind strukturell äußerst verschiedenartig. Meist handelt es sich um
kleine Moleküle mit einem basischen Stickstoffatom, 5-10 Å (Ångström) von der Stelle der
Oxidation entfernt. Dieser Stickstoff liegt bei physiologischem pH protoniert vor und inter-
agiert wahrscheinlich über elektrostatische Wechselwirkungen mit einem Glutaminsäurerest
(Glu-216) und Asparaginsäurerest (Asp-301) im aktiven Zentrum des Enzyms. Neutralisiert
man einen dieser Reste in der I-Helix durch ortsspezifische Mutagenese, so wird die Affinität
für die klassischen basischen stickstofftragenden Substrate und die katalytische Aktivität des
Enzyms drastisch herab gesetzt. Werden beide Reste gleichzeitig neutralisiert ist CYP2D6
sogar in der Lage Substrate abzubauen, die normal nicht von diesem Enzym metabolisiert
werden, d.h. die Substratspezifität ändert sich [Paine *et al.*, 2003].

Aber auch Stoffe ohne basischen Stickstoff, wie zum Beispiel Spirosulphonamid können mit
hoher Affinität gebunden werden [Guengerich *et al.*, 2002]. Auf diese Substrate hat der Aus-
tausch von Glu-216 und/oder Asp-301 gegen neutrale Aminosäuren keine oder nur geringe
Auswirkungen, woraus man schließen kann, dass solche Substrate an einer anderen Position
binden, und/oder mit anderen Resten interagieren. Größe und Form des aktiven Zentrums von

CYP2D6 ist also so ausgerichtet, dass eine breite Auswahl an Substanzen gebunden werden kann. Die Bindungsstelle für Substrate von CYP2D6 ist somit von Natur aus eher universell. Asp-301 und Glu-216 sind die einzigen Faktoren, die eine entscheidende Rolle bei der Definition der Substratspezifität spielen, indem sie die Bindung von basischen Substraten favorisieren und im Gegenzug dazu azide Substrate ablehnen [Paine *et al.*, 2003].

Wie bereits erwähnt metabolisiert CYP2D6 eine Reihe von Medikamenten, beispielsweise verschiedene Betablocker, Antidepressiva, Antipsychotika und Antiarrhythmika (siehe Tabelle 1). Aber auch andere Xenobiotika, darunter bestimmte Neurotoxine, wie z.B. MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin), das sehr wirksam die Parkinson Krankheit induzieren kann [Coleman *et al.*, 1996; Gilham *et al.*, 1997; Modi *et al.*, 1997], und endogene Stoffe wie Progesteron oder Pregnenolon dienen als Substrate für dieses Enzym [Niwa *et al.*, 1998; Hiroi *et al.*, 2001].

<u>β-Blocker</u>	Alprenolol, Metoprolol, Timolol, Bufuralol, Propranolol, Guanoxan, Indoramin, Bupranolol, Carvedilol, Trimepranol
<u>Antiarrhythmica</u>	Sparteïn, N-Propylajmalin, Propafenon, Mexiletin, Flecainid, Encainid, Procainamid, Lidocain
<u>Antidepressiva</u>	Nortriptylin, Desipramin, Clomipramin, Imipramin, Amitriptylin, Minaprin, Fluvoxamin, Atomoxetin (ADS/ADHS), Duloxetin, Venlafaxin, Fluperlapin, Maprotilin, Mianserin
<u>Antipsychotika</u>	Perphenazin, Thioridazin, Zuclopenthixol, Haloperidol, Tomoxetin, Paroxetin, Amiflamin, Methoxyphenamin, Fluoxetin, Levomepromazin, Olanzapin, Risperidon, Aripiprazol, Chlorpromazin, Cinnarizin, Clozapin, Fluphenazin, Trifluperidol, Promethazin
<u>Analgetika</u>	Codein, Ethylmorphin, Hydrocodon, Dextromethorphan, Phenacetin, Tramadol,
<u>Antihistamine</u>	Loratadin, Chlorpheniramin, Metiamid
<u>Andere</u>	Debrisoquin, 4-Hydroxy-Amphetamin, Phenformin, Perhexilin, MDMA (Ecstasy), Ritonavir (HIV 1 Protease Inhibitor) Dolasetron, Ondansetron, Tropisetron, Nicergolin, Dexfenfluramin, MPTP(1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin), Metoclopramid (Dopamin-Antagonist), Tamoxifen, Deprenyl, Flunarizin, Galanthamin

Tabelle 1: CYP2D6 Substrate [Wolf und Smith, 1999; Buzková *et al.*, 2006]

Neben der Fülle an Substraten hat man auch Substanzen gefunden, die in der Lage sind CYP2D6 zu inhibieren (siehe Tabelle 2). Die verschiedenen Substrate und Inhibitoren beeinflussen sich bei gleichzeitiger Verabreichung gegenseitig, wodurch es zu Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Medikamenten kommen kann (siehe 2.3)

<u>Starke Inhibitoren</u>	Bupropion, Fluoxetin, Paroxetine, Quinidin,
<u>Mittlere Inhibitoren</u>	Duloxetine , Terbinafin
<u>Schwache Inhibitoren</u>	Amiodaron, Cimetidin, Sertralin
<u>Andere</u>	Celecoxib, Cinacalcet, Citalopram, Clemastin, Clomipramin, Cocain, Diphenhydramin, Doxepin, Doxorubicin, Escitalopram, Goldenseal, Halofantrin, Histamine H1 Receptor Antagonisten, Hydroxyzin, Mibefradil, Midodrin, Moclobemid, Ranitidin, Red-haloperidol, Ticlopidin, Tripeleennamin

Tabelle 2: CYP2D6 Inhibitoren (Tabelle entnommen aus <http://medicine.iupui.edu/flockhart/table.htm>)

2.3.1.2 CYP2D6 Polymorphismen

CYP2D6 ist ein äußerst polymorphes Gen. Bis jetzt wurden bereits mehr als 70 verschiedene Allele charakterisiert, wobei fünf davon (*CYP2D6*1A*, *2, *2B, *4A und *5) 87 % aller Allele in der europäischen Bevölkerung ausmachen. Die restlichen allelen Varianten treten mit einer Frequenz von 0,1 % - 2,7 % auf (<http://www.imm.ki.se/cypalleles>) [Marez *et al.*, 1997]. Allgemein findet man bei den verschiedenen Allelen ein sehr heterogenes Mutationsspektrum, wie Deletionen, Insertionen und Punktmutationen, die die Aminosäuresequenz, aber auch das Spleißen der mRNA verändern. Darüber hinaus kommt die komplette Deletion von *CYP2D6* und DNA-Rearrangements, wie Rekombination oder Genkonversion des *CYP2D6* Gens mit den Pseudogenen *CYP2D7P* und *CYP2D8P* vor [Kagimoto *et al.*, 1990]. Dabei ist die 3'-Region der codierenden Sequenz (Exon 6 bis 9) von Mutationen weniger betroffen, was dafür spricht, dass dieser Bereich für konservierte Elemente, wie zum Beispiel die Häm-Bindungsstelle kodiert [Koymans *et al.*, 1993; Ellis *et al.*, 1995; Marez *et al.*, 1997]. Dennoch wurden bereits viele der Allele mit einer Verringerung, Erhöhung oder der vollständigen Inaktivierung der Enzymaktivität assoziiert.

Der Selektionsdruck auf dieses Enzym scheint demnach äußerst gering zu sein, was wahrscheinlich daran liegt, dass es keine essentielle physiologische Funktion im alltäglichen Leben ausübt. Es besteht sogar die Annahme, dass *CYP2D6* im Laufe der Evolution seine Funktionalität vollständig verlieren und sich somit zu einem Pseudogen entwickeln wird [Kagimoto *et al.*, 1990].

Die Häufigkeit der unterschiedlichen Allele variiert sowohl zwischen den ethnischen Gruppen als auch innerhalb einzelner Populationen einer ethnischen Gruppe [Yu *et al.*, 2002]. Als Fol-

ge ergeben sich Variationen bei der CYP2D6 Enzymaktivität und somit bei dem Metabolismus der von CYP2D6 abgebauten Substrate. Diese signifikanten Unterschiede in der Aktivität von CYP2D6 können bei einer medikamentösen Behandlung, genau wie die Fülle an Substraten und Inhibitoren (siehe 2.3.1.1) Probleme bereiten, besonders bei Medikamenten die ausschließlich von diesem Enzym metabolisiert werden und enge therapeutische Indizes aufweisen [Vandel *et al.*, 1999]. Somit unterscheiden sich einzelne Individuen oftmals stark im Auftreten von Nebenwirkungen und therapeutischer Effizienz [Tucker, 1994; Kroemer und Eichelbaum, 1995]. Außerdem konnten bestimmte Allelvarianten mit verschiedenen Krankheiten, einschließlich manchen Krebsarten, chronischen inflammatorischen Erkrankungen und neurodegenerativen Störungen assoziiert werden [Wolf *et al.*, 1994; Daly *et al.*, 1994; Beyeler *et al.*, 1996]. Individuen, die beispielsweise kein funktionelles CYP2D6 Enzym bilden können, sind nicht in der Lage manche Karzinogene oder Toxine, wie z.B. MPTP zu metabolisieren, was zu einer veränderten Prädisposition für bestimmte Krebsarten, oder im Fall von MPTP zu einer erhöhten Anfälligkeit für die Parkinson Krankheit führt [Coleman *et al.*, 1996; Gilham *et al.*, 1997]. Hinsichtlich einer metabolischen Aktivierung von Prokarzinogenen durch CYP2D6 kann sich die Abwesenheit der Enzymaktivität jedoch schützend auswirken [Wolf und Smith, 1999].

Grundsätzlich kann man zwischen 4 hauptsächlichen Phänotypen bei der CYP2D6 Enzymaktivität unterscheiden. Die „Poor Metabolizer“ (PM) haben keine oder nahezu keine Enzymaktivität, „Intermediate Metabolizer“ (IM) eine verringerte Aktivität, „Extensive Metabolizer“ (EM) eine normale und „Ultra Rapid Metabolizer“ (UM) eine erhöhte Enzymaktivität [Daly, 1995]. Die Grenzen zwischen den einzelnen Phänotypen sind fließend, zum Teil Substratabhängig und die Prävalenz variiert in den verschiedenen Populationen [Bertilsson, 1995].

2.3.1.2.1 Der PM Phänotyp

Dieser Phänotyp wird autosomal rezessiv vererbt und tritt bei durchschnittlich 5-10 % der Europäer, 1-2 % der Asiaten und mit 0-8 % bei Populationen afrikanischen Ursprungs auf. Er ist mit der Abwesenheit der CYP2D6 Aktivität assoziiert, die auf zwei nicht funktionelle Allele, sog. Nullallele des Gens zurückzuführen ist [Mahgoub *et al.*, 1977; Eichelbaum *et al.*, 1979; Bertilsson, 1995; Jurima-Romet *et al.*, 1997; Sachse *et al.*, 1997].

Zehn der bereits charakterisierten Allelvarianten tragen Mutationen, die mit einer defizienten Aktivität und somit mit dem PM Phänotyp einhergehen. Der Hauptteil der inaktivierenden

Mutationen sind entweder Deletionen, die zu einer Verschiebung des Leserasters führen oder Punktmutationen, die in Spleißdefekten resultieren. Es wurden aber auch bereits zwei Aminosäure Substitutionen beschrieben, die zu einem Verlust der Enzymaktivität führen [Daly, 2003].

Die Allele *CYP2D6**3, *4, *5 und *6 sind in der europäischen Bevölkerung am häufigsten für den PM Phänotyp verantwortlich. Dabei findet man in 66-70 % der PM-Fälle Allel *CYP2D6**4, in 15-17 % *CYP2D6**5, in 6 % *CYP2D6**6 und bei 5 % der Personen ohne Enzymaktivität Allel *CYP2D6**3. Somit kann man durch einen Test auf diese vier Allele 92-98 % aller PM identifizieren. Die restlichen Individuen mit einer defizienten Enzymaktivität sind homo- bzw. heterozygot für verschiedene relativ seltene inaktive Allele [Kagimoto *et al.*, 1990; Gaedigk *et al.*, 1991; Broly *et al.*, 1991; Saxena *et al.*, 1994; Daly *et al.*, 1995; Sachse *et al.*, 1997; Leathart *et al.*, 1998, Daly, 2003].

Die charakteristische Mutation bei Allel *CYP2D6**4 ist ein Basenaustausch von Guanin zu Adenin an der Position 1846, der Konsensussequenz der 3`Spleißstelle von Intron 3. Dadurch wird die Spleißreaktion verhindert und ein inaktives verkürztes Protein mit nur 181 anstatt 457 Aminosäuren gebildet [Kagimoto *et al.*, 1990; Gough *et al.*, 1990; Hanioka *et al.*, 1990]. Die Allele *CYP2D6**3 und *6 weisen dagegen Deletionen einzelner Basen auf, wodurch der Leserahmen verschoben wird. Bei Allel *3 geht ein Adenin an Position 2549 [Kagimoto *et al.*, 1990] und bei Allel *6 ein Thymin an Position 1707 verloren [Saxena *et al.*, 1994]. Durch die Leserahmenverschiebung bei *CYP2D6**6 entsteht zusätzlich ein neues Stop Codon was zu einem verkürzten Protein führt. Die gesamte Deletion des *CYP2D6* Gens bei Allel *5 ist der zweit häufigste genetische Defekt, der für den PM Phänotyp verantwortlich ist [Gaedigk *et al.*, 1991; Steen *et al.*, 1995(2)]. Die Deletion des Gens entsteht höchst wahrscheinlich über eine ungleiche reziproke Rekombination (siehe UM Phänotyp), wobei auf dem einen Chromosom des Gen deletiert und auf dem zweiten dupliziert wird [Steen *et al.*, 1995(2)].

2.3.1.2.2 Der IM Phänotyp

Etwa 5-10 % der europäischen Bevölkerung weisen den IM Phänotyp und somit eine verringerte *CYP2D6* Enzymaktivität auf. Zahlreiche Allele konnten bereits mit diesem Phänotyp in Verbindung gebracht werden, wie zum Beispiel *CYP2D6**9, *10, *14, *17, *29 und *41 [Tyndale *et al.*, 1991; Yokota *et al.*, 1993; Johansson *et al.*, 1994; Broly und Meyer, 1993; Masimirembwa *et al.*, 1996; Marez *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1999; Raimundo *et al.*, 2000].

Dabei zeigt sich jedoch bei einigen dieser Allele eine sehr ungleiche Verteilung in den verschiedenen ethnischen Populationen. So findet man *CYP2D6*10* hauptsächlich bei Asiaten (40-50 %) [Droll *et al.*, 1998; Tateishi *et al.*, 1999; Garcia-Barcelo *et al.*, 2000; Teh *et al.*, 2001; Zanger *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2002], *CYP2D6*17* (15-34 %) [Masimirembwa *et al.*, 1996; Leathart *et al.*, 1998; Wennerholm *et al.*, 1999; Wan *et al.*, 2001] dagegen meist bei Afroamerikanern und den verschiedenen afrikanischen Populationen. Diese Allele sind in der europäischen Bevölkerung, wenn überhaupt, nur sehr selten vertreten. Im Gegensatz dazu ist die Frequenz der Allele, die den Verlust der Enzymaktivität und somit den PM Phänotyp bedingen, bei Afrikanern, Afroamerikanern, Asiaten und Orientalen signifikant geringer als bei Kaukasiern (siehe 2.3.1.2.1). Dadurch findet man in der europäischen Bevölkerung zum einen wesentlich seltener den IM und zum anderen häufiger den PM Phänotyp als bei den übrigen Populationen. Diese Verschiebung der Genotypen bzw. Phänotypen bedingt grundsätzlich eine durchschnittlich geringere Enzymaktivität bei Afrikanern, Afroamerikanern und Asiaten. Außerdem fehlt bei diesen Populationen durch die niedrige Frequenz des PM Phänotyps die in der europäischen Population charakteristische Bimodalität, der Gegensatz von keiner zu normaler Enzymaktivität [Marez *et al.*, 1997; Sachse *et al.*, 1997; Griese *et al.*, 1998; Gaedigk *et al.*, 1999; Gaedigk *et al.*, 2002].

Treten zwei Allele, die für ein Enzym mit herabgesetzter Aktivität codieren, homo- bzw. heterozygot auf, kommt es zu dem IM Phänotyp. Aber nur ein kleiner Teil der IM in der europäischen Bevölkerung können durch solche Genotypen erklärt werden. Im Zusammenhang mit dem IM Phänotyp wird ebenfalls ein Gendosiseffekt diskutiert. Möglicherweise führt die Kombination eines Nullallels mit einem Wildtyp Allel zu einer allgemein herabgesetzten Enzymaktivität, da die gebildete Enzymmenge um die Hälfte reduziert sein müsste. Einige dieser Individuen zeigen tatsächlich einen IM Phänotyp, andere dagegen weisen allerdings eine normale Enzymaktivität auf und müssen somit dem EM Phänotyp zugeordnet werden [Daly, 2003; Griese *et al.*, 1998].

Eine Erklärung hierfür liefert möglicherweise eine Mutation im regulatorischen Bereich des *CYP2D6* Gens, ein Austausch von Cytosin durch Guanin an Position -1584, der mit einer möglichen erhöhten Enzymaktivität assoziiert wird und in erster Linie bei dem funktionellen Allel *CYP2D6*2*, aber auch bei *CYP2D6*35* zu finden ist. Dieses Cytosin/Guanin ist Teil eines Sequenzmotivs auf dem (-)-Strang (G/C GGTTCTTCC), das eine große Ähnlichkeit mit der Konsensus- bzw. Bindungssequenz der NK- κ B/c-Rel Familie von Transkriptionsfaktoren aufweist [<http://transfac.gbf.de/TRANS-FAC/index.html>; Heinemeyer *et al.*, 1998]. Dies spricht dafür, dass es sich hierbei möglicherweise ebenfalls um eine Bindungsstelle für solch

einen Faktor handelt. Die mutierte Sequenz scheint den Transkriptionsfaktor besser zu binden, was dann in einer gesteigerten Transkriptionseffizienz resultiert. Das Allel *CYP2D6*41*, das für ein Enzym mit geringerer Enzymaktivität codiert, weist diese Mutation nicht auf. Bei einer Studie von Raimundo *et al.*, (2000) konnte bei 12 von 14 IM, die heterozygot für ein Nullallel waren das zweite Allel als *CYP2D6*41* identifiziert werden, was darauf hinweist, dass dieses Allel in Kombination mit einem Nullallel eine gewisse Rolle bei der Ausbildung des IM Phänotyp spielt [Raimundo *et al.*, 2000; Zanger *et al.*, 2001; Zanger *et al.*, 2004].

Die -1584C>G Mutation wird ebenfalls im Zusammenhang mit der durchschnittlich geringeren *CYP2D6* Enzymaktivität anderer ethnischer Populationen diskutiert, da diese zum Beispiel bei Afroamerikanern mit nur einer Frequenz von 12 % im Gegensatz zu 43 % in der europäischen Bevölkerung auftritt [Gaedigk *et al.*, 2002]. Außerdem scheint diese Mutation auch bei der Ausbildung des UM Phänotyps eine gewisse Rolle zu spielen (siehe 2.3.1.2.4).

2.3.1.2.3 Der EM Phänotyp

Individuen mit diesem Phänotyp zeigen eine normale bzw. Wildtypenzymaktivität. Diese Personen tragen in der Regel zwei *CYP2D6*1* Allele bzw. zwei Allele deren Mutationen die Enzymaktivität nicht oder nur in geringem Maße beeinflussen, wie zum Beispiel *CYP2D6*2* oder **33* [Zanger *et al.*, 2004]. Individuen, heterozygot für ein Nullallel und ein funktionelles Allel können ebenfalls den EM Phänotyp ausprägen, sofern das intakte Allel nicht für ein Enzym mit herabgesetzter Aktivität kodiert (siehe 2.3.1.2.2).

2.3.1.2.4 Der UM Phänotyp

Bis zu 7 % der europäischen Bevölkerung zeigen eine erhöhte *CYP2D6* Enzymaktivität. Bei einigen dieser Individuen konnte dieser sog. UM Phänotyp mit einer bis mehreren zusätzlichen funktionellen Kopien des *CYP2D6* Gens assoziiert werden. Dieser Genotyp kommt durch eine Duplikation des Gens zustande, wobei die einzelnen Genkopien tandemartig arrangiert sind [Johansson *et al.*, 1993; Agundez *et al.*, 1995; Dahl *et al.*, 1995].

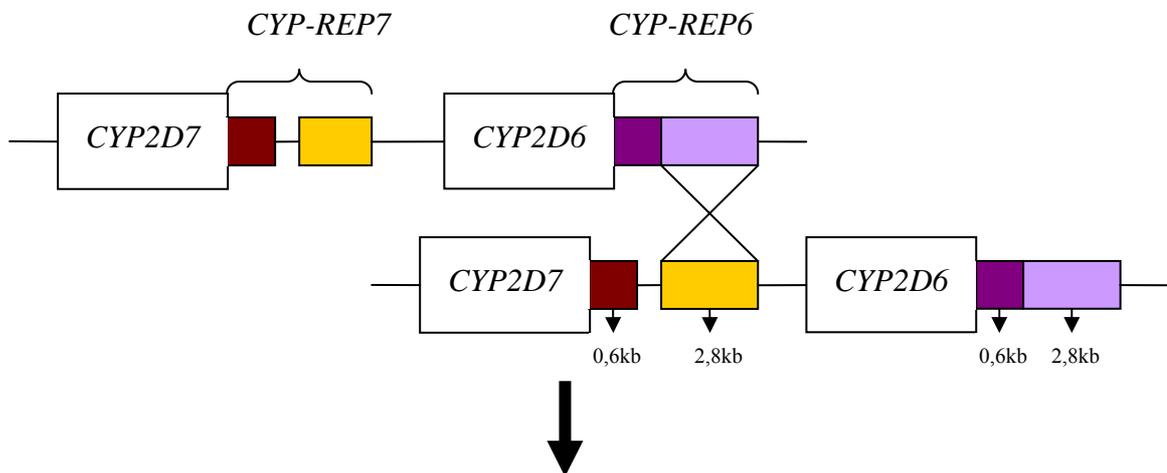
Das Auftreten von mehr als einer weiteren Genkopie ist relativ selten und tritt hauptsächlich in ostafrikanischen Populationen auf, wo man bereits Individuen mit bis zu 13 zusätzlichen *CYP2D6* Genen entdeckt hat [Johansson *et al.*, 1993]. Auch ist die Frequenz der Duplikation

an sich bei Ostafrikanern mit bis zu 30 % wesentlich häufiger als bei Europäern anzutreffen [Aklillu *et al.*, 1996].

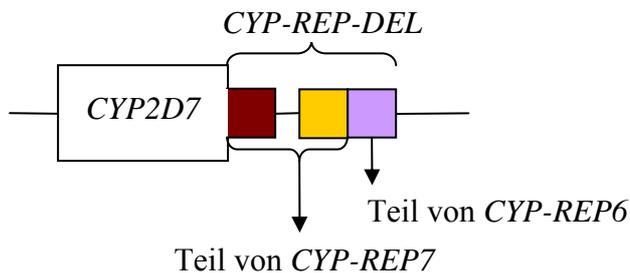
Es wird angenommen, dass die Duplikation des *CYP2D6* Gens über ein reziprokes ungleiches Rekombinationsereignis entsteht. Dabei wird auf einem Chromosom das Gen dupliziert, während es auf dem zweiten verloren geht. Dadurch entsteht also nicht nur eine Duplikation sondern ebenfalls eine Deletion von *CYP2D6*, was dem Nullallel *CYP2D6*5* entspricht [Steen *et al.*, 1995(1); Steen *et al.*, 1995(2)]. Der *CYP2D6* Locus wird von zwei großen direkten Wiederholungen, den sog. *CYP-REP* Einheiten flankiert. Dabei findet man eine 3,4 kb große Sequenz downsteam von *CYP2D6* (*CYP-REP6*). Die zweite Wiederholung zwischen dem Pseudogen *CYP2D7* und dem *CYP2D6* Locus (*CYP-REP7*) ist durch ein 1,6 kb großes Fragment unterbrochen, wodurch die 3,4 kb Sequenz in 0,6 kb und 2,8 kb Fragmente unterteilt wird. Die beiden 2,8 kb großen Sequenzen der *CYP-REP* Einheiten sind bezüglich ihrer Sequenz nahezu identisch, außer jeweils 4 bp am 5'- bzw. 3'-Ende. Bei einer Sequenzanalyse dieses Fragments der *CYP-REP* Einheiten bei Individuen mit Duplikation bzw. Deletion des *CYP2D6* Gens konnte festgestellt werden, dass *CYP-REP-DUP* (duplizierte *CYP-REP* Sequenz) das 5'- Ende von *CYP-REP6* und das 3'- Ende von *CYP-REP7* aufweist. Bei *CYP-REP-DEL* findet man genau den umgekehrten Fall (5'- Ende von *CYP-REP7* und das 3'- Ende von *CYP-REP6*), somit ist die *CYP-REP-DEL* Einheit, die bei einer Deletion von *CYP2D6* entsteht als Reziprok zu *CYP-REP-DUP* anzusehen (siehe Abb.2). Der Bruchpunkt der Rekombination liegt also höchst wahrscheinlich innerhalb des 2,8 kb Fragments. Einen weiteren Hinweis liefern auch zwei Sequenzmotive innerhalb dieser Sequenz, die häufig an Rekombinationsereignissen beteiligt sind, ein 10 bp großer Tandem Repeat und ein Alu-Element. Da aber die Sequenzen der zwei *CYP-REP* Einheiten fast identisch sind, kann die exakte Bruchstelle der Rekombination nicht bestimmt werden [Steen *et al.*, 1995(1); Steen *et al.*, 1995(2); Løvlie *et al.*, 1996].

Viele der Personen mit einem UM Phänotyp weisen jedoch keine zusätzlichen funktionellen *CYP2D6* Genkopien auf, tragen somit also nur zwei *CYP2D6* Gene. Bei vielen dieser duplikationsnegativen Individuen konnte das Allele *CYP2D6*35*, das ebenfalls den -1584 C>G Polymorphismus im regulatorischen Bereich trägt, nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die gesteigerte Transkriptionsrate durch diese Mutation für die höhere Enzymaktivität und somit für den UM Phänotyp verantwortlich ist [Løvlie *et al.*, 2001].

Duplikation und Deletion des *CYP2D6* Gens über ungleiche reziproke Rekombination



Deletion des *CYP2D6* Gens (*CYP2D6*5*):



Duplikation des *CYP2D6* Gens:

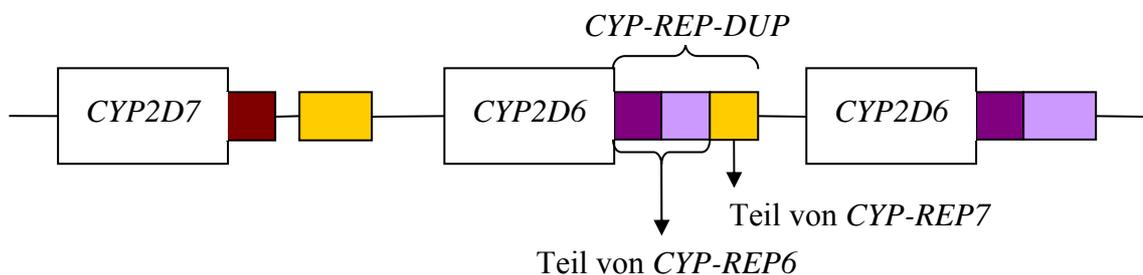


Abb. 2: ungleiche reziproke Rekombination am *CYP2D6* Locus: Erfolgt eine Rekombination zwischen dem 2,8kb Fragment der *CYP-REP6* und *CYP-REP7* Einheit, entsteht gleichzeitig eine Deletion des *CYP2D6* Gens auf dem einen und eine Duplikation dieses Gens auf dem anderen Chromosom.

2.4 Methadon

Methadon (6-Dimethylamino-4,4-diphenyl-3-heptanonhydrochlorid), ein fettlösliches basisches Medikament, ist ein synthetischer Antagonist für den μ - bzw. δ -Opioid-Rezeptor und ein starker Inhibitor der Serotonin- und Norepinephrin-Wiederaufnahme in die Neuronen. Es wird zur Heroinsubstitution und Behandlung von chronischen Schmerzen verwendet [Fain-

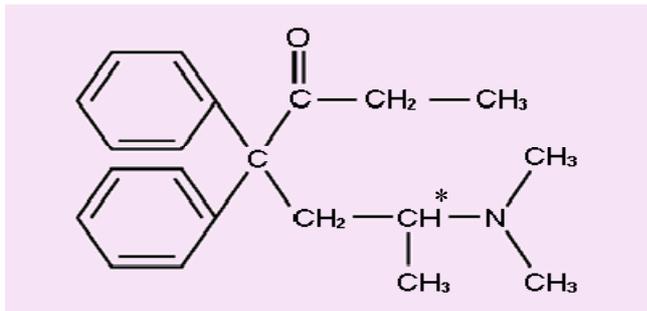


Abb. 3: Molekularstruktur von Methadon

singer *et al.*, 1993; Farrell *et al.*, 1994]. Methadon besitzt ein asymmetrisches Kohlenstoffatom* in seiner Struktur (Abb. 3) und kann somit in zwei enantiomeren Formen auftreten, dem (*R*)- bzw. *levo*- (*l*-) Methadon und (*S*)- bzw. *dextro*- (*d*-) Methadon. Dabei besitzt (*R*)-Methadon eine

höhere Affinität zum μ - und δ -Opioid-Rezeptor und weist somit im Vergleich zu (*S*)-Methadon eine 10-50fach höhere schmerzstillende Aktivität auf [Scott *et al.*, 1948; Kristensen *et al.*, 1995]. Klinisch verwendet wird entweder L-Polamidon, das ausschließlich (*R*)-Methadon enthält oder *rac*-Methadon, eine 50:50 Mischung aus den beiden Enantiomeren.

Methadon weist eine große interindividuelle Variabilität in der Pharmakodynamik und Pharmakokinetik auf [Wolff *et al.*, 1991; Wolff *et al.*, 1997]. Aus diesem Grund muss die Behandlung auf jeden Patienten individuell abgestimmt werden, insbesondere im Hinblick auf die Dosierung und die Wahl der verabreichten Komedikation. Eine adäquate Dosierung von Methadon ist der Hauptfaktor für eine erfolgreiche Substitutionsbehandlung von heroinsabhängigen Patienten (MMT = Methadone Maintenance Treatment) und liegt im Durchschnitt zwischen 20 und 120 mg Methadon pro Tag [Dole und Nyswander, 1966; Johnson *et al.*, 2000; Strain *et al.*, 1999; Caplehorn und Bell, 1991]. Des Weiteren findet man ebenfalls große Variationen für die Halbwertszeiten und Konzentration dieses Medikaments im Blut einzelner Patienten. Die Eliminationshalbwertszeit von Methadon liegt zwischen 15 und 60 Stunden, aber auch Werte geringer als 5 und höher als 130 Stunden wurden bereits beobachtet [Sawe, 1986; Plummer *et al.*, 1988; Lucas *et al.*, 2001]. Außerdem kann der Spiegel von Methadon im Blut bei Patienten mit gleicher Dosis bis zu 17fach variieren [Eap *et al.*, 2002]. Das Alter, Geschlecht und Gewicht der Individuen kann nur einen kleinen Teil der Varianz in der Pharmakokinetik von Methadon erklären. Es wird angenommen, dass diese Variationen neben der Konstitution der Patienten bzw. umweltbedingten Faktoren auch zu einem Teil genetisch determiniert sind. Im Rahmen dessen werden unter anderem Polymorphismen bei verschieden

Plasmaproteinen, an die Methadon während der Biotransformation bindet, wie das α_1 -AGP (α_1 -acid glycoprotein) bzw. Membrantransportern, wie P-Glycoprotein diskutiert [Anggård *et al.*, 1975; Eap *et al.*, 1990; Bouër *et al.*, 1999; Garrido *et al.*, 2000; Eap *et al.*, 2002]. Dennoch ist die Eliminierung von Methadon hauptsächlich von dessen Metabolisierung abhängig und somit spielen wahrscheinlich Variationen in der Aktivität der Methadon abbauenden Cytochrom P450 Enzyme eine entscheidende Rolle bei der Variabilität der Pharmakokinetik dieses Medikaments [Nilsson *et al.*, 1982(1)].

Methadon wird in der Leber abgebaut. Dabei entsteht zum einen über N-Demethylierung das pharmakologisch inaktive 2-Ethyliden-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidin (EDDP), das ebenfalls in zwei enantiomeren Formen, dem (*S*)- und (*R*)-EDDP, auftritt. EDDP zyklisiert anschließend spontan und wird über den Urin ausgeschieden [Sullivan und Due, 1973; Garrido und Troconiz, 1999]. Obwohl angenommen wird, dass EDDP der hauptsächliche Metabolit von Methadon ist, wurden bereits acht weitere Abbauprodukte identifiziert [Anggård *et al.*, 1975; Kreek *et al.*, 1980; Kreek *et al.*, 1983]. Die ausgeschiedene Menge an EDDP variiert zwischen 17-57 % der verabreichten Dosis an Methadon. Somit wird ein Teil des Präparats (43-83 %) nicht über die N-Demethylierung metabolisiert [Anggård *et al.*, 1975].

Es wurden bis jetzt sieben verschiedene Cytochrom P450 Enzyme entdeckt, die in der Lage sind, Methadon zu metabolisieren: CYP1A2 [Eap *et al.*, 1997], CYP2B6 [Gerber *et al.*, 2004], CYP2C8 [Wang und DeVane, 2003], CYP2C9 [Foster *et al.*, 1999], CYP2C19 [Foster *et al.*, 1999], CYP2D6 [Eap *et al.*, 1997] und CYP3A4 [Iribarne *et al.*, 1996; Foster *et al.*, 1999]. Einige dieser Enzyme zeigen eine unterschiedliche Aktivität im Abbau der beiden Enantiomeren. So metabolisiert Beispielsweise CYP2B6 hauptsächlich (*S*)- und CYP2C19 bevorzugt (*R*)-Methadon [Gerber *et al.*, 2004; Kharasch *et al.*, 2004; Totah *et al.*, 2007]. Außerdem zeigen nicht alle Enzyme die gleiche Aktivität gegenüber Methadon und sind auch somit nicht gleichermaßen an dessen Metabolismus beteiligt. Das prädominante Cytochrom P450 Enzym im Abbau von Methadon scheint CYP3A4 zu sein, welches neben CYP2B6 und CYP2C19 die N-Demethylierung zu EDDP katalysiert [Foster *et al.*, 1999; Oda *et al.*, 2001; Eap *et al.*, 2002; Gerber *et al.*, 2004]. In der europäischen Bevölkerung wurde eine 5-20fache Schwankung in der CYP3A4 Aktivität beobachtet, was möglicherweise den Unterschied in der ausgeschiedenen Menge von EDDP im Urin und zumindest einen Teil der hohen Variabilität der Pharmakokinetik von Methadon erklären könnte [Wilkinson, 1996]. Diese Variationen in der Enzymaktivität können jedoch im Fall von CYP3A4 sowie CYP1A2 nicht durch Polymorphismen in den dazugehörigen Genen erklärt werden [Schweikl *et al.*, 1993; Ketter *et al.*, 1995].

Im Gegensatz dazu sind bei den Genen der Cytochrom P450 Enzyme CYP2C9, CYP2C19 und CYP2D6 (siehe 2.3.1.2) Polymorphismen bekannt, die deren Funktion nachweislich beeinflussen [Eichelbaum, 1984; Küpfer und Preisig, 1984; Stubbins *et al.*, 1996]. In verschiedenen *in vivo* Studien wurde bereits nachgewiesen, dass CYP2D6 nicht nur mit Methadon interagiert sondern auch am stereoselektiven Metabolismus von (*R*)-Methadon beteiligt ist, dabei jedoch eine geringere Rolle als CYP3A4 einnimmt. So hemmt Methadon zum Beispiel zwei typische metabolische Wege von CYP2D6, die Demethylierung von Codein und Dextromethorphan [Mikus *et al.*, 1991; Wu *et al.*, 1993; Kerry *et al.*, 1994]. Darüber hinaus steigern CYP2D6 Inhibitoren, wie Paroxetin, Quinidin oder Fluoxetin die (*R*)-Methadon Konzentration im Blut [Eap *et al.*, 1997; Greenblatt *et al.*, 1999; Begre *et al.*, 2002; Eap *et al.*, 2002]. Außerdem konnte bei einer Inkubation von Methadon mit CYP2D6 eine favorisierte Verringerung der (*R*)-Methadon Konzentration nachgewiesen werden, wobei allerdings kein EDDP gebildet wurde. Dies weist zum einen darauf hin, dass CYP2D6 bevorzugt (*R*)-Methadon metabolisiert und zum anderen, dass es nicht an der Bildung von EDDP beteiligt ist, sondern ein anderes, bisher nicht bekanntes Abbauprodukt bildet [Eap *et al.*, 2002].

2.5 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, in wie weit die häufigsten Polymorphismen im *CYP2D6* Gen den Metabolismus und somit die Dosierung bzw. den Plasmaspiegel von Methadon bei einer Langzeittherapie beeinflussen. Um diesen möglichen Einfluss zu untersuchen wurden 96 Patienten, die im Rahmen eines Substitutionsprogramms Methadon erhielten, genotypisiert. Dazu wurden die Nullallele *CYP2D6**3, *4, *5 und *6, die Duplikation des Gens und die Mutation im regulatorischen Bereich -1584C>G nachgewiesen und die Methadonspiegel im Blut bestimmt. Außerdem sollte über einen Vergleich mit einer Referenzgruppe von 103 Personen festgestellt werden, ob sich Unterschiede in den Allelhäufigkeiten im Gen für CYP2D6 zwischen den beiden Personengruppen zeigen.

3 Material

3.1 Abkürzungen

Å	Ångström
α_1 -AGP	α_1 -acid glykoprotein (α_1 saures Glykoprotein)
AS-PCR	allele-specific PCR (Allelspezifische PCR)
bp	Basenpaar
BMI	body mass index
CAR	constitutive androstane receptor
CCD	charge couple device
CYP	Cytochrom P450
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-5'-triphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
EDDP	2-Ethyliden-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidin
EM	extensive metabolizer
EtOH	Ethanol
MMT	methadone maintenance treatment
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
NNRTI	non nucleoside reverse transcriptase inhibitor (nicht-nukleosidale Reverse-Transkriptase-Hemmer)
NRTI	nucleoside reverse transcriptase inhibitor (nukleosidaler Reverse-Transkriptase-Hemmer)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
P-Gp	Permeabilitätsglykoprotein
PM	poor metabolizer
POP	performance optimized polymer
PXR	pregnane X receptor

RFLP	restriction fragment length polymorphism (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus)
SNP	single nucleotide polymorphism
SSCP	single-strand conformation polymorphism
T _A	Anlagerungstemperatur
T _M	Schmelztemperatur
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TGGE/DGGE	temperature or denaturing gradient gel electrophoresis
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSR	template suppression reagent
UM	ultra rapid metabolizer
wt	Wildtyp

3.2 Geräte

- Thermocycler
GeneAmp® PCR System 9600, Applied Biosystems, PE Corporation, Foster City, CA
GeneAmp® PCR System 2400, Applied Biosystems, PE Corporation, Foster City, CA
GeneAmp® PCR System 2700, Applied Biosystems, PE Corporation, Foster City, CA
- Zentrifugen
Hettich Zentrifuge EBA 12, Andreas Hettich GmbH u. Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Eppendorf Zentrifuge 5415D, Eppendorf AG, Hamburg
Biofuge 22 R, Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland
- Kapillargerät
ABI™ 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, PE Corporation, Foster City, CA
- Real-Time PCR System
ABI Prism 7300 Real Time PCR System, Applied Biosystems, PE Corporation, Foster City, CA
- Digitalkamera
Nikon coolpix 5400, Nikon GmbH Düsseldorf

3.3 Chemikalien

- 10x PCR Buffer II Applied Biosystems, PE Corporation, Foster City, CA
- 310 Genetic Analyzer POP-4™ Applied Biosystems, PE Corporation, Foster City, CA
- 310 Genetic Analyzer POP-6™ Applied Biosystems, PE Corporation, Foster City, CA
- Analytical Grade Chelex® 100 Resin Bio-Rad Laboratories, Kalifornien
- Aqua ad iniectabilia Braun B. Braun Melsungen AG, Melsungen
- Biozym Agarose, Small DNA Biozym, Oldendorf, Deutschland
- Chloroform Merck, Darmstadt
- dNTP (Li-salt, 100mM) Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Ethanol Merck, Darmstadt
- Ethidiumbromid Bio-Rad Laboratories, Kalifornien
- Fluorescent Amidite Matrix Standards Applied Biosystems, PE Corporation, Foster City, CA
- Formamid (Ultra Pure Grade) Amresco, Ohio
- GeneScan®-500 [TAMRA] Size Standard Applied Biosystems, PE Corporation, Foster City, CA
- Loading Buffer Applied Biosystems, PE Corporation, Foster City, CA
- MgCl₂ Solution (25mM) Applied Biosystems, PE Corporation, Foster City, CA
- Phenol Q-Biogen, Illkirchen
- Seakam® LE Agarose FMC Bio Products, Rockland
- Tris/Acetic Acid/EDTA Buffer (TBE) 50x Bio-Rad Laboratories, Kalifornien
- TSR-Puffer Applied Biosystems, PE Corporation, Foster City, CA

3.4 Verbrauchsmaterial

- Polaroid-Sofortbildfilme Typ 667 Polaroid, Cambridge, USA

3.5 Verwendete „Kits“

- Centri•Sep™ Princeton Separations, Adelphia
- GeneAmp® XL PCR Kit Applied Biosystems, PE Corporation, Foster City, CA
- QIAamp® DNA Mini Kit Qiagen, Hilden, Deutschland
- QIAquick® PCR Purifikation Kit Qiagen, Hilden, Deutschland
- BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit Applied Biosystems, PE Corporation, Foster City, CA
- TaqMan® Universal PCR Master Mix Applied Biosystems, PE Corporation, Foster City, CA
- Quantifiler Human DNA Quantification Kit Applied Biosystems, PE Corporation, Foster City, CA

3.6 Verwendete Software

- Genotyper 3.7 Applied Biosystems, PE Corporation, Foster City, CA
- GenScan 3.7 Applied Biosystems, PE Corporation, Foster City, CA
- Sequencing Analyses 3.4.1 Applied Biosystems, PE Corporation, Foster City, CA
- SPSS 14.0 und 15.0 für Windows SPSS Inc., Chicago

3.7 Enzyme

3.7.1 Restriktionsenzyme

BstNI (10 U/ μ l)

10 x Reaktionspuffer 4 (NEBuffer)

100 X BSA

Temperatur: 60°C

Schnittstelle: CC/AGG bzw. CC/TGG

Hersteller: New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland

BtsI (10 U/ μ l)

10 x Reaktionspuffer 4 (NEBuffer)

100 x BSA

Temperatur: 37°C

Schnittstelle: GCAGTGNN/

Hersteller: New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland

3.7.2 Weitere verwendete Enzyme

Proteinase K Qbiogene, Carlsbad, USA

Ampli Taq Gold™ (5U/ μ l) Applied Biosystems/Roche, Branchburg, USA

3.8 Längenstandard

- DNA-Längenstandard XIII (50-Basenpaarleiter) Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany
- DNA-Längenstandard XVII (500-Basenpaarleiter) Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany

3.9 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Applied Biosystems, PE Corporation, Foster City, CA bzw. MWG-Biotech GmbH, Ebersberg, Deutschland synthetisiert

3.9.1 Oligonukleotide für Fragmentlängenanalysen

Name	Sequenz	
1707TdelF	6-FAM-5'-GTG GAT GGT GGG GCT AAT GCC TT-3' [Wang <i>et al.</i> , 1999]	T _A : 65 °C MgCl ₂ : 1 mM F: 238 / 237 bp
1707TdelR	5'-GCT TTG TGC CCT TCT GCC CAT CA-3'	
2549AdelF	HEX-5'-TGA CCC AGC TGG ATG AGC TGC T-3'	T _A : 69 °C MgCl ₂ : 1 mM F: 274 / 273 bp
2549AdelR	5'-CAT ACT CGG GAC AGA ACG GGG T-3'	

Tabelle 3: Name und Sequenz, der zum Nachweis der Mutationen 2549Adel (*CYP2D6**3) bzw. 1707Tdel (*CYP2D6**6) verwendeten Oligonukleotide, sowie die Anlagerungstemperatur (T_A), MgCl₂-Konzentration (MgCl₂) der jeweiligen Primerpaar-Kombinationen und die Fragmentlänge (F) der daraus resultierenden Amplifikate

3.9.2 Oligonukleotide für Allelspezifische PCRs

Name	Sequenz	
1846Gf	6-FAM-5'-TTA CCC GCA TCT CCC ACC CCC AG-3'	T _A : 68 °C MgCl ₂ : 0,7 mM dNTP: 80 µM F: 213 bp
1846Af	HEX-5'-TTA CCC GCA TCT CCC ACC CCC AA-3'	
1846GAR	5'-CAG AGA CTC CTC GGT CTC TCG CT-3' [Wang <i>et al.</i> , 1999]	
-1584Cr	6-FAM-5'-CCA GCT AAT TTT GTA TTT TTT GTA GAG ACC G-3'	T _A : 68 °C MgCl ₂ : 1 mM dNTP: 80 µM F: 278 bp
-1584Gr	ROX-5'-CCA GCT AAT TTT GTA TTT TTT GTA GAG ACC C-3'	
-1584CGf	5'-GCA GCT GCC ATA CAA TCC ACC TG-3' [Gaedigk <i>et al.</i> , 2003(1)]	

Tabelle 4: Name und Sequenz, der zum Nachweis der Mutationen 1846G>A, (*CYP2D6**4) und -1584C>G verwendeten Oligonukleotide, sowie die Anlagerungstemperatur (T_A), MgCl₂-Konzentration (MgCl₂), dNTP-Konzentration (dNTP) der jeweiligen Primerpaar-Kombinationen und die Fragmentlänge (F) der daraus resultierenden Amplifikate

Bedingungen für eine Multiplex-PCR mit den Oligonukleotiden 1707Tdelf, 1707Tdelr, 2549Adelf, 2549Adelr, 1846Gf, 1846Af, 1846GAr, -1584Cr, -1584Gr, -1584CGf

Anlagerungstemperatur: 68 °C
 MgCl₂-Konzentration: 1,2 mM
 dNTP-Konzentration: 80 µM

3.9.3 Oligonukleotide für Sequenzierung bzw. Restriktionsverdau

Name	Sequenz	
1707Tdelf	6-FAM-5'-GTG GAT GGT GGG GCT AAT GCC TT-3' [Wang <i>et al.</i> , 1999]	T _A : 65 °C MgCl ₂ : 1 mM F: 488 bp
1846GAr	5'-CAG AGA CTC CTC GGT CTC TCG CT-3' [Wang <i>et al.</i> , 1999]	
-1584CGf	5'-GCA GCT GCC ATA CAA TCC ACC TG-3' [Gaedigk <i>et al.</i> , 2003(1)]	T _A : 67 °C MgCl ₂ : 1 mM F: 540 bp
-1584CGr	5'-GTG GCT CCC CTC CAT TGT GCA AT -3' [Gaedigk <i>et al.</i> , 2003(1)]	

Tabelle 5: Name und Sequenz, der zum Nachweis der Mutation 1846G>A (*CYP2D6**4) über Restriktionsverdau und -1584C>G über Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide, sowie die Anlagerungstemperatur (T_A), MgCl₂-Konzentration (MgCl₂) der jeweiligen Primerpaar-Kombinationen und die Fragmentlänge (F) der daraus resultierenden Amplifikate

3.9.4 Oligonukleotide für XL-PCRs

Name	Sequenz	
CYP-REP7f	5'-CCT CAG GGA TGC TGC TGT CTG-3'	T _A : 61 °C Mg(OAc) ₂ : 0,8 mM F: 15 kb / 2,7 kb
CYP-REP6r	5'-GAC AGT TTC ACT CTT GTT GAC CA-3'	
2D6duplf	5'-TCC CCC ACT GAC CCA ACT CT-3' [Løvlie <i>et al.</i> , 1996]	T _A : 64 °C Mg(OAc) ₂ : 01 mM F: 4,7 kb / 3,1 kb
2D6duplr	5'-GGC GTT TCA TAC TTA TCA CCC AG-3'	

Tabelle 6: Name und Sequenz der zum Nachweis der Deletion (*CYP2D6**5) bzw. Duplikation des *CYP2D6* Gens verwendeten Oligonukleotide, sowie die Anlagerungstemperatur (T_A), Mg(OAc)₂-Konzentration (Mg(OAc)₂) der jeweiligen Primerpaar-Kombinationen und die Fragmentlänge (F) der daraus resultierenden Amplifikate

3.9.5 Oligonukleotide für Real-Time PCR

Name	Sequenz	Bedingungen
2D6ex9f3	5'-CTT CAC CTC CCT GCT GCA G-3' [Schaeffeler <i>et al.</i> , 2003]	F: 89 bp
2D6ex9r3	5'-TCA CCA GGA AAG CAA AGA CA-3' [Schaeffeler <i>et al.</i> , 2003]	
2D6ex9probe	6-FAM-5'-CCG GCC CAG CCA CCA TGG-3'-TAMRA [Schaeffeler <i>et al.</i> , 2003]	

Tabelle 7: Name und Sequenz, der zum Nachweis der Kopienzahl des *CYP2D6* Gens über Real-Time PCR verwendeten Oligonukleotide und TaqMan-Sonde, sowie die Fragmentlänge des daraus resultierenden Amplifikats

3.10 Untersuchungskollektiv

Anonymisierte EDTA-Blutproben von 43 weiblichen und 53 männlichen Patienten, die im Rahmen eines Substitutionsprogramms *rac*-Methadon (1 %ige Lösung; w/v) bzw. L-Polamidon (0,5 %ige Lösung; w/v) erhalten. Als Daten erhielten wir die tägliche Dosis an Methadon der jeweiligen Patienten sowie Körpergröße und -gewicht.

Als Referenzgruppe wurden 103 anonymisierte Blutproben, die im Rahmen verschiedener Trinkversuche im Institut für Rechtsmedizin der Universität München auf freiwilliger Basis entnommen wurden, verwendet.

4 Methoden

4.1 Präparation von „Buffy Coat“

Der „Buffy Coat“ ist ein Lymphozytenkonzentrat, welches man nach dem Abzentrifugieren von Vollblut erhält und 5 bis 10mal mehr DNA als das entsprechende Volumen an Vollblut enthält.

Um „Buffy Coat“ aus Vollblut zu gewinnen wurde das Blut für 10 Minuten bei 2.500 g und Raumtemperatur zentrifugiert (Biofuge 22R). Die mittlere der drei Phasen („Buffy Coat“) wurde abgenommen und zur DNA-Isolierung verwendet.

4.2 Isolierung genomischer DNA

Zur Isolierung der DNA wurden verschiedene Methoden eingesetzt. Ausschlaggebend bei der Wahl der Isolierungsmethode waren die spätere Verwendung und der Zustand des Ausgangsmaterials (Blut). Um eine PCR durchzuführen, bei der Fragmente von 2kb und größer amplifiziert werden sollen, benötigt man hochmolekulare DNA. Diese wurde entweder über eine Isolierung mit dem *QIAamp® DNA Mini Kit* oder über eine Phenol-Chloroform-Extraktion erhalten. Dabei wurde die Phenol-Chloroform-Extraktion nur bei Blut durchgeführt, das bereits stark agglutiniert war und wo keine Möglichkeit mehr bestand, Buffy Coat zu präparieren. Bei der Amplifikation von kleinen DNA-Fragmenten, wie bei der später beschriebenen Multiplex-PCR oder bei der Quantifizierung der DNA und *CYP2D6* über Real Time PCR stellte sich im Laufe der Versuche heraus, dass der Einsatz von niedermolekularer DNA bessere und genauere Ergebnisse erbrachte. Deshalb wurde für diese Versuche die DNA mittels der Chelex-Methode isoliert, bei der man Fragmente von 500 bis 2.000 Basenpaaren erhält.

4.2.1 DNA-Isolierung mittels Chelex

Diese DNA Extraktion nach Walsh *et al.* 1991 beruht auf dem Prinzip von Chelatkomplexen. Das Styrolharz Chelex® 100 dient hierbei als Chelator mit hoher Affinität zu polyvalenten Kationen. Durch die Zugabe der Chelex-Lösung sollen vor allem zweiwertige Kationen entfernt werden, die sich störend auf die anschließende PCR-Reaktion auswirken könnten.

Um das Probenmaterial zu waschen, wurde zu 10µl Vollblut 1ml *aqua bidest.* gegeben, gründlich gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 13.000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415D), der Überstand abgenommen und verworfen. Zu dem Zellsediment wurden 300 µl Chelex-Lösung und 10 µl Proteinase K (25 mM) zugegeben und der Ansatz ausgiebig gemischt. Bei einer Inkubation für 15 Minuten bei 56 °C erfolgte der Verdau der Proteine (Zellmembran und Histone) durch die Proteinase K. Anschließend wurde der Ansatz gemischt und bei 100 °C für 8 Minuten inkubiert, um die Proteinase K zu deaktivieren und die übrigen Zellbestandteile zu denaturieren, bzw. die DNA schließlich freizusetzen. Um das Styrolharz Chelex mit den gebundenen Kationen und störende Zelltrümmer zu sedimentieren, folgte eine abschließende Zentrifugation bei 13.000 rpm für 5 Minuten (Eppendorf Zentrifuge 5415D). Die im Überstand enthaltene DNA konnte anschließend direkt in die PCR eingesetzt werden. Bis zum Gebrauch wurde die DNA bei 4 °C oder bei -20 °C aufbewahrt

Chelex-Lösung: 5 % Chelex (w / v)

pH-Wert des Chelexharzes: im basischen Bereich (pH 10-11)

4.2.2 DNA-Isolierung mittels Phenol Chloroform

Diese Methode der DNA-Isolierung eignet sich, um aus großen Mengen Probenmaterials hochmolekulare DNA zu isolieren.

1 ml Vollblut wurden mit 2 ml Lyse-Mix-Puffer und 100 µl Proteinase K (25 mM) versetzt und über Nacht bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 2 ml Phenol zugegeben, um die Proteine von der DNA zu trennen. Der Ansatz wurde im Überkopfschüttler für 10 Minuten durch Rotation gemischt und danach 8 Minuten bei 4.000 g zentrifugiert (Biofuge 22R). Die oberste, wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt mit 1 ml Phenol und

1 ml Chloroform versetzt, wiederum 10 Minuten gemischt und für 8 Minuten bei 4.000 g zentrifugiert (Biofuge 22R). Dieser Schritt wurde einmal wiederholt und anschließend dem Überstand 2 ml Chloroform zugegeben, um Rückstände von Phenol zu entfernen. Nach erneuter 10-minütiger Rotation und Zentrifugation (8 Minuten, 4.000 g, Biofuge 22R) wurde die obere wässrige Phase abgenommen mit 5 ml 70 % EtOH versetzt und bei 4 °C für mindestens 30 Minuten inkubiert, um die DNA zu präzipitieren. Es folgte eine Zentrifugation bei Raumtemperatur für 8 Minuten bei 8.000 rpm (Eppendorf Zentrifuge 5415D). Der Überstand wurde abgenommen, das DNA enthaltende Sediment über Nacht luftgetrocknet und in 100 µl *aqua bidest.* gelöst.

Lyse-Mix-Puffer : 1 M Tris/HCl pH 7,6
 0,5 M EDTA
 5 M NaCl
 10 % SDS
 20 mg/ml Proteinase K

4.2.3 DNA-Isolierung mittels *QIAamp® DNA Mini Kit*

Bei dieser Methode erfolgte die Isolierung von hochmolekularer DNA im Maßstab von bis zu 15-25 µg aus 200 µl Buffy Coat. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR („polymerase chain reaction“) kann ein DNA-Abschnitt exponentiell amplifiziert werden. Dabei bestimmen zwei spezifische Oligonukleotide (Primer), die komplementär zum 5'-bzw. 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts sind, die beiden Enden des resultierenden Fragments. Primer sind nötig, damit die hitzestabile Taq-Polymerase die DNA-Synthese starten kann, da eine DNA-Polymerase freie 3'-OH-Gruppen benötigt. Die PCR läuft in drei sich wiederholenden Schritten, der Denaturierung, der Anlagerung und der Extension ab. Bei der Denaturierung wird die doppelsträngige Matrizen-DNA bei 94 bzw. 95 °C

in Einzelstränge getrennt, danach folgt die Anlagerung der Oligonukleotid-Primer bei deren spezifischer Anlagerungstemperatur (Annealingtemperatur) an die komplementäre Matrizensequenz. Die Anlagerungstemperatur eines Primers liegt meist bei 3 bis 5 °C unter seiner Schmelztemperatur (T_m), die nach der Wallace-Regel [Wallace *et al.*, 1979] wie folgt berechnet wird:

$$T_m = 2 \text{ °C} \times (A+T) + 4 \text{ °C} \times (G+C)$$

Die angelagerten Primer werden schließlich bei 72 °C, dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, verlängert.

Nach jedem vollendeten Zyklus dienen die neu entstandenen DNA-Moleküle in der nächsten Runde ebenfalls als Matrize, dadurch kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation. Die Anlagerung der Primer ist ebenfalls von der Mg^{2+} -Konzentration im Reaktionsansatz abhängig. Deshalb ist es wichtig, für jedes Primerpaar die Anlagerungstemperatur und die optimale Mg^{2+} -Konzentration auszutesten.

In der vorliegenden Arbeit wurden Reaktionsansätze von 25 µl erstellt. Hierfür wurden 500 pg bis 1 ng DNA, je 5 pmol der beiden Primer, 10 x Reaktionspuffer, 10 x dNTP-Lösung, die entsprechende Menge an $MgCl_2$ und 1,25 U *Ampli Taq Gold™* angesetzt und mit *aqua bidest.* auf ein Volumen von 25 µl eingestellt.

Da es sich bei der hier verwendeten *Ampli Taq Gold™* um eine chemisch modifiziertes Taq-Inhibitor-Gemisch (Hot Start Polymerase) handelt, dessen Aktivierung erst mit der thermischen Zerstörung der Taq-Inhibitorbindung beginnt, musste der initiale Denaturierungsschritt der PCR auf 12 Minuten verlängert werden.

Der Thermocycler wurde dann auf die nötigen Bedingungen eingestellt.

Grundschema:

1x	94 / 95 °C	12 min
25-35x	94 / 95 °C	30 sec
	T_A	30/45 sec
	72 °C	30 sec pro 500 bp
1x	72 °C	10 min

Tabelle 8: Grundschema der PCR-Bedingungen; T_A ist dabei die Anlagerungstemperatur für die Oligonukleotid-Primer, die bei der niedrigeren berechneten Temperatur der beiden Primer liegt.

Für die in dieser Arbeit verwendeten Primerpaarkombinationen wurden folgende Bedingungen gewählt:

	1707Tdelf u. 1707Tdelr	1707Tdelf u. 1846GAr	2549Adelf u. 2549Adelr
Anfangsdenaturierung	94 °C 12 min	94 °C 12 min	94 °C 12 min
Denaturierung	94 °C 30 sec	94 °C 30 sec	94 °C 30 sec
Annealing	65 °C 45 sec	65 °C 45 sec	69 °C 45 sec
Extension	72 °C 45 sec	72 °C 45 sec	72 °C 45 sec
Endextension	72 °C 10 min	72 °C 10 min	72 °C 10min

Tabelle 9: PCR-Bedingungen für die Primerpaarkombinationen 1707Tdelf und 1707Tdelr, 1707Tdelf und 1846GAr bzw. 2549Adelf und 2549Adelr

	-1584CGf u.1584CGr
Anfangsdenaturierung	94 °C 12 min
Denaturierung	94 °C 30 sec
Annealing	67 °C 45 sec
Extension	72 °C 45 sec
Endextension	72 °C 10 min

Tabelle 10: PCR-Bedingungen für die Primerpaarkombinationen -1584CGf und -1584CGr

10 x dNTP-Mischung: 2 mM dATP
 2 mM dCTP
 2 mM dGTP
 2 mM dTTP

Die Oligonukleotide wurden in *aqua bidest.* gelöst.

4.3.1 Allelspezifische PCR (AS-PCR)

Bei dieser Methode handelt es sich um die selektive PCR Amplifikation eines Allels, um einzelne Basenaustausche (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) zu detektieren. Dies wird erreicht mit Oligonukleotid-Primer, die spezifisch für die Wildtypsequenz bzw. die mutierte Sequenz sind. Dabei bestimmt die letzte oder vorletzte Base am 3'-Ende des jeweiligen Vorwärts- oder Rückwärtsprimer die Spezifität. Die hier verwendete *Ampli Taq Gold™* ist unter entsprechend stringenten Bedingungen, aufgrund der mangelnden 3'-5' Exonukleaseaktivität nicht in der Lage, bei einer Fehlpaarung das Amplifikat bzw. den Oligonukleotid-Primer zu verlängern. Somit entsteht, bei einer nicht passenden Base am 3'-Ende des Primers kein Amplifikat. In den meisten Fällen reicht es aus neben der Anlagerungstemperatur die Mg^{2+} -Konzentration und dNTP-Konzentration zu optimieren, um eine spezifische Bindung der verschiedenen Primerpaarkombinationen zu erreichen. Um die Spezifität weiter zu steigern, kann darüber hinaus eine Titration der Oligonukleotid-Primer-, Taq-Polymerase- und DNA-Konzentration hilfreich sein. Auch die Zugabe eines weiteren Primerpaares oder Formamid kann die Stringenz erhöhen [Sommer *et al.*, 1992; Bottema *et al.*, 1993; Bottema und Sommer, 1993]. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Bestimmung der Spezifität die letzte Base am 3'-Ende gewählt und Reaktionsansätze von 25 μ l erstellt. Hierfür wurden 500 pg bis 1 ng DNA, je 5 pmol der Primer, 10 x Reaktionspuffer, die entsprechende Menge an dNTP und $MgCl_2$ und 1,25 U *Ampli Taq Gold™* angesetzt und mit *aqua bidest.* auf ein Volumen von 25 μ l eingestellt.

Für die in dieser Arbeit verwendeten Primerpaarkombinationen der AS-PCR wurden folgende Bedingungen gewählt:

	1846Gf, 1846Af und 1846GAR		-1584Cr, -1584Gr und -1584CGf	
Anfangsdenaturierung	94 °C 12 min		94 °C 12 min	
Denaturierung	94 °C 30 sec	35 x	94 °C 30 sec	35 x
Annealing	65 °C 45 sec		65 °C 45 sec	
Extension	72 °C 45 sec		72 °C 45 sec	
Endextension	72 °C 10 min		72 °C 10 min	

Tabelle 11: PCR-Bedingungen für die Primerpaarkombinationen 1846Gf, 1846Af u. 1846GAR und -1584Cr, -1584Gr und -1584CGf

4.3.2 Multiplex-PCR

Die Multiplex-PCR ist eine material-und zeitsparende Methode zur simultanen Amplifikation mehrerer PCR Ziele in einem Reaktionsansatz. Hierfür werden mehrerer Primerpaare mit unterschiedlicher Fluoreszenzmarkierung eingesetzt. Bei der Etablierung einer Multiplex-PCR ist besonders auf ein sorgfältiges Primerdesign zu achten. Neben der Optimierung der Annealingtemperatur und $MgCl_2$ -Konzentration müssen bei einer Multiplex-PCR ebenfalls die Oligonukleotid-Primer-Konzentrationen aufeinander abgestimmt werden, um eine Amplifikation aller Fragmente mit gleicher bzw. ähnlicher Intensität zu gewährleisten.

In der vorliegenden Arbeit wurden Oligonukleotid-Primer für zwei Standard-PCRs und zwei AS-PCR miteinander kombiniert. Aus diesem Grund musste bei der Optimierung der PCR-Bedingungen ebenfalls auf eine hohe Stringenz geachtet werden. Neben den Oligonukleotid-Primer-Konzentrationen wurden die Annealingtemperatur, die Mg^{2+} -Konzentration und dNTP-Konzentration optimiert. Es wurden Reaktionsansätze von 25 μ l erstellt. Hierfür wurden 500 pg bis 1 ng DNA, 10 x Reaktionspuffer, 2,5 μ l Primermix (Zusammensetzung siehe Tabelle 12), 1 μ l der 10 x dNTP-Lösung (80 μ M pro dNTP), 1,2 mM $MgCl_2$ und 1,25 U *Ampli Taq GoldTM* angesetzt und mit *aqua bidest.* auf ein Volumen von 25 μ l eingestellt.

Primer	Konzentration der Primer im Primermix
-1584Cr	3 μ M
-1584Gr	3 μ M
-1584CGf	4 μ M
1707Tdelf	2,75 μ M
1707Tdelr	2,75 μ M
1846Gf	1 μ M
1846Af	1,25 μ M
1846GAr	1 μ M
2549Adelf	1,75 μ M
2549Adelr	1,75 μ M

Tabelle 12: Konzentrationen der einzelnen Oligonukleotid-Primer

Für die in dieser Arbeit verwendete Primerpaarkombination der Multiplex-PCR wurden folgende Bedingungen gewählt:

	-1584Cr, -1584Gr, -1584CGf, 1707Tdelf, 1707Tdelr, 1846Gf, 1846Af, 1846GAr, 2549Adelf u. 2549Adelr	
Anfangsdenaturierung	94 °C 12 min	
Denaturierung	94 °C 30 sec	32 x
Annealing	68 °C 45 sec	
Extension	72 °C 20 sec	
Endextension	60 °C 60 min	

Tabelle 13: PCR-Bedingungen für die Primerpaarkombinationen -1584Cr, -1584Gr, -1584CGf, 1707Tdelf, 1707Tdelr, 1846Gf, 1846Af, 1846GAr, 2549Adelf u. 2549Adelr

4.3.3 PCR von langen Fragmenten (XL-PCR) mittels

GeneAmp® XL PCR Kit

Bei einer Standard-PCR können bis zu etwa 3 kb lange DNA-Fragmente amplifiziert werden. Mit Hilfe bestimmter Polymerasen, weiterer Additive in der PCR-Reaktion und optimalen Bedingungen können aber auch Fragmente mit einer Länge von über 20-40 kb vervielfältigt werden. Um eine Amplifikation langer Fragmente zu erreichen, wird meist ein Gemisch aus zwei verschiedenen thermostabilen Polymerasen eingesetzt. Für eine hohe Prozessivität sorgt eine Polymerase ohne 3'-5' Exonukleaseaktivität (Korrekturleseaktivität, proofreading activity), wie zum Beispiel die Taq-Polymerase. Da die Effektivität einer PCR bei Fehlpaarung (Einbau einer nicht korrekten Base) drastisch sinkt wird dem Reaktionsgemisch eine zweite Polymerase mit Korrekturleseaktivität in geringerer Konzentration zugesetzt, damit die Reaktion problemlos fortlaufen kann. Für eine effiziente PCR von langen Fragmenten benötigt man darüber hinaus hochmolekulare und qualitativ hochwertige DNA.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Amplifikation von Fragmenten mit 3 und mehr kb der *GeneAmp® XL PCR Kit* verwendet. Hierfür wurden 1µg DNA, je 5 pmol der Primer, die entsprechende Menge Mg(OAc)₂, 3,3 x XL Buffer II, 800 µM GeneAmp 10 mM dNTP Blend (200 µM pro dNTP) und 1 U *rTh* DNA Polymerase, XL verwendet und die Reaktionsgemische der verschiedenen PCRs genau nach den Angaben des Herstellers erstellt.

Für die in dieser Arbeit verwendeten Primerpaarkombinationen zur Amplifikation von langen Fragmenten wurden folgende Bedingungen gewählt:

	2D6duplf und 2D6duplr	CYP-REP7f und CYP-REP6r
Anfangsdenaturierung	94 °C 1 min	94 °C 1 min
Denaturierung	94 °C 15 sec	94 °C 15 sec
Annealing	64 °C 45 sec	61 °C 45 sec
Extension	68 °C 5 min	68 °C 10 min
Endextension	72 °C 10 min	72 °C 10 min

Tabelle 14: PCR-Bedingungen für die Primerpaarkombinationen 2D6duplf u. 2D6duplr und CYP-REP7f und CYP-REP6r

4.4 Sequenzierung

4.4.1 Aufreinigung von PCR-Produkten mittels *QIAquick®*

PCRPurifikation Kit

Um eine ausreichende Menge an der zu sequenzierenden DNA zu erhalten, werden die entsprechenden DNA-Fragmente im Vorfeld amplifiziert. Erfolgt dies durch eine PCR müssen anschließend überschüssige Oligonukleotid-Primer, Nukleotide, Polymerasen und Salze entfernt werden. In der vorliegenden Arbeit erfolgte dies mittels dem *QIAquick® PCR Purifikation Kit*. Das Prinzip dieser Reinigung beruht auf selektive Bindungseigenschaften von Silikamembranen. Die DNA bindet in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen an die Membran, während andere Komponenten die Membran passieren.

Die Durchführung der Reinigung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die so gereinigten Fragmente wurden bei -20 °C gelagert.

4.4.2 Sequenzierung mittels *BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit*

Die verwendete DNA-Sequenzierungsmethode basiert auf dem Prinzip des Kettenabbruch-Verfahrens nach Sanger *et al.* (1977). Dabei wird ausgenutzt, dass bei der Neusynthese eines DNA-Stranges von einer festgelegten Primer-Stelle ausgegangen wird, das Ende jedoch nicht definiert ist. Als Substrate für die DNA-Polymerase werden dann sowohl dNTP als auch Di-desoxynukleotide (ddNTP) eingesetzt. Durch den Einbau eines ddNTP stoppt die Reaktion und es kommt zu einem Kettenabbruch, da wegen der fehlenden 3'-OH-Gruppe kein weiteres Nukleotid angefügt werden kann. Somit entstehen unterschiedlich lange DNA-Fragmente, deren Enden durch das eingebaute, zum Abbruch führende ddNTP bestimmt werden. Werden diese Fragmente mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, lassen sie sich bei einer elektrophoretischen Auftrennung durch einen Laser detektieren. Anhand der Laufreihenfolge kann man anschließend die zugrunde liegende Sequenz bestimmen. Es gibt zwei Möglichkeiten die Fragmente zu markieren. Der Farbstoff kann entweder an die ddNTP oder an das 5'-Ende des jeweiligen Oligonukleotid-Primers gekoppelt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Sequenzierung mittels dem *BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit*, der unterschiedlich fluoreszenzmarkierte ddNTP enthält, durchgeführt. Für die Sequenzierung des -1584 C>G Polymorphismus wurde der Primer -1584CGf und für die Deletion des Adenins an Position 2549 (*CYP2D6*3*) der Primer 2549Adelr verwendet. Der Reaktionsansatz wurde nach Angaben des Herstellers erstellt, wobei 2 µl der gereinigten PCR-Produkte und 2 µl des entsprechenden Primer (Endkonzentration 0,2 µM) eingesetzt wurden.

Bedingungen für die Sequenzierreaktion:

	-1584CGf bzw. 2549Adelr	
Anfangsdenaturierung	96 °C 1 min	
Denaturierung	96 °C 10 sec	25 x
Annealing	55 °C 10 sec	
Extension	60 °C 2 min	

Tabelle 15: PCR-Bedingungen der Sequenzierreaktion für den -1584CGf bzw. 2549Adelr Primer

4.4.3 Aufreinigung der Sequenzierprodukte mittels

*Centri•Sep*TM

Bevor die Sequenzierprodukte mittels Kapillarelektrophorese analysiert werden können, müssen überschüssige ddNTP, dNTP, Oligonukleotid-Primer und Polymerase aus dem Ansatz entfernt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Reinigung mittels *Centri•Sep*TM durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf Gelfiltration, wobei ein unlösliches, aber stark hydratisierendes Polymer kleinere Moleküle aufnimmt, während größere Moleküle nicht aufgenommen werden und die Säule schneller passieren. Die Durchführung der Reinigung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

4.5 Enzymatische Restriktion von DNA

Mit einem Restriktionsverdau ist es möglich, DNA zu analysieren und charakterisieren. Zu der zu verdauenden DNA wurde 10 x Restriktionspuffer (es wurden die vom Hersteller empfohlenen 10 x Puffer verwendet) und das Restriktionsenzym hinzu gegeben und mit *aqua bidest.* auf ein Endvolumen von 20 µl gebracht. Die Restriktionstemperatur und der zu verwendende 10 x Restriktionspuffer wurden nach maximaler Enzymaktivität ausgewählt. Die eingesetzte Enzymmenge richtete sich nach der DNA-Konzentration, wobei pro µg DNA 1-2 U Enzym zugegeben wurden (1 U Enzym verdaut 1 µg DNA in einer Stunde). Der Ansatz wurde anschließend bei der entsprechenden Temperatur für 1-2 Stunden im Wasserbad inkubiert. Das Ergebnis und die Vollständigkeit der Restriktion wurde überprüft, indem der Verdau auf ein Agarosegel aufgetragen wurde.

4.6 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Unter Elektrophorese versteht man die Bewegung von geladenen Teilchen, wie z. B. Molekülen in einem Medium unter Einfluss eines elektrischen Feldes. Die Wandergeschwindigkeiten verschiedener Moleküle hängen von deren Ladung, Form, effektiver Größe, Lösungsumgebung sowie der Stärke des elektrischen Feldes ab. Durch diese unterschiedlichen Wan-

dergeschwindigkeiten ist es unter anderem auch möglich, DNA-Fragmente aufgrund ihrer negativen Ladung der Größe nach aufzutrennen, wobei sich größere Fragmente langsamer als kleinere Fragmente in dem jeweils verwendeten Medium bewegen.

4.6.1 Agarose-Gelelektrophorese

Diese Methode eignet sich zur Bestimmung der Größe und Konzentration von DNA-Molekülen. Man kann die Agarosegelelektrophorese ebenfalls für präparative Zwecke nutzen. Je nach Länge der DNA-Fragmente verwendet man unterschiedlich prozentige Gele, je kürzer die Fragmente, desto höher der Prozentsatz an Agarose im Gel.

Die für die gewünschte Konzentration erforderliche Agarosemenge wurde abgewogen, mit 1 x Laufpuffer (in der Regel TBE) auf das benötigte Volumen aufgefüllt und im Mikrowellenherd aufgeköcht. Danach wurde die Lösung auf etwa 60 °C abgekühlt, 5 µl Ethidiumbromid (0,005 %, v/v) dazugegeben und in die vorbereitete Gelkammer gegossen. Nach dem Erstarren des Gels gab man es in eine mit 1 x Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer und zog den Gelkamm vorsichtig heraus. Dabei sollte das Gel mit Laufpuffer bedeckt sein.

Nun konnten die DNA Proben in die Taschen eingefüllt werden. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/6 Volumen Loading Buffer von Applied Biosystems versetzt. Die Auftrennung erfolgte dann je nach Fragmentgröße, gewünschter Bandenschärfe, Prozentigkeit des Gels und verwendetem Laufpuffer bei 30-110 V. Da im Agarosegel Ethidiumbromid (0,005 %, v/v) enthalten ist, konnten die DNA-Fragmente nach dem Gellauf unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden. Die Ermittlung der Größe der Fragmente erfolgte durch den Vergleich mit dem ebenfalls auf das Gel aufgetragenen Längenstandard.

50 x TBE-Puffer: Tris/Acetic Acid/EDTA Buffer (TBE) 50 x,
Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA

1 x TBE-Puffer: 2 % (v/v) 50 x TBE-Puffer in deionisiertem Wasser

Längenstandard : 4 µl Längenstandard-Stammlösung (250 ng/µl)
2 µl 6 x Auftragspuffer
4 µl *aqua bidest.*

Endkonzentration: 100 ng/µl

4.6.2 Kapillar-Gelelektrophorese

Die mittels PCR amplifizierten, fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente werden in einer denaturierenden Matrix aus einem linearen Polymer der Größe nach aufgetrennt.

Die Amplifikate werden hierfür nach der PCR in einem nicht ionischen Lösungsmittel resuspendiert und anschließend denaturiert. Somit erhält man einzelsträngige DNA, die keine Sekundärstrukturen ausbildet, wodurch die Fragmente ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Um diesen Zustand während des Gellaufs aufrecht zu erhalten, enthält das Gel im Kapillargerät 7M Harnstoff, der die Wasserstoffbrückenbindungen der Doppelhelix aufbricht. Nach Anlegen einer Spannung bewegen sich die Amplifikate durch die mit dem flüssigen Polymer gefüllte Kapillare im elektrischen Feld zur Anode. Dabei wandern die DNA-Fragmente an einem Argonlaser vorbei, dessen Hauptemission bei einer Wellenlänge von 488 nm und 514,5 nm liegt. Der Argonlaser regt die markierten Amplifikate an und das emittierte Licht wird auf einen CCD-Chip projiziert („Charge Coupled Device“), der die Intensität von vier nicht überlappenden Wellenlängen-Bereichen detektieren kann. Jeder Bereich korrespondiert dabei mit dem Emissionsmaximum der in der vorangegangenen Multiplex-PCR bzw. Sequenzierreaktion eingesetzten vier Fluoreszenzfarbstoffe. Mittels spezieller Software zur DNA-Fragmentanalyse bzw. Sequenzanalyse werden die Amplifikate bezüglich ihrer Menge, Fragmentgröße und Fluoreszenzmarkierung analysiert. In der vorliegenden Arbeit wurde das *ABI™ 310 Genetic Analyzer System* von Applied Biosystems, ein mikroprozessorgesteuertes Elektrophorese- und Fluoreszenz-Detektions-System, verwendet.

4.6.2.1 Sequenzanalyse mittels Kapillar-Gelelektrophorese

Vor der Kapillar-Gelelektrophorese wurden 4 µl der zuvor mittels PCR amplifizierten und gereinigten Sequenzierprodukte in 20 µl TSR-Puffer aufgenommen und für 2,5 Minuten bei 100 °C denaturiert. Als Polymer wurde 310 Genetic Analyzer POP-6™ verwendet, zur Analyse der Sequenzierprodukte das „virtuelle-Filter-Set-E“ genutzt und die Auswertung erfolgte über die Sequencing Analyses 3.4.1 Software von Applied Biosystems.

4.6.2.2 DNA-Fragmentanalyse mittels Kapillar-Gelelektrophorese

Um die Größe von Amplifikaten messen zu können muss pro Ansatz ein Längenstandard mitgeführt werden, der fluoreszenzmarkierte DNA-Fragmente mit festgelegter Länge enthält. In der vorliegenden Arbeit wurde vor der Kapillar-Gelelektrophorese zu 15 µl Formamid, 0,5 µl Längenstandard und 2 µl der zu analysierenden PCR-Produkte gegeben und für 2,5 Minuten bei 100 °C denaturiert. Als Polymer wurde 310 Genetic Analyzer POP-4™ verwendet, zur Analyse der PCR-Produkte das "virtuelle-Filter-Set-A" genutzt und die Auswertung erfolgte über die Genotyper 3.7 und GeneScan 3.7 Software von Applied Biosystems.

Längenstandard: GeneScan®-500 [TAMRA] Size Standard

4.7 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und bietet gleichzeitig die Möglichkeit der Quantifizierung von Nukleinsäuren. Darüber hinaus kann die Real-Time PCR auch zum Nachweis von SNP (single nukleotide polymorphism) verwendet werden.

Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen am Ende bzw. während eines PCR-Zyklus durchgeführt. Die Fluoreszenz nimmt dabei mit der Menge der synthetisierten PCR-Produkte zu, was eine Quantifizierung ermöglicht. Eine gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente ist nicht nötig, die Daten sind sofort verfügbar und das Kontaminationsrisiko ist gering, da die PCR-Gefäße nach der PCR-Reaktion nicht mehr geöffnet werden müssen. Zusätzlich zu den beiden Oligonukleotid-Primern, die in jeder PCR vorhanden sind, befindet sich im Reaktionsansatz eine Sonde, die an eine Gensequenz zwischen den beiden Primern bindet. Diese TaqMan®-Sonde ist an ihrem einen Ende mit dem Quencher, an ihrem anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (z.B. TAMRA und FAM) markiert. Bei einer intakten TaqMan®-Sonde liegen die beiden Fluoreszenzfarbstoffe nahe zusammen, so dass nach Anregung durch einen Argon-Laser die Energie des Reporterfarbstoffes auf den Quencherfarbstoff übertragen wird und nur dieser Licht emittiert. Wenn die Taq-Polymerase, die zusätzlich eine Exonukleaseaktivität besitzt, die Sonde während der Synthese des Gegenstrangs am 5'-Ende abbaut, entfernen sich dadurch Quencher und Fluorophor voneinander

und eine steigende Reporter-Fluoreszenz kann gemessen werden. Um die Menge an DNA in den einzelnen Proben berechnen zu können, wird pro 96-well-Platte eine Verdünnungsreihe mit bekannten DNA-Konzentrationen mitgeführt. Anhand dieser Eichkurve kann dann die DNA-Menge der Reaktionsansätze bestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das *ABI Prism 7300 Real Time PCR System* verwendet.

4.7.1 Bestimmung der Menge an humaner DNA mittels

Quantifiler Human DNA Quantification Kit

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Bestimmung der Menge an humaner DNA der *Quantifiler Human DNA Quantification Kit* verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

4.7.2 Bestimmung der Kopienzahl des *CYP2D6* Gens

Um die Anzahl der Kopien des *CYP2D6* Gens pro Genom im Verhältnis zu einem Referenzgen zu bestimmen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Real-Time PCR Assay verwendet, der von Schaeffeler *et al.* 2003 beschrieben wurde. Es wurden je DNA-Probe zwei Reaktionsansätze von 25 µl erstellt. Hierfür wurden 2 µl DNA, 1 x *TaqMan® Universal PCR Master Mix*, 300 nM pro Oligonukleotid-Primer und 200 nM der TaqMan-Sonde eingesetzt und mit *aqua bidest.* auf ein Volumen von 25 µl eingestellt.

Bedingungen für die Real-Time PCR:

	2D6ex9f3, 2D6ex9r3 und 2D6ex9 probe	
Anfangsdenaturierung	95 °C 10 min	
Denaturierung	95 °C 15 sec	40 x
Annealing	60 °C 1 min	

Tabelle 16: PCR-Bedingungen des Real-Time PCR Assay der Primerpaar- und TaqMan-Probe-Kombination 2D6ex9f3 und 2D6ex9r3 Primer und 2D6ex9 probe.

Die Ergebnisse dieser Real-Time PCR wurden anschließend mit der mittels *Quantifiler Human DNA Quantification Kit* gemessenen Menge an humaner DNA in Korrelation gesetzt. Durch den Quotienten aus der Menge an *CYP2D6* und der Menge an humaner DNA kann man dann Rückschlüsse auf die Kopienzahl des *CYP2D6* Gens ziehen (s. Tabelle 17).

<u>Menge <i>CYP2D6</i></u> Menge an humaner DNA	Anzahl der <i>CYP2D6</i> Genkopien
0 : 1 Verhältnis	Keine Genkopie
0,5 : 1 Verhältnis	1 Genkopie
1 : 1 Verhältnis	2 Genkopien
1,5 : 1 Verhältnis	3 Genkopien

Tabelle 17: Korrelation der Menge an humaner DNA mit der Menge an gemessenem *CYP2D6*

4.8 Bestimmung des Methadonspiegels im Blut

Die Bestimmung des Methadonspiegels im Blut der Methadonpatienten erfolgte über flüssigflüssig Extraktion und anschließender Hochdruckflüssigkeitschromatographie nach Eap *et al.* (1996) im Rahmen der Dissertation von Herrn Albert Wicht [in Arbeit]. Hierbei wurde die Gesamtmethadonkonzentration, die Konzentration von (*R*)- und (*S*)-Methadon, sowie das Vorhandensein von weiteren möglicherweise konsumierten Substanzen ermittelt.

4.9 Statistische Beurteilung

Die statistischen Berechnungen und Tests erfolgten mithilfe der SPSS 14.0 bzw. 15.0 Software für Windows.

5 Ergebnisse

5.1 Genotypisierung der Methadonpatienten und der Referenzgruppe

5.1.1 Entwicklung einer Multiplex-PCR zur Detektion der Nullallele *CYP2D6**3, *4 und *6 sowie der Punktmutation -1584C>G

Zum Nachweis der charakteristischen Mutationen der Nullallele *CYP2D6**3 (2549A~~del~~), *4 (1846G>A) und *6 (1707T~~del~~) und der Punktmutation -1584C>G wurde eine Multiplex-PCR entwickelt. Hierfür wurden spezifische Oligonukleotid-Primer für die einzelnen Polymorphismen ausgewählt und ausgetestet. Anschließend wurden die PCR Bedingungen für die Multiplex-PCR etabliert.

5.1.1.1 Wahl der Oligonukleotid-Primer

Bei der Auswahl der Oligonukleotid-Primer musste besonders auf die Spezifität geachtet werden, da die Sequenzen des *CYP2D6* Gens und der Pseudogene *CYP2D7P* bzw. *CYP2D8P* große Ähnlichkeit aufweisen.

5.1.1.1.1 Oligonukleotid-Primer zum Nachweis von 2549Adel (*CYP2D6**3) und 1707Tdel (*CYP2D6**6)

Die Allele *CYP2D6**3 und *6 weisen Deletionen einzelner Basenpaare auf. Bei Allel *3 geht ein Adenin an Position 2549 (Exon 5) und bei Allel *6 ein Thymin an Position 1707 (Exon 3) verloren. Die Primer wurden so gewählt, dass die Stelle der Deletion innerhalb des Fragments liegt. Somit erhält man bei einer Deletion ein um ein Basenpaar verkürztes Amplifikat. Im Laufe der Versuche stellte sich heraus, dass durch die ausgewählten Oligonukleotid-Primer für den Nachweis von Allel *3 ebenfalls die 3bp-Deletion 2613-2615delAGA des Allels *CYP2D6**9 nachgewiesen werden konnte (Sequenzen siehe Anhang).

2549Adel (*CYP2D6**3):

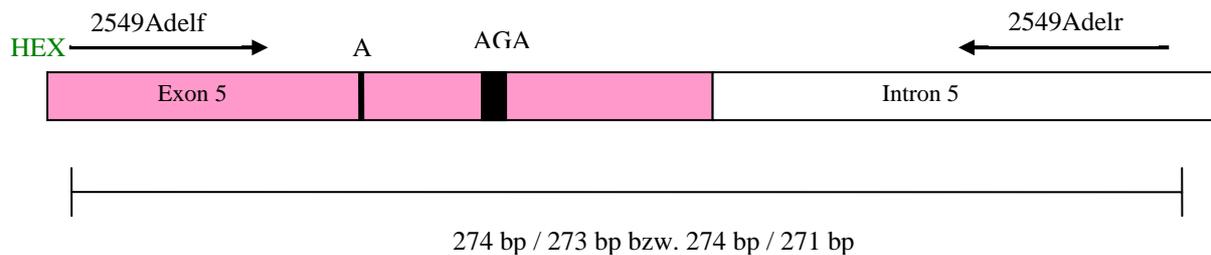


Abb. 4: Schematische Darstellung der gewählten Oligonukleotid-Primer 2549Adelf und 2549Adelr, zum Nachweis der Deletion 2549Adel des Allels *CYP2D6**3 sowie 2613-2615delAGA des Allels *CYP2D6**9.

Ein Teil von Exon 5 und Intron 5 wird amplifiziert. Bei der Wildtypsequenz erhält man ein Fragment mit einer Länge von 274 bp, bei der Deletion des Adenins ein Amplifikat von 273 bp bzw. bei Deletion von Adenin, Guanin und Adenin 271 bp. Für den Nachweis wurde der Vorwärtsprimer am 5'-Ende mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff Hex markiert.

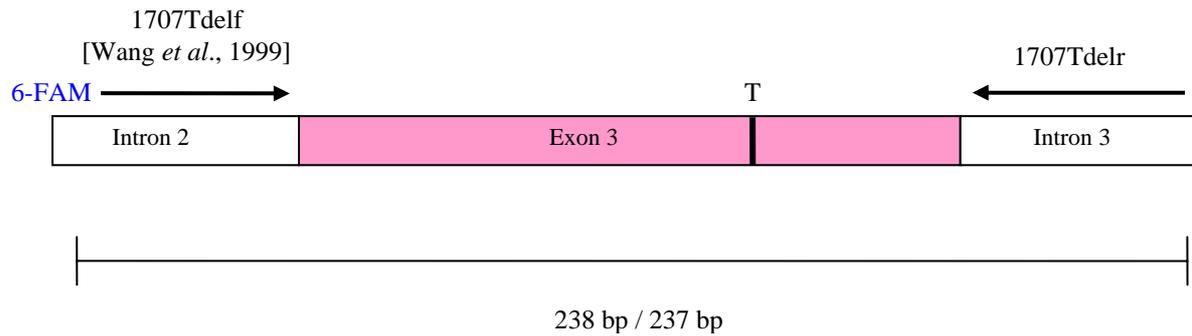
1707Tdel (CYP2D6*6):

Abb. 5: Schematische Darstellung der gewählten Oligonukleotid-Primer 1707Tdelf [Wang *et al.*, 1999] und 1707Tdelr, zum Nachweis der Deletion 1707Tdel des Allels *CYP2D6*6*. Ein Teil von Intron 2, Intron 3 und das gesamte Exon 3 werden amplifiziert. Bei der Wildtypsequenz erhält man ein Fragment mit einer Länge von 238 bp, bei Deletion des Thymins ein Amplifikat von 237 bp. Für den Nachweis wurde der Vorwärtsprimer am 5'-Ende mit dem blauen Fluoreszenzfarbstoff 6-FAM markiert.

5.1.1.1.2 Oligonukleotid-Primer zum Nachweis von 1846G>A (*CYP2D6*4*) und -1584C>G

Die charakteristische Mutation bei Allel *CYP2D6*4* ist ein Basenaustausch von Guanin zu Adenin an der Position 1846, der Konsensus Sequenz der 3`Spleißstelle von Intron 3. Zum Nachweis dieser Mutation, sowie dem Basenaustausch von Cytosin zu Guanin im regulatorischen Bereich an Position -1584 wurde jeweils eine allelspezifische PCR etabliert. Hierfür wurden unterschiedliche Vorwärtsprimer bzw. Rückwärtsprimer verwendet die sich in der letzten Base am 3'-Ende unterscheiden. Dabei wird ausschließlich, der am 3'-Ende passende Oligonukleotid-Primer bei der entsprechenden Sequenz verlängert. Der Gegenprimer der jeweiligen Reaktion bleibt gleich (Sequenzen siehe Anhang).

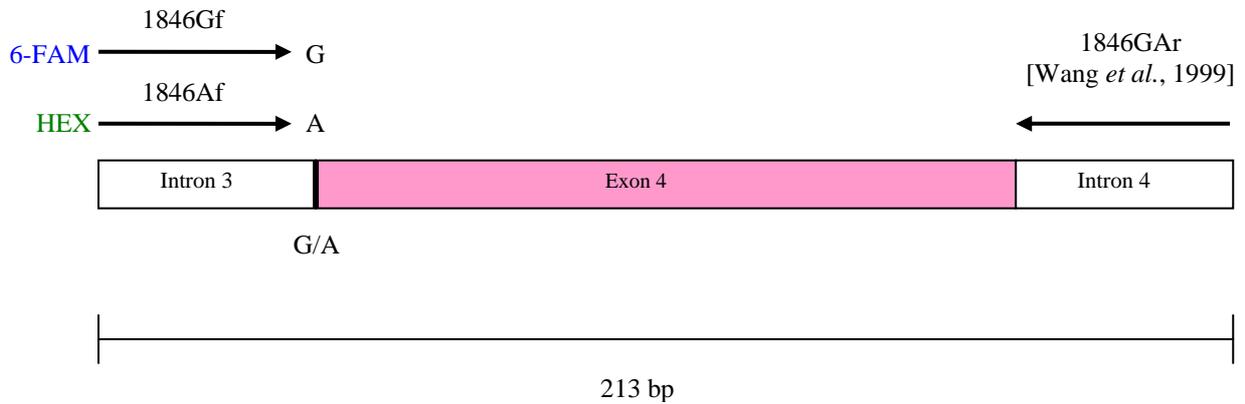
1846G>A (CYP2D6*4)

Abb. 6: Schematische Darstellung der gewählten Oligonukleotid-Primer 1846Gf, 1846Af und 1846GAR [Wang *et al.*, 1999], zum Nachweis des Basenaustauschs 1846G>A des Allels *CYP2D6*4*. Kurze Teile von Intron 3 und Intron 4 sowie das gesamte Exon 4 werden amplifiziert. Die beiden Vorwärtsprimer tragen unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe. Somit erhält man bei Vorhandensein der Wildtypsequenz durch die Markierung am 5'-Ende des 1846Gf Primers mit 6-FAM ein Fragment mit blauer Fluoreszenz, bei der mutierten Sequenz durch die Markierung des 1846Af Primers mit HEX am 5'-Ende ein Fragment mit grüner Fluoreszenz.

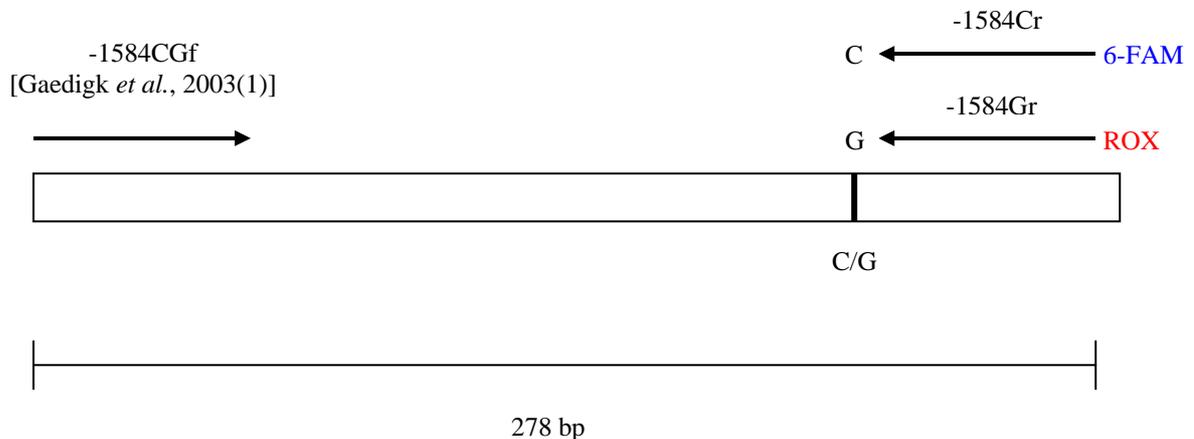
-1584C>G:

Abb. 7: Schematische Darstellung der gewählten Oligonukleotid-Primer -1584CGf [Gaedigk *et al.*, 2003(1)], -1584Cr und -1584Gr, zum Nachweis des Basenaustauschs -1584C>G. Die beiden Rückwärtsprimer tragen unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe; somit bekommt man bei Vorhandensein der Wildtypsequenz durch die Markierung am 5'-Ende des -1584Cr Primers mit 6-FAM ein Fragment mit blauer Fluoreszenz, bei der mutierten Sequenz durch die Markierung des -1584Gr Primers mit ROX am 5'-Ende ein Fragment mit roter Fluoreszenz.

5.1.1.2 Etablierung der Multiplex-PCR-Bedingungen

Zur Etablierung der Multiplex-PCR wurden Annealingtemperaturen von 64 bis 68 °C, MgCl₂-Konzentrationen von 1 bis 2 mM in 0,2 mM Intervallen und dNTP-Konzentrationen von 80, 120, 160 und 200 µM pro dNTP im Reaktionsansatz ausgetestet. Bei 68 °C, 1,2 mM MgCl₂ und 80 µM pro dNTP konnten alle Fragmente gleichzeitig und spezifisch amplifiziert werden. Darüber hinaus wurden unterschiedliche Oligonukleotid-Primer-Konzentrationen ausgetestet. Gestartet wurde die Testreihe mit einer Konzentration von 0,2 µM pro Oligonukleotid-Primer. Anschließend wurde die Konzentration der einzelnen Primer je nach Intensität der Signale verringert bzw. erhöht. Die Konzentrationen der verschiedenen Oligonukleotid-Primer im Reaktionsansatz sind in Tabelle 13 dargestellt. Mit diesen Konzentrationen konnten alle Fragmente gut dargestellt werden, dennoch zeigten die einzelnen Signale zum Teil unterschiedliche Intensitäten (Abb. 8).

Primer	Konzentration der Primer im Reaktionsansatz
-1584Cr	0,3 µM
-1584Gr	0,3 µM
-1584CGf [Gaedigk <i>et al.</i> , 2003(1)]	0,4 µM
1707Tdelf [Wang <i>et al.</i> , 1999]	0,275 µM
1707Tdelr	0,275 µM
1846Gf	0,1 µM
1846Af	0,125 µM
1846GAr [Wang <i>et al.</i> , 1999]	0,1 µM
2549Adelf	0,175 µM
2549Adelr	0,175 µM

Tabelle 18: Konzentrationen der einzelnen Oligonukleotid-Primer

Bei einer DNA-Menge unterhalb von 500 pg pro Reaktionsansatz konnten teilweise verschiedene Fragmente nicht mehr dargestellt werden. Überstieg die Menge an DNA im Reaktionsansatz 1 ng erhielt man Farbdurchschläge und die Spezifität der Primerbindungen ging verloren. Somit ergab eine DNA-Menge von 500 pg bis 1 ng pro Reaktionsansatz die besten Ergebnisse bezüglich Darstellbarkeit aller Fragmente und Spezifität der Primerbindung. Darüber hinaus zeigte sich, dass mit niedermolekularer DNA (Isolierung mittels Chelex) bessere Resultate als mit hochmolekularer DNA (z.B. Isolierung mittels Phenol/Chloroform) erzielt werden konnten (Daten nicht gezeigt).

Die Fragmente zur Bestimmung der 1846G>A Mutation (*CYP2D6**4) konnten in beiden Fluoreszenzbereichen nur als Doppelpeak dargestellt werden (Abb. 8). Dies ist darauf zurückzu-

führen, dass an manche Fragmente bei der PCR ein Adenin angefügt wird und bei anderen nicht. Dieses Problem kann meist durch die Veränderung der dNTP-Konzentration behoben werden. In der vorliegenden Arbeit ging jedoch eine Erhöhung der dNTP-Konzentration zu Lasten der Stringenz bzw. die Verringerung mit dem Verlust der Darstellbarkeit einzelner Fragmente einher. Da es sich bei dieser Mutation nicht um eine 1bp-Deletion handelt konnte die nicht korrekte Darstellung in Kauf genommen werden.

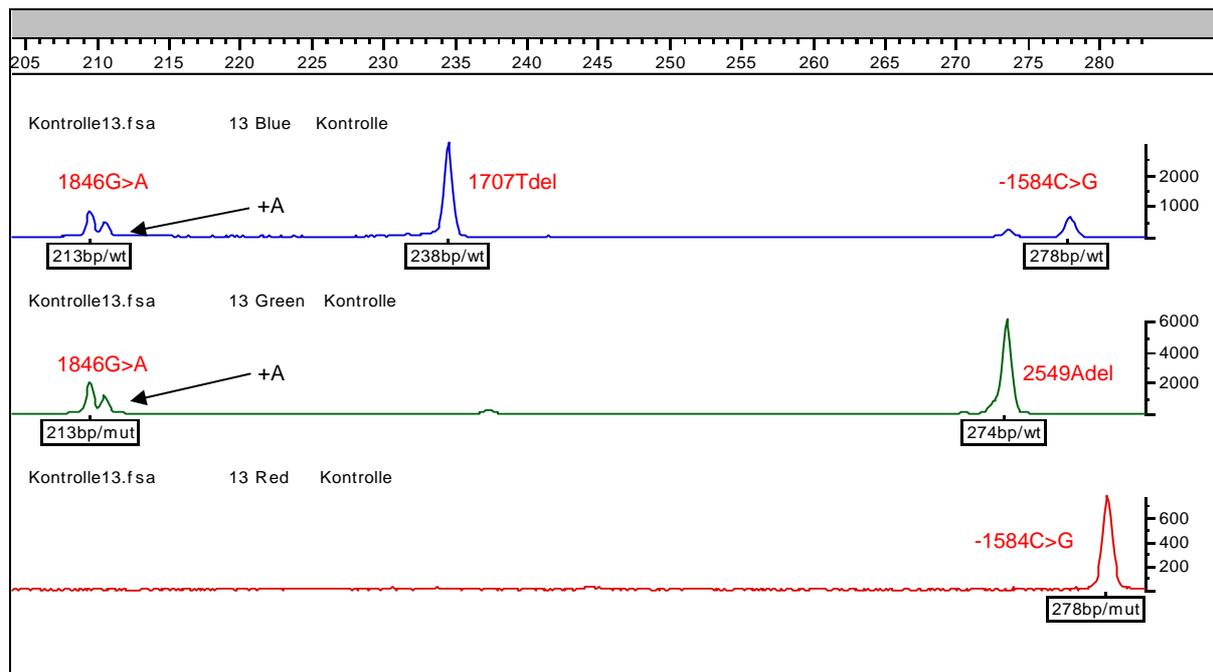
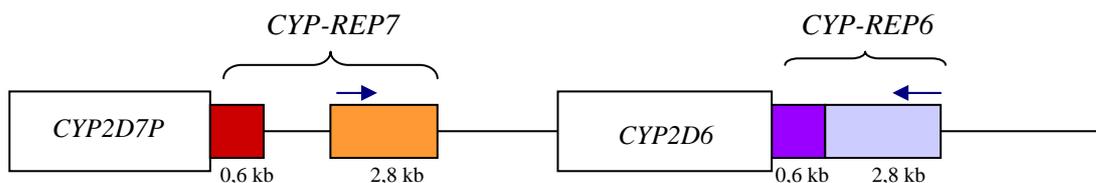


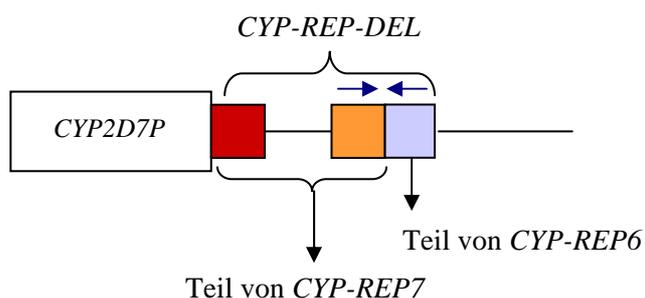
Abb. 8: Elektropherogramm der Multiplex-PCR. Dargestellt ist ein Genotyp heterozygot für die Mutationen 1846G>A und -1584C>G und homozygot für den Wildtyp an Position 1707 und 2549. Darüber hinaus sind die Doppelpeaks bei den Fragmenten für den Wildtyp und die Mutation an Position 1846 dargestellt. Die Signale für die Fragmente des Wildtyps und der Mutation an Position -1584 liegen nicht exakt an der gleichen Position, was auf eine unterschiedliche Wandergeschwindigkeit im elektrischen Feld durch die Markierung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (-1584C markiert mit 6-FAM und -1584G mit ROX) zurückzuführen ist.

5.1.2 Nachweis der Deletion (*CYP2D6*5*) des *CYP2D6* Gens

Für den Nachweis der Deletion des *CYP2D6* Gens über eine PCR-Reaktion wurde ein Vorwärtsprimer, der spezifisch am 5'-Ende des 2,8 kb-Fragments von *CYP-REP7* (*CYP-REP7f*) und ein Rückwärtsprimer, der ausschließlich am 3'-Ende des 2,8 kb-Fragments von *CYP-REP6* (*CYP-REP6r*) bindet, gewählt (Sequenzen siehe Anhang). Ist das *CYP2D6* Gen vorhanden, erhält man ein Fragment von ca. 15 kb, das das 2,8 kb-Fragment von *CYP-REP7*, das *CYP2D6* Gen und die gesamte *CYP-REP6*-Einheit enthält. Nach einem reziproken ungleichen Rekombinationsereignis geht das 3'-Ende des 2,8 kb-Fragments von *CYP-REP7*, das *CYP2D6* Gen, das 0,6 kb-Fragment und das 5'-Ende des 2,8 kb-Fragments von *CYP-REP6* verloren und es bleibt nach erfolgreicher Amplifikation ein Fragment von ca. 2,7 kb (Abb. 11)



⇒ Man erhält zwei Fragmente von ca. 15 kb



⇒ Man erhält ein Fragment von ca. 2,7 kb

Abb. 9: Schematische Darstellung der PCR zum Nachweis der Deletion des *CYP2D6* Gens (*CYP2D6*5*) mit den Primern *CYP-REP7f* und *CYP-REP6r* (blaue Pfeile).

Bei der Etablierung dieser PCR zeigte sich, dass die ausgewählten Oligonukleotid-Primer auch unspezifische Bindungen eingehen. Bei der Erhöhung der Stringenz konnte das ca. 2,7 kb große Fragment nach erfolgter Deletion dargestellt werden, das ca. 15 kb Wildtyp-Fragment allerdings nicht. Da die durch diese PCR ermittelten Ergebnisse durch einen Real-Time PCR Assay überprüft wurden, konnte auf die Darstellung des 15 kb Fragments verzichtet werden.

Überprüft wurden die Ergebnisse dieser PCR auf einem Agarosegel (Abb. 10).

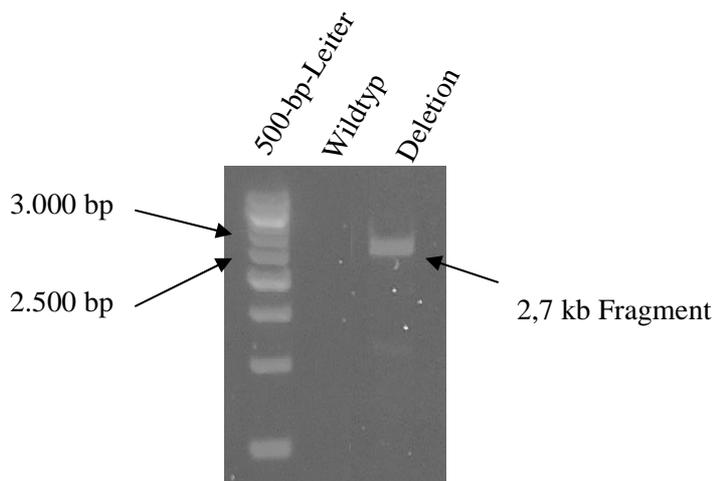
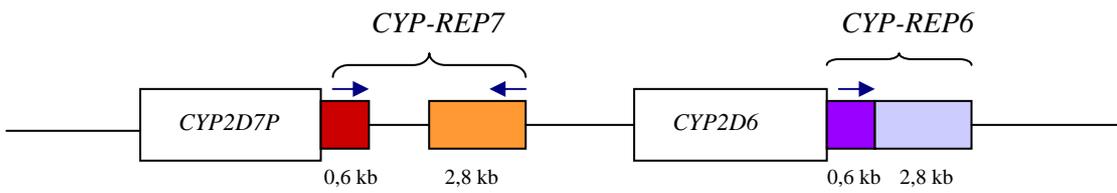


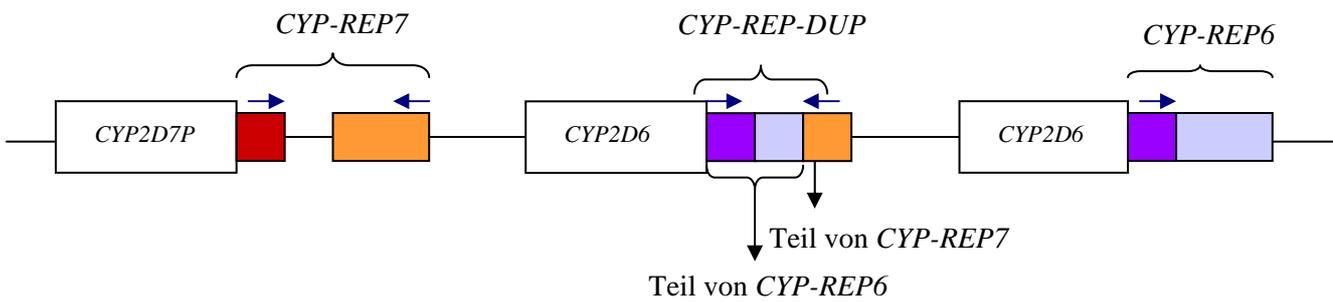
Abb. 10: Nachweis der Deletion des *CYP2D6* Gens (*CYP2D6*5*) mit den Primern CYP-REP7f und CYP-REP6r auf einem 0,8 % Agarosegel.

5.1.3 Nachweis der Duplikation des *CYP2D6* Gens

Zum Nachweis der Duplikation des *CYP2D6* Gens wurde ein Vorwärtsprimer (2D6duplf [Løvlie *et al.*, 1996]) gewählt, der sowohl innerhalb des 0,6 kb-Fragments der *CYP-REP7*-Einheit, als auch im 0,6 kb-Fragment der *CYP-REP6*-Einheit bindet. Der Rückwärtsprimer (2D6duplr) dagegen bindet ausschließlich am 3'-Ende des 2,8 kb-Fragments von *CYP-REP7* (Sequenzen siehe Anhang). Ursprünglich wird mit diesem Oligonukleotid-Primerpaar die gesamte *CYP-REP7*-Einheit (ca. 4,7 kb) amplifiziert. Bei einer Duplikation des *CYP2D6* Gens entsteht die so genannte *CYP-REP-DUP*-Einheit, wodurch neben dem 4,7 kb-Fragment ein weiteres Amplifikat von ca. 3,1 kb bei der PCR gebildet wird (Abb. 11).



⇒ Man erhält ein Fragment von ca. 4,7 kb



⇒ Man erhält zwei Fragmente von ca. 4,7 kb und ca. 3,1 kb

Abb. 11: Schematische Darstellung der PCR zum Nachweis der Duplikation des *CYP2D6* Gens mit den Primern 2D6duplf [Løvlie *et al.*, 1996] und 2D6duplr (blaue Pfeile)

Überprüft wurden die Ergebnisse dieser PCR auf einem Agarosegel (Abb. 12).

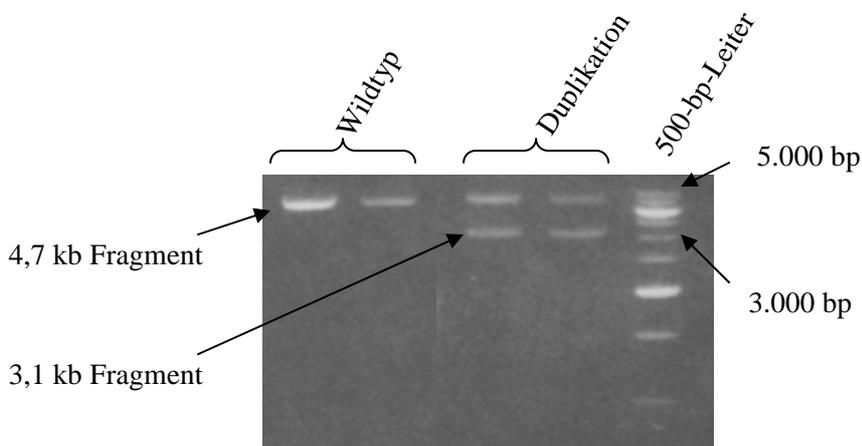


Abb. 12: Nachweis der Duplikation des *CYP2D6* Gens mit den Primern 2D6duplf [Løvlie *et al.*, 1996] und 2D6duplr auf einem 0,8 % Agarosegel.

5.1.4 Genotypen und Allelhäufigkeiten der Untersuchungs-kollektive

96 Methadonpatienten und 103 Personen einer Referenzgruppe wurden mittels der zuvor etablierten Multiplex-PCR (siehe 5.1.1) und der unter den Punkten 5.1.2 und 5.1.3 beschriebenen PCR-Reaktionen auf die Allele *CYP2D6**3, *4, *5 und *6, den Basenaustausch -1584C→G sowie die Duplikation des *CYP2D6* Gens hin untersucht.

Die Mutationen 1707Tdel und 1846G>A, bzw. der Wildtyp an diesen Positionen der einzelnen Proben wurden mittels Restriktionsverdau mit den Enzymen *BtsI* (Nachweis von 1707Tdel) und *BstNI* (Nachweis von 1846G>A), der Genotyp an den Positionen -1584 und 2549 über eine jeweilige Sequenzierung der Genorte überprüft (Daten nicht gezeigt). Die Anzahl an *CYP2D6* Genkopien pro Genom wurde zusätzlich zu den oben genannten PCR Reaktionen über Real-Time PCR bestimmt, wobei die Gesamtmenge an humaner DNA mit der DNA-Menge, ermittelt über Oligonukleotid-Primer und TaqMan-Sonde, die innerhalb des Exon 9 des *CYP2D6* Gens binden verglichen wurde (Daten nicht gezeigt).

Im Folgenden werden die Genkopien, die keine der untersuchten Mutationen zeigen mit der Abkürzung *wt*, die Allele mit der Mutation im Promotorbereich mit *-1584C>G* und alle übrigen Allele ausschließlich mit * und der entsprechenden Allelnummer bezeichnet.

Die Methadonpatienten und Personen der Referenzgruppe zeigten bezüglich der Genotypen und der daraus resultierenden, wahrscheinlichen Phänotypen eine ähnliche Verteilung (Tabelle 19).

So wiesen 53 der Methadonpatienten und 55 der Referenzpersonen keine der in dieser Arbeit untersuchten Mutationen, die eine Verringerung bzw. Inaktivierung der Enzymaktivität zur Folge haben, auf. 25 (Methadonpatienten) bzw. 27 (Referenzgruppe) dieser Individuen zeigten einen heterozygoten Genotyp bezüglich der *-1584C>G* Mutation. Der homozygote Genotyp *-1584C>G / -1584C>G* fand sich bei 4 Individuen der Patientengruppe und 5 Referenzpersonen. Phänotypisch sollten diese Personen ebenfalls der Gruppe der EM zugeordnet werden, da sich diese Mutation in erster Linie bei Allel *CYP2D6**2, das für ein Enzym mit normaler Funktionalität kodiert, findet.

Genotypen	Wahrscheinlicher Phänotyp	Anzahl Methadonpatienten	Anzahl Referenzgruppe
<i>wt / wt</i>	EM	24	23
<i>wt / -1584C>G</i>	EM	25	27
<i>-1584C>G / -1584C>G</i>	EM	4	5
<i>*3 / wt</i>	IM/EM	1	3
<i>*3 / *4</i>	PM	1	1
<i>*4 / wt</i>	IM/EM	11	20
<i>*4 / -1584C>G</i>	EM	12	8
<i>*4 / *4</i>	PM	1	3
<i>*4 / *6</i>	PM	1	0
<i>*4 / *9</i>	IM	1	0
<i>*5 / wt</i>	IM/EM	3	4
<i>*5 / -1584C>G</i>	EM	1	0
<i>*6 / wt</i>	IM/EM	3	1
<i>*6 / -1584C>G</i>	EM	0	2
<i>*6 / *9</i>	IM	1	0
<i>*9 / wt</i>	EM	2	1
<i>*9 / -1584C>G</i>	EM	1	1
<i>wt / wt / wt</i>	UM	1	0
<i>wt / wt / -1584C>G</i> bzw. <i>wt / -1584C>G / -1584C>G</i>	UM	2	2
<i>-1584C>G / -1584C>G / -1584C>G</i>	UM	0	1
<i>wt / *4 / -1584C>G</i> bzw. <i>*4 / -1584C>G / -1584C>G</i> bzw. <i>*4 / *4 / -1584C>G</i>	EM	1	1

Tabelle 19: Genotypen und deren Anzahl sowie die daraus resultierenden, wahrscheinlichen Phänotypen unter den 96 Methadonpatienten und 103 Personen der Referenzgruppe.
 PM = poor metabolizer; IM = intermediate metabolizer;
 EM = extensive metabolizer; UM = ultra rapid metabolizer;
 IM/EM = mögliche intermediäre Metabolisierer

Zwei defekte Kopien des *CYP2D6* Gens (*CYP2D6**3/*4, *4/*4 bzw. *4/*6) konnten bei 3 Methadonpatienten bzw. 4 Personen der Referenzgruppe nachgewiesen werden und sind somit dem PM Phänotyp zuzuordnen. Dies entspricht einer Frequenz von ca. 3,1 bzw. 3,8 % an PM in den beiden Untersuchungskollektiven.

31 Personen des Substitutionsprogramms und 38 Individuen aus der Referenzgruppe zeigten einen heterozygoten Genotyp bezüglich eines der untersuchten Nullallele (*CYP2D6**3, *4, *5 bzw. *6). Bei 13 bzw. 10 dieser Personen konnte ebenfalls die Mutation -1584C>G im Promotorbereich nachgewiesen werden, wodurch diese Personen vermutlich dem EM Phänotyp zuzuordnen sind. 18 bzw. 28 dieser Individuen zeigten diese Mutation nicht. Das Fehlen dieser Mutation könnte im Zusammenhang mit dem *CYP2D6**41 Allel bezüglich der Ausprägung des IM Phänotyps eine Rolle spielen [Raimundo *et al.*, 2000; Zanger *et al.*, 2001; Zanger *et al.*, 2004]. Aus diesem Grund wurde für die Personen mit einem heterozygoten Genotyp für ein Nullallel und der Wildtypsequenz -1584C auf dem intakten Allel eine weitere Geno-

typ-Gruppe (IM/EM) gebildet. Zwei Methadonpatienten wiesen einen heterozygoten Genotyp für ein Nullallel und *CYP2D6**9, das für ein Enzym mit herabgesetzter Enzymaktivität codiert auf, was zu einer Ausprägung des IM Phänotyp führen sollte. Darüber hinaus fand sich das Allel *9 in Kombination mit intakten Allelen bei 3 weiteren Personen des Substitutionsprogramms und 2 Individuen der Referenzgruppe.

Die Duplikation des *CYP2D6* Gens konnte bei vier Personen in jeder der beiden Gruppen nachgewiesen werden, wodurch sich eine Häufigkeit von 4,2 % unter den Methadonpatienten und 3,9 % innerhalb der Referenzgruppe ergab. Allerdings fand sich bei jeweils einem Individuum der Untersuchungskollektive unter den drei Genkopien zumindest ein Nullallel (*CYP2D6**4), was zu der Ausprägung eines EM anstatt UM Phänotyps führen sollte. Somit ergab sich für beide Untersuchungskollektive eine Frequenz von ca. 3 % duplikationspositiver UMs.

Allele	Anzahl Methadonpatienten	Häufigkeit Methadonpatienten	Anzahl Referenzgruppe	Häufigkeit Referenzgruppe
<i>wt</i>	93	50,5 %	102	51,5 %
<i>-1584C>G</i>	47	25,5 %	48	24,2 %
*3	2	1,1 %	4	2,0 %
*4	28	15,2 %	35	17,7 %
*5	4	2,2 %	4	2,0 %
*6	5	2,7 %	3	1,5 %
*9	5	2,7 %	2	1,0 %

Tabelle 20: Anzahl und Häufigkeiten der untersuchten Allele unter den Methadonpatienten und Personen der Referenzgruppe. Hierbei wurden die Personen mit einer Duplikation des *CYP2D6* Gens, aufgrund des nicht eindeutig zu bestimmenden Genotyps nicht berücksichtigt.

Bei der Betrachtung der verschiedenen untersuchten Allele und Mutationen zeigten beide Gruppen eine annähernde Übereinstimmung der Häufigkeiten (Tabelle 20). Ca. 50 % der Allele wiesen keine in dieser Arbeit untersuchten Mutationen auf und bei ca. 25 % fand sich die Mutation *-1584C>G*. Das häufigste Nullallel innerhalb der beiden Untersuchungskollektive stellte *CYP2D6**4 mit ungefähr 15 bzw. 18 % dar. Alle übrigen Allele lagen bei einer Frequenz von einem bis knapp 3 %.

Um die beiden Untersuchungskollektive bezüglich der Allelhäufigkeiten statistisch zu vergleichen wurde ein χ^2 -Test [Pearson, 1900] durchgeführt. Dabei ergab sich ein p-Wert von 0,17. Somit wiesen die Allelhäufigkeiten der beiden Untersuchungskollektive keine signifikanten Unterschiede auf.

5.2 Einfluss des *CYP2D6* Genotyps auf den Metabolismus von Methadon

Um den Einfluss von *CYP2D6* auf den Metabolismus von Methadon zu untersuchen, wurde ein Vergleich zwischen der verabreichten Dosis, dem ermittelten Spiegel bzw. dem Verhältnis von Dosis zu Spiegel von Methadon mit den zuvor ermittelten *CYP2D6* Genotypen und den daraus resultierenden wahrscheinlichen Phänotypen der 96 Methadonpatienten durchgeführt. Da ausschließlich (*R*)-Methadon für den therapeutischen Effekt zuständig ist und die Annahme besteht, dass *CYP2D6* ausschließlich dieses Isomer metabolisiert [Eap *et al.*, 1997; Greenblatt *et al.*, 1999; Begre *et al.*, 2002; Eap *et al.*, 2002], wird bei den folgenden Vergleichen der erhaltenen Genotypen mit Dosierung, Spiegel und Verhältnis von Dosis zu Spiegel in erster Linie auf (*R*)-Methadon eingegangen.

5.2.1 Auswirkung des *CYP2D6* Genotyps auf die Dosierung von Methadon

5.2.1.1 Dosierung von Methadon

Im Rahmen eines Substitutionsprogramms wurde 43 Frauen und 53 Männern Methadon in Form von L-Polamidon (0,5 %ige Lösung) bzw. *rac*-Methadon (1 %ige Lösung) in verschiedenen, auf jeden Patienten individuell abgestimmten Dosen verabreicht.

Die 96 Methadonpatienten erhielten zwischen 0,2 bis 40 ml *rac*-Methadon (74 Patienten) bzw. 0,4 bis 14 ml L-Polamidon (22 Patienten), was einer Menge von 1 bis 200 mg (*R*)- und (*S*)-Methadon bzw. 2 bis 70 mg (*R*)-Methadon entspricht. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Gewicht bzw. Gewicht/Größe der einzelnen Patienten und der jeweiligen verabreichten Dosis festzustellen, wurde die Korrelation zwischen Gewicht und Dosis bzw. BMI (body mass index) und Dosis berechnet. Da die verabreichten Dosen von Methadon innerhalb des Untersuchungskollektivs keiner Normalverteilung unterliegen (Daten nicht gezeigt), wurde zu diesem Zweck der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (Spearman- ρ -Test) verwendet [Spearman, 1904]. Bei dieser Berechnung ergab sich hinsichtlich der Korrelation zwischen Gewicht und Dosis für Gesamtmethadon ein Rangkorrelationskoeffizient von 0,196 mit einem p-Wert von 0,055, für (*R*)- bzw. (*S*)-Methadon von 0,183 bzw. 0,229 (Korre-

lationskoeffizient) und 0,075 bzw. 0,049 (p-Wert). Für den Vergleich der Dosierung mit den für jeden Patienten berechneten BMI ergaben sich Rangkorrelationskoeffizienten von 0,215 (Gesamtmethadon), 0,196 ((*R*)-Methadon) und 0,232 ((*S*)-Methadon) mit den jeweiligen p-Werten von 0,035 für Gesamtmethadon, 0,056 für (*R*)-Methadon und 0,047 für (*S*)-Methadon. Somit ergab sich für Gewicht und verabreichter Dosis von Gesamt- und (*R*)-Methadon bzw. BMI und Dosis von (*R*)-Methadon keine signifikante Korrelation. Bei dem Vergleich von Gewicht und verabreichter Dosis von (*S*)-Methadon bzw. BMI und Dosis von Gesamt- und (*S*)-Methadon konnte jedoch eine, auf einem 5 % Niveau signifikante Korrelation nachgewiesen werden.

Für die Beurteilung der weiteren Ergebnisse wurde die verabreichte Menge an Methadon auf das Körpergewicht der jeweiligen Patienten bezogen. Bei dieser Berechnung ergaben sich Werte von 0,026 bis 6,25 mg/kg Gesamtmethadon und somit von 0,013 bis 3,125 mg/kg (*R*)- und (*S*)-Methadon, bzw. ausschließlich (*R*)-Methadon pro Tag (Die verabreichten Dosen von Gesamtmethadon in mg/kg der einzelnen Patienten ist in Abb. 13 zu sehen).

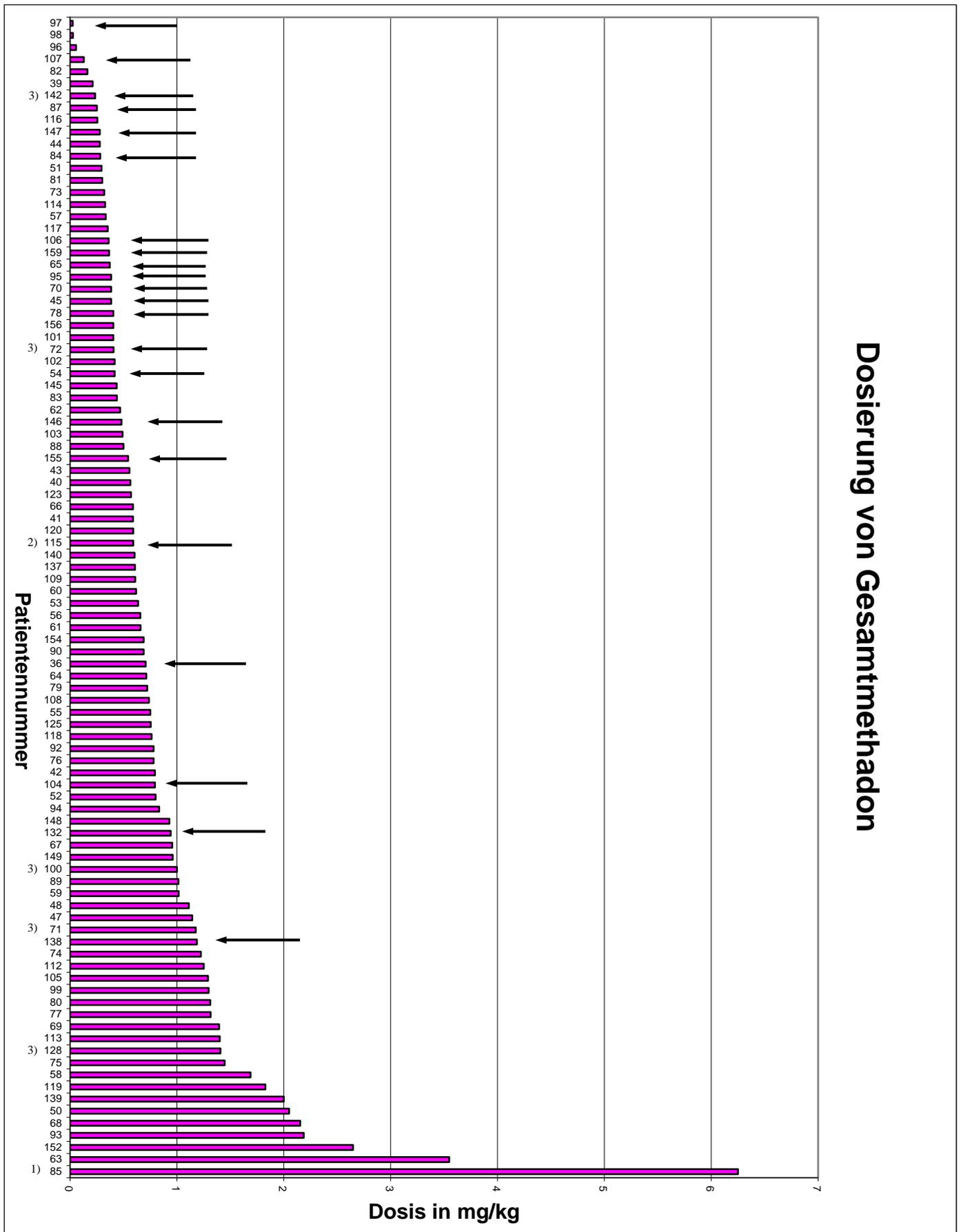


Abb. 13: Dosis von Gesamtmethadon in mg/kg der Methadonpatienten. 22 der Patienten erhielten L-Polamidon und dementsprechend ausschließlich (R)-Methadon (→). Den übrigen 74 Personen wurde *rac*-Methadon verabreicht. Nach Angaben des behandelnden Arztes: ¹⁾ Patientin #85: unterzog sich zusätzlich einer antiviralen Therapie mit Enzyminduktion; ²⁾ Patient #115: hat eine Leberzirrhose; ³⁾ Patienten # 39, #71, #72, #100 und #128 haben ein Alkoholproblem

Bei der Betrachtung der verabreichten Dosen innerhalb der gesamten Patientengruppe zeigte sich, dass ein Grossteil der Personen Dosierungen zwischen ca. 0,2 bis 1,4 mg/kg Gesamtmethadon, bzw. 0,1 bis 0,7 mg/kg (*R*)- und/oder (*S*)-Methadon erhielten. Dosen außerhalb dieses Bereichs wurden nur vereinzelt verabreicht. Die graphische Darstellung der Häufigkeiten zeigt eine Linksverschiebung und dadurch eine nicht normale Verteilung der Dosierung von Gesamtmethadon, bzw. (*R*)- und (*S*)-Methadon, mit Medianwerten von 0,63 mg/kg für Gesamtmethadon, 0,38 mg/kg für (*R*)-Methadon und 0,37 mg/kg für (*S*)-Methadon (Abb.14).

Eine Patientin (# 85), die sich einer antiviralen Therapie mit Enzyminduktion [Havlir *et al.*, 1995; Riska *et al.*, 1999; Akerele *et al.*, 2002; Ferrari *et al.*, 2004] unterziehen musste, erhielt mit einer Menge von 40 ml *rac*-Methadon (6,25 mg/kg Gesamtmethadon bzw. 3,125 mg/kg (*R*)- und (*S*)-Methadon) pro Tag die mit Abstand höchste Dosis innerhalb der gesamten Patientengruppe. Darüber hinaus sollen nach Angabe des behandelnden Arztes die Patienten #39, #71, #72, #100 und #128 ein Alkoholproblem haben und Patient #115 unter einer Leberzirrhose leiden. Die Personen #39, #71, #100 und #128 erhielten jeweils *rac*-Methadon, Patient #72 und #115 L-Polamidon. Patient #39 lag mit einer Dosis von 0,212 mg/kg Gesamtmethadon bzw. 0,106 mg/kg (*R*)- und (*S*)-Methadon unterhalb der ermittelten Medianwerte (0,63 mg/kg für Gesamtmethadon, 0,38 und 0,37 für (*R*)- und (*S*)-Methadon). Die Patienten #71, #100 und #128 zeigten Werte von 1,176 mg/kg, 1 mg/kg und 1,406 mg/kg Gesamtmethadon bzw. 0,588 mg/kg, 0,5 mg/kg und 0,703 mg/kg (*R*)- und (*S*)-Methadon und lagen somit oberhalb der berechneten mittleren Dosierung von Gesamt-, (*R*)- und (*S*)-Methadon. Die beiden Personen #72 und #115 erhielten Dosen von 0,406 mg/kg und 0,592 mg/kg Gesamt- bzw. (*R*)-Methadon. Sie wiesen infolgedessen Werte auf, die bezüglich der Dosierung von Gesamtmethadon etwas unterhalb des berechneten Medianwerts von 0,63 mg/kg, aber im Hinblick auf (*R*)-Methadon oberhalb der mittleren Dosierung von 0,38 mg/kg lagen.

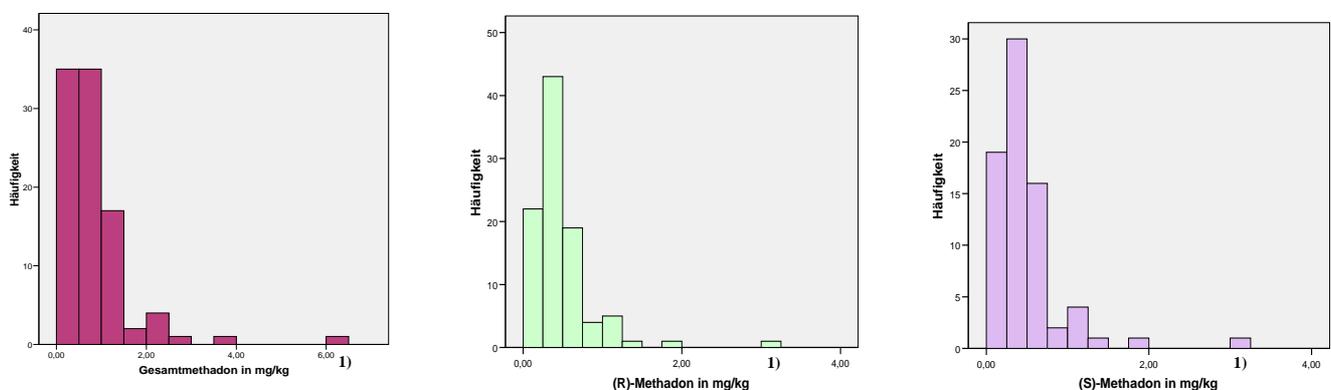


Abb. 14: Dosisverteilung von Gesamt- und (*R*)- Methadon der 96 Patienten die im Rahmen des Substitutionsprogramms L-Polamidon bzw. *rac*-Methadon erhielten und von (*S*)-Methadon der 74 Methadonpatienten die *rac*-Methadon verabreicht bekommen haben in mg/kg. Aufgetragen sind die Häufigkeiten (Y-Achse) gegen die Dosierung in mg/kg (X-Achse). Für die Darstellung wurde die Dosierung in Klassen von 0,5 mg/kg für Gesamtmethadon bzw. von 0,25 mg/kg für (*R*)- und (*S*)-Methadon eingeteilt.

¹⁾ Patientin #85: unterzog sich zusätzlich einer antiviralen Therapie mit Enzyminduktion

Eine Linksverschiebung der Daten und somit eine nicht normale Verteilung zeigte sich ebenfalls bei der getrennten Betrachtung der 43 weiblichen bzw. 53 männlichen Methadonpatienten bezüglich der verabreichten Dosis (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus ergaben sich für die mittlere Dosierung von Gesamtmethadon mit den jeweiligen Medianwerten von 0,59 mg/kg bei den Männern bzw. 0,71 mg/kg bei den Frauen, von (*R*)-Methadon mit den Werten von 0,36 mg/kg (männliche Patienten) und 0,40 mg/kg (weibliche Patienten) und (*S*)-Methadon mit einer mittleren Dosis von 0,33 mg/kg (Männer) und 0,38 mg/kg (Frauen), keine erheblichen Unterschiede.

Aufgrund der nicht normalen und unabhängigen Verteilung der Dosen wurde für eine statistische Bewertung der Geschlechtsunterschiede ein Mann-Whitney-U Test [Mann und Whitney, 1947] durchgeführt. Dabei ergab sich für Gesamtmethadon ein p-Wert von 0,387, für (*R*)-Methadon 0,078 und für (*S*)-Methadon 0,466. Somit zeigten die männlichen und weiblichen Patienten keine signifikanten Unterschiede bei der Dosierung von Methadon.

5.2.1.2 Vergleich: Dosierung von (*R*)-Methadon und *CYP2D6* Genotyp

Insgesamt konnten unter den Methadonpatienten drei Personen ohne ein funktionelles *CYP2D6* Gen (PM), drei Patienten, die durch Duplikation des *CYP2D6* Gens in die Kategorie der UM eingeteilt wurden und zwei Personen, die dem IM Phänotyp zuzuordnen sind, ermittelt werden. Die PM lagen bezüglich ihrer Dosierung mit Werten von 0,139, 0,25 und 0,361 mg/kg (*R*)-Methadon unterhalb und die beiden IM unterhalb (0,33 mg/kg) bzw. oberhalb (0,4 mg/kg) des zuvor ermittelten Medianwerts von 0,38 mg/kg und innerhalb des Bereichs von 0,1 bis 0,7 mg/kg (*R*)-Methadon der gesamten Patientengruppe. Die graphische Darstellung (Abb. 15) zeigt, dass sich die Personen mit einem PM Phänotyp somit tendenziell auf der linken Seite der Abbildung (niedrigere Dosen) und die Patienten die infolge ihres Genotyps den IMs zuzuordnen sind, im mittleren Bereich finden. Zwei der UMs wurden mit 0,013 bzw. 0,081 mg/kg (*R*)-Methadon geringere Dosen als dem Hauptteil der Patientengruppe verabreicht. Ausschließlich Patientin #104 mit dem UM Genotyp erhielt im Vergleich zur Mehrheit der untersuchten Personen, eine relativ hohe Dosierung an (*R*)-Methadon (0,795 mg/kg), die oberhalb des allgemeinen Medianwertes und außerhalb der Spanne von 0,1 bis 0,7 mg/kg lag. Die 18 Patienten, die aufgrund einer defekten Kopie des *CYP2D6* Gens und der Ermangelung an der -1584C>G Mutation auf dem intakten Allel möglicherweise dem IM Phänotyp zuzuordnen sind, erhielten Dosen von 0,028 bis 1 mg/kg (*R*)-Methadon. Dabei waren die beiden

Patientinnen mit 0,028 und 1 mg/kg die einzigen Ausreißer in dieser Gruppe. Die übrigen 16 Patienten lagen innerhalb des Bereichs von 0,1 bis 0,7 mg/kg. Die restlichen 70 Methadonpatienten waren bezüglich ihres Genotyps dem EM Phänotyp zuzuordnen. Diese Personen erhielten Dosen zwischen 0,024 bis 3,125 mg/kg (*R*)-Methadon und verteilten sich somit über die gesamte Bandbreite der Dosierung (Abb.15 zeigt die verabreichte Dosis von (*R*)-Methadon in mg/kg der einzelnen Methadonpatienten).

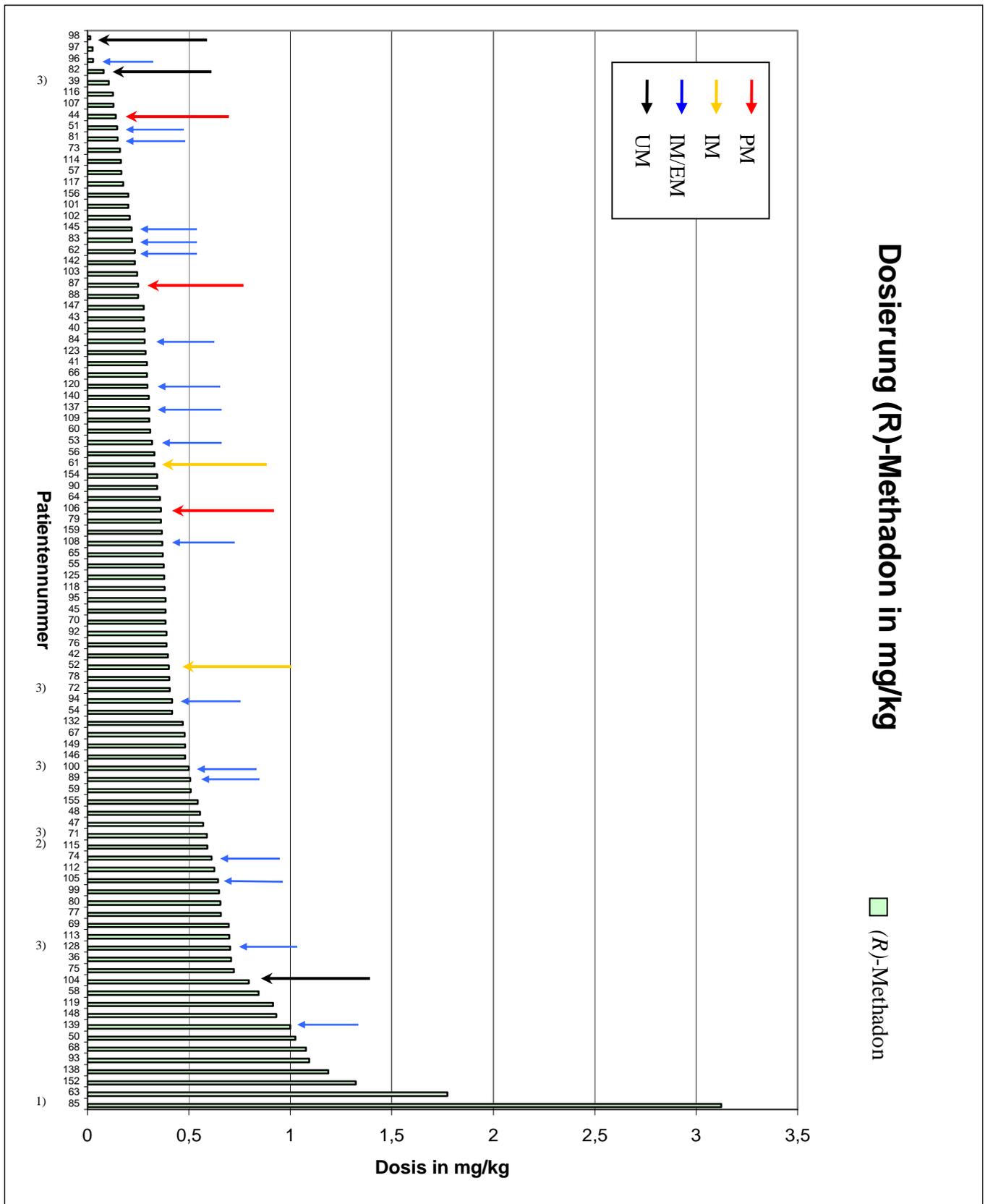


Abb. 15: Dosierungen von (R)-Methadon in mg/kg der 96 Methadonpatienten und die Zuordnung der zuvor detektierten Genotypen und der daraus resultierenden Phänotypen. Personen ohne Kennzeichnung mit einem Pfeil zeigten einen Genotyp, der zur Ausprägung eines EM Phänotyps führen sollte.
¹⁾ Patientin #85: unterzog sich einer antiviralen Therapie mit Enzyminduktion; ²⁾ Patient # 115: hat eine Leberzirrhose;
³⁾ Patienten #39, #71, #72, #100, #128 haben ein Alkoholproblem

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Dosierung von (*R*)-Methadon und dem *CYP2D6* Genotyp besser veranschaulichen und beurteilen zu können, wurden die Medianwerte der Dosen innerhalb der fünf ermittelten wahrscheinlichen Phänotypen berechnet und miteinander verglichen. Dabei ergab sich, dass die Individuen mit einem IM und EM Genotyp Medianwerte (0,37 und 0,38 mg/kg) zeigten, die annähernd bzw. genau der berechneten mittleren Dosis (0,38 mg/l) der gesamten Patientengruppe entsprachen. Die PMs und möglichen IMs lagen mit den Werten von 0,25 und 0,31 mg/kg ein wenig unterhalb und die Personen, die aufgrund einer Duplikation des *CYP2D6* Gens dem UM Phänotyp zugeordnet wurden mit einem Medianwert von 0,08 mg/kg weit unterhalb des ermittelten allgemeinen Medianwerts der Dosierung von (*R*)-Methadon (Abb. 16, Tabelle 21).

Abb.16:

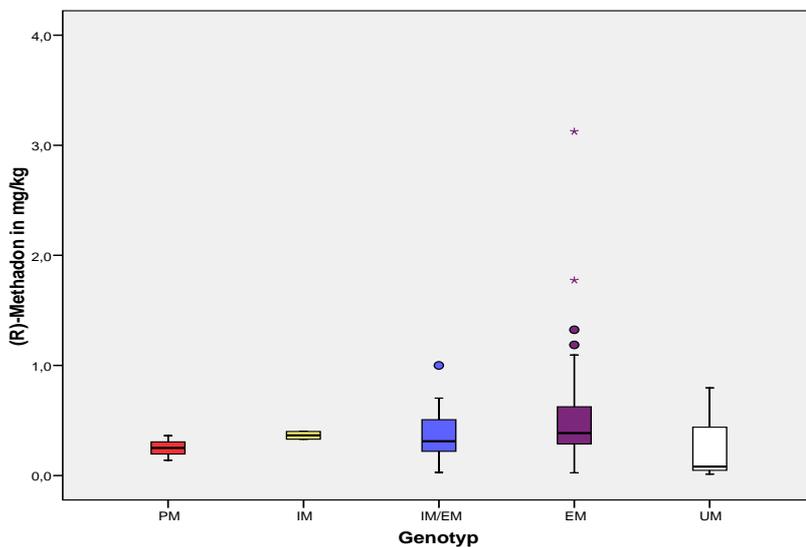


Tabelle 21:

Phänotyp	Medianwert: Dosierung (<i>R</i>)-Methadon in mg/kg
PM	0,25
IM	0,37
IM/EM	0,31
EM	0,38
UM	0,08
allgemein	0,38

Graphische Darstellung der Verteilung (**Abb. 16**) und tabellarische Auflistung der Medianwerte (**Tabelle 21**) der Dosierung von (*R*)-Methadon in mg/kg der Individuen, die aufgrund ihres Genotyps dem PM, IM, IM/EM, EM, bzw. UM Phänotyp zugeordnet wurden.

Aufgrund der nicht normalen und unabhängigen Verteilung der Dosen wurde für die statistische Bewertung eines möglichen Einflusses des *CYP2D6* Genotyps auf die Dosierung von (*R*)-Methadon ein Kruskal-Wallis-Test [Kruskal und Wallis, 1952] durchgeführt. Dabei ergab sich ein p-Wert von 0,271 und somit kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen ermittelten wahrscheinlichen Phänotypen. Der Vollständigkeit halber wurde dieser Test auch für Gesamt- und (*S*)-Methadon durchgeführt, wobei mit p-Werten von 0,088 und 0,063 ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen festzustellen war.

5.2.2 Auswirkung des *CYP2D6* Genotyps auf den Methadonspiegel im Blut

5.2.2.1 Messung des Methadonspiegels

Mittels flüssig-flüssig Extraktion und anschließender Hochdruckflüssigkeitschromatographie wurde der Gesamtspiegel an Methadon, sowie die Konzentration an (*R*)- und (*S*)-Methadon im Blut der 96 Methadonpatienten gemessen [Wicht, in Arbeit]. Bei den Patienten #78, #96, #97, #107 und #116 lag der Gesamtmethadonspiegel und bei Patient #48 der (*R*)-Methadonspiegel unter der Nachweisgrenze und konnte somit nicht ermittelt werden. Aus diesem Grund wurden diese Probanden im Folgenden nicht berücksichtigt.

Bei den übrigen 90 Patienten wurden Gesamtmethadonspiegel von 0,05 bis 0,928 mg/l gemessen. Der prozentuale Anteil an (*R*)-Methadon schwankte bei den Patienten die im Rahmen des Substitutionsprogramms *rac*-Methadon erhielten zwischen ca. 30 und 80 %. Dies entsprach einer Menge von 0,027 bis 0,44 mg/l (*R*)-Methadon bzw. 0,015 bis 0,498 mg/l (*S*)-Methadon (Abb. 17 zeigt die gemessenen Methadonspiegel von (*R*)- und (*S*)-Methadon in mg/l der einzelnen Methadonpatienten sortiert nach der Menge an gemessenem (*R*)-Methadon).

Patientin #142 erhielt ausschließlich L-Polamidon, zeigte jedoch sowohl (*R*)- als auch (*S*)-Methadon in einem Verhältnis von 80 zu 20 % im Blut, was möglicherweise auf den Beikonsum von zusätzlichem *rac*-Methadon zurückzuführen ist. Deshalb wurde diese Patientin bei den weiteren Ergebnissen ebenfalls nicht berücksichtigt.

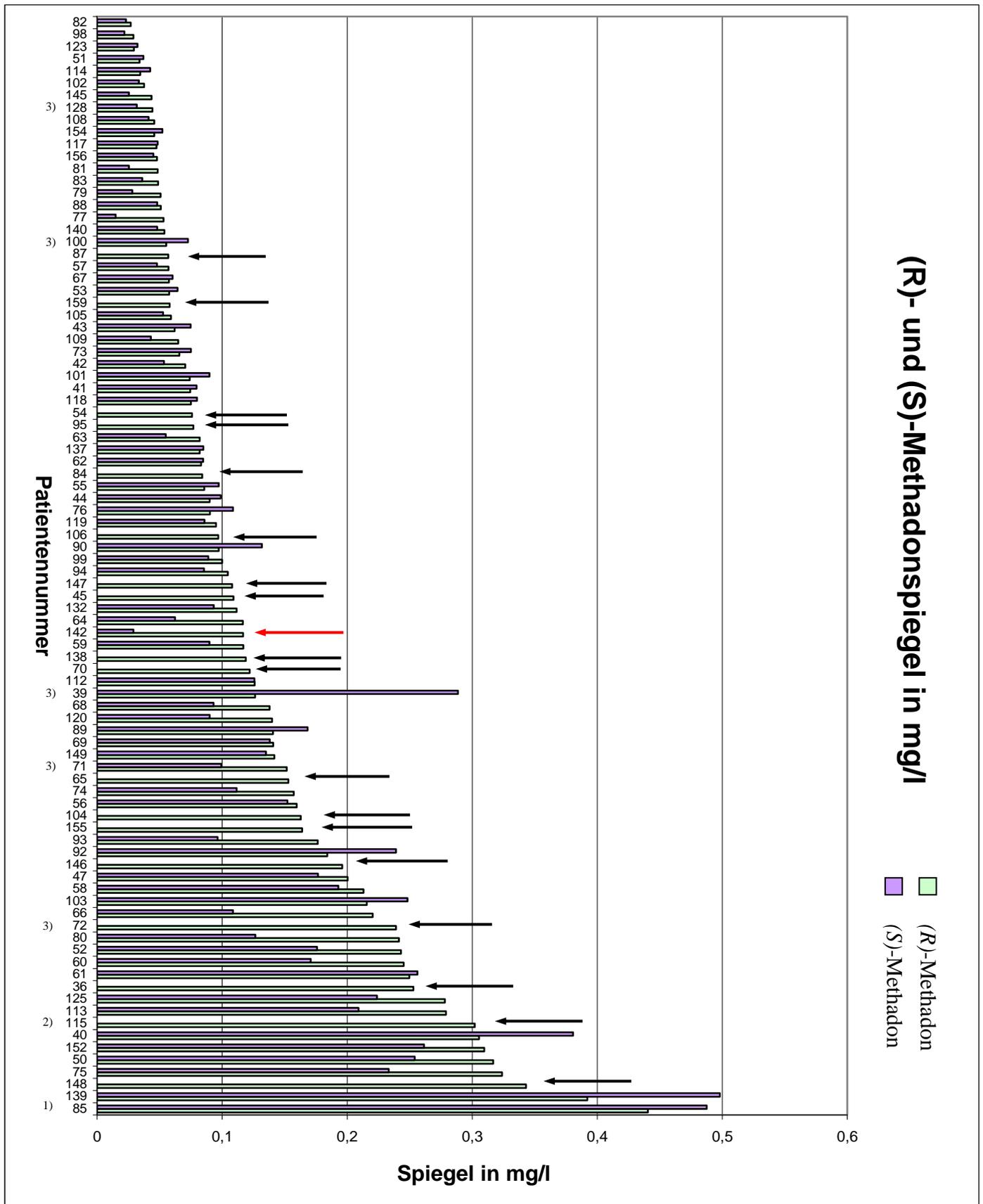


Abb. 17: Spiegel (S)- und/oder (R)-Methadon in mg/l der Methadonpatienten. 18 der Patienten erhielten L-Polamidon und zeigten dementsprechend ausschließlich (R)-Methadon (→). Patientin #142 erhielt ebenfalls L-Polamidon, dennoch konnte auch (S)-Methadon in ihrem Blutplasma nachgewiesen werden (→). Den übrigen 71 Personen wurde *rac*-Methadon verabreicht und zeigten somit bei den Messungen des Spiegels (R)- und (S)-Methadon.
 Nach Angaben des behandelnden Arztes: ¹⁾ Patientin #85: unterzog sich zusätzlich einer antiviralen Therapie mit Enzyminduktion; ²⁾ Patient #115: hat eine Leberzirrhose; ³⁾ Patienten # 39, #71, #72, #100 und #128 haben ein Alkoholproblem

Bei einer graphischen Darstellung der gemessenen Spiegel an Gesamt-, (*R*)- und (*S*)- Methadon innerhalb der gesamten Patientengruppe (ohne Patienten #48, #78, #96, #97, #107, #116 und #142) fand sich bezüglich der Häufigkeitsverteilung ein ähnliches Bild wie bei den verabreichten Dosen (Abb. 18). Auch hier zeigte sich eine Linksverschiebung und somit eine nicht normale Verteilung der gemessenen Methadonspiegel im Blutplasma mit Medianwerten von 0,17 mg/l für Gesamtmethadon, 0,10 mg/l für (*R*)-Methadon und 0,09 mg/l für (*S*)-Methadon. Patientin # 85, die sich einer antiviralen Therapie mit Enzyminduktion unterziehen musste, zeigte mit einem Spiegel von 0,928 mg/l Gesamtmethadon bzw. 0,44 und 0,488 mg/l (*R*)- und (*S*)-Methadon zusammen mit Proband #139 die höchsten gemessenen Werte. Die Probanden #39 und #71, die im Rahmen des Substitutionsprogramms *rac*-Methadon erhielten und laut behandelnden Arztes ein Alkoholproblem haben, zeigten Methadonspiegel von 0,415 und 0,251 mg/l Gesamtmethadon, 0,126 und 0,152 mg/l (*R*)-Methadon bzw. 0,289 und 0,099 mg/l (*S*)-Methadon. Sie lagen somit ebenfalls oberhalb der errechneten mittleren Methadonspiegel. Die Patienten #100 und #128 zeigten dagegen etwas niedrigere Spiegel an Methadon mit Werten von 0,128 und 0,076 mg/l (Gesamtmethadon), 0,055 und 0,044 mg/l ((*R*)-Methadon) bzw. 0,073 und 0,032 mg/l ((*S*)-Methadon). Person #72 (Alkoholproblem) und #115 (Leberzirrhose) erhielten zur Heroinsubstitution L-Polamidon. Ihre gemessenen Methadonspiegel lagen bei 0,239 und 0,302 mg/l Gesamt- bzw. (*R*)-Methadon und somit weit oberhalb der mittleren gemessenen Methadonspiegel.

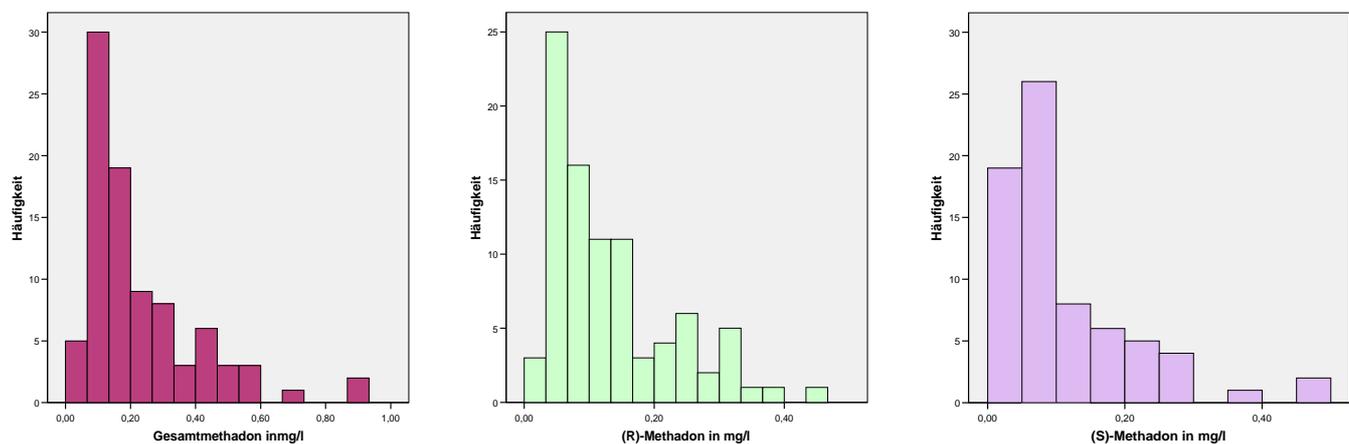


Abb. 18: Verteilung der gemessenen Spiegel von Gesamt- und (*R*)-Methadon der übrigen 89 Patienten die im Rahmen des Substitutionsprogramms L-Polamidon bzw. *rac*-Methadon erhielten und von (*S*)-Methadon der 71 Methadonpatienten die *rac*-Methadon verabreicht bekommen haben in mg/l. Aufgetragen sind die Häufigkeiten (Y-Achse) gegen den gemessenen Spiegel in mg/l (X-Achse). Für die Darstellung wurden die Methadonspiegel in Klassen von 0,066 mg/l für Gesamtmethadon, von 0,033 mg/l für (*R*)-Methadon bzw. von 0,05 mg/l für (*S*)-Methadon eingeteilt.

Bezüglich der gemessenen Methadonspiegel im Blut wurde ebenfalls eine separate Betrachtung der Geschlechter vorgenommen. Auch hier zeigte sich eine Linksverschiebung der Messwerte und somit eine nicht normale Verteilung (Daten nicht gezeigt). Die berechneten

Medianwerte lagen für den Gesamtmethadonspiegel bei 0,15 mg/l (Männer) und 0,18 mg/l (Frauen). Für den (*R*)-Methadonspiegel ergab sich bei den männlichen Patienten ein Wert von 0,09 mg/l, bei den weiblichen Patienten von 0,11 mg/l und für (*S*)-Methadon lag der Medianwert bei Männern und Frauen bei 0,09 mg/l. Aufgrund der nicht normalen und unabhängigen Verteilung der Methadonspiegel wurde für einen statistischen Vergleich wiederum ein Mann-Whitney-U Test [Mann und Whitney, 1947] durchgeführt. Dabei wurden p-Werte von 0,378 für Gesamtmethadon, 0,209 für (*R*)-Methadon und 0,648 für (*S*)-Methadon erhalten. Folglich zeigten sich zwischen den männlichen und weiblichen Patienten, bezüglich des ermittelten Methadonspiegels, wiederum keine signifikanten Unterschiede.

5.2.2.2 Prozentualer Anteil an (*R*)-Methadon

Insgesamt erhielten von den übrigen 89 Patienten 71 Personen im Rahmen des Substitutionsprogramms *rac*-Methadon. Bei der Messung des Methadonspiegels im Blut zeigte sich, dass die prozentualen Anteile an (*R*)- bzw. (*S*)-Methadon zum Teil erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Patienten aufwiesen. So erstreckte sich der Anteil an (*R*)-Methadon von 30,45 bis 78,17 % und dementsprechend der Anteil an (*S*)-Methadon von 21,83 und 69,55 %. Die Berechnung der jeweiligen Mittelwerte ergab einen mittleren Anteil an (*R*)-Methadon von 53 % und 47 % für (*S*)-Methadon und die graphische Darstellung der Häufigkeiten (Abb. 19) zeigte bei beiden Isomeren eine annähernde Normalverteilung.

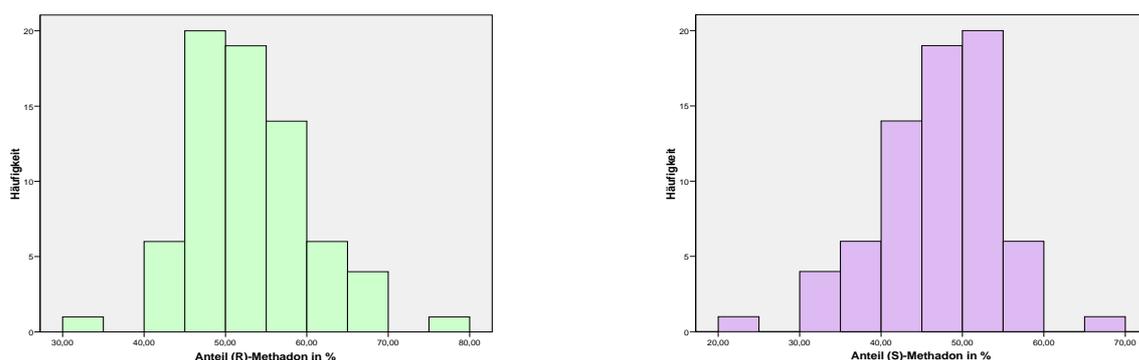


Abb. 19: Verteilung des Anteils an (*R*)- und (*S*)-Methadon am Gesamtmethadonspiegel der 71 Patienten die im Rahmen des Substitutionsprogramms *rac*-Methadon erhielten. Aufgetragen sind die Häufigkeiten (Y-Achse) gegen den prozentualen Anteil an (*R*)- bzw. (*S*)-Methadon (X-Achse). Für die Darstellung wurde der prozentuale Anteil in Klassen von 5 % eingeteilt.

Die getrennte Betrachtung der männlichen und weiblichen Patienten zeigte den gleichen mittleren Anteil an (*R*)- bzw. (*S*)-Methadon von 53 % bzw. 47 % bei beiden Geschlechtern wie

das gesamte Untersuchungskollektiv. Darüber hinaus ergab sich für den Anteil an beiden Isomeren bei Männern und Frauen ebenfalls eine Normalverteilung der Häufigkeiten (Daten nicht gezeigt). Für einen statistischen Vergleich des Anteils an (*R*)- bzw. (*S*)-Methadon unter den männlichen und weiblichen Methadonpatienten wurde aufgrund der Normalverteilung der Daten ein T-Test [Gosset, 1914/15] für zwei unabhängige Stichproben durchgeführt, der für (*R*)-Methadon einen p-Wert von 0,911 und für (*S*)-Methadon von 0,932 erbrachte. Somit ergab sich auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen Männern und Frauen.

5.2.2.3 Vergleich: (*R*)-Methadonspiegel und *CYP2D6* Genotyp

Die drei Methadonpatienten ohne ein funktionelles *CYP2D6* Gen (PM) wiesen einen (*R*)-Methadonspiegel von 0,057, 0,09 und 0,097 mg/l auf. Somit lagen alle drei Patienten unter dem ermittelten Medianwert des gesamten Untersuchungskollektivs von 0,10 mg/l (*R*)-Methadon. Die beiden IM zeigten im Blutplasma (*R*)-Methadonspiegel (0,243 und 0,25 mg/l), die im Vergleich zur Mehrheit der Patienten relativ hoch waren. Mit Werten von 0,027 und 0,029 mg/l lagen zwei der drei Patienten, die durch Duplikation des *CYP2D6* Gens in die Kategorie der UM eingeteilt wurden, nicht nur weit unter dem errechneten Medianwert von 0,10 mg/l (*R*)-Methadon, sondern zeigten ebenfalls die niedrigsten im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Methadonspiegel. Der dritte UM im Untersuchungskollektiv lag dagegen mit seinem (*R*)-Methadonspiegel von 0,163 mg/l bei weitem höher und darüber hinaus oberhalb des Medianwerts der Allgemeinheit. Die graphische Darstellung (Abb. 20) zeigt, dass die Personen, die in Folge ihres Genotyps dem PM zuzuordnen sind und zwei der UMs auf der linken Seite der Abbildung (niedrigere Spiegel) und im mittleren Bereich, die Patienten mit einem IM Phänotyp und die dritte Person, die den UM Phänotyp ausprägen sollte dagegen auf der Seite der höheren Spiegel zu finden sind. Die übrigen 17 Patienten, die aufgrund ihres Genotyps möglicherweise einen IM Phänotyp ausprägen (*wt/Nullallel*), wiesen (*R*)-Methadonspiegel von 0,034 bis 0,392 mg/l auf und verteilten sich somit über die gesamte Bandbreite der gemessenen (*R*)-Methadonspiegel. Allerdings lagen die meisten dieser Individuen auf der Seite der niedrigeren bzw. im mittleren Bereich der erhaltenen Spiegel (13 von 17 Patienten). Die restlichen 64 Personen, die dem EM Phänotyp zugeordnet wurden, verteilten sich mit (*R*)-Methadonspiegel von 0,03 bis 0,44 mg/l über den gesamten gemessenen Bereich (Abb. 20 zeigt die gemessenen Spiegel von (*R*)-Methadon in mg/l der einzelnen Methadonpatienten).

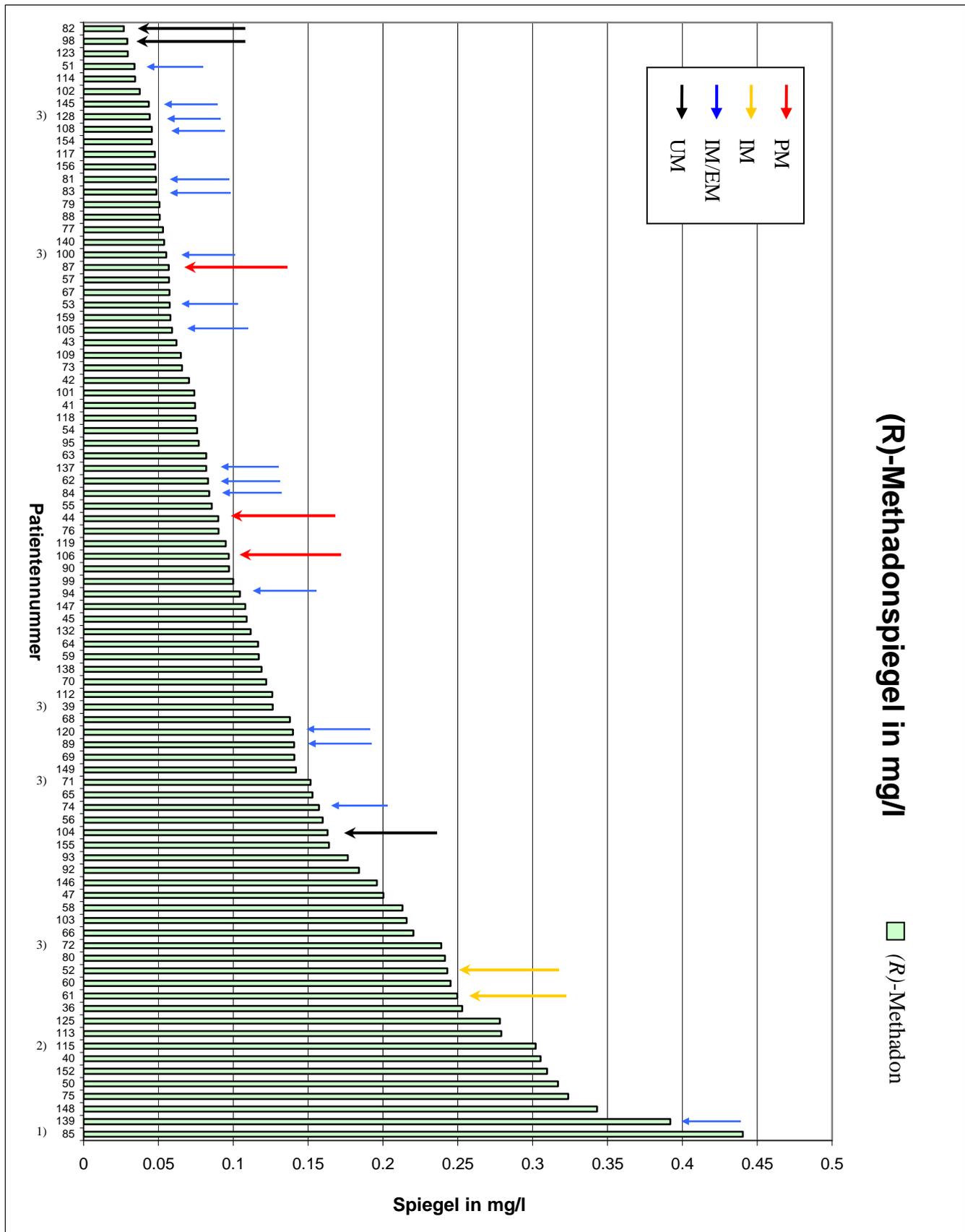
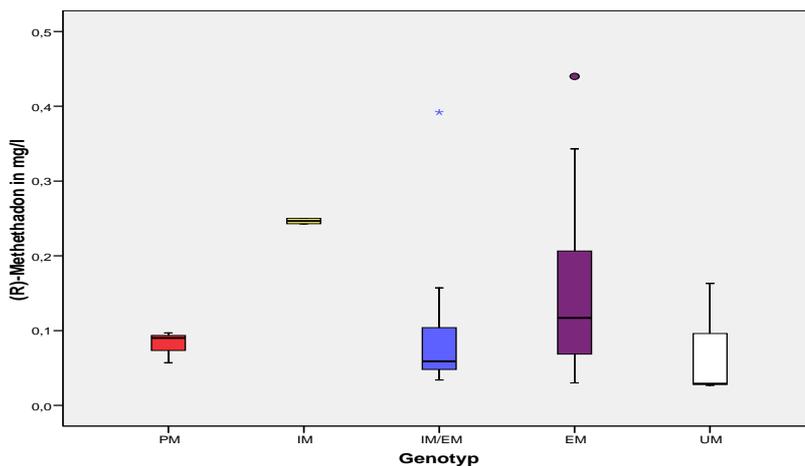


Abb. 20: (R)-Methadonspiegel in mg/l der restlichen 89 Methadonpatienten und die Zuordnung der zuvor detektierten Genotypen und der daraus resultierenden Phänotypen. Personen ohne Kennzeichnung mit einem Pfeil zeigten einen Genotyp, der zur Ausprägung eines EM Phänotyps führen sollte.
 1) Patientin #85: unterzog sich einer antiviralen Therapie mit Enzyminduktion; 2) Patient # 115: hat eine Leberzirrhose;
 3) Patienten #39, #71, #72, #100, #128 haben ein Alkoholproblem

Für eine bessere Veranschaulichung und Beurteilung einer möglichen Korrelation zwischen den gemessenen (*R*)-Methadonspiegeln und dem *CYP2D6* Genotyp wurden ebenfalls die Medianwerte der Spiegel innerhalb der fünf ermittelten wahrscheinlichen Phänotypen berechnet und miteinander verglichen. Hierbei ergab sich, dass die Gruppen der PM und EM einen mittleren Spiegel (0,09 mg/l und 0,12 mg/l) zeigten, der dem für die gesamte Patientengruppe berechneten Medianwert von 0,1 mg/l sehr nahe kam. Der Medianwert der Personen, die dem IM Phänotyp zugeordnet wurden lag bei 0,25 und somit weit oberhalb des allgemeinen mittleren Spiegels. Die Patienten, die aufgrund einer Duplikation des *CYP2D6* Gens den UMs zuzuordnen sind und die Personen, die möglicherweise einen IM Phänotyp (IM/EM) ausprägen, lagen unterhalb des für die gesamte Patientengruppe ermittelten Medianwerts. Dabei ergab sich für die UM mit 0,03 mg/l der niedrigste Wert für den mittleren (*R*)-Methadonspiegel (Abb. 21; Tabelle 22).

Abb.21:**Tabelle 22:**

Phänotyp	Medianwerte (<i>R</i>)-Methadonspiegel in mg/l
PM	0,09
IM	0,25
IM/EM	0,06
EM	0,12
UM	0,03
allgemein	0,1

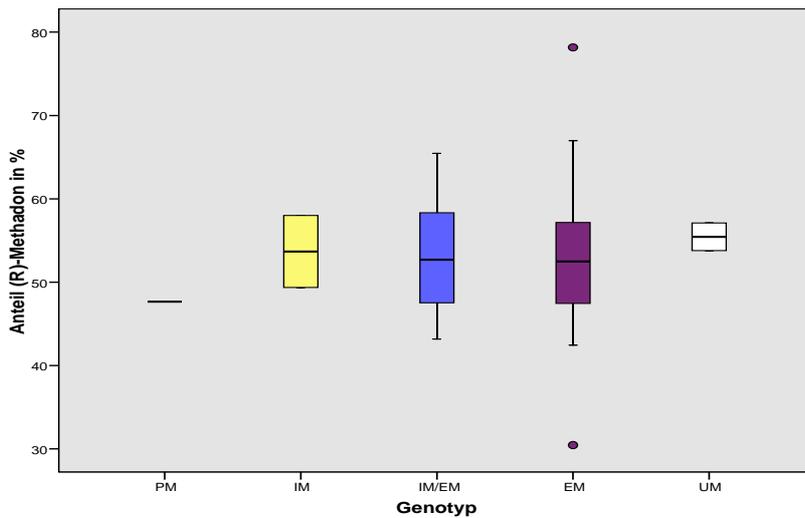
Graphische Darstellung der Verteilung (Abb.21) und tabellarische Auflistung der Medianwerte (Tabelle 22) der (*R*)-Methadonspiegel in mg/l der Individuen, die aufgrund ihres Genotyps dem PM, IM, IM/EM, EM bzw. UM Phänotyp zugeordnet wurden.

Die statistische Bewertung erfolgte aufgrund der nicht normalen Verteilung der Daten wiederum über einen Kruskal-Wallis-Test [Kruskal und Wallis, 1952]. Dabei ergab sich für den (*R*)-Methadonspiegel ein p-Wert von 0,021. Somit kann die Hypothese, dass sich der (*R*)-Methadonspiegel zwischen den einzelnen Phänotypen signifikant unterscheidet, auf einem 5 % Niveau nicht abgelehnt werden. Für Gesamt- und (*S*)-Methadon ergab der Test p-Werte von 0,010 und 0,014. Somit zeigte sich bezüglich des Spiegels von Gesamt- und (*S*)-Methadon ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen wahrscheinlichen Phänotypen.

5.2.2.4 Vergleich: Anteil an (*R*)-Methadon am Gesamtspiegel und *CYP2D6* Genotyp

Die einzige Patientin, die aufgrund ihres Genotyps dem PM Phänotyp zuzuordnen ist und im Rahmen des Substitutionsprogramms *rac*-Methadon erhielt, wies einen prozentualen Anteil an (*R*)-Methadon von ca. 48 % auf und lag somit geringfügig unterhalb des Mittelwerts der gesamten Patientengruppe von 53 %. Die beiden IM zeigten Werte unterhalb (ca. 50 %) und oberhalb (ca. 58 %) und die beiden Personen, die durch eine Genduplikation einen UM Phänotyp ausprägen sollten oberhalb (ca. 54 und 57 %) des allgemeinen Mittelwert. Die 16 Patienten, die aufgrund ihres Genotyps möglicherweise dem IM Phänotyp zuzuordnen sind (*wt/Nullallel*), wiesen Anteile an (*R*)-Methadon von ca. 44 bis 66 % auf und verteilten sich somit genau wie die restlichen Personen die dem EM Phänotyp zugeordnet werden sollten, mit Werten von 30 bis 78 % über die gesamte Bandbreite der gemessenen prozentualen Anteile an (*R*)-Methadon.

Zur Veranschaulichung eines eventuellen Zusammenhangs zwischen dem gemessenen Anteil an (*R*)-Methadon im Blut der Methadonpatienten und dem *CYP2D6* Genotyp wurden auch hier die Mittelwerte der prozentualen Anteile innerhalb der fünf ermittelten wahrscheinlichen Phänotypen berechnet und miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass ausschließlich der PM Phänotyp (diese Gruppe enthielt nur eine Person) mit einem Wert von ca. 48 % unterhalb des allgemeinen Mittelwerts von 53 % lag. Alle übrigen Gruppen wiesen Werte auf, die dem Mittelwert der gesamten Patientengruppe entsprachen bzw. oberhalb dieses Wertes lagen.

Abb.22:**Tabelle 23:**

Phänotyp	Mittelwerte Anteil an (R)-Methadon in %
PM	47,66
IM	53,68
IM/EM	53,15
EM	52,94
UM	55,44
allgemein	53

Graphische Darstellung der Verteilung (**Abb.22**) und tabellarische Auflistung der Mittelwerte (**Tabelle 23**) der prozentualen Anteile an (R)-Methadon im Blut der Individuen, die aufgrund ihres Genotyps dem PM, IM, IM/EM, EM bzw. UM Phänotyp zugeordnet wurden.

Aufgrund der Normalverteilung der Daten wurde für eine statistische Bewertung eine Varianzanalyse (ANOVA) [Eisenhart, 1947] durchgeführt. Hierbei ergab sich sowohl für den prozentualen Anteil an (R)-Methadon, als auch für den Anteil von (S)-Methadon im Blut der Methadonpatienten ein p-Wert von 0,948. Somit zeigte sich bezüglich des prozentualen Anteils an (R)- bzw. (S)-Methadon kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen ermittelten Genotypen und den daraus resultierenden wahrscheinlichen Phänotypen.

5.2.3 Auswirkung des *CYP2D6* Genotyps auf das Verhältnis zwischen Dosis und Spiegel von Methadon

5.2.3.1 Korrelation zwischen verabreichter Dosis und gemessenem Spiegel von Methadon

Da (*R*)-Methadon augenscheinlich alleine für den therapeutischen Effekt zuständig ist [Eap *et al.*, 1997; Greenblatt *et al.*, 1999; Begre *et al.*, 2002; Eap *et al.*, 2002], wird bei der Betrachtung der Korrelation zwischen Dosis und Spiegel in erster Linie auf dieses Isomer eingegangen.

Bei den vorangegangenen Auswertungen wurden die verabreichte Dosis an Methadon in mg/kg und der gemessene Methadonspiegel in mg/l angegeben. Da eine Umrechnung von mg in l oder umgekehrt aufgrund fehlender Angaben wie das Blutvolumen der einzelnen Patienten nicht möglich war, konnten im Folgenden ausschließlich die Werte von Dosierung und Spiegel miteinander verglichen werden.

Der graphische Vergleich der verabreichten Dosis und dem gemessenen Spiegel von (*R*)-Methadon der einzelnen Patienten zeigte, dass Personen mit ähnlicher Dosierung nicht notwendiger Weise den gleichen Spiegel aufwiesen (Abb. 23). Bei den Probanden #39, #40 und #98 überstiegen die Werte der gemessenen (*R*)-Methadonspiegel die der verabreichten Dosierung. Die graphische Darstellung der Korrelation zwischen Dosierung und ermitteltem Spiegel von (*R*)-Methadon zeigte zwar eine breite Streuung aber auch eine gewisse Korrelation (Abb. 24). Bei Betrachtung des graphischen Vergleichs von Dosis und Spiegel von Gesamt- und (*S*)-Methadon zeigten sich ähnliche Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

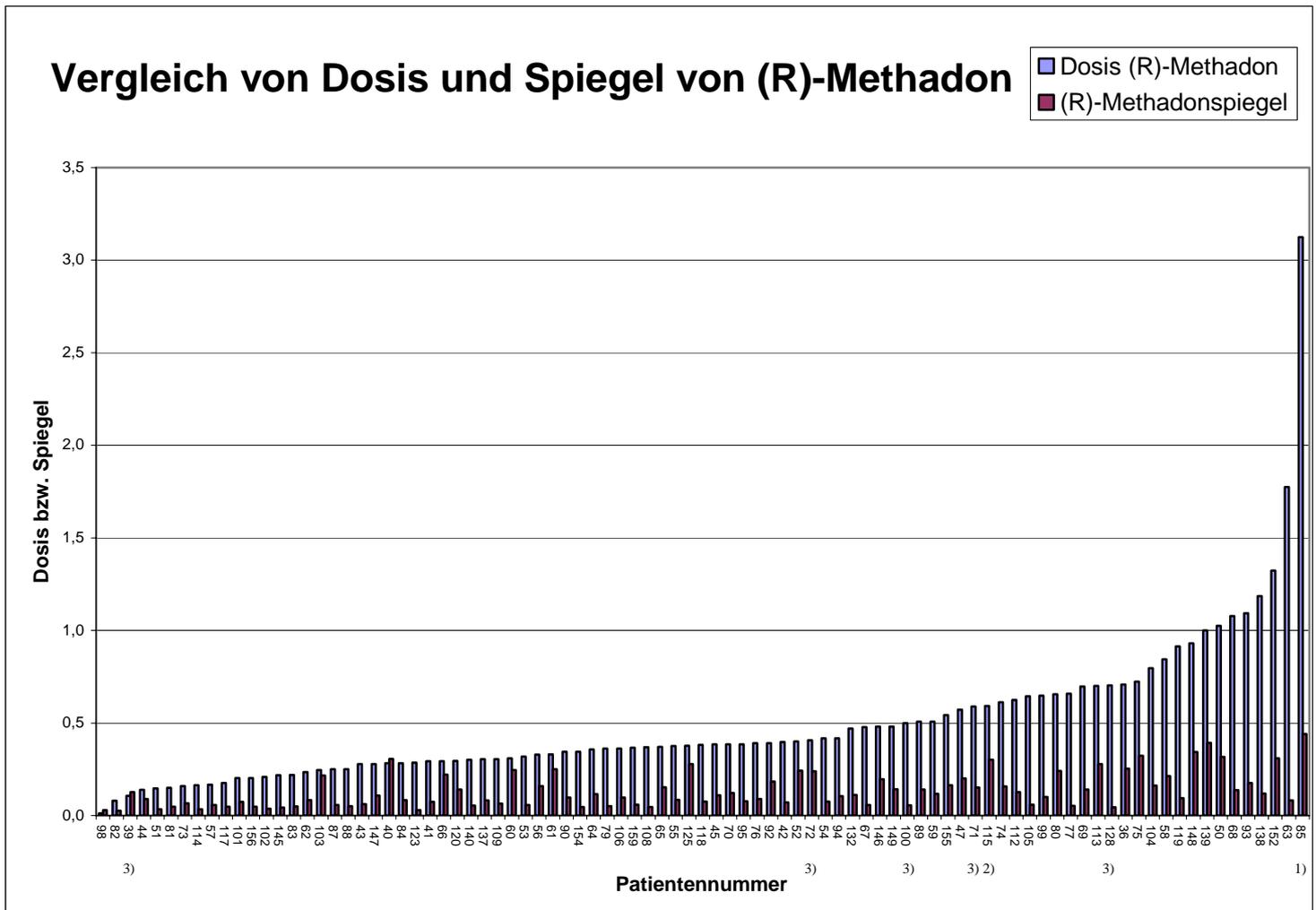


Abb. 23: Graphische Darstellung der Dosierung und Spiegel von (R)-Methadon der einzelnen Patienten. ¹⁾ Patientin #85: unterzog sich einer antiviralen Therapie mit Enzyminduktion; ²⁾ Patient # 115: hat eine Leberzirrhose; ³⁾ Patienten #39, #71, #72, #100, #128 haben ein Alkoholproblem

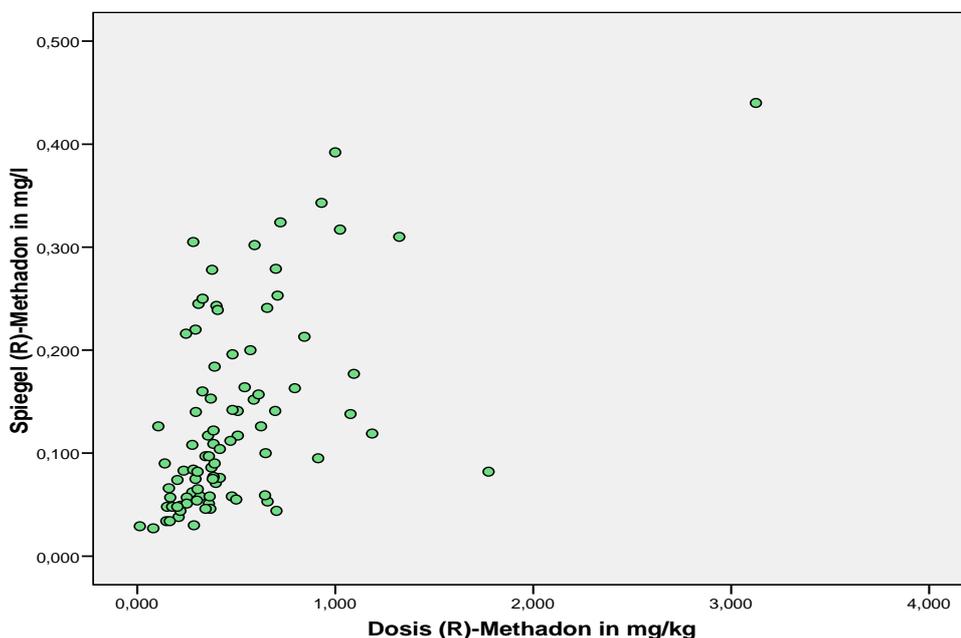


Abb. 24: Graphische Darstellung der Korrelation zwischen Dosierung und Spiegel von (R)-Methadon der einzelnen Patienten

Da die Daten der verabreichten Dosen bzw. der gemessenen Spiegel an (*R*)-Methadon nicht normal verteilt sind, wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (Spearman- ρ -Test) [Spearman, 1904] berechnet. Dabei ergaben sich für die Korrelation zwischen Dosis und Spiegel von (*R*)-Methadon ein Koeffizient von 0,57 und eine Signifikanz von 0,000. Somit ist die Korrelation auf dem 1 % Niveau als signifikant anzusehen. Der Vollständigkeit halber wurde der Rangkorrelationskoeffizient ebenfalls für Gesamt- und (*S*)-Methadon berechnet. Die erhaltenen Werte von 0,54 bzw. 0,000 (Gesamtmethadon) und 0,44 bzw. 0,000 ((*S*)-Methadon) zeigten auch hier einen signifikanten Zusammenhang zwischen verabreichter Dosis und gemessenem Spiegel. Die getrennte Berechnung der Korrelation nach Spearman der männlichen und weiblichen Methadonpatienten ergab für (*R*)-Methadon einen Korrelationskoeffizienten von 0,53 (Männer) bzw. 0,64 (Frauen) und eine Signifikanz von 0,000 für beide Geschlechter. Für Gesamtmethadon wurden Werte von 0,51 bzw. 0,000 (Männer) und 0,54 bzw. 0,000 (Frauen) und für (*S*)-Methadon Werte von 0,34 bzw. 0,028 (Männer) und 0,49 bzw. 0,003 (Frauen) erhalten. Somit ist die Korrelation zwischen Dosis und Spiegel bei Männern und Frauen für (*R*)- und Gesamtmethadon bzw. für (*S*)-Methadon bei Frauen auf dem 1 % Niveau signifikant. Bei den männlichen Patienten kann bezüglich (*S*)-Methadon die Korrelation ausschließlich auf einem 5 % Niveau nicht abgelehnt werden.

5.2.3.2 Quotient aus verabreichter Dosis und gemessenem Spiegel von Methadon

Zur Veranschaulichung des Abbaus von Methadon und dem Verhältnis der verabreichten Dosis zu dem gemessenen Spiegel von Methadon wurden die Quotienten aus den Werten von Dosis und Spiegel von Methadon gebildet. Dies entspricht der Berechnung des Verteilungsvolumens eines Medikaments, das definiert wird als das fiktive Volumen eines Körpers, in das ein bestimmter Wirkstoff sich vom Blutplasma ausgehend verteilt. Das Verteilungsvolumen trägt die Einheit l/kg. Da in dieser Arbeit allerdings nicht auf die individuelle Verteilung von Methadon, sondern ausschließlich auf die Variationen zwischen Dosis und Spiegel der einzelnen Patienten und dem Zusammenhang zwischen diesen und dem Genotyp von CYP2D6 eingegangen werden soll, wurde auf die Benennung des Quotienten mit der Einheit l/kg im Folgenden verzichtet.

Bei der Berechnung der Quotienten aus Dosis und Spiegel ergaben sich für die restlichen 89 Methadonpatienten Werte für Gesamtmethadon von 0,51 bis 25,90 und für (*R*)-Methadon von

0,45 bis 21,63. Die 71 Personen, die im Rahmen des Substitutionsprogramms *rac*-Methadon erhielten, zeigten Quotienten für (*S*)-Methadon von 0,37 bis 44,32. Da bei den Probanden #39, #40 und #98 die Werte des Spiegels größer waren als die der verabreichten Dosis erhielt man bei dieser Berechnung auch Quotienten < 1 . Die graphische Darstellung zeigt zum einen die große Bandbreite an erhaltenen Werten und zum anderen große Unterschiede bei den einzelnen Patienten bezüglich der Quotienten von (*R*)- und (*S*)-Methadon (Abb. 25 zeigt die berechneten Quotienten aus Dosis und Spiegel von (*R*)- und (*S*)-Methadon der einzelnen Methadonpatienten).

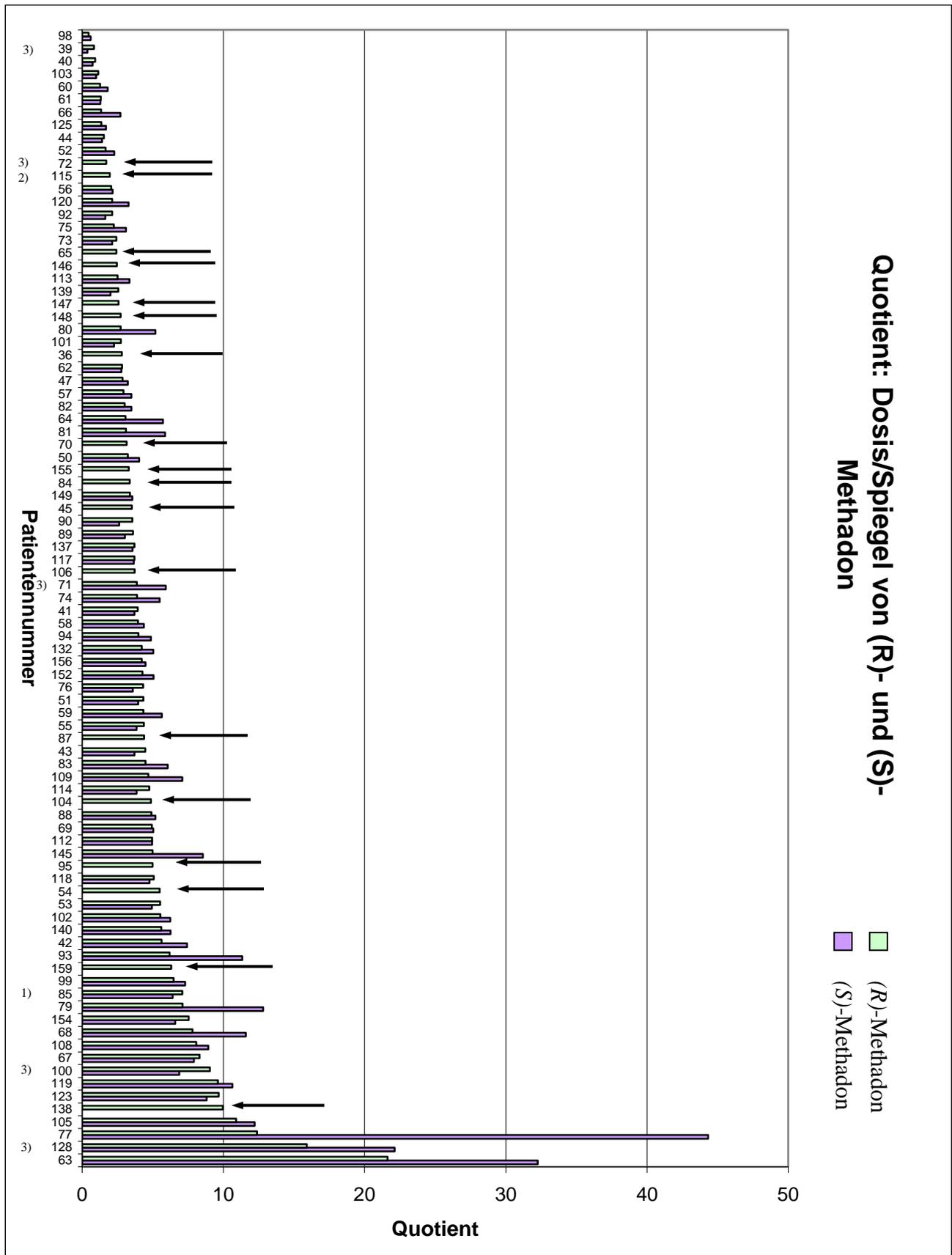


Abb. 25: Quotienten aus Spiegel und Dosis von (S)- und/oder (R)-Methadon der Methadonpatienten. 18 der Patienten erhielten L-Polamidon, somit konnten ausschließlich Quotienten aus Spiegel und Dosis von (R)-Methadon gebildet werden (→). Den übrigen 71 Personen wurde *rac*-Methadon verabreicht.
 Nach Angaben des behandelnden Arztes: ¹⁾ Patientin #85: unterzog sich zusätzlich einer antiviralen Therapie mit Enzyminduktion; ²⁾ Patient #115: hat eine Leberzirrhose; ³⁾ Patienten # 39, #71, #72, #100 und #128 haben ein Alkoholproblem

Die Verteilung der Häufigkeiten der Quotienten aus Dosis und Spiegel von Gesamt-, (*R*)- und (*S*)-Methadon zeigte jeweils eine Linksverschiebung und somit eine nicht normale Verteilung der Daten (Abb. 26) mit Medianwerten von 4,05 für Gesamtmethadon, 3,89 für (*R*)-Methadon und 4,50 für (*S*)-Methadon, was annähernd dem für Methadon berechneten Verteilungsvolumen von 4 l/kg entspricht [Nilsson *et al.*, 1982(2)].

Bei Patientin #85 (antivirale Therapie mit Enzyminduktion) ergaben sich Quotienten, die mit Werten von 6,7 für Gesamtmethadon, 7,1 für (*R*)-Methadon und 6,4 für (*S*)-Methadon oberhalb der ermittelten Medianwerte der Allgemeinheit lagen. Von den Patienten mit Alkoholproblemen zeigte ausschließlich Patient #39 Werte, die weit unterhalb der berechneten mittleren Quotienten lagen (0,5 für Gesamtmethadon, 0,8 für (*R*)-Methadon und 0,4 für (*S*)-Methadon). Bei den Patienten #71, #100 und #128 wurden Quotienten aus Dosis und Spiegel erhalten, die ein wenig (#71: 6,7 für Gesamtmethadon, 3,9 für (*R*)-Methadon und 5,9 für (*S*)-Methadon; #100: 7,8 für Gesamtmethadon, 9,0 für (*R*)-Methadon und 6,9 für (*S*)-Methadon) bzw. weit (#128: 18,5 für Gesamtmethadon, 15,9 für (*R*)-Methadon und 22,1 für (*S*)-Methadon) oberhalb der ermittelten Medianwerte für die gesamte Patientengruppe lagen. Die Patienten #72 (Alkoholproblem) und #115 (Leberzirrhose) erhielten im Rahmen des Substitutionsprogramms L-Polamidon. Für diese beiden Probanden wurden Werte von 1,7 (#72) bzw. 2,0 (#115) für Gesamt- und (*R*)-Methadon erhalten und zeigten somit im Vergleich mit den anderen Patienten eher niedrige Werte für die Quotienten aus Dosis und Spiegel.

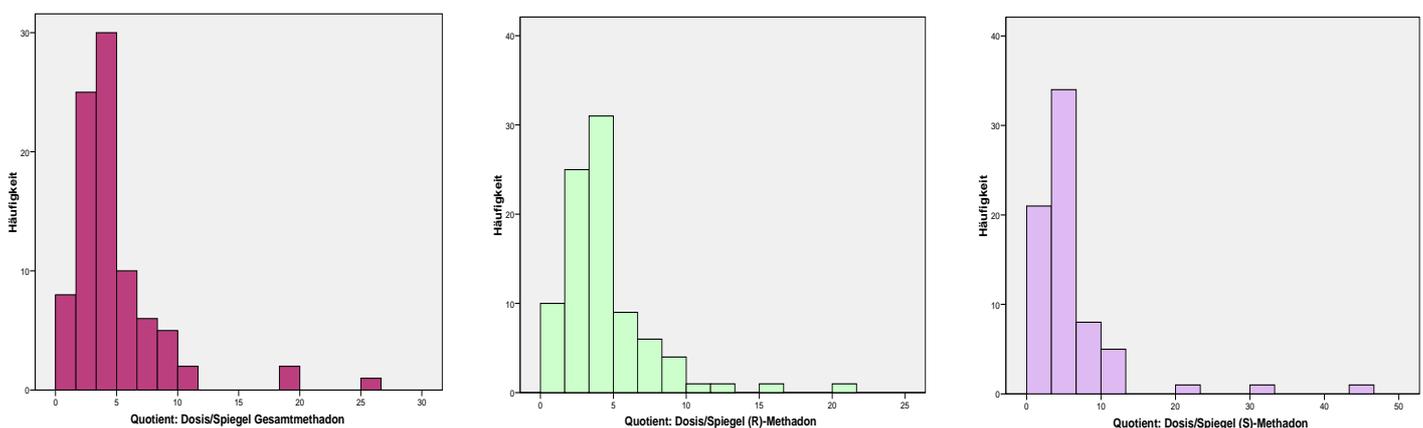


Abb. 26: Verteilung der berechneten Quotienten aus Dosis und Spiegel von Gesamt- und (*R*)-Methadon der übrigen 89 Patienten die im Rahmen des Substitutionsprogramms L-Polamidon bzw. *rac*-Methadon erhielten und von (*S*)-Methadon der 71 Methadonpatienten die *rac*-Methadon verabreicht bekommen haben. Aufgetragen sind die Häufigkeiten (Y-Achse) gegen die berechneten Quotienten aus Dosis und Spiegel (X-Achse). Für die Darstellung wurden die berechneten Quotienten in Klassen von 1,66 für Gesamt- und (*R*)-Methadon bzw. von 3,33 für (*S*)-Methadon eingeteilt.

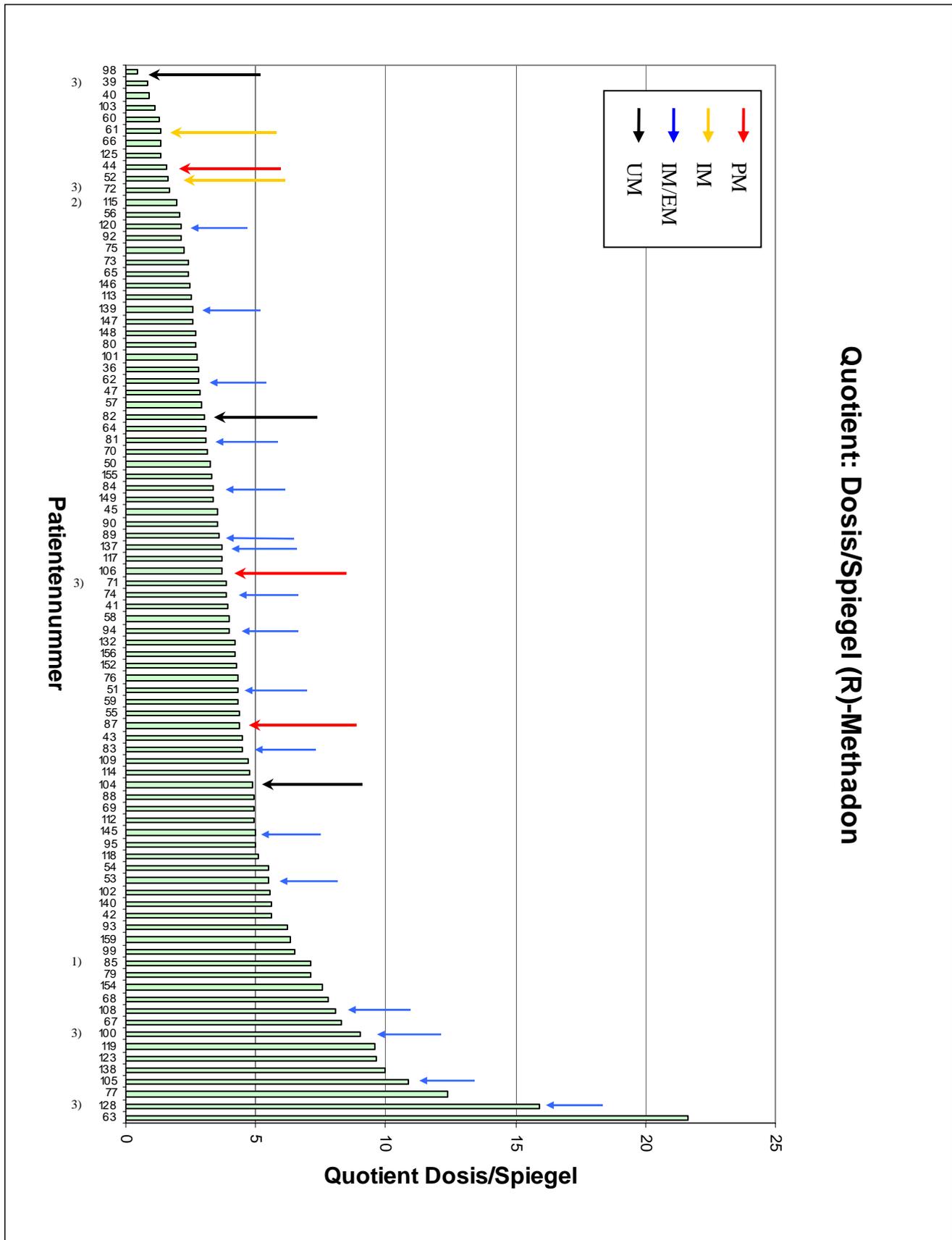
Die Verteilungen der Quotienten aus Dosis und Spiegel bei Männern bzw. Frauen zeigten bei Gesamt-, (*R*)- und (*S*)-Methadon ebenfalls keine Normalverteilung (Daten nicht gezeigt). Die

berechneten Medianwerte lagen für die Quotienten von Gesamtmethadon bei 3,77 (Männer) und 4,10 (Frauen). Für (*R*)-Methadon ergab sich bei den männlichen Patienten ein Wert von 3,80, bei den weiblichen Patienten von 4,28 und für (*S*)-Methadon lagen die Medianwerte bei 3,78 (Männer) und 5,04 (Frauen). Aufgrund der nicht normalen und unabhängigen Verteilung der Quotienten aus der jeweilig verabreichten Dosis und dem dazu ermittelten Spiegel von Methadon wurde für einen statistischen Vergleich wiederum ein Mann-Whitney-U Test [Mann und Whitney, 1947] durchgeführt. Dabei wurden p-Werte von 0,467 für Gesamtmethadon, 0,442 für (*R*)-Methadon und 0,337 für (*S*)-Methadon erhalten. Somit zeigten sich zwischen den männlichen und weiblichen Patienten, bezüglich der errechneten Quotienten aus Dosis und Spiegel ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

5.2.3.3 Vergleich: Quotient aus Dosis und Spiegel von (*R*)-Methadon und *CYP2D6* Genotyp

Die drei Personen, die aufgrund ihres Genotyps dem PM Phänotyp zuzuordnen sind lagen bezüglich der berechneten Quotienten aus Dosis und Spiegel von (*R*)-Methadon, mit Werten von 1,54, 3,73 und 4,39 ein wenig unterhalb bzw. oberhalb und die beiden IM unterhalb (1,32 und 1,65) des zuvor ermittelten Medianwerts der gesamten Patientengruppe von 3,89. Die graphische Darstellung (Abb. 27) zeigt, dass sich die Personen mit einem PM Phänotyp somit auf der linken Seite und im mittleren Bereich der Abbildung und die Patienten die infolge ihres Genotyps den IMs zuzuordnen sind, im linken Bereich finden.

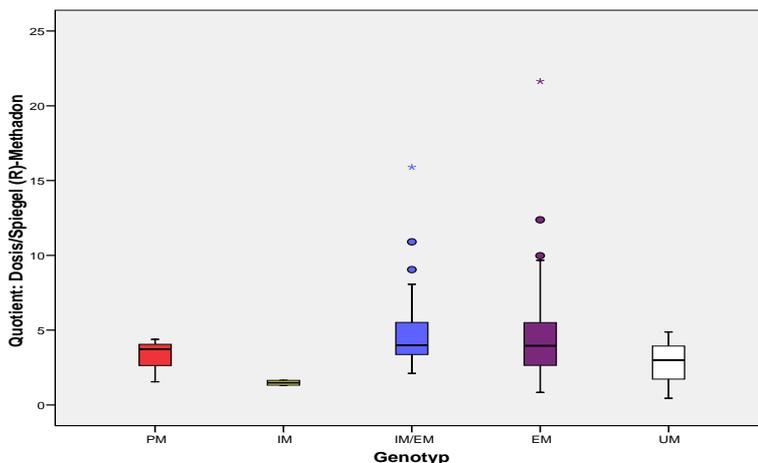
Die drei UMs verteilen sich mit Quotienten von 0,45, 3,00 und 4,88 bezüglich des allgemeinen Medianwerts von 3,89 und der graphischen Darstellung ähnlich den Personen, die dem PM Phänotyp zuzuordnen sind (Abb.27). Bei den 17 Patienten die aufgrund einer defekten Kopie des *CYP2D6* Gens und der Ermangelung an der -1584C>G Mutation auf dem intakten Allel möglicherweise einen IM Phänotyp ausprägen, wurden Quotienten aus Dosis und Spiegel von (*R*)-Methadon erhalten, die von 2,11 bis 15,90 reichten und sich somit über die gesamte Bandbreite der errechneten Quotienten erstreckten (Abb.27). Die übrigen 64 Personen, die einen EM Phänotyp ausprägen sollten, verteilten sich mit Werten von 0,82 bis 21,63 ebenfalls über den gesamten Bereich an berechneten Quotienten aus verabreichter Dosis und gemessenem Spiegel (Abb. 27 zeigt die berechneten Quotienten aus verabreichter Dosis und gemessenem Spiegel von (*R*)-Methadon der einzelnen Methadonpatienten).



Quotient: Dosis/Spiegel (R)-Methadon

Abb. 27: Quotienten aus Dosis und Spiegel von (R)-Methadon der restlichen 89 Methadonpatienten und die Zuordnung der zuvor detektierten Genotypen und der daraus resultierenden Phänotypen. Personen ohne Kennzeichnung mit einem Pfeil zeigten einen Genotyp, der zur Ausprägung eines EM Phänotyps führen sollte.
 1) Patientin #85: unterzog sich einer antiviralen Therapie mit Enzyminduktion; 2) Patient # 115: hat eine Leberzirrhose;
 3) Patienten #39, #71, #72, #100, #128 haben ein Alkoholproblem

Um den Einfluss des *CYP2D6* Genotyps auf das Verhältnis der verabreichten Dosis zu dem gemessenen (*R*)-Methadonspiegel besser beurteilen zu können, wurden die Medianwerte der Quotienten innerhalb der fünf ermittelten wahrscheinlichen Phänotypen ermittelt und miteinander verglichen. Dabei ergab sich, dass ausschließlich die Individuen, die einen IM Phänotyp ausprägen sollten, weit unterhalb (1,48) des für die gesamte Patientengruppe berechneten Medianwerts von 3,89 lagen. Die übrigen Gruppen zeigten Medianwerte, die annähernd dem allgemeinen mittleren Quotienten entsprachen (Abb. 28, Tabelle 24)

Abb.28:**Tabelle 24:**

Phänotyp	Medianwerte Quotienten: Dosis/Spiegel (<i>R</i>)-Methadon
PM	3,73
IM	1,48
IM/EM	3,99
EM	3,96
UM	3,00
allgemein	3,89

Graphische Darstellung der Verteilung (**Abb.28**) und tabellarische Auflistung der Medianwerte (**Tabelle 24**) der berechneten Quotienten aus Dosis und Spiegel von (*R*)-Methadon der Individuen, die aufgrund ihres Genotyps dem PM, IM, IM/EM, EM bzw. UM Phänotyp zugeordnet wurden.

Da die Häufigkeiten der berechneten Quotienten aus Dosis und Spiegel wiederum nicht normal verteilt sind, erfolgte die statistische Bewertung ebenfalls über einen Kruskal-Wallis-Test [Kruskal und Wallis, 1952]. Für die Quotienten aus Dosis und Spiegel von (*R*)-Methadon ergab sich hierbei ein p-Wert von 0,154 und somit kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen ermittelten Genotypen und den daraus resultierenden wahrscheinlichen Phänotypen. Der Vollständigkeit halber wurde dieser Test ebenfalls für Gesamt- und (*S*)-Methadon durchgeführt, wobei p-Werte von 0,128 und 0,058 erhalten wurden. Folglich kann die Hypothese, dass sich das Verhältnis von Dosis zu Spiegel bei Gesamt- und (*S*)-Methadon zwischen den einzelnen ermittelten Genotypen signifikant unterscheidet, abgelehnt werden.

6 Diskussion

6.1 Genotypisierung

In dieser Arbeit sollte der Einfluss von CYP2D6 auf den Metabolismus von Methadon bei 96 Personen, die an einem Drogensubstitutionsprogramm teilnahmen, untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die Nullallele *CYP2D6**3, *4, *5 und *6, die in der europäischen Bevölkerung am häufigsten für einen PM Phänotyp verantwortlich sind [Kagimoto *et al.*, 1990; Gaedigk *et al.*, 1991; Broly *et al.*, 1991; Saxena *et al.*, 1994; Daly *et al.*, 1995; Sachse *et al.*, 1997; Leathart *et al.*, 1998, Daly, 2003], die Duplikation des *CYP2D6* Gens, die einen UM Phänotyp bedingt [Johansson *et al.*, 1993; Agundez *et al.*, 1995; Dahl *et al.*, 1995] sowie die Mutation -1584C>G im regulatorischen Bereich des Gens, die vermutlich ebenfalls einen Einfluss auf die Enzymaktivität hat [Raimundo *et al.*, 2000; Løvlie *et al.*, 2001; Zanger *et al.*, 2001; Zanger *et al.*, 2004], untersucht werden. Zum Nachweis dieser Mutationen mussten zuerst geeignete Nachweissysteme etabliert werden. Hierbei sollte, in Bezug auf die mögliche Verwendung im Routinebetrieb, in erster Linie darauf geachtet werden, dass diese Methoden wenig Zeit und Material in Anspruch nehmen.

6.1.1 Nachweis der Allele *CYP2D6**3, *4 und *6 sowie der Mutation -1584C>G

Zum Nachweis der für die Allele *CYP2D6**3, *4 und *6 verantwortlichen Mutationen sowie dem Basenaustausch -1584C>G im regulatorischen Bereich von *CYP2D6* ist die hier entwickelte Multiplex-PCR eine zeit- und materialsparende Methode. Für die gleichzeitige und spezifische Darstellung aller Fragmente wurden zwei Standard-PCRs mit allelspezifischen PCRs kombiniert. Im Hinblick auf die spezifische Darstellung aller Allele und der damit verbundenen hohen Stringenz musste teilweise auf die ausgewogene Darstellung aller Fragmente verzichtet werden. Darüber hinaus zeigte sich, dass die eingesetzte DNA-Menge sowie die DNA-Qualität eine entscheidende Rolle spielte. Bei einer Menge von < 500 pg pro Reaktionsansatz konnten einzelne Fragmente oftmals nicht mehr dargestellt werden. Überschritt die

DNA-Menge 1 ng kam es zu Verfälschungen der Ergebnisse durch unspezifische Bindungen und Farbdurchschläge. Außerdem wurden mit niedermolekularer DNA bessere Ergebnisse erzielt als mit hochmolekularer DNA, was möglicherweise an einer unterschiedlichen Zugänglichkeit der Primerbindungsstellen liegt.

Die Überprüfung der einzelnen zu untersuchenden Genorte über Restriktionsverdau bzw. Sequenzierung aller hier untersuchten Proben zeigte jedoch, dass die in dieser Arbeit etablierte Multiplex-PCR eine zuverlässige Methode zum Nachweis der oben genannten Mutationen ist. Für einen Einsatz dieser Methode für den routinemäßigen Nachweis dieser Mutationen im *CYP2D6* Gen wäre dennoch eine höhere Stabilität wünschenswert. Um dies zu erreichen könnte zum Beispiel getestet werden, in wie weit Tween 20, Triton X-100 [Levinson *et al.*, 1992], β -Mercaptoethanol [Chamberlain *et al.*, 1988; Gibbs *et al.*, 1990; Runnebaum *et al.*, 1991] bzw. Tetramethylammoniumchlorid [Ugozzoli und Wallace, 1992] nicht-spezifische Bindungen minimiert. Um eine ausgewogenere Intensität der Amplifikate zu erhalten, könnte man auch die Oligonukleotid-Primer für die limitierten Amplikons zuerst dem Reaktionsansatz zugeben und nach ein paar Zyklen die restlichen Primer beifügen [Edwards und Gibbs, 1994]. Zu guter Letzt könnte man auch neue Oligonukleotid-Primer bzw. weitere Konzentrationen der bestehenden Primer austesten.

Darüber hinaus ist es auch möglich, auf andere Nachweissysteme auszuweichen. So gibt es noch die Möglichkeit der Minisequenzierung, Pyrosequenzierung, Invader Assays und bereits etablierte einzelne TaqMan Assays zum Nachweis von SNPs [Shi, 2001; Wang *et al.*, 2007]. Jedoch kann hier nur jeweils ein SNP pro Ansatz getestet werden, was wesentlich zeitaufwändiger und teilweise auch kostenintensiver ist. Microarrays, wie der Assay mit der NanoChip® Molecular Biology Workstation von Nanogen zeigte dagegen bereits bei dem gleichzeitigen Nachweis von verschiedenen SNPs [Erali *et al.*, 2003; Schrijver *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004; Ferrari *et al.*, 2005] sowie der Genotypisierung von *CYP2D6* gute Ergebnisse [Lee *et al.*, 2007].

6.1.2 Nachweis der Deletion (*CYP2D6*5*) sowie der Duplikation des *CYP2D6* Gens

Die erste beschriebene Methode zum Nachweis der Deletion und Duplikation des *CYP2D6* Gens erfolgte über eine Analyse mittels RFLP und anschließendem Southern Blotting. Mit dem dabei verwendeten Restriktionsenzym *XbaI* erhielt man je nach Genotyp Fragmente von 29 kb (keine Deletion bzw. Duplikation des *CYP2D6* Gens), 44 kb (assoziiert mit dem *CYP2D6*4* Allel), 13 kb (Deletion des *CYP2D6* Gens) bzw. 42 kb (Duplikation des *CYP2D6* Gens) [Gaedigk *et al.*, 1991; Gonzalez *et al.*, 1988; Meyer *et al.*, 1990]. Diese Methode ist allerdings äußerst zeitaufwendig und es wird eine große Menge an qualitativ hochwertiger DNA benötigt. Darüber hinaus ist es nicht möglich, die exakte Kopienzahl des *CYP2D6* Gens zu bestimmen [Steen *et al.*, 1995(1)].

Es wurden ebenfalls bereits verschiedene PCRs von langen Fragmenten, so genannte XL-PCRs zum Nachweis der Deletion und Duplikation des *CYP2D6* Gens ohne interne Kontrolle [Steen *et al.*, 1995(1); Johansson *et al.*, 1996] bzw. mit interner Kontrolle [Lundqvist *et al.*, 1999; Løvlie *et al.*, 1996], eine Multiplex Long-PCR [Hersberger *et al.*, 2000] sowie ein multiplexer Assay zum gleichzeitigen Nachweis von Deletion und Duplikation des *CYP2D6* Gens und der meisten SNPs [Roberts und Kennedy, 2006] beschrieben. Die in dieser Arbeit unter anderem verwendeten PCRs zum Nachweis von langen Fragmenten zählen ebenfalls zu den XL-PCRs mit interner Kontrolle. Die Duplikation des *CYP2D6* Gens konnte mit der hier etablierten XL-PCR zuverlässig nachgewiesen werden. Bei dem Nachweis der Deletion von *CYP2D6* (*CYP2D6*5*) konnte allerdings die interne Kontrolle, das ca. 15 kb Wildtyp-Fragment auch nach den verschiedensten Veränderungen der PCR-Bedingungen, wie zum Beispiel eine Verlängerung der Extensionszeit, Verringerung der Anlagerungstemperatur bzw. eine Erhöhung der dNTP und Mg(OAc)₂-Konzentration im Reaktionsansatz nicht erhalten werden. Es zeigte sich ausschließlich, dass die hier verwendeten Oligonukleotid-Primer bei einer Verringerung der Stringenz unspezifische Primer-Bindungen eingehen. Aus diesem Grund und da das ca. 2,7 kb große Fragment, das nach erfolgter Deletion entsteht, mit dieser PCR jedoch zuverlässig erhalten werden konnte, wurde auf die Darstellung der internen Kontrolle vorerst verzichtet. Mit weiteren Austestungen anderer PCR-Bedingungen bzw. anderer Oligonukleotid-Primer könnte man das ca. 15 kb Wildtyp-Fragment und somit die interne Kontrolle dieser PCR möglicherweise erhalten. Der Nachweis von Duplikation und Deletion mittels PCR ist dennoch eine zeitsparendere Methode als die herkömmlich verwendete RFLP-

Analyse. Man benötigt allerdings auch hier eine große Menge an hochmolekularer DNA und es besteht wiederum keine Möglichkeit, die exakte Kopienzahl des *CYP2D6* Gens zu bestimmen. Darüber hinaus ist diese Methode durch das hohe Risiko von Ausfällen für den Routinebetrieb mit einem hohen Probendurchsatz nicht geeignet [Meijerman *et al.*, 2007].

Ein Real-Time PCR Assay zum Nachweis der Duplikation, Deletion sowie der exakten Kopienzahl des *CYP2D6* Gens wurde von Schaeffeler *et al.* (2003) beschrieben. Hierbei binden die Oligonukleotid-Primer und die TaqMan-Sonde für *CYP2D6* innerhalb von Exon 9. Die Bestimmung der Kopienzahl erfolgt dann über einen Vergleich mit der Menge an Albumin Gen (internes Referenzgen). Zur Überprüfung der Ergebnisse bezüglich der Duplikation bzw. Deletion des *CYP2D6* Gens in dieser Arbeit wurde ebenfalls ein Real-Time PCR Assay herangezogen. Zur Bestimmung der Kopienzahl des *CYP2D6* Gens wurden die Oligonukleotid-Primer und die TaqMan-Sonde von Schaeffeler *et al.* (2003), anstatt des Albumin Gens als Referenz der *Quantifiler Human DNA Quantification Kit* verwendet. Hierbei konnten allerdings die erwarteten Verhältnisse zwischen der Menge an *CYP2D6* und Referenz von 0:1 (keine Genkopie), 0,5:1 (eine Genkopie), 1:1 (zwei Genkopien) bzw. 1,5:1 (drei Genkopien) usw. nicht erhalten werden. Bei der Quantifizierung mittels *Quantifiler Human DNA Quantification Kit* wurde grundsätzlich eine ca. 1,5 bis 1,7mal höhere DNA-Menge gemessen, als bei der Bestimmung der DNA-Menge über den Real-Time PCR Assay für *CYP2D6*. Dabei zeigte sich ebenfalls, dass die DNA-Qualität für diesen Nachweis eine gewisse Rolle spielt. So erhielt man unter Verwendung von hochmolekularer DNA (Isolierung mittels Phenol-Chloroform) größere Mengenunterschiede zwischen den beiden verwendeten Assays (ca. 1,7:1) als mit niedermolekularer DNA (Isolierung mittels Chelex; ca. 1,5:1). Trotz dieser Abweichungen konnte die Kopienzahl des *CYP2D6* Gens jedoch zuverlässig bestimmt werden. Der Mengenunterschied bei den beiden verwendeten Real-Time PCR Assays ist höchst wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Oligonukleotid-Primer und die TaqMan Sonde des *Quantifiler Human DNA Quantification Kit* eine höhere Bindungseffizienz aufweisen, als die zur Bestimmung der Menge an *CYP2D6* Gen. Darüber hinaus ist davon auszugehen, dass die PCR-Bedingungen in einem kommerziell genutzten Kit so optimiert wurden, dass eine höchst mögliche Amplifikationseffizienz erreicht wird. Mittlerweile ist ebenfalls bekannt, dass ein SNP, der bei den Allelen *CYP2D6*10* und *CYP2D6*36* zu finden ist die Bindung der TaqMan Sonde negativ beeinflusst und dadurch die Quantifizierungseffizienz herabsetzt. In diesem Fall wird ebenfalls eine geringere Menge an *CYP2D6* detektiert, als tatsächlich vorhanden ist. Bei Bodin *et al.* (2005) wurde ein weiterer Real-Time PCR Assay zum Nachweis der Deletion und Duplikation bzw. zur Bestimmung der Kopienzahl des *CYP2D6* Gens beschrie-

ben. Die Oligonukleotid-Primer und die TaqMan Sonde für diesen Test binden innerhalb des Intron 6, wo bis jetzt noch keinerlei Mutationen nachgewiesen wurden. Als Referenzgen wird bei diesem Assay nicht das Albumin Gen sondern das Gen für die RNase P verwendet [Bodin *et al.*, 2005].

Mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Real-Time PCR Assays konnten die Ergebnisse der zuvor etablierten XL-PCRs abgesichert werden. Dennoch sollte für einen abschließlichen Nachweis der Kopienzahl von *CYP2D6* mittels TaqMan Assay ein anderes Referenzgen bzw. die Methode nach Bodin *et al.* (2005) getestet werden. Ansonsten ist die Real-Time PCR auf jeden Fall eine zeit- und materialsparende, sowie einfach durchzuführende Methode zum Nachweis der Deletion und Duplikation bzw. Bestimmung der exakten Kopienzahl von *CYP2D6* und scheint bis jetzt am besten für einen Routinebetrieb mit hohem Probandendurchsatz geeignet zu sein.

6.2 Allelhäufigkeiten

In der vorliegenden Arbeit wurden mit den zuvor etablierten Methoden 96 Personen, die im Rahmen eines Drogensubstitutionsprogramms Methadon erhielten und eine Gruppe von 103 Referenzpersonen auf die Allele *CYP2D6**3, *4, *6 und *9 den Basenaustausch -1584C>G sowie die Duplikation des *CYP2D6* Gens hin untersucht. Es zeigte sich, dass die Allelhäufigkeiten der beiden Untersuchungskollektive keine signifikanten Unterschiede aufwiesen. Dadurch kann man also davon ausgehen, dass *CYP2D6* bzw. die Variation in der *CYP2D6* Aktivität nichts mit der Anfälligkeit für Heroinabhängigkeit zu tun hat und somit in diesem Sinne kein suchterzeugender Faktor ist.

6.2.1 PM Genotyp

Unter den Methadonpatienten fanden sich drei, innerhalb der Referenzgruppe vier Probanden mit zwei defekten Kopien des *CYP2D6* Gens (*CYP2D6**3/*4, *4/*4 bzw. *4/*6), was einer Frequenz von ca. 3,1 bzw. 3,8 % an PM in den beiden Untersuchungskollektiven entspricht. Phänotypisierungen zufolge sollten jedoch 5 bis 10 % der europäischen Bevölkerung einen PM Phänotyp ausprägen [Mahgoub *et al.*, 1977; Eichelbaum *et al.*, 1979; Bertilsson, 1995;

Jurima-Romet *et al.*, 1997; Sachse *et al.*, 1997]. Die etwas geringere Frequenz innerhalb der in dieser Arbeit untersuchten Gruppen ist möglicherweise zum einen auf die geringe Stichprobenzahl zurückzuführen. Zum anderen wurden die beiden Untersuchungskollektive ausschließlich auf die Nullallele, die am häufigsten in der kaukasischen Bevölkerung auftreten und für den PM Phänotyp verantwortlich zu sein scheinen (*CYP2D6**3, *4, *5 und *6) hin untersucht. Die Allele *CYP2D6**7 [Evert *et al.*, 1994], *8 [Broly *et al.*, 1995], *11 [Marez *et al.*, 1995], *12 [Marez *et al.*, 1996], *13 [Panserat *et al.*, 1995], *14 [Wang *et al.*, 1999], *15 [Sachse *et al.*, 1996], *16 [Daly *et al.*, 1996(2)], *18 [Yokoi *et al.*, 1996], *19 [Marez *et al.*, 1997], *20 [Marez-Allorge *et al.*, 1999], *21 [Chida *et al.*, 1999; Yamazaki *et al.*, 2003], *38 [Leathart *et al.*, 1998], 40* [Gaedigk *et al.*, 2002], *42 [Gaedigk *et al.*, 2003(2)] und *44 [Yamazaki *et al.*, 2003], die ebenfalls bezüglich bestimmter Substrate bzw. generell für ein nicht funktionelles *CYP2D6* Enzym kodieren sowie die bis jetzt ausschließlich *in vitro* untersuchten Nullallele *CYP2D6**56 [Li *et al.*, 2006] und *62 [Klein *et al.*, 2007] wurden in dieser Arbeit nicht berücksichtigt, da sie in der europäischen Bevölkerung, wenn überhaupt nur mit einer äußerst niedrigen Frequenz auftreten. Dennoch kann das Auftreten eines oder mehrerer dieser Allele in den hier untersuchten Personengruppen nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Die Sequenzierung des gesamten *CYP2D6* Gens aller Probanden könnte über das Vorkommen dieser seltenen Nullallele Aufschluss geben und mögliche weitere PMs identifizieren.

6.2.2 IM Genotyp

Mit dem Oligonukleotid-Primerpaar 2549Adelf und 2549Adelr zum Nachweis der Deletion des Adenins an Position 2549 (*CYP2D6**3) konnte die für *CYP2D6**9 charakteristische 3bp-Deletion 2613-2615delAGA nachgewiesen werden. Dieses Allel kodiert für ein Enzym mit verminderter Aktivität [Tyndale *et al.*, 1991; Broly und Meyer, 1993]. Insgesamt wiesen 5 Methadonpatienten und 2 Personen der Referenzgruppe diese Variante auf. Bei drei Methadonpatienten und den beiden Referenzpersonen trat *CYP2D6**9 in Kombination mit einem Wildtyp Allel auf, was die Ausprägung eines EM Phänotyps zur Folge haben sollte. Zwei Probanden der Methadongruppe zeigten allerdings einen heterozygoten Genotype für Allel *CYP2D6**9 und ein Nullallel (*CYP2D6**4/ *CYP2D6**9 und *CYP2D6**6/ *CYP2D6**9) und waren somit den IMs zuzuordnen. Mit 2,1 % liegt die hier ermittelte Frequenz an IMs jedoch unterhalb der in der Literatur beschriebenen von etwa 5 bis 10 %. Dies ist zum Teil darauf

zurückzuführen, dass die Probanden in der vorliegenden Arbeit auf keine weiteren Allele, die für ein Enzym mit verminderter Aktivität kodieren, wie *CYP2D6*10* und *CYP2D6*17* untersucht wurden. Zum einen kommen diese Allele in der europäischen Bevölkerung wenn überhaupt nur sehr selten vor [Masimirembwa *et al.*, 1996; Droll *et al.*, 1998; Leathart *et al.*, 1998; Tateishi *et al.*, 1999; Wennerholm *et al.*, 1999; Garcia-Barcelo *et al.*, 2000; Teh *et al.*, 2001; Wan *et al.*, 2001; Zanger *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2002] und zum anderen können Kombinationen aus zwei Allelen, die für ein Enzym mit verminderter Aktivität kodieren ebenfalls nur bei einem geringen Teil der IMs nachgewiesen werden. Zur Erklärung der übrigen Individuen, die einen IM Phänotyp ausprägen, wird in der Literatur ein Gendosiseffekt bei Personen mit einem Null- und einem Wildtypallel diskutiert. Bei einigen dieser Individuen zeigt sich auch tatsächlich ein IM Phänotyp, andere dagegen weisen eine normale Enzymaktivität auf [Daly, 2003; Griese *et al.*, 1998]. Zur Erklärung wird die Mutation -1584C>G im regulatorischen Bereich des *CYP2D6* Gens, die mit einer erhöhten Transkriptionsrate und somit mit einer höheren Enzymaktivität assoziiert wird, herangezogen. Findet sich diese Mutation im Promotorbereich des Allels, das für ein intaktes Enzym kodiert, sollte die vermehrte Transkription den Verlust an der Enzymmenge, bedingt durch das Nullallel kompensieren und einen EM Phänotyp zur Folge haben. Unter dieser Annahme könnte die Wildtypsequenz (-1584C) im regulatorischen Bereich des intakten Allels in Kombination mit einem Nullallel zur Ausprägung eines IM Phänotyps führen. In der Vorliegenden Arbeit konnte bei 31 Probanden des Substitutionsprogramms und 38 Referenzpersonen ein für ein Nullallel heterozygoter Genotyp nachgewiesen werden. Darüber hinaus wiesen 18 bzw. 28 dieser Personen keine -1584G Mutation sondern die Wildtypsequenz -1584C im Promotorbereich des Nullallels sowie des intakten Allels auf. Dies entspricht einer Frequenz von ca. 18 % bzw. 27 % in den beiden Gruppen und liegt somit weit oberhalb des in der Literatur ermittelten Anteils an IMs in der europäischen Bevölkerung.

Das Fehlen der Mutation -1584G im regulatorischen Bereich des *CYP2D6* Gens findet man unter anderem auch bei dem Allel *CYP2D6*41*, das ebenfalls für ein Enzym mit verminderter Aktivität kodiert. Es wird angenommen, dass der größte Teil an IMs durch die Kombination dieses Allels mit einem Nullallel erklärt werden kann. Die herabgesetzte Enzymaktivität wurde zuerst auf eine niedrigere Transkriptionsrate, bedingt durch die Wildtypsequenz im Promotorbereich des *CYP2D6*41* Allels zurückgeführt [Raimundo *et al.*, 2000; Zanger *et al.*, 2001; Zanger *et al.*, 2004]. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass eine weitere für das Allel *CYP2D6*41* charakteristische Mutation in Intron 6 (2988G>A) für einen erhöhten Anteil an nichtfunktionellen Spleißvarianten mit fehlendem Exon 6 verantwortlich ist. Somit führt diese

Mutation höchst wahrscheinlich zu einer verminderte Enzymaktivität und sollte als Schlüsselmutation des Allels *CYP2D6*41* betrachtet werden [Raimundo *et al.*, 2004; Toscano *et al.*, 2006].

Der Nachweis des *CYP2D6*41* Allels über die Mutation 2988G>A in Intron 6 wäre demnach in der vorliegenden Arbeit sehr hilfreich um den tatsächlichen Anteil an IMs unter den Probanden der beiden Untersuchungskollektive, insbesondere unter den 18 Methadonpatienten bzw. 28 Referenzpersonen, die einen heterozygoten Genotyp für ein Nullallel und ein Allel mit der Wildtypsequenz -1584C im regulatorischen Bereich zeigen, zu definieren. Darüber hinaus könnten, zur Abrundung der hier erhaltenen Daten, zusätzlich die Allele *CYP2D6*10* und *CYP2D6*17*, die ebenso zur Ausprägung eines IM Phänotyp beitragen können, in die Untersuchung einbezogen werden. Da diese beiden Allele jedoch äußerst selten in der europäischen Bevölkerung auftreten [Masimirembwa *et al.*, 1996; Droll *et al.*, 1998; Leathart *et al.*, 1998; Tateishi *et al.*, 1999; Wennerholm *et al.*, 1999; Garcia-Barcelo *et al.*, 2000; Teh *et al.*, 2001; Wan *et al.*, 2001; Zanger *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2002], würde man allerdings keine bedeutende Auswirkung auf die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse erwarten.

6.2.3 UM Genotyp

Bei vier der Methadonpatienten und vier Probanden der Referenzgruppe konnte eine Duplikation des *CYP2D6* Gens nachgewiesen werden. Jedoch fand sich bei jeweils einem Individuum aus jeder Gruppe zumindest ein Nullallel unter den drei vorhandenen Kopien des *CYP2D6* Gens, was zur Ausprägung eines EM Phänotyps führen sollte. Damit wurde für beide Untersuchungskollektive eine Frequenz von etwa 3 % duplikationspositiver UMs erhalten. Insgesamt zeigen allerdings ca. 7 % der europäischen Bevölkerung eine erhöhte Enzymaktivität bezüglich *CYP2D6* und sind somit dem UM Phänotyp zuzuordnen [Johansson *et al.*, 1993; Agundez *et al.*, 1995; Dahl *et al.*, 1995].

Grundsätzlich kann nur bei einem Teil der Individuen, die einen UM Phänotyp ausprägen die erhöhte Enzymaktivität über eine Duplikation des *CYP2D6* Gens erklärt werden. Bei einem Großteil der duplikationsnegativen UMs konnte das Allel *CYP2D6*35*, dass für ein Enzym mit erhöhter Aktivität kodiert [Løvlie *et al.*, 2001] nachgewiesen werden. Dieses Allel zeigt genau wie das Allel *CYP2D6*2* die Mutation -1584C>G im regulatorischen Bereich des Gens. Es wird angenommen, dass die erhöhte Enzymaktivität in direktem Zusammenhang mit einer erhöhten Transkriptionsrate bedingt durch die Mutation im Promotorbereich steht

[Løvlie *et al.*, 2001; Zanger *et al.*, 2001; Gaedigk *et al.*, 2003(1)]. In einer Studie von Allorge *et al.* (2001) konnte allerdings nachgewiesen werden, dass die Expression bedingt durch das Allel *CYP2D6**35 als normal anzusehen ist. Dies lässt darauf schließen, dass die von diesem Allel kodierte *CYP2D6* Variante eine höhere katalytische Aktivität, hervorgerufen durch einen der zusätzlich vorkommenden Basenaustausche (31G>A, 2850C>T und/oder 4180G>C), die zu den Aminosäuresubstitutionen Val11Met, Arg296Cys und Ser486Thr führen, ausprägt [Allorge *et al.*, 2001].

Insgesamt konnte bei 25 Methadonpatienten und 27 Referenzpersonen ein heterozygoter bzw. bei 4 Individuen der Patientengruppe und 5 Personen der Referenzgruppe ein homozygoter Genotyp bezüglich der -1584G Mutation nachgewiesen werden. Unter diesen Probanden finden sich möglicherweise weitere Individuen, die einen UM Phänotyp ausprägen. Ein Nachweis des *CYP2D6**35 Allels über die Polymorphismen 31G>A, 2850C>T und/oder 4180G>C könnte diese duplikationsnegativen UMs identifizieren und die Frequenz innerhalb der beiden Untersuchungskollektive erhöhen.

6.2.4 EM Genotyp

Unter den 96 Methadonpatienten und 103 Referenzpersonen konnte bei 53 bzw. 55 Probanden keine in dieser Arbeit untersuchten Mutationen, die eine Verringerung oder Inaktivierung der Enzymaktivität bedingen, nachgewiesen werden. Diese Personen wurden der Gruppe zugeordnet, die einen EM Phänotyp ausprägen. Dennoch ist, wie bereits unter den Punkten 6.2.1 bis 6.2.3 diskutiert wurde, nicht völlig auszuschließen, dass sich unter diesen Probanden Individuen finden, die dem PM, IM bzw. UM Phänotyp zuzuordnen sind. Dies könnte nur durch die Bestimmung weitere Allele, die die Enzymaktivität beeinflussen bzw. durch eine Sequenzierung des gesamten *CYP2D6* Gens ausgeschlossen werden. Aufgrund der niedrigen Frequenz der übrigen Allele ist dennoch davon auszugehen, dass nur wenige der hier untersuchten Personen in die falsche Genotypklasse eingeordnet wurden.

6.3 Dosierung, Spiegel bzw. Verhältnis von Dosis zu Spiegel von Methadon

Die im Rahmen des Substitutionsprogramms verabreichten Tagesdosen der 96 Methadonpatienten erstreckten sich in der vorliegenden Arbeit von 2 bis 400 mg Gesamtmethadon bzw. 1 bis 200 mg (*R*)- und (*S*)-Methadon. Der Großteil der Probanden erhielt Dosen zwischen 15 und 140 mg, was annähernd der für eine erfolgreiche MMT beschriebenen durchschnittlichen täglichen Dosierung von 20 bis 120 mg Methadon entspricht [Dole und Nyswander, 1966; Johnson *et al.*, 2000; Strain *et al.*, 1999; Caplehorn und Bell, 1991]. Der gemessene Spiegel von Gesamtmethadon erstreckte sich von 0,05 bis 0,928 mg/l, und unterlag somit ebenfalls großen interindividuellen Schwankungen. Der prozentuale Anteil an (*R*)- bzw. (*S*)-Methadon bei den Patienten, die im Rahmen des Substitutionsprogramms *rac*-Methadon erhielten wiesen mit Werten von 30 bis 80 % teilweise erhebliche Unterschiede auf. Ursache hierfür ist wahrscheinlich, dass einige der am Metabolismus von Methadon beteiligten Cytochrom P450 Enzyme bezüglich ihrer Aktivität eine Stereoselektivität gegenüber den beiden Isomeren zeigen [Gerber *et al.*, 2004; Kharasch *et al.*, 2004; Totah *et al.*, 2007]. Eine Variabilität in der Enzymaktivität bei den einzelnen Individuen könnte möglicherweise die Unterschiede zwischen dem Anteil an (*R*)- und (*S*)-Methadon zum Teil erklären. Um das Verhältnis der verabreichten Dosis zu dem jeweilig gemessenen Methadonspiegel zu veranschaulichen wurden die Quotienten aus den Werten von Dosis und Spiegel berechnet und miteinander verglichen. Die so erhaltenen Werte zeigten eine große Spannbreite für Gesamt-, (*R*)- und (*S*)-Methadon. Bei den Quotienten < 1 überstiegen die Werte des ermittelten Spiegels die der verabreichten Dosis. Dies ist jedoch vermutlich eher darauf zurückzuführen, dass hier Werte mit unterschiedlichen Einheiten (mg/kg und mg/l) miteinander verglichen wurden und nicht auf den Beikonsum von zusätzlichem Methadon.

In der vorliegenden Arbeit konnte folglich eine große interindividuelle Variabilität bezüglich der verabreichten Menge bzw. dem gemessenen Spiegel an Methadon beobachtet werden. Ein deskriptiver Vergleich der verabreichten Dosis mit dem gemessenen Spiegel an Methadon, sowie die Betrachtung der berechneten Quotienten zeigte auf, dass sich das Verhältnis zwischen Dosis und Spiegel bei den einzelnen Patienten stark unterscheiden kann. Darüber hinaus wiesen Probanden, die im Rahmen der Therapie annähernd gleiche Mengen an Methadon erhielten, zum Teil starke Variationen im Bezug auf die Konzentration dieses Medikaments im Blut auf [Eap *et al.*, 2002]. Dennoch konnte in dieser Arbeit, wie bereits bei verschiedenen

anderen Studien über die Dosierung und Blutplasmaspiegel von Methadon bei MMT Patienten eine signifikante Korrelation zwischen verabreichter Menge und gemessener Blutkonzentration festgestellt werden [Loimer und Schmid, 1992; Adelson *et al.*, 2007; Eap *et al.*, 2000]. Ein statistischer Abgleich der verabreichten Menge an Methadon mit dem Körpergewicht und BMI zeigte auf, dass nur teilweise eine signifikante Korrelation besteht und somit das Gewicht und die Größe der Probanden, wenn überhaupt nur einen geringen Einfluss auf die Dosierung von Methadon haben. Bei dem Vergleich der weiblichen und männlichen Patienten in Bezug auf die verabreichte Dosis, den gemessenen Spiegel sowie des berechneten Quotienten aus beidem konnte dagegen keinerlei Signifikanz festgestellt werden. Folglich scheint das Geschlecht der Probanden die benötigte Menge sowie die Konzentration im Blut von Methadon nicht zu beeinflussen.

6.4 Einfluss von CYP2D6 auf Dosierung, Spiegel bzw. Verhältnis von Dosis zu Spiegel von Methadon

Um festzustellen in wie weit der Genotyp von CYP2D6 einen Einfluss auf die Variabilität in Bezug auf die Dosierung, den Spiegel und das Verhältnis von Dosis zu Spiegel von Methadon hat, wurden die erhaltenen Ergebnisse der Genotypisierung mit den Werten von Dosis und Blutkonzentration deskriptiv und statistisch miteinander verglichen. Da CYP2D6 allem Anschein nach ausschließlich (*R*)-Methadon metabolisiert [Eap *et al.*, 1997; Greenblatt *et al.*, 1999; Begre *et al.*, 2002; Eap *et al.*, 2002], wurde in erster Linie dieses Isomer zur Veranschaulichung einer Korrelation zwischen CYP2D6 und Methadon herangezogen.

Erwartungsgemäß sollten Personen ohne ein funktionelles *CYP2D6* Gen vergleichsweise niedrige Dosen an (*R*)-Methadon erhalten. Probanden, die aufgrund ihres Genotyps einen UM Phänotyp ausprägen, würden eher hohe Mengen an Methadon benötigen. Personen mit einem IM Genotyp sollten bezüglich ihrer Dosierung zwischen den PMs und EMs zu finden sein.

In der vorliegenden Arbeit erhielten die drei Probanden, die keine intakte Kopie des *CYP2D6* Gens aufwiesen Dosen, die ein wenig unterhalb des Medianwerts der gesamten Patientengruppe lagen. Somit hat es den Anschein, dass bezüglich des PM Genotyps zumindest ein gewisser Einfluss auf die Gabe von Methadon besteht. Jedoch erhielt ausschließlich einer der drei Personen, die ihrem Genotyp zu Folge dem UM Phänotyp zuzuordnen sind im Vergleich zu den übrigen Patienten eine sehr hohe Dosis an (*R*)-Methadon. Den beiden anderen UMs

dagegen wurde im Vergleich zu allen übrigen Patienten eine äußerst niedrige Dosis verabreicht. Dabei erhielt Patient # 97 mit 0,139 mg/kg sogar die niedrigste (*R*)-Methadonmenge des gesamten Untersuchungskollektivs. Die Patienten, die einen IM Phänotyp ausprägen sollten und die, die aufgrund einer defekten Kopie des *CYP2D6* Gens und der Ermangelung an der -1584C>G Mutation auf dem intakten Allel möglicherweise dem IM Phänotyp zuzuordnen sind, bekamen im Rahmen des Substitutionsprogramms höhere Mengen an (*R*)-Methadon als die PMs, zeigten bezüglich ihrer Dosierung jedoch keinen nennenswerten Unterschied zu den EMs. In Bezug auf die IM und UM Genotypen konnte somit nur teilweise bzw. gar keine Auswirkung auf die Dosierung von (*R*)-Methadon nachgewiesen werden. Die statistische Bewertung der Ergebnisse im Hinblick auf den ermittelten Genotyp und der Dosierung von (*R*)-Methadon, aber auch von Gesamt- und (*S*)-Methadon zeigte darüber hinaus keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypgruppen.

Im Hinblick auf den erhaltenen (*R*)-Methadonspiegel im Blut sollten Personen ohne ein funktionelles *CYP2D6* Gen, einen relativ hohen, Personen mit einem UM Genotyp einen niedrigen Spiegel aufweisen. Probanden mit einem IM bzw. EM Phänotyp sollten Werte dazwischen zeigen (PM > IM > EM > UM). Darüber hinaus sollte der Anteil an (*R*)-Methadon aufgrund der Stereoselektivität von *CYP2D6* bei den PMs höher anzusiedeln sein als bei den Personen, die aufgrund ihres Genotyps einen IM, EM und UM Phänotyp ausprägen.

Betrachtet man die hier ermittelten durchschnittlichen Methadonspiegel der einzelnen Genotypklassen zeigt sich wie erwartet, dass die Personen, die anhand ihres Genotyps dem UM Phänotyp zugeordnet wurden die niedrigsten Konzentrationen an Methadon im Blut aufwiesen. Die höchsten Werte zeigten allerdings nicht die Probanden ohne ein funktionelles *CYP2D6* Gen, die zusammen mit den EMs eine durchschnittliche Konzentration, die annähernd dem Medianwert der gesamten Patientengruppe entsprach, aufwiesen sondern die beiden Patienten, die einen IM Genotyp zeigten. Die statistische Beurteilung ergab für (*R*)-, (*S*)- und Gesamtmethadon einen signifikanten Unterschied der gemessenen Spiegel zwischen den einzelnen Genotypgruppen. Diese Signifikanz ist allerdings vielmehr auf die hohen Werte der beiden IMs und der generell sehr niedrigen Stichprobenzahl und nicht auf einen Einfluss von *CYP2D6* auf die Konzentration von Methadon im Blut zurückzuführen. Eine weitere Untersuchung der Personen mit einem möglichen IM Phänotyp, um diese Probanden sicher den IMs oder EMs zuzuordnen bzw. eine Erhöhung der Stichprobenzahl könnte möglicherweise diesen hier erhaltenen signifikanten Unterschied aufheben.

Bezüglich des erhaltenen Anteils von (*R*)-Methadon zeigte die Gruppe der PMs die niedrigste Prozentzahl, wobei allerdings ausschließlich ein Proband ohne ein funktionelles *CYP2D6* Gen im Rahmen des Substitutionsprogramms *rac*-Methadon erhielt. Alle übrigen Genotypklassen wiesen keine nennenswerten Unterschiede zum allgemein berechneten Medianwert auf. Somit ergab sich auch im Hinblick auf den prozentualen Anteil von (*R*)-Methadon weder deskriptiv noch bei der statistischen Beurteilung ein nachweislicher Einfluss von *CYP2D6*.

Bei einem möglichen Einfluss von *CYP2D6* auf den Metabolismus von (*R*)-Methadon sollte ebenfalls das Verhältnis von verabreichter Dosis zu dem gemessenen Spiegel zwischen den verschiedenen Phänotypen variieren. Um einen möglichen Zusammenhang diesbezüglich zu veranschaulichen, wurde der Quotient aus Dosis und Spiegel berechnet und mit den in dieser Arbeit ermittelten Genotypklassen verglichen. Erwartungsgemäß sollten Personen, die einen PM Genotyp zeigen, im Verhältnis zur verabreichten Dosis einen relativ hohen, die UMs dagegen einen niedrigen (*R*)-Methadonspiegel im Blut aufweisen. Probanden mit einem IM bzw. EM Genotyp sollten zwischen den beiden anderen Gruppen zu finden sein (PM < IM < EM < UM).

Zwei der Probanden mit Genduplikation zeigten zwar sehr niedrige (*R*)-Methadonspiegel im Blut. Jedoch wurde diesen Probanden auch eine äußerst geringe Dosis an (*R*)-Methadon verabreicht, wodurch das Verhältnis von Dosis zu Spiegel im Gegensatz zu dem Erwarteten sehr niedrig ausfiel. Insgesamt zeigten die Gruppen der PMs, IM/EMs und UMs bezüglich der errechneten Quotienten und somit des Verhältnisses von Dosis zu Spiegel Werte die dem allgemeinen Medianwert der gesamten Patientengruppe annähernd glichen. Ausschließlich die beiden Personen mit einem IM Genotyp wiesen ein sehr niedriges Verhältnis zwischen Dosis und Spiegel auf. Die statistische Auswertung zeigte jedoch, dass es zwischen den ermittelten Genotypklassen keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf das Verhältnis von verabreichter Dosis zu gemessenen Spiegel von (*R*)-, (*S*)- und auch Gesamtmethadon gab.

In Folge dessen konnte in dieser Arbeit kein eindeutiger Einfluss des *CYP2D6* Genotyps auf die Dosierung, den Spiegel, den Anteil sowie das Verhältnis von Dosis zu Spiegel von (*R*)-Methadon nachgewiesen werden. Diese Resultate widersprechen allerdings den Ergebnissen einiger diesbezüglich durchgeführter Studien, bei denen gewisse Unterschiede der mittleren Dosis, sowie signifikante Abweichungen der Plasmakonzentration von Methadon zwischen UMs und PMs aufgezeigt werden konnten [Eap *et al.*, 2001; Collier *et al.*, 2007]. Patienten mit einem UM Phänotyp scheinen darüber hinaus eher Entzugserscheinungen zu zeigen bzw. über

eine mangelnde Wirkung zu klagen als Probanden ohne ein intaktes *CYP2D6* Gen [Pérez de los Cobos *et al.*, 2007]. Weiterhin zeigt ein höherer Anteil an Personen mit einem UM Genotyp (72%) als Probanden mit einem PM Genotyp (40%) Probleme bezüglich einem Beikonsum illegalen Drogen bzw. Entzugserscheinungen. Darüber hinaus erhalten UMs die erfolgreich an einer Methadontherapie teilnehmen eine um 93 % höhere Dosis als UMs bei denen die Drogensubstitution fehlschlägt und nur etwa 28 % der Personen mit einem PM Genotyp, im Gegensatz zu 50 % der Probanden mit einem UM Genotyp erhalten Dosen über 100 mg pro Tag [Eap *et al.*, 2001].

Ein Grund für die in dieser Arbeit aufgezeigten abweichenden Resultate könnte in der geringen Stichprobenzahl und der daraus resultierenden niedrigen Anzahl an Personen mit einem PM bzw. UM Genotyp begründet liegen. Eine Erweiterung des Untersuchungskollektivs könnte die hier erhaltenen Ergebnisse möglicherweise verändern. Darüber hinaus ist nicht auszuschließen, dass unter den Probanden, die der Gruppe der EMs zugeordnet wurden weitere Personen mit einem UM, IM bzw. PM Genotyp zu finden sind, da sie möglicherweise hier nicht untersuchte Allele, wie z.B. *CYP2D6*41*, *CYP2D6*35* bzw. eines der seltenen Allele, die für ein nicht funktionelles *CYP2D6* Enzym codieren, tragen.

Des Weiteren sollte ebenfalls der mögliche Beikonsum von illegal erworbenem zusätzlichem Methadon nicht außer Acht gelassen werden. So zeigte zum Beispiel eine Patientin (#142), die im Rahmen des Substitutionsprogramms L-Polamidon und somit ausschließlich (*R*)-Methadon erhielt in ihrem Blut sowohl (*R*)- als auch (*S*)-Methadon in einem Verhältnis von 80 zu 20 %. Eine enzymvermittelte Umwandlung von (*R*)- zu (*S*)-Methadon ist zwar denkbar, aber in dieser Höhe eher unwahrscheinlich. Darüber hinaus wurde ein solches Phänomen in der Literatur bis jetzt noch nicht beschrieben. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass zumindest diese Patientin zusätzlich illegal erworbenes *rac*-Methadon eingenommen hat. Bei den übrigen Probanden konnte solch ein Methadon-Beikonsum nicht nachgewiesen werden. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass sich unter diesen Patienten ebenfalls Personen finden, die zusätzliches Methadon aus anderen Quellen beziehen und einnehmen, was in Folge dessen zu einer Verfälschung der hier erhaltenen Resultate führen würde.

Bei 49 der 96 Methadonpatienten konnte ferner ein Beikonsum von anderen Medikamenten nachgewiesen werden. Bei dieser Untersuchung zeigte sich, dass diese Probanden zwischen ein und sechs weitere Präparate eingenommen haben. Unter diesen Substanzen fanden sich auch Wirkstoffe wie Carbamazepin und das *CYP2D6* Substrat Risperidon [Huang *et al.*, 1993], die *CYP3A4* induzieren, wodurch die Plasmakonzentration von Methadon sinkt [Preston *et al.*, 1984; Ferrari *et al.*, 2004], bzw. Diazepam, ein *CYP3A4* Substrat [Yasumori

et al., 1993], das die Konzentration von Methadon im Blut erhöht. Darüber hinaus konnten ebenfalls Substanzen, wie zum Beispiel Tramadol [Dayer *et al.*, 1997], Amitriptylin [Baumann *et al.*, 1986; Mellström *et al.*, 1986] und Clomipramin [Bertilsson *et al.*, 1997], die von CYP2D6 metabolisiert werden bzw. Stoffe wie Citalopram [Preskorn, 1997] und Doxepin [Szewczuk-Bogusławska *et al.*, 2004], Inhibitoren für das CYP2D6 Enzym nachgewiesen werden. Ferner erhielt Patientin #85 aufgrund einer HIV Infektion zusätzlich antivirale Medikamente. Ihr wurde im Rahmen des Substitutionsprogramms mit Abstand die höchste Dosis von 400 mg *rac*-Methadon verabreicht. Die Interaktion zwischen einigen antiretroviralen Medikamenten und Methadon sind klinisch sehr bedeutsam [Gourevitch, 2001; Rainey, 2002; Ferrari *et al.*, 2004]. So muss bei Verabreichung einiger NRTI (nucleoside reverse transcriptase inhibitors – nukleosidaler Reverse-Transkriptase-Hemmer) und NNRTIs (non nucleoside reverse transcriptase inhibitor - nicht-nukleosidale Reverse-Transkriptase-Hemmer) die Menge an Methadon erhöht werden, um eine adäquate Dosis zur Heroinsubstitution zu erhalten und Entzugserscheinungen zu vermeiden [Altice *et al.*, 1999; Gourevitch und Friedland, 2000]. Der Grund für den Einfluss auf den Metabolismus von Methadon ist oftmals eine vermehrte Induktion des Cytochrom P450 Enzyms CYP3A4. Die erhöhte Menge und daraus resultierende höhere Aktivität von CYP3A4 reduziert die Bioverfügbarkeit von Methadon und Entzugserscheinungen sind die Folge [Havilir *et al.*, 1995; Riska *et al.*, 1999; Akerele *et al.*, 2002; Ferrari *et al.*, 2004]. Da nicht bei allen Patienten weitere Präparate nachgewiesen werden konnten, die einzelnen Probanden oftmals unterschiedliche Präparate erhielten, die Anzahl der eingenommenen Medikamente bei den verschiedenen Personen variierte und möglicherweise noch weitere hier nicht untersuchte Substanzen eingenommen wurden, konnte dieser Beikonsum und der daraus resultierende Einfluss auf die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse statistisch nicht gewertet werden. In den Arbeiten von Eap *et al.* (2001) und Coller *et al.* (2007) wo Unterschiede der mittleren Dosis, sowie signifikante Abweichungen der Plasmakonzentration von Methadon zwischen UMs und PMs aufgezeigt werden konnten, wurde auf einen möglichen Beikonsum von zusätzlichen Medikamenten bzw. illegal erworbenem Methadon der Methadonpatienten nicht eingegangen. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass auch dieser Faktor zu den im Vergleich zur Literatur abweichenden Ergebnissen beitragen könnte.

Weitere Punkte, die möglicherweise einen Einfluss auf die in dieser Arbeit erhaltenen Resultate haben, sind Alkoholmissbrauch und Lebererkrankungen. Nach Angaben des behandelnden Arztes haben fünf Probanden der 96 Methadonpatienten ein Alkoholproblem und eine der hier untersuchten Personen leidet unter einer Leberzirrhose. Bei einem chronischen Missbrauch von Alkohol in Verbindung mit einer MMT besteht die Annahme, dass der Anteil an

bioverfügbarem Methadon durch eine erhöhte Induktion von CYP3A4 im Blutplasma sinkt. Dies hätte zur Folge, dass die Dosis an Methadon zur Vermeidung von Entzugerscheinungen erhöht werden müsste [Kreek, 1981]. Vier der Patienten mit einem Alkoholproblem bekamen tatsächlich im Vergleich mit dem Gesamtkollektiv eine etwas höhere Dosis an Gesamt- bzw. (*R*)-Methadon. Dem fünften dieser Probanden wurde jedoch eine äußerst geringe Dosis verabreicht. Allerdings lässt sich mit der geringen Anzahl von nur fünf Patienten keine fundierte Aussage über den Einfluss von Alkoholmissbrauch auf Dosis und Spiegel von Methadon treffen. Der Patient mit Leberzirrhose wies bezüglich der erhaltenen Dosis sowie des gemessenen Spiegels an (*R*)-Methadon höhere Werte als die, für das Gesamtkollektiv jeweils ermittelten Mediane auf. Der Vergleich von Dosis und Spiegel über den Quotienten aus Dosis und Spiegel zeigte jedoch einen eher niedrigen Wert, was möglicherweise auf einen verminderten Metabolismus schließen lässt. Bei einigen Personen mit Lebererkrankungen konnte bereits eine abnormale Kinetik beobachtet werden und es wird angenommen, dass dies auf eine funktionelle Insuffizienz des hepatischen mikrosomalen Systems zurückzuführen ist [Kreek, 1973; Ferrari *et al.*, 2004]. Dennoch ist die Rolle von chronischen Lebererkrankungen bis jetzt noch nicht klar definiert. Darüber hinaus ist mit nur einem Probanden die Stichprobenzahl in dieser Arbeit ebenfalls zu gering, um einen Einfluss von Leberschäden auf eine MMT zu beurteilen.

6.5 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnte ebenfalls eine sehr große Variabilität im Hinblick auf die Dosierung von Methadon, dessen Blutplasmaspiegel sowie dem Verhältnis zwischen beidem veranschaulicht werden [Wolff *et al.*, 1991; Wolff *et al.*, 1997]. Somit konnte auch hier gezeigt werden, dass die verabreichte Menge an Methadon keine Rückschlüsse auf die Konzentration dieses Präparats im Blut zulässt und dass sich die einzelnen Probanden bezüglich der Bioverfügbarkeit von Methadon teilweise stark voneinander unterscheiden. Diese interindividuellen Variationen der Pharmakokinetik von Methadon machen eine Aussage über den Zusammenhang von Dosis, Blutkonzentration sowie den klinischen Effekt schwer möglich. Darüber hinaus konnte weiterhin gezeigt werden, dass das Geschlecht, das Gewicht und die Größe der einzelnen Patienten, keinen oder nur sehr geringen Einfluss auf die verabreichte Menge an Methadon haben und somit die große Variationsbreite der Dosierung von Methadon nicht erklären können.

Die Auswertung der hier erhaltenen Ergebnisse gestaltete sich darüber hinaus als schwierig, da der Beikonsum von weiteren Medikamenten bzw. von zusätzlichem illegal erworbenen Methadon, chronischer Alkoholkonsum und Lebererkrankungen ebenfalls einen gewissen Einfluss auf die Resultate haben und eine exakte Aussage nicht ermöglichen. Ferner konnten mit den hier entwickelten bzw. verwendeten Methoden zur Genotypisierung von *CYP2D6* nicht alle Allele, die einen Einfluss auf die Enzymaktivität haben, bestimmt werden, wodurch einige Probanden möglicherweise nicht in die korrekte Phänotypgruppe eingeordnet wurden. In der vorliegenden Arbeit konnte dennoch, auch unter Berücksichtigung der oben genannten Punkte keine Auswirkung des hier ermittelten *CYP2D6* Genotyps und dem daraus resultierenden wahrscheinlichen Phänotyp bezüglich der *CYP2D6* Aktivität auf die Dosierung von Methadon, dessen Blutplasmaspiegel sowie dem Verhältnis aus beidem festgestellt werden. Dies lässt darauf schließen, dass *CYP2D6* eine eher untergeordnete Rolle beim Metabolismus von Methadon spielt und dass eine veränderte Aktivität, vor allem der Verlust dieser (PM Phänotyp) durch die sechs weiteren Cytochrom P450 Enzyme *CYP1A2* [Eap *et al.*, 1997], *CYP2B6* [Gerber *et al.*, 2004], *CYP2C8* [Wang und DeVane, 2003], *CYP2C9* [Foster *et al.*, 1999], *CYP2C19* [Foster *et al.*, 1999] und *CYP3A4* [Iribarne *et al.*, 1996; Foster *et al.*, 1999], die in der Lage sind Methadon zu metabolisieren, kompensiert wird. Somit können Unterschiede in der Enzymaktivität von *CYP2D6* die hohe Variabilität der Pharmakokinetik von Methadon nicht erklären.

Bei den Enzymen *CYP1A2*, *CYP3A4*, *CYP2C9* und *CYP2C19* konnten bereits ebenso erhebliche interindividuelle Schwankungen im Bezug auf ihrer Aktivität, die bei *CYP2C9* und *CYP2C19* zumindest teilweise genetisch determiniert sind, festgestellt werden [Ingelman-Sundberg *et al.*, 1999; Schweikl *et al.*, 1993]. Im Gen für *CYP3A4* wurden ebenfalls einzelne Polymorphismen entdeckt, die die Enzymaktivität beeinflussen. Dennoch können diese Mutationen die starken Schwankungen bezüglich der Aktivität nicht erklären [Ketter *et al.*, 1995]. Es wird angenommen, dass die Variabilität der Enzymaktivität von *CYP3A4* durch eine unterschiedliche Transkriptionsrate [Garrido und Troconiz, 1999; Watanabe *et al.*, 2004], bzw. über eine veränderte Aktivierung der entsprechenden Gene durch die spezifischen Transkriptionsrezeptoren, wie zum Beispiel PXR (pregnane X receptor) und CAR (constitutive androstane receptor) bedingt wird [Honkakoski *et al.*, 1998; Bertilsson *et al.*, 1998; Lehmann *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2001]. PXR ist ein Hauptregulator der Transkription vieler Gene, einschließlich *CYP3A4*, die in die Detoxifikation von Xenobiotika involviert sind [Goodwin *et al.*, 2002] und mittlerweile wurden auch bereits verschiedene Polymorphismen im Gen für

PXR entdeckt, die dessen Aktivität und somit die Induktion der verschiedenen Enzyme beeinflussen [Hustert *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001; Koyano *et al.*, 2004].

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich auf die Genetik im Zusammenhang mit dem Metabolismus von Methadon eingegangen. Der Metabolismus und genetische Variationen der daran beteiligten Enzyme bestimmen jedoch nicht alleine die Pharmakokinetik bzw. die Bioverfügbarkeit eines Medikaments. Die Verteilung von Methadon im Körper spielt beispielsweise ebenfalls eine gewisse Rolle bei der großen Variabilität bezüglich der Kinetik und sollte somit nicht außer Acht gelassen werden.

So diffundiert zum Beispiel aufgrund dessen Fettlöslichkeit ein Teil von Methadon in das Fettgewebe im Körper, wodurch der Spiegel an freiem Methadon im Blut verringert wird. Personen mit einem höheren Körperfettanteil sollten demnach einen niedrigeren Methadonspiegel im Blut aufweisen als Personen mit einem geringeren Anteil an Fettgewebe. Bei den hier untersuchten Patienten waren ausschließlich die Körpergröße und das Gewicht bekannt, womit der Body-Mass-Index (BMI) berechnet werden kann. Jedoch berücksichtigt der BMI nicht die individuelle Zusammensetzung des Körpergewichts aus Fett- und Muskelgewebe. Für eine exakte Bestimmung der Korrelation zwischen Fettanteil und Blutplasmaspiegel von Methadon sollte demnach der Körperfettanteil der Personen bestimmt und anstelle des BMI in die Berechnung einbezogen werden, um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Einlagerung von Methadon im Fettgewebe und der interindividuellen Variabilität der Bioverfügbarkeit dieses Präparats zu veranschaulichen. Da jedoch der Körperfettanteil der in dieser Arbeit untersuchten Personen nicht bekannt war wurde auf eine Einbeziehung dieses Faktors in die hier erhaltenen Ergebnisse verzichtet. Dennoch kann zumindest annähernd eine Aussage dahingehend getroffen werden, dass Frauen, aufgrund ihres durchschnittlich höheren Körperfettanteils einen etwas geringeren Methadonspiegel als die männlichen Probanden aufweisen sollten. In der vorliegenden Arbeit konnte aber weder bei der verabreichten Dosis noch bei dem gemessenen Methadonspiegel ein signifikanter Unterschied zwischen den männlichen und weiblichen Patienten festgestellt werden, was darauf schließen lässt, dass die Diffusion von Methadon in das Fettgewebe nur einen geringen Einfluss auf die hohe Variabilität der Pharmakokinetik von Methadon hat.

Bezüglich der Variabilität der Bioverfügbarkeit von Methadon sollte ebenso die renale Ausscheidung dieses Präparats, die auch Unterschiede aufweisen kann nicht außer Acht gelassen werden [Anggård *et al.*, 1975; Meresaar *et al.*, 1981]. Die Ausscheidung von nicht modifizier-

tem Methadon ist augenscheinlich abhängig vom pH-Wert im Urin. Kommt es zu einer Azidifikation und der pH-Wert im Urin sinkt unter sechs erhöht sich die Ausscheidung von Methadon um das 3 bis 8fache und die Ausscheidung von EDDP (2-Ethyliden-1,5-Dimethyl-3,3-Diphenylpyrrolidin), dem hauptsächlichen Metabolit von Methadon [Sullivan und Due, 1973; Anggård *et al.*, 1975; Kreek *et al.*, 1980; Kreek *et al.*, 1983; Garrido und Troconiz, 1999], sinkt. Bei einem hohen pH-Wert dagegen wird die Ausscheidung von nicht modifiziertem Methadon auf ein Minimum reduziert [Baselt und Casarett, 1972; Bellward *et al.*, 1977; Nilsson *et al.*, 1982(1); Nilsson *et al.*, 1982(3)]. Auch dieser Einfluss auf die Variabilität der Pharmakokinetik konnte in der vorliegenden Arbeit, aufgrund der mangelnden Information über den pH-Wert im Urin der einzelnen, hier untersuchten Patienten nicht berücksichtigt werden.

Weitere Aspekte, die einen Einfluss auf die Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit von Methadon haben, sind zum einen die Rückresorption dieser Verbindung in das Darmlumen und zum anderen die Bindung an Plasmaproteine.

So zählt Methadon zum Beispiel zu den Substraten für das Permeabilitätsglykoprotein P-Gp, einen Efflux-Transporter, der für die Rückresorption vieler Medikamente in das Darmlumen verantwortlich ist [Bouër *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2004]. Es wird vermutet, dass die Absorption von Methadon zumindest einen Teil der Variabilität in der Pharmakokinetik von Methadon erklären könnte [Crettol *et al.*, 2006]. In diesem Zusammenhang wurden auch bereits mehrere Polymorphismen im Gen für P-Gp (*ABCB1* Gen) beschrieben, die möglicherweise einen Einfluss auf die Aktivität dieses Transporters haben [Hoffmeyer *et al.*, 2000; Marzolini *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2005; Ishikawa *et al.*, 2004]. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass das *ABCB1* Gen über PXR transkriptionell aktiviert wird [Goodwin *et al.*, 2002], was auch zu einer interindividuellen Variabilität bezüglich der Aktivität dieses Efflux-Transporters und somit zu einer unterschiedlichen Bioverfügbarkeit von Methadon bei den verschiedenen Patienten führen könnte.

Darüber hinaus bindet Methadon zu einem großen Teil (60-90 %) an verschiedenen Plasmaproteine, wie Albumin, Lipoproteinen und vor allem an das azide α_1 saure Glykoprotein (α_1 -AGP) [Olsen, 1972; Romach *et al.*, 1981; Eap *et al.*, 1990; Garrido *et al.*, 2000]. Die ausgehende Bindung an Proteine ist offensichtlich entscheidend für die Aktivität von Methadon. Die Konzentration und der Phänotyp von α_1 -AGP können zwischen Individuen variieren. Darüber hinaus ändert sich die Menge der Varianten innerhalb eines Individuums, abhängig vom Krankheitsstatus, umweltbedingte Veränderungen oder bei Schwangerschaft [Eap *et al.*, 1990; Kremer *et al.*, 1988]. So erhöht sich zum Beispiel die Konzentration von α_1 -AGP durch

Stress oder Heroinkonsum, wodurch mehr Methadon gebunden wird und die Konzentration an freiem Methadon im Blut sinkt [Ferrari *et al.*, 2004; Garrido *et al.*, 1996].

Neben den interindividuellen Variationen in der Pharmakokinetik von Methadon, sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass der Blutplasmaspiegel auch täglichen Schwankungen unterliegt. So steigt ca. 15 bis 30 Minuten nach Verabreichung der Tagesdosis die Plasmakonzentration von Methadon nachweislich an und fällt dann im Laufe der Zeit wieder ab [Wolff *et al.*, 1993]. Diesbezüglich, kann der Methadonspiegel, je nach Zeitpunkt der Blutentnahme in Bezug auf die Verabreichung der Dosis variieren. Für einen Vergleich von verschiedenen Patienten zur Untersuchung der interindividuellen Schwankungen sollte dementsprechend die zeitliche Differenz zwischen Entnahmen der Blutprobe und Dosisverabreichung bei allen Patienten gleich sein. In der vorliegenden Arbeit wurde bei allen Patienten die Blutprobe bei Verabreichung der Tagesdosis entnommen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass alle Patienten unter den gleichen Voraussetzungen untersucht wurden.

Auf die hohe interindividuelle Variabilität in Bezug auf die benötigte Dosis von Methadon hat jedoch nicht nur die Pharmakokinetik einen gewissen Einfluss. In diesem Zusammenhang muss auch die Pharmakodynamik erwähnt werden. Die Einnahme von Opiaten über einen längeren Zeitraum, sowie höhere Opiatdosen konnten bereits mit einer erhöhten Toleranz gegenüber diesen Präparaten bezüglich der Rezeptoraffinität in Verbindung gebracht werden [Stevens und Yaksh, 1989(1); Stevens und Yaksh, 1989(2); Stevens und Yaksh, 1992]. So stellt sich die Frage, in wie weit die Dauer des vorangegangenen Heroinkonsums, die in diesem Zusammenhang eingenommenen Dosis, die Applikationsform, sowie die Reinheit des konsumierten Heroins einen Einfluss auf die im Rahmen einer MMT verabreichte Dosis an Methadon haben. Bei Trafton *et al.* (2006) konnte zwar festgestellt werden, dass die pro Tag eingenommene Menge an Heroin keinen effektiven Schluss auf die benötigte Methadonmenge zulässt und dass auch eine geringere Reinheit des Heroins nicht bedeutet, dass diese Personen auch eine geringere Dosis an Methadon zur Substitution benötigen, dennoch sollte dieser Aspekt der Pharmakodynamik nicht außer Acht gelassen werden. Da bei den hier untersuchten Methadonpatienten jegliche Information über den vorangegangenen Heroinkonsum fehlte, konnte ein möglicher Einfluss diesbezüglich bei den, hier erhaltenen Ergebnissen nicht berücksichtigt werden.

Beobachtungen zu Folge sinkt auch die Methadonkonzentration im Blut nach einer gewissen Zeit der MMT [Anggård *et al.*, 1975; Verebely *et al.*, 1975] und die Dosis an Methadon muss

erhöht werden, um Entzugserscheinungen zu verhindern. Es wird angenommen, dass die Induktion des eigenen Metabolismus von Methadon zumindest teilweise für die Verringerung des Methadonspiegels verantwortlich ist [Horns *et al.*, 1975; Holmstrand *et al.*, 1978; Nilsson *et al.*, 1982(2)] und eine Stabilisierung des Spiegels erst innerhalb von 14 Tagen von statten geht [Adelson *et al.*, 2007]. Bei den hier untersuchten Methadonpatienten fehlte ebenfalls die Information über die Dauer der Therapie. Man kann folglich nicht mit Sicherheit sagen, dass alle hier untersuchten Probanden bereits ihre, auf ihre Bedürfnisse abgestimmte Dosis erhielten bzw. einen bereits stabilisierten Methadonspiegel im Blut aufwiesen.

6.6 Ausblick

Ein grundsätzliches Problem in der Pharmakogenetik besteht darin, dass oftmals die Untersuchung eines einzelnen Faktors bzw. eines Proteins oder Enzyms, das möglicherweise einen Einfluss auf den Wirkstoff von Interesse hat, keinen ausreichenden Hinweis auf die Verträglichkeit bzw. Wirkungsweise eines speziellen Medikaments liefert. Um tatsächlich über die Erstellung eines Genprofils genaue Aussagen über die Wirkung eines Präparats zu treffen, wäre es nötig, dass alle Proteine und Enzyme, die mit dem Medikament im Körper interagieren, bekannt und auf genetischer Ebene ausreichend untersucht sind. Nur so könnte man feststellen, ob ein oder sogar mehrere der beteiligten Gene (polygener Effekt) Variationen aufweisen und somit für die andersartige Reaktion auf das verabreichte Medikament verantwortlich sind. Darüber hinaus dürfen aber bei solchen Untersuchungen andere Faktoren, die die Pharmakinetik bzw. -dynamik beeinflussen, sowie umweltbedingte Einflüsse, wie Ernährung, Krankheiten und Beikonsum von anderen Medikamenten ebenfalls nicht außer Acht gelassen werden. Im Falle von Methadon wird dieses Problem sehr gut veranschaulicht. Jeder der oben genannten Faktoren für sich scheint bei näherer Betrachtung keinen großen Beitrag zu der hohen Variabilität der Pharmakokinetik von Methadon zu leisten. Jedoch könnte möglicherweise ein Gesamtbild, d.h. die Untersuchung aller Faktoren Aufschluss über die Variabilität der Bioverfügbarkeit und Kinetik von Methadon bei einzelnen Individuen geben. Dies würde zum einen bedeuten, ein Genprofil aller beteiligten Proteine und Enzyme, wie CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, PXR, CAR, P-Gp und α_1 -AGP zu erstellen, die Transkriptionsrate der zugrunde liegenden Gene zu ermitteln und diese so erhaltenen Ergebnisse miteinander zu korrelieren und deren Auswirkung auf die Pharmakokinetik zu untersuchen.

chen. Zum anderen sollten möglichst viele Informationen über die einzelnen Patienten, wie Verlauf des vorangegangenen Heroinkonsums, Körpermaße wie Gewicht, Größe und Körperfettanteil, Beikonsum von anderen Substanzen, Ernährung und etwaige Krankheiten gesammelt werden, um auch hier den Einfluss auf die Medikation mit Methadon festzustellen.

Somit sind auf jeden Fall noch weitere und ausgedehntere Studien von Nöten, um die extreme Variabilität der Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik von Methadon zu klären. Bis dahin ist die Phänotypisierung, d.h. das Einstellen der individuellen Dosierung von Methadon bei den einzelnen Patienten über einen längeren Zeitraum unumgänglich.

7 Anhang

7.1 Sequenzen

7.1.1 1707 Tdel in Exon 3 (*CYP2D6**6)

```

1549 -----GTGGATGGTGGG
1561 GCTAATGCCTT CATGGCCACGCGCACGTGCCCGTCCCACCCCAGGGGTGTTCTTGCGGC
1621 GCTATGGGCCCGCGTGGCGCGAGCAGAGGCGCTTCTCCGTGTCCACCTTGCGCAACTTGG
1681 GCCTGGGCAAGAAGTCGCTGGA GCAGTGGG TGACCGAGGAGGCCGCTGCCTTTGTGCCG
1741 CCTTCGCCAACCCTCCGGTGGG TGATGGGCAGAAGGGCACAAAGC -----

```

1707Tdelf: 6-FAM-5' -GTGGATGGTGGGGCTAATGCCTT-3' [Wang *et al.*, 1999]

1707Tdelr: 5' -GCTTTGTGCCCTTCTGCCCATCA-3'

Abb. 29: Sequenzabschnitt 1549 bis 1786 des *CYP2D6* Gens, amplifiziert mit den für die Multiplex-PCR etablierten Oligonukleotid-Primern 1707Tdelf [Wang *et al.*, 1999] und 1707Tdelr (grau unterlegt). Die Primer wurden so gewählt, dass der für das Allel *CYP2D6**6 charakteristische Polymorphismus, eine Deletion des Thymins an Position 1707 (rot unterlegt) innerhalb der zu amplifizierenden Sequenz liegt. Das so erhaltene Amplifikat umfasst das gesamte Exon 3 (blau) sowie Teile von Intron 2 und Intron 3 (schwarz). Darüber hinaus ist eine Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym *BtsI* (orange) markiert, die für den Nachweis der 1707 Tdel über Restriktionsverdau verwendet wurde.

7.1.2 1846G→A zwischen Intron 3 und Exon 4 (*CYP2D6**4)**Abb.:30a**

1824 -----TTACCCGCATCTCCCACCCCCAGGACGCCCCCTTTTCGC

1861 CCCAACGGTCTCTTGGACAAAGCCGTGAGCAACGTGATCGCCTCCCTCACCTGCGGGCGC

1921 CGCTTCGAGTACGACGACCCTCGCTTCCTCAGGCTGCTGGACCTAGCTCAGGAGGGACTG

1981 AAGGAGGAGTCGGGCTTTCTGCGCGAGGTGCGGAGCGAGAGACCGAGGAGTCTCTG-----

1846Gf: 6-FAM-5' -TTACCCGCATCTCCCACCCCCAG-3'

1846Af: HEX-5' -TTACCCGCATCTCCCACCCCCAA-3'

1846GAr: 5' -CAGAGACTCCTCGGTCTCTCGCT-3' [Wang *et al.*, 1999]

Abb.:30b

1549 -----GTGGATGGTGGG

1561 GCTAATGCCTTCATGGCCACGCGCACGTGCCCGTCCCACCCCCAGGGGTGTTCTTGCGC

1621 GCTATGGGCCCGCGTGGCGGAGCAGAGGCGCTTCTCCGTGTCCACCTTGCGCAACTTGG

1681 GCCTGGGCAAGAAGTCGCTGGAGCAGTGGGTGACCGAGGAGGCCGCTGCCTTTGTGCCG

1741 CCTTCGCCAACCCTCCGTTGGGTGATGGGCAGAAGGGCACAAAGCGGGAAGTGGGAAGG

1801 CGGGGGACGGGAAGGCGACCCCTTACCCGCATCTCCCACCCCGAGGACGCCCCCTTTTCGC

1861 CCCAACGGTCTCTTGGACAAAGCCGTGAGCAACGTGATCGCCTCCCTCACCTGCGGGCGC

1921 CGCTTCGAGTACGACGACCCTCGCTTCCTCAGGCTGCTGGACCTAGCTCAGGAGGGACTG

1981 AAGGAGGAGTCGGGCTTTCTGCGCGAGGTGCGGAGCGAGAGACCGAGGAGTCTCTG-----

1707Tdelf: 6-FAM-5' -GTGGATGGTGGGGCTAATGCCTT-3'

1846GAr: 5' -CAGAGACTCCTCGGTCTCTCGCT-3' [Wang *et al.*, 1999]

Abb. 30a: Sequenzabschnitt 1824 bis 2036 des *CYP2D6* Gens, amplifiziert mit den für die Multiplex-PCR etablierten Oligonukleotid-Primern 1846Gf bzw. 1846Af und 1846GAr [Wang *et al.*, 1999] (grau unterlegt). Die Primer für diese Allelspezifische PCR wurden so gewählt, dass jeweils die letzte Base am 3'-Ende der beiden Vorwärtsprimer an die Wildtyp- bzw. mutierte Sequenz des für das Allel *CYP2D6**4 charakteristischen Polymorphismus, der Basenaustausch eines Guanins durch ein Adenin an Position 1846 (rot unterlegt) binden. Die so erhaltene Amplifikate umfassen das gesamte Exon 4 (blau) sowie Teile von Intron 3 und Intron 4 (schwarz).

Abb. 30b: Sequenzabschnitt 1549 bis 2036 des *CYP2D6* Gens, amplifiziert mit den Oligonukleotid-Primern 1707Tdelf und 1846GAr (grau unterlegt) zum Nachweis der 1846G→A Mutation über Restriktionsverdau mit *Bst*NI. Die Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym *Bst*NI ist orange markiert.

7.1.3 2549 Adel in Exon 5 (*CYP2D6**3)

2516 -----TGAC
 2521 CCAGCTGGATGAGCTGCTAACTGAGCACAGGATGACCTGGGACCCAGCCCAGCCCCCCCG
 2581 AGACCTGACTGAGGCCTTCCTGGCAGAGATGGAGAAGGTGAGAGTGGCTGCCACGGTGGG
 2641 GGGCAAGGGTGGTGGGTTGAGCGTCCCAGGAGGAATGAGGGGAGGCTGGGCAAAGGTTG
 2701 GACCAGTGCATCACCCGGCGAGCCGCATCTGGGCTGACAGGTGCAGAATTGGAGGTCATT
 2761 TGGGGGCTACCCCGTTCTGTCCCGAGTATG-----

2549Adel_f: HEX-5' -TGACCCAGCTGGATGAGCTGCT-3'

2549Adel_r: 5' -CATACTCGGGACAGAACGGGGT-3'

Abb. 31: Sequenzabschnitt 2516 bis 2790 des *CYP2D6* Gens, amplifiziert mit den für die Multiplex-PCR etablierten Oligonukleotid-Primern 2549Adel_f und 2549Adel_r (grau unterlegt). Die Primer wurden so gewählt, dass der für das Allel *CYP2D6**3 charakteristische Polymorphismus, eine Deletion des Adenins an Position 2549 (rot unterlegt) innerhalb der zu amplifizierenden Sequenz liegt. Darüber hinaus liegt innerhalb dieses Sequenzabschnitts ebenfalls die für das Allel *CYP2D6**9 charakteristische 3bp-Deletion 2613-2615delAGA. Das mit den oben genannten Oligonukleotid-Primern erhaltene Amplifikat umfasst einen Teil des Exon 5 (blau) sowie einen Teil von Intron 6 (schwarz).

7.1.4 -1584C→G im regulatorischen Bereich von *CYP2D6*

Abb.:32a

```

-1889 -----GCAGCTGCCATACAATCCACCTGTAGAGGGC
-1800 CCGGTCCTCCTGTCCTCAGTGGATGATCCCGTAGAAGTCCAGAGCTCGGCAGCTGCCCTC
-1740 CCACAAAAGACAGGATTTTCAAAGCAGCAAGAGAGAAGAGACGTATCAGGTAGTCACAGT
-1680 GGCTCAGGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCAGGTGGGAGGATCGCTTCACCCCA
-1620 GGAATTCAAGACCAGCCTGGACAACCTTGAAGAACCCGGTCTCTACAAAAAATACAAAAT
-1560 TAGCTGG-----

-1584Cr: 6-FAM-5' -CCAGCTAATTTTGTATTTTTTTGTAGAGACCG-3'
-1584Gr: ROX-5' -CCAGCTAATTTTGTATTTTTTTGTAGAGACCC-3'
-1584CGf: 5' -GCAGCTGCCATACAATCCACCTG-3' [Gaedigk et al., 2003(1)]

```

Abb.:32b

```

-1889 -----GCAGCTGCCATACAATCCACCTGTAGAGGGC
-1800 CCGGTCCTCCTGTCCTCAGTGGATGATCCCGTAGAAGTCCAGAGCTCGGCAGCTGCCCTC
-1740 CCACAAAAGACAGGATTTTCAAAGCAGCAAGAGAGAAGAGACGTATCAGGTAGTCACAGT
-1680 GGCTCAGGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCAGGTGGGAGGATCGCTTCACCCCA
-1620 GGAATTCAAGACCAGCCTGGACAACCTTGAAGAACCCGGTCTCTACAAAAAATACAAAAT
-1560 TAGCTGGGATTGGGTGCGGTGGCTCATGCCTATAATCCCAGCACTTTGGGAGCCTGAGGT
-1500 GGGTGGATCACCTGAAGTCAGGAGTTCAAGACTAGCCTGGCCAACATGGTGAAACCCTAT
-1440 CTCTACTGAAAATACAAAAAGCTAGACGTGGTGGCACACACCTGTAATCCCAGCTACTTA
-1380 GGAGGCTGAGGCAGGAGAATTGCTTGAAGCCTAGAGGTGAAGGTTGTAGTGAGCCGAGAT
-1320 TGCATCATTGCACAATGGAGGGGAGCCAC-----

-1584CGf: 5' -GCAGCTGCCATACAATCCACCTG-3' [Gaedigk et al., 2003(1)]
-1584CGr: 5' -GTGGCTCCCCTCCATTGTGCAAT-3' [Gaedigk et al., 2003(1)]

```

Abb. 32a: Sequenzabschnitt -1889 bis -1853 im regulatorischen Bereich des *CYP2D6* Gens, amplifiziert mit den für die Multiplex-PCR etablierten Oligonukleotid-Primern -1584CGf [Gaedigk *et al.*, 2003(1)] und -1584Cr bzw. -1584Gr (grau unterlegt). Die Primer für diese Allelspezifische PCR wurden so gewählt, dass jeweils die letzte Base am 3'-Ende der beiden Rückwärtsprimer an die Wildtyp- bzw. mutierte Sequenz des Polymorphismus im regulatorischen Bereichs, den Basenaustausch eines Cytosins durch ein Guanins an Position -1584 (rot unterlegt) binden.

Abb. 32b: Sequenzabschnitt -1889 bis -1291 im regulatorischen Bereich des *CYP2D6* Gens, amplifiziert mit den Oligonukleotid-Primern -1584CGf und -1584CGr (grau unterlegt) zum Nachweis der -1584C→G Mutation über Sequenzierung

7.1.5 5'- und 3'-Bereich des *CYP2D6* Gens

Abb.:33a

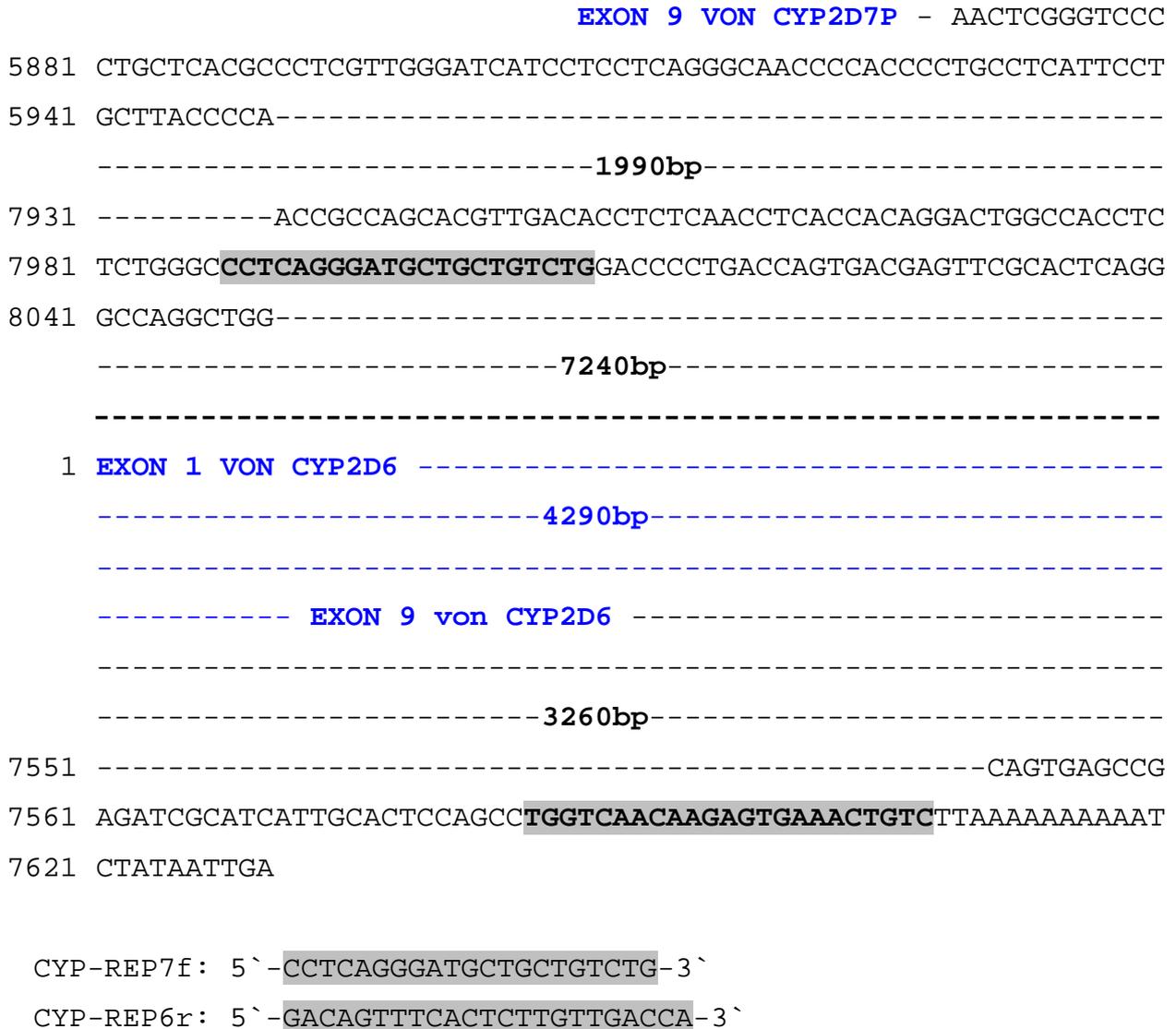


Abb. 33a: Sequenzabschnitte im 5'- und 3'-Bereich des *CYP2D6* Gens; gezeigt sind die Bindungsstellen der Oligonukleotid-Primer CYP-REP7f und CYP-REP6r (grau unterlegt) zum Nachweis der Deletion des *CYP2D6* Gens; Der CYP-REP7f Primer bindet im 3'-Bereich von *CYP2D7P* (am Anfang des 2,8 kb-Fragments von *CYP-REP7*), der Primer CYP-REP6r im 3'-Bereich von *CYP2D7P* (am Ende des 2,8 kb-Fragments von *CYP-REP6*). Bei einem Wildtyp-Genotyp wird das 2,8 kb-Fragment von *CYP-REP7*, *CYP2D6* (blau) und *CYP-REP6* amplifiziert und ein Fragment von ca. 15 kb wird gebildet. Nach einer Deletion des *CYP2D6* Gens entsteht die so genannte *CYP-REP-DEL*-Einheit und es wird nur noch ein Fragment von ca. 2,7 kb-Fragment amplifiziert (schematische Darstellung siehe

Abb.:33b

EXON 9 VON CYP2D7P – AACTCGGGTCCC

5881 CTGCTCACGCCCTCGTTGGGATCATCCTCCTCAGGGCAACCCACCCCTGCCTCATTCT

5941 GCTTACCCACCGCCTGGCCGCATTTGAGACGGGTACGTTGAGGCTGAGCAGATGTCAGT

6001 TACCCTTGCCCATAATCCAGTG**TCCCCCACTGACCCA**ACTCTGACTGCCAGATTGGTGA

6061 CAAGGACTACATTGTCTGG-----

-----**4630bp**-----

10711 -----AGATCACACCATTGCACTCCAGT**CTGGGGTG**

10741 **ATAAGTATGAAACGCC**ATCTCCAAAACAAAAGAAAAGCCTAATTCCCCAAGA**ACTGTCAG**

10801 TCTTTCACCT-----

-----**4480bp**-----

1 **EXON 1 VON CYP2D6** -----

-----**4290bp**-----

4261 -----**EXON 9 von CYP2D6** AACTCGGGTCCCCTGCTCACGCCCTCGTTG

4321 GGATCATCCTCCTCAGGGCAACCCACCCCTGCCTCATTCTGCTTACCCACCGCCTGG

4381 CCGCATTTGAGACAGGGGTACGTTGAGGCTGAGCAGATGTCAGTTACCCTTGCCCATAAT

4441 CCCATG**TCCCCCACTGACCCA**ACTCTGACTGCCAGATTGGTGACAAGGACTACATTGTC

2D6duplf: 5' - **TCCCCCACTGACCCA**ACTCT - 3' [Løvlie *et al.*, 1996]

2D6duplr: 5' - **GGCGTTTCATACTTATCACCCAG** - 3'

Abb. 33b: Sequenzabschnitte im 5'- und 3'-Bereich des *CYP2D6* Gens; gezeigt sind die Bindungsstellen der Oligonukleotid-Primer 2D6duplf [Løvlie *et al.*, 1996] und 2D6duplr (grau unterlegt) zum Nachweis der Duplikation des *CYP2D6* Gens; Der 2D6duplf Primer bindet jeweils im 3'-Bereich von *CYP2D7P* und *CYP2D6* (im 0,6 kb-Fragment von *CYP-REP7* und *CYP-REP6*), der Primer 2D6duplr ausschließlich im 3'-Bereich von *CYP2D7P* (am Ende des 2,8 kb-Fragments von *CYP-REP7*). Bei einem Wildtyp-Genotyp wird der größte Teil der *CYP-REP7*-Einheit amplifiziert und ein Fragment von ca. 4,7 kb wird gebildet. Nach einer Duplikation entsteht die so genannte *CYP-REP-DUP*-Einheit und ein zweites Fragment mit ca. 3,1 kb wird mit dem hier verwendeten Oligonukleotid-Primerpaar amplifiziert (schematische Darstellung siehe 5.1.3).

7.1.6 Exon 9 von *CYP2D6*

4039 -----GCCGCCGTGCATGCCTCGGGGAGCCCCTGGCCCGCATGGAGC
4081 TCTTCCTCTTCTTCACCTCCCTGCTGCAGCACTTCAGCTTCTCGGTGCCCACTGGACAGC
4141 CCGGCCAGCCACCATGGTGTCTTTGCTTTCCTGGTGA GCCCATCCCCCTATGAGCTTT
4201 GTGCTGTGCCCGCTAGAATGGGGTACCTAGTCCCAGCCTGCTCCCTAGCCAGAGGCTC
4290 TAATGTACAATAAAGCAATGTGGTAGTTCC-----

2D6ex9f3. 5' -CTTCACCTCCCTGCTGCAG-3' [Schaeffeler *et al.*, 2003]

2D6ex9r3: 5' -TCACCAGGAAAGCAAAGACA-3' [Schaeffeler *et al.*, 2003]

2D6ex9probe: 6-FAM-5' -CCGGCCAGCCACCATGG-3' -TAMRA [Schaeffeler *et al.*, 2003]

Abb. 34: Sequenzabschnitt 4039 bis 4290 des *CYP2D6* Gens: gezeigt sind die Bindungsstellen der Oligonukleotid-Primer 2D6ex9f3 und 2D6ex9r3 (grau unterlegt) sowie der TaqMan-Sonde 2D6exprobe (gelb unterlegt). Mit den hier aufgeführten Oligonukleotid-Primern werden 89 bp innerhalb von Exon 9 des *CYP2D6* Gens amplifiziert

7.2 Methadonpatienten

Patient	Geschlecht	Genotyp	Phänotyp	Präparat	Dosis in ml	Gewicht in kg	Größe in cm	Dosis (R)-Met. mg/kg	Dosis (S)-Met. mg/kg	Spiegel (R)-Met. mg/l	Spiegel (S)-Met. mg/l	Quotient Dosis / Spiegel (R)-Met.	Beikonsum
36	f	*4 / -1584G	EM	P	8,5	60	166	0.708	-	0,253	-	2,800	-
39 ³⁾	m	wt / wt	EM	M	1,4	66	173	0.106	0.106	0,126	0,289	0,839	+
40	m	wt / wt	EM	M	7	124	186	0.282	0.282	0,305	0,381	0,924	-
41	m	wt / -1584G	EM	M	4	68	180	0.294	0.294	0,075	0,079	3,947	-
42	m	*4 / -1584G	EM	M	5	63	178,5	0.397	0.397	0,071	0,053	5,626	+
43	m	wt / wt	EM	M	3	54	173	0.278	0.278	0,062	0,075	4,477	-
44	f	*4 / *4	PM	M	2,5	90	165	0.139	0.139	0,09	0,099	1,542	-
45	m	wt / -1584G	EM	P	4	52	174	0.385	-	0,109	-	3,529	+
47	m	wt / -1584G	EM	M	8	70	176	0.571	0.571	0,2	0,177	2,852	+
48	m	wt / -1584G	EM	M	10	90	176	0.556	0.556	-	0,682	-	+
50	m	*4 / -1584G	EM	M	12,5	61	167	1.025	1.025	0,317	0,254	3,233	-
51	f	wt / *4	IM/EM	M	2	68	169	0.147	0.147	0,034	0,037	4,333	-
52	m	*6 / *9	IM	M	8	100	187	0.4	0.4	0,243	0,176	1,646	+
53	f	wt / *4	IM/EM	M	3,5	55	166	0.318	0.318	0,058	0,064	5,519	-
54	f	wt / wt	EM	P	5	60	178	0.417	-	0,076	-	5,482	-
55	f	wt / wt	EM	M	4,5	60	173	0.375	0.375	0,086	0,097	4,377	+
56	m	wt / wt	EM	M	5	76	183	0.329	0.329	0,16	0,152	2,059	-
57	f	*4 / -1584G	EM	M	2	60	162	0.167	0.167	0,057	0,048	2,916	-
58	m	wt / -1584G	EM	M	13	77	177	0.844	0.844	0,213	0,193	3,963	+
59	f	wt / -1584G	EM	M	6,5	64	174	0.508	0.508	0,117	0,09	4,338	+
60	f	wt / wt	EM	M	6	97	176	0.309	0.309	0,245	0,171	1,261	-
61	m	*4 / *9	IM	M	7	106	182	0.33	0.33	0,25	0,256	1,322	+
62	m	wt / *5	IM/EM	M	3	64	174	0.234	0.234	0,083	0,085	2,816	-
63	f	*5 / -1584G	EM	M	22	62	164	1.774	1.774	0,082	0,055	21,634	-
64	f	*4 / -1584G	EM	M	4,5	63	162	0.357	0.357	0,117	0,062	3,064	+
65	m	wt / wt	EM	P	7,5	101	179	0.371	-	0,153	-	2,427	-
66	f	wt / -1584G	EM	M	4	68	173	0.294	0.294	0,22	0,109	1,334	+
67	f	-1584G / -1584G	EM	M	6,5	68	172	0.478	0.478	0,058	0,06	8,308	+
68	f	wt / -1584G	EM	M	14	65	153	1.077	1.077	0,138	0,093	7,806	+
69	m	wt / -1584G	EM	M	8,5	61	177	0.697	0.697	0,141	0,138	4,948	+
70	f	wt / -1584G	EM	P	5	65	172	0.385	-	0,122	-	3,153	+
71 ³⁾	m	wt / wt	EM	M	10	85	186	0.588	0.588	0,152	0,099	3,879	+
72 ³⁾	f	-1584G / -1584G	EM	P	6,5	80	168	0.406	-	0,239	-	1,700	-
73	f	*4 / -1584G	EM	M	1,5	47	159	0.16	0.16	0,066	0,075	2,422	-
74	m	wt / *6	IM/EM	M	12	98	180	0.612	0.612	0,157	0,112	3,891	+
75	m	wt / -1584G	EM	M	12	83	172	0.723	0.723	0,324	0,233	2,233	+
76	f	*4 / -1584G	EM	M	5	64	155	0.391	0.391	0,09	0,109	4,327	-
77	m	wt / *9	EM	M	10	76	181	0.658	0.658	0,053	0,015	12,377	-
78	f	wt / wt	EM	P	5,5	68	167	0.404	-	-	-	-	-
79	m	-1584G / -1584G	EM	M	6	83	167	0.361	0.361	0,051	0,028	7,113	-
80	f	wt / wt	EM	M	8	61	163	0.656	0.656	0,241	0,127	2,715	+
81	f	wt / *4	IM/EM	M	1,5	50	160	0.15	0.15	0,048	0,026	3,097	-
82	m	wt / wt / -1584G od. wt / -1584G / -1584G	UM	M	1	62	175	0.081	0.081	0,027	0,023	2,999	!
83	m	wt / *4	IM/EM	M	3	68,4	178,5	0.219	0.219	0,049	0,036	4,496	+
84	f	wt / *3	IM/EM	P	3	53	160	0.283	-	0,084	-	3,369	-
85 ¹⁾	f	wt / -1584G	EM	M	40	64	165	3.125	3.125	0,44	0,488	7,095	-
87	m	*3 / *4	PM	P	3	60	180	0.25	-	0,057	-	4,386	-
88	f	*4 / -1584G	EM	M	3	60	174	0.25	0.25	0,051	0,048	4,911	+
89	m	wt / *4	IM/EM	M	7	69	180	0.507	0.507	0,141	0,168	3,605	-
90	f	*4 / -1584G	EM	M	4	58	167	0.345	0.345	0,097	0,132	3,547	-
92	m	wt / -1584G	EM	M	5	64	180,5	0.391	0.391	0,184	0,239	2,123	-
93	m	wt / -1584G	EM	M	14	64	178	1.094	1.094	0,177	0,096	6,195	+
94	m	wt / *4	IM/EM	M	5	60	178	0.417	0.417	0,104	0,086	3,989	-
95	m	wt / wt	EM	P	4	52	171	0.385	-	0,077	-	4,995	+
96	f	wt / *4	IM/EM	M	0,3	54	160	0.028	0.028	-	-	-	-
97	m	wt / wt	EM	P	0,4	83	175	0.024	-	-	-	-	-
98	m	wt / wt / wt	UM	M	0,2	77	182	0.013	0.013	0,029	0,022	0,446	+
99	f	wt / wt	EM	M	7	54	168	0.648	0.648	0,1	0,089	6,478	-
100 ³⁾	m	wt / *4	IM/EM	M	6	60	164	0.5	0.5	0,055	0,073	9,044	+
101	m	wt / wt	EM	M	3	74	181	0.203	0.203	0,074	0,09	2,736	+
102	m	wt / -1584G	EM	M	3	72	176	0.208	0.208	0,038	0,033	5,537	-
103	m	wt / wt	EM	M	6	122	181	0.246	0.246	0,216	0,248	1,139	+

Patient	Geschlecht	Genotyp	Phänotyp	Präparat	Dosis in ml	Gewicht in kg	Größe in cm	Dosis (R)-Met. mg/kg	Dosis (S)-Met. mg/kg	Spiegel (R)-Met. mg/l	Spiegel (S)-Met. mg/l	Quotient Dosis / Spiegel (R)-Met.	Beikonsum
104	f	wt / wt / -1584G od. wt / -1584G / -1584G	UM	P	10,5	66	184	0,795	-	0,163	-	4,880	-
105	m	wt / *4	IM/EM	M	8	62	174	0,645	0,645	0,059	0,053	10,899	+
106	m	*4 / *6	PM	P	6	83	174	0,361	-	0,097	-	3,726	+
107	m	wt / -1584G	EM	P	2	78	175	0,128	-	-	-	-	-
108	f	wt / *6	IM/EM	M	4,5	61	169	0,369	0,369	0,046	0,041	8,069	+
109	m	wt / -1584G	EM	M	5	82	192	0,305	0,305	0,065	0,043	4,691	-
112	f	wt / *9	EM	M	5,5	44	157	0,625	0,625	0,126	0,126	4,956	+
113	f	*4 / -1584G	EM	M	7	50	164	0,7	0,7	0,279	0,209	2,509	+
114	m	wt / -1584G	EM	M	2	61	187	0,164	0,164	0,034	0,043	4,754	-
115 ²⁾	m	wt / -1584G	EM	P	9	76	178	0,592	-	0,302	-	1,961	+
116	f	-1584G / -1584G	EM	M	1,5	59	164	0,127	0,127	-	-	-	-
117	m	wt / wt	EM	M	3	85	192	0,176	0,176	0,048	0,048	3,707	-
118	f	wt / wt	EM	M	4,5	59	164	0,381	0,381	0,075	0,08	5,080	+
119	f	wt / -1584G	EM	M	9,5	52	162	0,913	0,913	0,095	0,086	9,611	+
120	m	wt / *4	IM/EM	M	5,5	93	183	0,296	0,296	0,14	0,09	2,113	+
123	m	wt / wt	EM	M	4	70	185	0,286	0,286	0,03	0,032	9,669	+
125	m	wt / -1584G	EM	M	6,5	86	172	0,378	0,378	0,278	0,224	1,359	-
128 ³⁾	m	wt / *4	IM/EM	M	9	64	169	0,703	0,703	0,044	0,032	15,899	-
132	f	wt / wt	EM	M	8	85	181	0,471	0,471	0,112	0,093	4,215	+
137	m	wt / *5	IM/EM	M	4,5	74	174	0,304	0,304	0,082	0,085	3,706	-
138	f	wt / *4 / -1584G bzw. *4 / -1584G / -1584G bzw. *4 / *4 / -1584G	EM	P	14	59	172	1,186	-	0,119	-	9,970	+
139	f	wt / *5	IM/EM	M	9	45	152	1	1	0,392	0,498	2,551	-
140	m	wt / -1584G	EM	M	3,5	58	172	0,302	0,302	0,054	0,048	5,603	+
142	f	wt / wt	EM	P	3	64	169	0,234	-	0,117	0,029	-	-
145	m	wt / *6	IM/EM	M	3	69	173	0,217	0,217	0,044	0,025	4,991	+
146	f	wt / -1584G	EM	P	5	52	160	0,481	-	0,196	-	2,453	+
147	m	wt / -1584G	EM	P	4,5	81	180	0,278	-	0,108	-	2,572	-
148	f	wt / -1584G	EM	P	8	43	161	0,93	-	0,343	-	2,712	+
149	m	wt / wt	EM	M	7,5	78	188	0,481	0,481	0,142	0,135	3,389	+
152	f	*4 / -1584G	EM	M	18	68	170	1,324	1,324	0,31	0,261	4,275	+
154	f	wt / wt	EM	M	4	58	170	0,345	0,345	0,046	0,052	7,543	+
155	f	wt / wt	EM	P	7	64,5	173,5	0,543	-	0,164	-	3,309	-
156	m	*9 / -1584G	EM	M	3	74	182	0,203	0,203	0,048	0,045	4,231	+
159	m	*4 / -1584G	EM	P	6	82	178	0,366	-	0,058	-	6,308	+

Tabelle 25: Aufstellung der 96 Personen, die im Rahmen eines Substitutionsprogramms Methadon verabreicht bekommen haben. Aufgeführt sind die Nummern, Gewicht, Größe und Geschlecht, der ermittelte Genotyp bezüglich der untersuchten Mutationen im *CYP2D6* Gen, wahrscheinlicher Phänotyp der *CYP2D6* Enzymaktivität, Form, Menge und Konzentration in ml, bzw. mg/kg des verabreichten Methadons, der gemessene Spiegel an (R)- und (S)-Methadon im Blutplasma, der Quotient aus verabreichter Dosis und dem gemessenen Spiegel an (R)-Methadon sowie der Beikonsum von weiteren Medikamenten der einzelnen Patienten.

Nach Angaben des behandelnden Arztes:

- 1) Patientin #85: unterzog sich einer antiviralen Therapie mit Enzyminduktion
- 2) Patient # 115: hat eine Leberzirrhose mit CHE 2012 und Quick von 54%
- 3) Patienten #39, #71, #72, #100, #128 haben ein Alkoholproblem

m: männlich; f: weiblich; wt: Wildtyp; *: Allel; -1584G: Basenaustausch von Cytosin zu Guanin an Position -1584; PM = poor metabolizer (rot); IM = intermediate metabolizer (gelb unterlegt); EM = extensive metabolizer (schwarz); UM = ultra rapid metabolizer (grün unterlegt); IM/EM = mögliche intermediäre Metabolisierer (blau); M: *rac*-Methadon; P: L-Polamidon

8 Literaturverzeichnis

Adelson M, Peles E, Bodner G, Kreek MJ: Correlation between high methadone doses and methadone serum levels in methadone maintenance treatment (MMT) patients. *J Addict Dis*, 2007; 26(1): 15-26

Agundez JA, Ledesma MC, Ladero JM, Benitez J: Prevalence of CYP2D6 gene duplication and its repercussion on the oxidative phenotype in a white population. *Clin Pharmacol Ther*, 1995; 57(3): 265-269

Akerele EO, Levin F, Nunes E, Brady R, Kleber H: Effects of HIV triple therapy on methadone levels. *Am J Addict*, 2002; 11(4): 308-14

Aklillu E, Persson I, Bertilsson L, Johansson I, Rodrigues F, Ingelman-Sundberg M: Frequent distribution of ultrarapid metabolizers of debrisoquine in an ethiopian population carrying duplicated and multiduplicated functional CYP2D6 alleles. *J Pharmacol Exp Ther*, 1996; 278(1): 441-446

Allorge D, Harlow J, Boulet O, Hayhurst GP, Chowdry J, Roth E, Crewe K, Lo-Guidice JM, Lhermitte M, Broly F, Tucker GT, Ellis SW: In-vitro analysis of the contribution of CYP2D6.35 to ultrarapid metabolism. *Pharmacogenetics*, 2001; 11(8): 739-741

Altice FL, Friedland GH, Cooney EL: Nevirapine induced opiate withdrawal among injection drug users with HIV infection receiving methadone. *AIDS*, 1999; 13(8): 957-962

Anggård E, Gunne LM, Homstrand J, McMahon RE, Sandberg CG, Sullivan HR: Disposition of methadone in methadone maintenance. *Clin Pharmacol Ther*, 1975; 17(3): 258-266

Baselt RC, Casarett LJ: Urinary excretion of methadone in man. *Clin Pharmacol Ther*, 1972; 13(1): 64-70

Baumann P, Jonzier-Perey M, Koeb L, Küpfer A, Tinguely D, Sch pf J: Amitriptyline pharmacokinetics and clinical response: II. Metabolic polymorphism assessed by hydroxylation of debrisoquine and mephenytoin. *Int Clin Psychopharmacol*, 1986; 1(2): 102-112

Begre S, von Bardeleben U, Ladewig D, Jaquet-Rochat S, Cosendai-Savary L, Golay KP, Kosel M, Baumann P, Eap CB: Paroxetine increases steady-state concentrations of (R)-methadone in CYP2D6 extensive but not poor metabolizers. *J Clin Psychopharmacol*, 2002; 22(2): 211-215

Bellward GD, Warren PM, Howald W, Axelson JE, Abbott FS: Methadone maintenance: effect of urinary pH on renal clearance in chronic high and low doses. *Clin Pharmacol Ther*, 1977; 22(1): 92-99

Bertilsson G, Heidrich J, Svensson K, Asman M, Jendeberg L, Sydow-Backman M, Ohlsson R, Postlind H, Blomquist P, Berkenstam A: Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; 95(21): 12208-12213

Bertilsson L: Geographical/interracial differences in polymorphic drug oxidation. Current state of knowledge of cytochromes P450 (CYP) 2D6 and 2C19. *Clin Pharmacokinet*, 1995; 29(3): 192-209

Bertilsson L, Dahl ML, Tybring G: Pharmacogenetics of antidepressants: clinical aspects. *Acta Psychiatr Scand Suppl*, 1997; 391: 14-21

Beyeler C, Armstrong M, Bird HA, Idle JR, Daly AK: Relationship between genotype for the cytochrome P450 CYP2D6 and susceptibility to ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 1996; 55(1): 66-68

- Black SD, Coon MJ: P-450 cytochrome: structure and function. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1987; 60: 35-87
- Bodin L, Beaune PH, Lorient MA: Determination of Cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) Gene Copy Number by Real-Time Quantitative PCR. *J Biomed Biotechnol*, 2005; 2005(3): 248-253
- Bottema CD, Sarkar G, Cassady JD, Ii S, Dutton CM, Sommer SS: Polymerase chain reaction amplification of specific alleles: a general method of detection of mutations, polymorphisms, and haplotypes. *Methods Enzymol*, 1993; 218: 388-402
- Bottema CD, Sommer SS: PCR amplification of specific alleles: rapid detection of known mutations and polymorphisms. *Mutat Res*, 1993; 288(1):93-102
- Bouër R, Barthe L, Philibert C, Tournaire C, Woodley J, Houin G: The roles of P-glycoprotein and intracellular metabolism in the intestinal absorption of methadone: in vitro studies using the rat everted intestinal sac. *Fundam Clin Pharmacol*, 1999; 13(4): 494-500
- Broly F, Gaedigk A, Heim M, Eichelbaum M, Morike K, Meyer UA: Debrisoquine/sparteine hydroxylation genotype and phenotype: analysis of common mutations and alleles of CYP2D6 in a European population. *DNA Cell Biol*, 1991; 10(8): 545-548
- Broly F, Meyer UA: Debrisoquine oxidation polymorphism: phenotypic consequences of a 3-base-pair deletion in exon 5 of the CYP2D6 gene. *Pharmacogenetics*, 1993; 3(3): 123-130
- Broly F, Marez D, Lo Guidice JM, Sabbagh N, Legrand M, Boone P, Meyer UA: A nonsense mutation in the cytochrome P450 CYP2D6 gene identified in a Caucasian with an enzyme deficiency. *Hum Genet*, 1995; 96(5): 601-603
- Buzková H, Pechandová K, Slanař O, Perlík: Genetic polymorphism of cytochrome P450 and methods for its determination. *Prague Med Rep*, 2006; 107(4): 383-393
- Caplehorn JRM, Bell J: Methadone dosage and retention of patients in maintenance treatment. *Med J Aust*, 1991; 154(3): 195-199
- Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT: Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res*, 1988; 16(23): 11141-11156
- Chida M, Yokoi T, Nemoto N, Inaba M, Kinoshita M, Kamataki T: A new variant CYP2D6 allele (CYP2D6*21) with a single base insertion in exon 5 in a Japanese population associated with a poor metabolizer phenotype. *Pharmacogenetics*, 1999; 9(3): 287-293
- Coleman T, Ellis SW, Martin IJ, Lennard MS, Tucker GT: 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) is N-demethylated by cytochromes P450 2D6, 1A2 and 3A4 - implications for susceptibility to Parkinson's disease. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996; 277(2): 685-690
- Coller JK, Joergensen C, Foster DJR, James H, Gillis D, Christrup L, Somogyi AA: Lack of influence of CYP2D6 genotype on the clearance of (R)-, (S)- and racemic-methadone. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2007; 45: 410-417
- Crettol S, Déglon JJ, Besson J, Croquette-Krokar M, Hämmig R, Gothuey I, Monnat M, Eap CB: ABCB1 and cytochrome P450 genotypes and phenotypes: influence on methadone plasma levels and response to treatment. *Clin Pharmacol Ther*, 2006; 80(6): 668-681

- Dahl ML, Johansson I, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M, Sjöqvist F: Ultrarapid hydroxylation of debrisoquine in a Swedish population. Analysis of the molecular genetic basis. *J Pharmacol Exp Ther*, 1995; 274(1): 516-520
- Daly AK, Cholerton S, Armstrong M, Idle JR: Genotyping for polymorphisms in xenobiotic metabolism as a predictor of disease susceptibility. *Environ Health Perspect*, 1994 Nov; 102 Suppl 9: 55-61
- Daly AK: Molecular basis of polymorphic drug metabolism. *J Mol Med*. 1995; 73(11): 539-553
- Daly AK, Leathart JB, London SJ, Idle JR: An inactive cytochrome P450 CYP2D6 allele containing a deletion and a base substitution. *Hum Genet*, 1995; 95(3): 337-341
- Daly AK, Brockmoller J, Broly F, Eichelbaum M, Evans WE, Gonzalez FJ, Huang JD, Idle JR, Ingelman-Sundberg M, Ishizaki T, Jacqz-Aigrain E, Meyer UA, Nebert DW, Steen VM, Wolf CR, Zanger UM: Nomenclature for human CYP2D6 alleles. *Pharmacogenetics*, 1996 J; 6 (3): 193-201(1)
- Daly AK, Fairbrother KS, Andreassen OA, London SJ, Idle JR, Steen VM: Characterization and PCR-based detection of two different hybrid CYP2D7P/CYP2D6 alleles associated with the poor metabolizer phenotype. *Pharmacogenetics*, 1996; 6(4): 319-328 (2)
- Daly AK: Pharmacogenetics of the major polymorphic metabolizing enzymes. *Funam Clin Pharmacol*, 2003; 17(1): 27-41
- Dayer P, Desmeules J, Collart L: Pharmacology of Tramadol. *Drugs*, 1997; 53: 18-24.
- Dole VP, Nyswander ME: Rehabilitation of heroin addicts after blockade with methadone. *N Y State J Med*, 1966; 66(15): 2011-2017
- Droll K, Bruce-Mensah K, Otton SV, Gaedigk A, Sellers EM, Tyndale RF: Comparison of three CYP2D6 probe substrates and genotype in Ghanaians, Chinese and Caucasians. *Pharmacogenetics*, 1998; 8(4): 325-333
- Eap CB, Cuendet C, Baumann P: Binding of d-methadone, l-methadone, and dl-methadone to proteins in plasma of healthy volunteers: role of the variants of alpha 1-acid glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther*, 1990; 47(3): 338-346
- Eap CB, Finkbeiner T, Gatpar M, et al. Replacement of (R)-methadone by a double dose of (R,S)-methadone in addicts: interindividual variability of the (R)/(S) ratios and evidence of adaptive changes in methadone pharmacokinetics. *Eur J Clin Pharmacol* 1996; 50: 385-9
- Eap CB, Bertschy G, Powell K, Baumann P: Fluvoxamine and fluoxetine do not interact in the same way with the metabolism of the enantiomers of methadone. *J Clin Psychopharmacol*, 1997; 17(2): 113-117
- Eap CB, Bourquin M, Martin J, Spagnoli J, Livoti S, Powell K, Baumann P, Déglon J: Plasma concentrations of the enantiomers of methadone and therapeutic response in methadone maintenance treatment. *Drug Alcohol Depend*, 2000; 61(1): 47-54
- Eap CB, Broly F, Mino A, Hammig R, Deglon JJ, Uehlinger C, Meili D, Chevalley AF, Bertschy G, Zullino D, Kosel M, Preisig M, Baumann P: Cytochrome P450 2D6 genotype and methadone steady-state concentrations. *Clin Psychopharmacol*, 2001; 21 (2): 229-234
- Eap CB, Buclin T, Baumann P: Interindividual variability of the clinical pharmacokinetics of methadone: implications for the treatment of opioid dependence. *Clin Pharmacokinet*, 2002; 41(14): 1153-1193

- Edwards MC, Gibbs RA: Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *PCR Methods Appl*, 1994; 3(4): 65-75
- Eichelbaum M, Spannbrucker N, Steincke B, Dengler HJ: Defective N-oxidation of spartein in man; a new pharmacogenetic defect. *Eur J Clin Pharmacol*, 1979; 16(3): 183-187
- Eichelbaum M: Polymorphic drug oxidation in humans. *FASEB J*, 1984; 43(8): 2298-2302
- Eisenhart C: The assumptions underlying the analysis of variance. *Biometrics*, 1947; 3: 1-21
- Ellis SW, Hayhurst GP, Smith G, Lightfoot T, Wong MM, Simula AP, Ackland MJ, Sternberg MJ, Lennard MS, Tucker GT, Wolf CR: Evidence that aspartic acid 301 is a critical substrate-contact residue in the active site of cytochrome P450 2D6. *J Biol Chem*, 1995; 270(49): 29055-29028
- Erali M, Schmidt B, Lyon E, Wittwer C: Evaluation of electronic microarrays for genotyping factor V, factor II, and MTHFR. *Clin Chem*, 2003; 49(5): 732-739
- Evert B, Griese EU, Eichelbaum M: A missense mutation in exon 6 of the CYP2D6 gene leading to a histidine 324 to proline exchange is associated with the poor metabolizer phenotype of sparteine. *Naunyn Schmiedbergers Arch Pharmacol*, 1994; 350(4): 434-439
- Fainsinger R, Schoeller T, Bruera E: Methadone in the management of cancer pain: a review. *Pain*, 1993; 52(2): 137-147
- Farrell M, Ward J, Mattick R, Hall W, Stimson GV, des Jarlais D, Gossop M, Strang J: Methadone maintenance treatment in opiate dependence: a review. *BMJ*, 1994; 309(6960): 997-1001
- Ferrari A, Coccia CP, Bertolini A, Sternieri E: Methadone--metabolism, pharmacogenetics and interactions. *Pharmacol Res*, 2004; 50(6): 551-559
- Ferrari M, Cremonesi L, Bonini P, Fogliene B, Stenirri S: Single-nucleotide polymorphism and mutation identification by the nanogen microelectronic chip technology. *Methods Mol Med*, 2005; 114: 93-106
- Foster DJ, Somogyi AA, Bochner F: Methadone N-demethylation in human liver microsomes: lack of stereoselectivity and involvement of CYP3A4. *Br J Clin Pharmacol*, 1999; 47(4): 403-412
- Gaedigk A, Blum M, Gaedigk R, Eichelbaum M, Meyer UA: Deletion of the entire cytochrome P450 CYP2D6 gene as a cause of impaired drug metabolism in poor metabolizers of the debrisoquine/sparteine polymorphism. *Am J Hum Genet*, 1991; 48(5): 943-950
- Gaedigk A, Gotschall RR, Forbes NS, Simon SD, Kearns GL, Leeder JS: Optimization of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) phenotype assignment using a genotyping algorithm based on allele frequency data. *Pharmacogenetics*, 1999; 9(6): 669-682
- Gaedigk A, Bradford LD, Marcucci KA, Leeder JS: Unique CYP2D6 activity distribution and genotype-phenotype discordance in black Americans. *Clin Pharmacol Ther*, 2002; 72(1): 76-89
- Gaedigk A, Ryder DL, Bradford LD, Leeder JS: CYP2D6 poor metabolizer status can be ruled out by a single genotyping assay for the -1584G promoter polymorphism. *Clin Chem*, 2003; 49(6 Pt 1): 1008-1011(1)
- Gaedigk A, Ndjountché L, Gaedigk R, Leeder JS, Bradford LD: Discovery of a novel nonfunctional cytochrome P450 2D6 allele, CYP2D642, in African American subjects. *Clin Pharmacol Ther*, 2003; 73(6): 575-576(2)

- Garcia-Barcelo M, Chow LY, Chiu HF, Wing YK, Lee DT, Lam KL, Waye MM: Genetic analysis of the CYP2D6 locus in a Hong Kong Chinese population. *Clin Chem*, 2000; 46(1): 18-23
- Garfinkel D: Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch Biochem Biophys*, 1958; 77(2):493-509
- Garrido MJ, Jiminez R, Gomez E, Calvo R: Influence of plasma-protein binding on analgesic effect of methadone in rats with spontaneous withdrawal. *J Pharm Pharmacol*, 1996; 48(3): 281-284
- Garrido MJ, Troconiz IF: Methadone: a review of its pharmacokinetic/pharmacodynamic properties. *J Pharmacol & Toxicol Methods*, 1999; 42(2): 61-66
- Garrido MJ, Aguirre C, Troconiz IF, Marot M, Valle M, Zamacona MK, Calvo R: Alpha 1-acid glycoprotein (AAG) and serum protein binding of methadone in heroin addicts with abstinence syndrome. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2000; 38(1): 35-40
- Gerber JG, Rhodes RJ, Gal J: Stereoselective metabolism of methadone N-demethylation by cytochrome P4502B6 and 2C19. *Chirality*, 2004; 16(1): 36-44
- Gibbs RA, Nguyen PN, Edwards A, Civitello AB, Caskey CT: Multiplex DNA deletion detection and exon sequencing of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene in Lesch-Nyhan families. *Genomics*, 1990; 7(2): 235-244
- Gilham DE, Cairns W, Paine MJ, Modi S, Poulosom R, Roberts GC, Wolf CR: Metabolism of MPTP by cytochrome P4502D6 and the demonstration of 2D6 mRNA in human foetal and adult brain by in situ hybridization. *Xenobiotika*. 1997; 27(1): 111-125
- Gonzalez FJ, Skoda RC, Kimura S, Umeno M, Zanger UM, Nebert DW, Gelboin HV, Hardwick JP, Meyer UA: Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature*, 1988; 331(6155): 442-446
- Goodwin B, Redinbo MR, Kliewer SA: Regulation of cyp3a gene transcription by the pregnane x receptor. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2002; 42:1-23
- Gosset W S: „The elimination of spurious correlation due to position in time or space“, in: *Biometrika*, 1914/1915; 10: 179–180.
- Gough AC, Miles JS, Spurr NK, Moss JE, Gaedigk A, Eichelbaum M, Wolf CR: Identification of the primary gene defect at the cytochrome P450 CYP2D locus. *Nature*, 1990; 347(6295): 773-776
- Gourevitch MN, Friedland GH: Interactions between methadone and medications used to treat HIV infection: a review. *Mt Sinai J Med*, 2000; 67(5-6): 429-436
- Gourevitch MN: Interactions between HIV-related medications and methadone: an overview. Updated March 2001. *Mt Sinai J Med*, 2001; 68(3): 227-228
- Greenblatt DJ, von Moltke LL, Harmatz JS, Shader RI: Human cytochromes and some newer antidepressants: kinetics, metabolism, and drug interactions. *J Clin Psychopharmacol*. 1999; 19(5 Suppl 1): 23S-35S
- Griese EU, Zanger UM, Brudermanns U, Gaedigk A, Mikus G, Morike K, Stuvén T, Eichelbaum M: Assessment of the predictive power of genotypes for the in-vivo catalytic function of CYP2D6 in a German population. *Pharmacogenetics*, 1998; 8(1): 15-26
- Guengerich FP, Miller GP, Hanna IH, Martin MV, Leger S, Black C, Chauret N, Silva JM, Trimble LA, Yergey JA, Nicoll-Griffith DA: Diversity in the oxidation of substrates by cytochrome P450 2D6:

lack of an obligatory role of aspartate 301-substrate electrostatic bonding. *Biochemistry*. 2002; 41(36): 11025-11034

Hanioka N, Kimura S, Meyer UA, Gonzalez FJ: The human CYP2D locus associated with a common genetic defect in drug oxidation: a G1934----A base change in intron 3 of a mutant CYP2D6 allele results in an aberrant 3' splice recognition site. *Am J Hum Genet*, 1990; 47(6): 994-1001

Havlic D, Cheesman SH, McLaughlin M, Murphy R, Erice A, Spector SA, Greenough TC, Sullivan JL, Hall D, Myers M, et al.: High-dose nevirapine: safety, pharmacokinetics, and antiviral effect in patients with human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis*, 1995; 171(3):537-545

Heinemeyer T, Wingender E, Reuter I, Hermjakob H, Kel AE, Kel OV, Ignatieva EV, Ananko EA, Podkolodnaya OA, Kolpakov FA, Podkolodny NL, Kolchanov NA: Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Res*, 1998; 26(1):362-367

Hersberger M, Marti-Jaun J, Rentsch K, Hänseler E: Rapid detection of the CYP2D6*3, CYP2D6*4, and CYP2D6*6 alleles by tetra-primer PCR and of the CYP2D6*5 allele by multiplex long PCR. *Clin Chem*, 2000; 46: 1072-1077

Hiroi T, Kishimoto W, Chow T, Imaoka S, Igarashi T, Funae Y: Progesterone oxidation by cytochrome P450 2D isoforms in the brain. *Endocrinology*. 2001; 142(9): 3901-3908

Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, Johné A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U: Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000; 97(7): 3473-3478

Holmstrand J, Anggård E, Gunne LM: Methadone maintenance: plasma levels and therapeutic outcome. *Clin Pharmacol Ther*, 1978; 23(2): 175-180

Honkakoski P, Zelko I, Sueyoshi T, Negishi M: The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene. *Mol Cell Biol*, 1998; 18(10): 5652-5658

Horns WH, Rado M, Goldstein A: Plasma levels and symptom complaints in patients maintained on daily dosage of methadone hydrochloride. *Clin Pharmacol Ther*, 1975; 17(6): 636-649

Huang ML, Van Peer A, Woestenborghs R, De Coster R, Heykants J, Jansen AA, Zylicz Z, Visscher HW, Jonkman JH: Pharmacokinetics of the novel antipsychotic agent risperidone and the prolactin response in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther*, 1993; 54(3): 257-68

Huang Y, Shirajian J, Schroder A, Yao Z, Summers T, Hodko D, Sosnowski R: Multiple sample amplification and genotyping integrated on a single electronic microarray. *Electrophoresis*, 2004; 25(18-19): 3106-3116

Hustert E, Zibat A, Presecan-Siedel E, Eiselt R, Mueller R, Fuss C, Brehm I, Brinkmann U, Eichelbaum M, Wojnowski L, Burk O: Natural protein variants of pregnane X receptor with altered transactivation activity toward CYP3A4. *Drug Metab Dispos*, 2001; 29(11): 1454-1459

Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, McLellan RA: Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol Sci*, 1999; 20(8): 342-349

Iribarne C, Berthou F, Baird S, Dreano Y, Picart D, Bail JP, Beaune P, Menez JF. Involvement of cytochrome P450 3A4 enzyme in the N-demethylation of methadone in human liver microsomes. *Chem Res Toxicol*, 1996; 9(2): 365-373

- Ishikawa T, Tsuji A, Inui K, Sai Y, Anzai N, Wada M, Endou H, Sumino Y: The genetic polymorphism of drug transporters: functional analysis approaches. *Pharmacogenomics*, 2004; 5(1): 67-99
- Johansson I, Lundqvist E, Bertilsson L, Dahl ML, Sjöqvist F: Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; 90(24): 11825-11829
- Johansson I, Oscarson M, Yue QY, Bertilsson L, Sjöqvist F, Ingelman-Sundberg M: Genetic analysis of the Chinese cytochrome P4502D locus: characterization of variant CYP2D6 genes present in subjects with diminished capacity for debrisoquine hydroxylation. *Mol Pharmacol*, 1994; 46(3): 452-459
- Johansson I, Lundqvist E, Dahl ML, Ingelman-Sundberg M: PCR-based genotyping for duplicated and deleted CYP2D6 genes. *Pharmacogenetics*, 1996; 6(4): 351-355
- Johnson RE, Chutuape MA, Strain EC, Walsh SL, Stitzer ML, Bigelow GE: A comparison of levomethadyl acetate, buprenorphine, and methadone for opioid dependence. *N Engl J Med*, 2000; 343(18): 1290-1297
- Jurima-Romet M, Foster BC, Casley WL, Rode A, Vloshinsky P, Huang HS, Geertsens S: CYP2D6-related oxidation polymorphism in a Canadian Inuit population. *Can J Physiol Pharmacol*, 1997; 75(3): 165-172
- Kagimoto M, Heim M, Kagimoto K, Zeugin T, Meyer UA: Multiple mutations of the human cytochrome P450IID6 gene (CYP2D6) in poor metabolizer of debrisoquine. Study of the functional significance of individuals mutations by expression of chimeric genes. *J Biol Chem*, 1990; 265(28): 17209-17214
- Kerry NL, Somogyi AA, Bochner F, Mikus G: The role of CYP2D6 in primary and secondary oxidative metabolism of dextromethorphan: in vitro studies using human liver microsomes. *Br J Clin Pharmacol*, 1994; 38(3): 243-248
- Ketter TA, Flockhart DA, Post RM, Denicoff K, Pazzaglia PJ, Marangell LB, George MS, Callahan AM: The emerging role of cytochrome P450 3A in psychopharmacology. *J Clin Psychopharmacol*, 1995; 15(6): 387-398
- Kharasch ED, Hoffer C, Whittington D, Scheffels P: Role of hepatic and intestinal cytochrome P450 3A and 2B6 in the metabolism, disposition, and miotic effects of methadone. *Clin Pharmacol Ther*, 2004; 76(3): 250-269
- Kimura S, Umeno M, Skoda RC, Meyer UA, Gonzalez FJ: The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene, and a pseudogene. *Am J Hum Genet*. 1989; 45(6): 889-904
- Klein K, Tatzel S, Raimundo S, Saussele T, Hustert E, Pleiss J, Eichelbaum M, Zanger UM: A natural variant of the heme-binding signature (R441C) resulting in complete loss of function of CYP2D6. *Drug Metab Dispos*, 2007; 35(8): 1247-1250
- Klingenberg M: Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys*. 1958; 75(2): 376-386
- Koyano S, Kurose K, Saito Y, Ozawa S, Hasegawa R, Komamura K, Ueno K, Kamakura S, Kitakaze M, Nakajima T, Matsumoto K, Akasawa A, Saito H, Sawada J: Functional characterization of four naturally occurring variants of human pregnane X receptor (PXR): one variant causes dramatic loss of both DNA binding activity and the transactivation of the CYP3A4 promoter/enhancer region. *Drug Metab Dispos*, 2004; 32(1): 149-154

- Koymans LM, Vermeulen NP, Baarslag A, Donne-Op den Kelder GM: A preliminary 3D model for cytochrome P450 2D6 constructed by homology model building. *J Comput Aided Mol Des*, 1993; 7(3): 281-289
- Kreek MJ: Plasma and urine levels of methadone. Comparison following four medication forms used in chronic maintenance treatment. *NY State J Med*, 1973; 73(23): 2773-2777
- Kreek MJ, Bencsath FA, Field FH: Effects of liver disease on urinary excretion of methadone and metabolites in maintenance patients: quantitation by direct probe chemical ionization mass spectrometry. *Biomed Mass Spectrom*, 1980; 7(9): 385-395
- Kreek MJ: Metabolic interactions between opiates and alcohol. *Ann N Y Acad Sci*, 1981; 362: 36-49
- Kreek MJ, Bencsath FA, Fanizza A, Field FH: Effects of liver disease on fecal excretion of methadone and its unconjugated metabolites in maintenance patients. Quantitation by direct probe chemical ionization mass spectrometry. *Biomed Mass Spectrom*, 1983; 10(10): 544-549
- Kremer JM, Wilting J, Janssen LH: Drug binding to human alpha-1-acid glycoprotein in health and disease. *Pharmacol Rev*, 1988; 40 (1): 1-47
- Kristensen K, Christensen CB, Christrup LL: The mu1, mu2, delta, kappa opioid receptor binding profiles of methadone stereoisomers and morphine. *Life Sci*, 1995; 56(2): PL45-PL50
- Kroemer HK, Eichelbaum M: "It's the genes, stupid". Molecular bases and clinical consequences of genetic cytochrome P450 2D6 polymorphism. *Life Sci*, 1995; 56(26): 2285-2298
- Kruskal WH, Wallis WA: Use of rank in one-criterion variance analyses. *J Amer Statist Assoc*, 1953; 48: 907-911
- Küpfer A, Preisig R: Pharmacogenetics of mephenytoin: a new drug hydroxylation polymorphism in man. *Eur J Clin Pharmacol*, 1984; 26(6): 753-759
- Leathart JB, London SJ, Steward A, Adams JD, Idle JR, Daly AK: CYP2D6 phenotype-genotype relationships in African-Americans and Caucasians in Los Angeles. *Pharmacogenetics*, 1998; 8(6): 529-541
- Lee HK, Lewis LD, Tsongalis GJ, Schur BC, Jannetto PJ, Wong SH, Yeo KT: Validation of a CYP2D6 genotyping panel on the NanoChip Molecular Biology Workstation. *Clin Chem*, 2007; 53(5): 823-828
- Lehmann JM, McKee DD, Watson MA, Willson TM, Moore JT, Kliewer SA: The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J Clin Invest*, 1998; 102(5): 1016-1023
- Levinson G., Fields RA, Harton, GL, Palmer FT, Maddelena A, Fugger EF, Schulman JD: Reliable gender screening for human preimplantation embryos, using multiple DNA target-sequences. *Hum Reprod*, 1992; 7(9):1304-1313
- Li L, Pan RM, Porter TD, Jensen NS, Silber P, Russo G, Tine JA, Heim J, Ring B, Wedlund PJ. New cytochrome P450 2D6*56 allele identified by genotype/phenotype analysis of cryopreserved human hepatocytes. *Drug Metab Dispos*, 2006; 34(8): 1411-1416
- Loimer N, Schmid R: The use of plasma levels to optimize methadone maintenance treatment. *Drug Alcohol Depend*, 1992; 30(3): 241-246

- Løvlie R, Daly AK, Molven A, Idle J, Steen VM: Ultrarapid metabolizers of debrisoquine: Characterisation and PCR-based detection of alleles with duplication of the *CYP2D6* gene. *FEBS Letters*, 1996; 392: 30-34
- Løvlie R, Daly AK, Matre GE, Molven A, Steen VM: Polymorphisms in *CYP2D6* duplication-negative individuals with the ultrarapid metabolizer phenotype: a role for the *CYP2D6*35* allele in ultrarapid metabolism? *Pharmacogenetics*, 2001; 11(1): 45-55
- Lucas AC, Bermejo AM, Tabernero MJ, Fernandez P, Campora P: Influence of concomitant drugs on methadone elimination half-life in patients under a maintenance treatment. *Addict Biol*, 2001; 6(2): 171-176
- Lundqvist E, Johansson I, Ingelmann-Sundberg M: Genetic mechanisms for duplication and multiduplication of the human *CYP2D6* gene and methods for detection of duplicated *CYP2D6* genes. *Gene*, 1999; 226(2): 328-338
- Mahgoub A, Idle JR, Dring LG, Lancaster R, Smith RL: Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man. *Lancet*, 1977; 17; 2(8038): 584-586
- Mann HB, Whitney DR: On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann Math Statist*, 1947; 18: 50-60
- Marez D, Sabbagh N, Legrand M, Lo Guidice JM, Boone P, Broly F: A novel *CYP2D6* allele with an abolished splice recognition site associated with the poor metabolizer phenotype. *Pharmacogenetics*, 1995; 5(5): 305-311
- Marez D, Legrand M, Sabbagh N, Lo Guidice JM, Boone P, Broly F: An additional allelic variant of the *CYP2D6* gene causing impaired metabolism of sparteine. *Hum Genet*, 1996; 97(5): 668-670
- Marez D, Legrand M, Sabbagh N, Guidice JM, Spire C, Lafitte JJ, Meyer UA, Broly F: Polymorphism of the cytochrome P450 *CYP2D6* gene in a European population: characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution. *Pharmacogenetics*, 1997; 7(3): 193-202
- Marez-Allorge D, Ellis SW, Lo Guidice JM, Tucker GT, Broly F: A rare G2061 insertion affecting the open reading frame of *CYP2D6* and responsible for the poor metabolizer phenotype. *Pharmacogenetics*, 1999; 9(3): 393-396
- Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB: Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther*, 2004; 75(1): 13-33
- Masimirembwa C, Persson I, Bertilsson L, Hasler J, Ingelmann-Sundberg M: A novel mutant variant of the *CYP2D6* gene (*CYP2D6*17*) common in a black African population: association with diminished debrisoquine hydroxylase activity. *Br J Clin Pharmacol*, 1996; 42(6): 713-719
- Meijerman I, Sanderson LM, Smith PH, Beijnen JH, Schellens JH: Pharmacogenetic screening of the gene deletion and duplications of *CYP2D6*. *Drug Metab Rev*, 2007; 39(1): 45-60
- Mellström B, Säwe J, Bertilsson L, Sjöqvist F: Amitriptyline metabolism: association with debrisoquin hydroxylation in nonsmokers. *Clin Pharmacol Ther*, 1986; 39(4): 369-71
- Meresaar U, Nilsson MI, Holmstrand J, Anggård E: Single dose pharmacokinetics and bioavailability of methadone in man studied with a stable isotope method. *Eur J Clin Pharmacol*, 1981; 20(6): 473-478
- Meyer UA, Skoda RC, Zanger UM: The genetic polymorphism of debrisoquine/sparteine metabolism-molecular mechanisms. *Pharmacol Ther*, 1990; 46(2): 297-308

- Mikus G, Somogyi AA, Bochner F, Eichelbaum M: Codeine O-demethylation: rat strain differences and the effects of inhibitors. *Biochem Pharmacol*, 1991; 41(5): 757-762
- Modi S, Gilham DE, Sutcliffe MJ, Lian LY, Primrose WU, Wolf CR, Roberts GC: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine as a substrate of cytochrome P450 2D6: allosteric effects of NADPH-cytochrome P450 reductase. *Biochemistry*. 1997; 36(15): 4461-4470
- Nebert DW, Gonzalez FJ: P450 Genes: Structure, Evolution, and Regulation. *Ann Rev Biochem*, 1987; 56: 945-993
- Nelson DR: Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch Biochem Biophys*, 1999; 369(1): 1-10.
- Nilsson MI, Meresaar U, Anggård E: Clinical pharmacokinetics of methadone. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl*, 1982; 74: 66-69 (1)
- Nilsson MI, Anggård E, Holmstrand J, Gunne LM: Pharmacokinetics of methadone during maintenance treatment: adaptive changes during the induction phase. *Eur J Clin Pharmacol*, 1982; 22(4): 343-349 (2)
- Nilsson MI, Widerlöv E, Meresaar U, Anggård E: Effect of urinary pH on the disposition of methadone in man. *Eur J Clin Pharmacol*, 1982; 22(4): 337-342 (3)
- Niwa T, Yabusaki Y, Honma K, Matsuo N, Tatsuta K, Ishibashi F, Katagiri M: Contribution of human hepatic cytochrome P450 isoforms to regioselective hydroxylation of steroid hormones. *Xenobiotica*. 1998; 28(6): 539-547
- Oda Y, Karasch ED: Metabolism of methadone and levo-alpha-acetylmethadol (LAAM) by human intestinal cytochrome P450 3A4 (CYP3A4): potential contribution of intestinal metabolism to presystemic clearance and bioactivation. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001; 298(3): 1021-1032
- Olsen GD: Methadone binding to human plasma albumin. *Science*, 1972; 176(34): 525-526
- Omura T, Sato R: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification, and properties. *J Biol Chem*. 1964; 239: 2379-2385
- Paine MJ, McLaughlin LA, Flanagan JU, Kemp CA, Sutcliffe MJ, Roberts GC, Wolf CR: Residues glutamate 216 and aspartate 301 are key determinants of substrate specificity and product regioselectivity in cytochrome P450 2D6. *J Biol Chem*, 2003; 278(6): 4021-4027
- Panserat S, Mra C, Gérard N, Vincent-Viry M, Galteau MM, Jacoz-Aigrain E, Krishnamoorthy R: An unequal cross-over event within the CYP2D gene cluster generates a chimeric CYP2D7/CYP2D6 gene which is associated with the poor metabolizer phenotype. *Br J Clin Pharmacol*, 1995; 40(4): 361-367
- Pearson K: On the Criterion that a Given System of Deviations from the Probable in the Case of Correlated System of Variables is such that it can be Reasonably Supposed to have Arisen from Random Sampling. *Philosophical Magazine*, 1900; 50: 157-175
- Pérez de los Cobos J, Siñol N, Trujols J, del Río E, Bañuls E, Luquero E, Menoyo A, Queraltó JM, Baiget M, Alvarez E: Association of CYP2D6 ultrarapid metabolizer genotype with deficient patient satisfaction regarding methadone maintenance treatment. *Drug Alcohol Depend*, 2007; 89 (2-3): 190-194
- Plummer JL, Gourlay GK, Cherry DA, Cousins MJ: Estimation of methadone clearance: application in the management of cancer pain. *Pain*, 1988; 33(3): 313-322

- Preskorn SH: Clinically relevant pharmacology of selective serotonin reuptake inhibitors. An overview with emphasis on pharmacokinetics and effects on oxidative drug metabolism. *Clin Pharmacokinet*, 1997; 32: 1-21
- Preston KL, Griffiths RR, Cone EJ, Darwin WD, Gorodetzky CW: Diazepam and methadone blood levels following concurrent administration of diazepam and methadone. *Drug Alcohol Depend*, 1986; 18(2): 195-202
- Raimundo S, Fischer J, Eichelbaum M, Griese EU, Schwab M, Zanger UM: Elucidation of the genetic basis of the common "intermediate metabolizer" phenotype for drug oxidation by CYP2D6. *Pharmacogenetics*, 2000; 10(7): 577-581
- Raimundo S, Toscano C, Klein K, Fischer J, Griese EU, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM: A novel intronic mutation, 2988G>A, with high predictivity for impaired function of cytochrome P450 2D6 in white subjects. *Clin Pharmacol Ther*, 2004; 76(2): 128-138
- Rainey PM: HIV drug interactions: the good, the bad, and the other. *Ther Drug Monit*, 2002; 24(1): 26-31
- Riska P, Lamson M, MacGregor T, Sabo J, Hattox S, Pav J, Keirns J: Disposition and biotransformation of the antiretroviral drug nevirapine in humans. *Drug Metab Dispos*, 1999; 27(8): 895-901
- Roberts RL, Kennedy MA: Rapid detection of common cytochrome P450 2D6 alleles in Caucasians. *Clin Chim Acta*, 2006; 366: 348-351
- Romach MK, Piafsky KM, Abel JG, Khouw V, Sellers EM: Methadone binding to orosomucoid (alpha 1-acid glycoprotein): determinant of free fraction in plasma. *Clin Pharmacol Ther*, 1981; 29(2): 211-217
- Runnebaum IB, Nagarajan M, Bowman M, Soto D, Sukumar S: Mutations in p53 as potential molecular markers for human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; 88(23): 10657-10661
- Sachse C, Brockmöller J, Bauer S, Reum T, Roots I: A rare insertion of T226 in exon 1 of CYP2D6 causes a frameshift and is associated with the poor metabolizer phenotype: CYP2D6*15. *Pharmacogenetics*, 1996; 6(3): 269-272
- Sachse C, Brockmöller J, Bauer S, Roots I: Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet*, 1997; 60(2): 265-271
- Sanger J, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977; 74(12): 5463-5467
- Sawe J: High-dose morphine and methadone in cancer patients. Clinical pharmacokinetic considerations of oral treatment. *Clin Pharmacokinet*, 1986; 11(2): 87-106
- Saxena R, Shaw GL, Relling MV, Frame JN, Moir DT, Evans WE, Caporaso N, Weiffenbach B: Identification of a new variant CYP2D6 allele with a single base deletion in exon 3 and its association with the poor metabolizer phenotype. *Hum Mol Genet*, 1994; 3(6): 923-926
- Schaeffeler E, Schwab M, Eichelbaum M, Zanger UM: CYP2D6 genotyping strategy based on gene copy number determination by TaqMan real-time PCR. *Hum Mutat*, 2003; 22(6): 476-485
- Schrijver I, Lay MJ, Zehnder JL: Diagnostic single nucleotide polymorphism analysis of factor V Leiden and prothrombin 20210G > A. A comparison of the Nanogen Eelectronic Microarray with restriction enzyme digestion and the Roche LightCycler. *Am J Clin Pathol*, 2003; 199(4): 490-496

- Schweikl H, Taylor JA, Kitareewan S, Linko P, Nagorney D, Goldstein JA: Expression of CYP1A1 and CYP1A2 genes in human liver. *Pharmacogenetics*, 1993; 3(5): 239-249
- Scott CC, Robbins EB, Chen KK: Pharmacological comparison of the optical isomers of methadone. *J Pharmacol Exp Ther*, 1948; 92: 25-35
- Shi MM: Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies. *Clin Chem*, 2001; 47(2): 164-172
- Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP: 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*. 1994; 270(1): 414-23
- Sommer SS, Groszbach AR, Bottema CD: PCR amplification of specific alleles (PASA) is a general method for rapidly detecting known single-base changes. *Biotechniques*, 1992; 12(1): 82-87
- Spearman C: The proof and measurement of association between two things. *Amer J Psychol*, 1904; 15: 72-101
- Steen VM, Andreassen OA, Daly AK, Tefre T, Børresen AL, Idle JR, Gulbrandsen AK: Detection of the poor metabolizer-associated CYP2D6(D) gene deletion allele by long-PCR technology. *Pharmacogenetics*, 1995; 5(4): 215-223 (1)
- Steen VM, Molven A, Aarskog NK, Gulbrandsen AK: Homologous unequal cross-over involving a 2.8 kb direct repeat as a mechanism for the generation of allelic variants of human cytochrome P450 CYP2D6 gene. *Hum Mol Genet*, 1995; 4(12): 2251-2257 (2)
- Stevens CW, Yaksh TL: Potency of infused spinal antinociceptive agents is inversely related to magnitude of tolerance after continuous infusion. *J Pharmacol Exp Ther*, 1989; 250(1): 1-8 (1)
- Stevens CW, Yaksh TL: Time course characteristics of tolerance development to continuously infused antinociceptive agents in rat spinal cord. *J Pharmacol Exp Ther*, 1989; 251(1): 216-223 (2)
- Stevens CW, Yaksh TL: Studies of morphine and D-ala2-D-leu5-enkephalin (DADLE) cross-tolerance after continuous intrathecal infusion in the rat. *Anesthesiology*, 1992; 76(4): 596-603
- Strain EC, Bigelow GE, Liebson IA, Stitzer ML: Moderate- vs high-dose methadone in the treatment of opioid dependence: a randomized trial. *JAMA*, 1999; 281(11): 1000-1005
- Streetman DS, Bertino Jr JS, Nafziger AN: Phenotyping of drug-metabolizing enzymes in adults: a review of in-vivo cytochrome P450 phenotyping probes. *Pharmacogenetics*, 2000; 10:187-216
- Stubbins MJ, Harries LW, Smith G, Tarbit MH, Wolf CR: Genetic analysis of the human cytochrome P450 CYP2C9 locus. *Pharmacogenetics*, 1996; 6(5): 429-439
- Sullivan HR, Due SL: Urinary metabolites of dl-methadone in maintenance subjects. *J Med Chem*, 1973; 16(8): 909-913
- Szewczuk-Bogusławska M, Kiejna A, Beszlej JA, Orzechowska-Juzwenko K, Milejski P: Doxepin inhibits CYP2D6 activity in vivo. *Pol J Pharmacol*, 2004; 56(4): 491-494
- Tateishi T, Chida M, Ariyoshi N, Mizorogi Y, Kamataki T, Kobayashi S: Analysis of the CYP2D6 gene in relation to dextromethorphan O-demethylation capacity in a Japanese population. *Clin Pharmacol Ther*, 1999; 65(5): 570-575

- Teh LK, Ismail R, Yusoff R, Hussein A, Isa MN, Rahman AR: Heterogeneity of the CYP2D6 gene among Malays in Malaysia. *J Clin Pharm Ther*, 2001; 26(3): 205-211
- Toscano C, Klein K, Blievernicht J, Schaeffeler 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. *Pharmacogenet Genomics*, 2006; 16(10): 755-766
- Total RA, Allen KE, Sheffels P, Whittington D, Kharasch ED: Enantiomeric metabolic interactions and stereoselective human methadone metabolism. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007; 321(1): 389-399
- Trafton JA, Minkel J, Humphreys K: Determining effective methadone doses for individual opioid-dependent patients. *PLoS Med*, 2006; 3(3): e80
- Tribut O, Lessard Y, Reymann JM, Allain H, Bentué-Ferrer D: Pharmacogenomics. *MedSciMonit*, 2002; 8(7): 152-163
- Tucker GT: Clinical implications of genetic polymorphism in drug metabolism. *J Pharm Pharmacol*, 1994; 46 Suppl 1: 417-424
- Tyndale R, Aoyama T, Broly F, Matsunaga T, Inaba T, Kalow W, Gelboin HV, Meyer UA, Gonzalez FJ: Identification of a new variant CYP2D6 allele lacking the codon encoding Lys-281: possible association with the poor metabolizer phenotype. *Pharmacogenetics*, 1991; 1(1): 26-32
- Ugozzoli L, Wallace B: Application of an allele-specific polymerase chain reaction to the direct determination of ABO blood group genotypes. *Genomics*, 1992; 12(4): 670-674
- Vandel P, Haffen E, Vandel S, Bonin B, Nezelof S, Sechter D, Broly F, Bizouard P, Dalery J: Drug extrapyramidal side effects. CYP2D6 genotypes and phenotypes. *Eur J Clin Pharmacol*, 1999; 55(9): 659-665
- Verebely K, Volavka J, Mulé S, Resnick R: Methadone in man: pharmacokinetic and excretion studies in acute and chronic treatment. *Clin Pharmacol Ther*, 1975; 18(2): 180-190
- Wallace RB, Shaffer J, Murphy RF, Bonner J, Hirose T, Itakura K: Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Res*, 1979; 6(11): 3543-57
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R: Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 1991; 10(4): 506-513
- Wan YJ, Poland RE, Han G, Konishi T, Zheng YP, Berman N, Lin KM: Analysis of the CYP2D6 gene polymorphism and enzyme activity in African-Americans in southern California. *Pharmacogenetics*, 2001; 11(6): 489-499
- Wang D, Johnson AD, Papp AC, Kroetz DL, Sadée W: Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics*, 2005; 15(10): 693-704
- Wang JS, DeVane CL: Involvement of CYP3A4, CYP2C8, and CYP2D6 in the metabolism of (R)- and (S)-methadone in vitro. *Drug Metab Dispos*, 2003; 31(6): 742-747
- Wang JS, Ruan Y, Taylor RM, Donovan JL, Markowitz JS, DeVane CL: Brain penetration of methadone (R)- and (S)-enantiomers is greatly increased by P-glycoprotein deficiency in the blood-brain barrier of Abcb1a gene knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 2004; 173(1-2): 132-138. Epub 2004

- Wang L, Luhm R, Lei M: SNP and mutation analysis. *Adv Exp Med Biol*, 2007; 593: 105-116
- Wang SL, Lai MD, Huang JD: G169R mutation diminishes the metabolic activity of CYP2D6 in Chinese. *Drug Metab Dispos*, 1999; 27(3): 385-388
- Watanabe M, Kumai T, Matsumoto N, Tanaka M, Suzuki S, Satoh T, Kobayashi S: Expression of CYP3A4 mRNA is correlated with CYP3A4 protein level and metabolic activity in human liver. *J Pharmacol Sci*, 2004; 94(4): 459-462
- Weinshilboum R: Inheritance and drug response. *N Engl J Med*, 2003; 348: 529-537
- Wennerholm A, Johansson I, Massele AY, Lande M, Alm C, Aden-Abdi Y, Dahl ML, Ingelman-Sundberg M, Bertilsson L, Gustafsson LL: Decreased capacity for debrisoquine metabolism among black Tanzanians: analyses of the CYP2D6 genotype and phenotype. *Pharmacogenetics*, 1999; 9(6): 707-714
- Werck-Reichhart D, Feyereisen R: Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol*. 2000; 1(6) REVIEWS3003. Epub 2000
- White RE, Coon MJ: Oxygen activation by cytochrome P-450. *Annu Rev Biochem*, 1980; 49: 315-356
- Wicht A: Der Einfluss des Body-Mass-Index auf die Pharmakokinetik von Methadon. Dissertation, In Arbeit
- Wilkinson GR: Cytochrome P4503A (CYP3A) metabolism: prediction of in vivo activity in humans. *J Pharmacokinet Biopharm*, 1996; 24(5): 475-490
- Wolf CR, Smith CA, Forman D: Metabolic polymorphisms in carcinogen metabolising enzymes and cancer susceptibility. *Br Med Bull*, 1994; 50(3): 718-731
- Wolf CR, Smith G: Cytochrome P450 CYP2D6. *IARC Sci Publ*, 1999; 148: 209-229
- Wolff K, Sanderson M, Hay AM, Raistrick D: Methadone concentrations in plasma and their relationship to drug dosage. *Clin Chem*, 1991; 37(2): 205-209
- Wolff K, Hay AW, Raistrick D, Calvert R: Steady-state pharmacokinetics of methadone in opioid addicts. *Eur J Clin Pharmacol*, 1993; 44(2): 189-194
- Wolff K, Rostami-Hodjegan A, Shires S, Hay AW, Feely M, Calvert R, Raistrick D, Tucker GT: The pharmacokinetics of methadone in healthy subjects and opiate users. *Br J Clin Pharmacol*, 1997; 44(4): 325-334
- Wu D, Otton SV, Sproule BA, Busto U, Inaba T, Kalow W, Sellers EM: Inhibition of human cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) by methadone. *Br J Clin Pharmacol*, 1993; 35(1): 30-34
- Yamazaki H, Kiyotani K, Tsubuko S, Matsunaga M, Fujieda M, Saito T, Miura J, Kobayashi S, Kamataki T: Two novel haplotypes of CYP2D6 gene in a Japanese population. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2003; 18(4): 269-271
- Yasumori T, Nagata K, Yang SK, Chen LS, Murayama N, Yamazoe Y, Kato R: Cytochrome P450 mediated metabolism of diazepam in human and rat: involvement of human CYP2C in N-demethylation in the substrate concentration-dependent manner. *Pharmacogenetics*, 1993; 3(6): 291-301.

- Yokoi T, Kosaka Y, Chida M, Chiba K, Nakamura H, Ishizaki T, Kinoshita M, Sato K, Gonzalez FJ, Kamataki T: A new CYP2D6 allele with a nine base insertion in exon 9 in a Japanese population associated with poor metabolizer phenotype. *Pharmacogenetics*, 1996; 6(5): 395-401
- Yokota H, Tamura S, Furuya H, Kimura S, Watanabe M, Kanazawa I, Kondo I, Gonzalez FJ: Evidence for a new variant CYP2D6 allele CYP2D6J in a Japanese population associated with lower in vivo rates of sparteine metabolism. *Pharmacogenetics*, 1993; 3(5): 256-263
- Yu A, Kneller BM, Rettie AE, Haining RL: Expression, purification, biochemical characterization, and comparative function of human cytochrome P450 2D6.1, 2D6.2, 2D6.10, and 2D6.17 allelic isoforms. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002; 303(3): 1291-1300
- Zaigler M, Tantcheva-Poor I, Fuhr U: Problems and perspectives of phenotyping for drug-metabolizing enzymes in man. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2000; 37: 1-9
- Zanger UM, Fischer J, Raimundo S, Stuvem T, Evert BO, Schwab M, Eichelbaum M: Comprehensive analysis of the genetic factors determining expression and function of hepatic CYP2D6. *Pharmacogenetics*, 2001; 11(7): 573-585
- Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M: Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2004; 369(1): 23-37
- Zhang J, Kuehl P, Green ED, Touchman JW, Watkins PB, Daly A, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K, Wrighton SA, Hancock M, Kim RB, Strom S, Thummel K, Russell CG, Hudson JR Jr, Schuetz EG, Boguski MS: The human pregnane X receptor: genomic structure and identification and functional characterization of natural allelic variants. *Pharmacogenetics*, 2001; 11(7): 555-572

Danksagung

Ich danke:

Prof. Dr. med. W. Eisenmenger dem Leiter des Instituts für Rechtsmedizin in München für die Bereitstellung des Themas und die Förderung dieser Arbeit,

Frau PD Dr. Anslinger und Herrn PD Dr. Rolf für die wissenschaftliche Betreuung der Dissertation und fachliche Diskussionsbereitschaft,

Herrn Dr. Detlef Thieme und Frau Dr. Iris Schulz für ihre fachliche Hilfe,

Herrn Albert Wicht für die gute Zusammenarbeit und Bereitstellung der Daten zu den gemessenen Methadonspiegeln,

Frau Gabriele Hölscher vom Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie (IBE) für ihre fachliche Hilfe und Diskussionsbereitschaft zur Statistik,

Frau Birgit Bayer für die praktischen Hilfen,

Frau Monika Czerny, Uschi Bruckmoser, Susanne Ring und Britta Gätjens für ihre Hilfsbereitschaft und die nette Arbeitsatmosphäre,

Herrn Herbert Koch für Fotografie und Bildbearbeitung,

Herrn Dr. Frank Schäfer für die Sammlung und Bereitstellung der Blutproben,

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern, die mich im Institut für Rechtsmedizin in München während meiner Dissertation direkt und indirekt unterstützt haben,

meiner Familie, sowie meiner Freundin Astrid Mühle-Enke, ohne deren Unterstützung, Unterhaltung und Ablenkung diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre,

und insbesondere meiner Tochter Julia, die mich während der Erstellung dieser Arbeit oft entbehren musste.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtstag	17.09.1972
Geburtsort	Dachau
Familienstand	ledig, ein Kind

Schulausbildung

1979-1983	Grundschule Dachau-Süd
1983-1984	Hauptschule Dachau-Süd
1984-1993	Ignaz-Taschner-Gymnasium in Dachau

Studium

1993-2002	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilian Universität in München
	Abschluss: Diplom

Erziehungsurlaub

März 1999- September 2001

Promotion

Seit 01.07.2003	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Rechtsmedizin München
-----------------	--