

Facharbeit
aus dem Fach
Chemie

Thema: Charakterisierung genetischer Einflussfaktoren im Zusammenhang mit der individuellen Wirkung von Arzneistoffen



Verfasser: Robert Dietrich, Hohenbirken 37, 83670 Bad Heilbrunn

Leistungskurs: Chemie 3C1

Kursleiter: LAss Kurt Gallenberger

Abgabetermin: 26. Januar 2007

Inhaltsverzeichnis:

	Seite
1. Unsere Gene – Der Beipackzettel für Nebenwirkungen von Arzneistoffen?	3
2. Genotypisierung von Einzel Nukleotid Polymorphismen als genetische Einflussfaktoren anhand fluoreszierender Schmelzkurvenanalysen.....	4
2.1 Einzel Nukleotid Polymorphismen – SNPs	5
2.2 Prinzip der PCR	5
2.2.1 Trennung des DNA-Doppelstranges	6
2.2.2 Anhaften der <i>Primer</i> auf den DNA-Einzelstrang.....	6
2.2.3 Verlängerung der DNA als Doppelstrang.....	6
2.3 Das <i>Probe</i> -Molekül	7
2.3.1 Die individuelle Base mit dem Fluoreszein.....	7
2.3.2 Bindungsarten/-möglichkeiten der <i>Probe</i> auf den DNA-Strang.....	9
2.4 Durchführung/Prinzip der Schmelzkurvenanalyse	9
2.5 Auswertung der Schmelzkurven.....	10
2.6 Das LightCycler® 480 Instrument	11
3. Schlüsselproteine für den Arzneimittelmetabolismus	12
3.1 Die ZytochromP450 – Enzymfamilie.....	12
3.2 Das ZytochromP450 2C9 (CYP2C9) – Enzym	12
3.3 Genprodukte des CYP2C9 Enzyms	13
4. Material und Methoden	14
4.1 Herstellung des Reaktionsansatzes	14
4.2 Das PCR-Protokoll.....	15
4.3 Genotypisierung eines Polymorphismus im CYP2C9 Enzym Exon3	15
4.4 Genotypisierung eines Polymorphismus im CYP2C9 Enzym Exon7	16
5. Analyse der vorhandenen SNPs anhand von Schmelzkurven	17
6. Diskussion.....	19
7. Literaturverzeichnis.....	20
8. Danksagung und Erklärung	21
9. Anlagen	22

1. Unsere Gene – Der Beipackzettel für Nebenwirkungen von Arzneistoffen?

Gerne wird auf den Beipackzettel verwiesen, wenn es um die Nebenwirkungen von Medikamenten geht, doch darf man diese für alle Menschen so pauschalisieren? Denn die Wirkung eines Medikaments variiert, wie unser Aussehen, von Mensch zu Mensch: meist werden die gewünschten therapeutischen Erfolge erzielt, in zehn bis 70 Prozent aller Fälle wirkt die Arznei jedoch nur schlecht oder gar nicht. Bei knapp sieben Prozent aller Therapien kommt es zu schweren Nebenwirkungen, die in 0,3 Prozent aller Fälle tödlich enden.^{15(S.1)}

Einen großen Anteil an diesen individuellen Unterschieden hat unser Genom, jener Bauplan, der alle Menschen einzigartig macht. Bereits 1958 vermutete der deutsche Kinderarzt Friedrich Vogel, dass unsere Gene an der individuellen Wirkung von Arzneimitteln in erheblichem Maße beteiligt sind.^{6(S.506)}

„Das Forschungsgebiet, dass sich mit der Aufklärung der Zusammenhänge zwischen dem individuellen genetischen Profil von Menschen und ihrer Reaktion auf Medikamente in Bezug auf Wirksamkeit und Verträglichkeit beschäftigt, nennt sich Pharmakogenetik.“^{4(S.6)}

Viel wichtiger jedoch ist das Wechselspiel von Arzneien und Genom mit dem sich der Forschungszweig der Pharmakogenomik befasst.^{6(S.506)}

Unser Erbgut übt auf mindestens drei Wegen seinen Einfluss auf die Wirkung von Drogen aus: die Pharmakokinetik beschreibt den Metabolismus, also die Aufnahme, den Umbau und den Abbau von Medikamenten im Körper.^{6(S.506)} Bei manchen Menschen scheitert ein Medikament nämlich schon, bevor es überhaupt an seinen Einsatzort gelangt: ihr Körper nimmt das Molekül gar nicht oder nur sehr langsam auf. Bei anderen wiederum verläuft der teilweise nötige Umbau der Arznei nur schleppend. Eine dritte Gruppe von Patienten baut den Wirkstoff zu schnell oder zu langsam ab. Ein zu schneller Abbau eines Medikaments vermindert dabei dessen Wirkung – das gleiche gilt, wenn es zu langsam in den Körper gelangt oder umgebaut wird. Erfolgt der Abbau oder die Ausscheidung hingegen nur schleppend, so ist das Gegenteil der Fall: die Droge bleibt zu lange im Körper und die Gefahr von Nebenwirkungen nimmt zu.⁹ Ursachen für den unterschiedlichen Arzneimittel-metabolismus sind neben Umweltfaktoren und Ernährung auch die genetische Veranlagung,^{4(S.6)} denn verantwortlich für diesen Metabolismus sind bestimmte Proteine unseres Körpers. Die Bauanleitung für diese Proteine liefern wiederum Gene, weshalb oft kleine Unterschiede im Genom von Patienten der Grund für pharmakokinetische Abweichungen sind.^{4(S.7)}

Die Pharmakodynamik beschreibt dagegen die Wechselwirkung von Arzneien mit ihrem molekularen Ziel.^{6(S.506)} Im klassischen Fall geht es dabei um den molekularen Grund einer Krankheit. Meist handelt es sich um ein körpereigenes Protein, dessen Wirkung gestört ist. Kleine Abweichungen in unserem Erbgut können die Struktur der Proteine daher teilweise stark verändern. Da Medikamente aber oftmals höchst empfindlich auf solche Differenzen

reagieren – schließlich soll sich ein Wirkstoff nur gegen ein ganz bestimmtes Zielmolekül richten, um möglichst wenig Nebenwirkungen zu erzeugen – verlieren sie ihre Wirkung, wenn ihr Zielmolekül verändert ist.

In dieser Arbeit soll anhand von Sequenzanalysen nach dem Verfahren der Genotypisierungsreaktion die unterschiedliche Wirkung von Medikamenten aufgrund individueller genetischer Unterschiede nachgewiesen werden.

2. Genotypisierung von Einzel Nukleotid Polymorphismen als genetische Einflussfaktoren anhand fluoreszierender Schmelzkurvenanalysen

Will man die molekularen Ursachen einer Krankheit oder die Fehlwirkung eines Medikaments verstehen, muss man bei den Genen suchen. Zunächst gilt es, diejenigen Bereiche des Genoms zu finden, die an der Krankheitsentstehung bzw. der Wirkung auf den Metabolismus eines Medikaments beteiligt sind. Einen Erfolg versprechenden Ansatz bieten die so genannten Einzel Nukleotid Polymorphismen (engl.: **Single Nucleotide Polymorphism**, kurz SNP).^{13(S.1)} Diese mehr oder weniger zufällig über das Genom verteilten Veränderungen einzelner Basen tragen vermutlich in erheblichem Maße zu unseren individuellen genetischen Unterschieden bei. Da ein SNP die Basenabfolge des DNA-Stranges verändert, wird die mutierte RNA bei der Proteinbiosynthese in eine falsche Aminosäure übersetzt. Ein SNP verändert somit die Aminosäuresequenz im zugehörigen Protein. Je nach Position des SNPs in einem Gen ist das zugehörige Genprodukt mehr oder weniger stark betroffen.^{13(S.1)} Auf diese Weise kann zum Beispiel ein Enzym gestört, zerstört oder auch verbessert sein. Daraus resultiert der unterschiedliche Metabolismus von Medikamenten, welche auf die korrekte Funktion des Enzyms angewiesen sind.^{4(S.6)} Findet man bestimmte SNPs immer wieder in Verbindung mit einer Krankheit oder einer bestimmten Arzneimittel-Unverträglichkeit bzw. Fehlwirkung, kann man also davon ausgehen, dass die betroffenen Gene etwas mit der beobachteten Störung zu tun haben.^{13(S.1)} Um diese SNPs im menschlichen Genom zu lokalisieren wird nach dem Verfahren der Genotypisierung von Einzel Nukleotid Polymorphismen mit Hilfe auf Fluoreszenz-Emission basierender Schmelzkurvenanalysen (engl.: Genotyping of SNP via Fluorescent Melting Curve Analysis) gearbeitet.^{7(S.11)} Die Genotypisierungsreaktion findet in einem LightCycler® Instrument statt. Dieses Analysegerät ermöglicht sowohl die Vervielfältigung des zu untersuchenden DNA-Materials per PCR-Amplifikation, als auch die anschließend erfolgende Schmelzkurvenanalyse. Sinn dieser Sequenzierung ist es, den Genotypen in einem bestimmten Genabschnitt zu bestimmen. Durch Vergleichen mit zugrunde liegenden Versuchsergebnissen können Mutationen durch Basenaustausch erkannt werden.⁹ Noch wichtiger als die Bestimmung dieser Vielzahl genetischer Varianten (Genotypen) ist es, diejenigen zu bestimmen, welche mit gesundheitsrelevanten Funktionsänderungen der kodierten Eiweiße (so genannte

Phänotypen) einhergehen.^{1(S.19)} Das genetische Profil ist im Gegensatz zu Faktoren wie Alter und Gesundheitszustand eine unveränderbare Determinante als Einflussfaktor auf die Ansprechrate von Medikamenten, da dieses Profil im Erbgut festgeschrieben ist. Einmal gewonnene Genotypisierungsdaten sind somit ein Leben lang gültig.^{4(S.6)}

2.1 Einzel Nukleotid Polymorphismen – SNPs

Die menschlichen Gene sind zu 99,9 Prozent gleich, lediglich die verbleibenden 0,1 Prozent sorgen für die individuellen Unterschiede, von denen Merkmale wie Augen- oder Haarfarbe am auffälligsten sind.^{7(S.4)} Der Einzel Nukleotid Polymorphismus stellt die häufigste genetische Variation in einzelnen Bausteinen der menschlichen DNA dar.^{5(S.1963)} Gene mit geringer Abweichung in ihrer DNA-Sequenz (Allele) werden als „polymorphe“ Gene bezeichnet.⁹ Diese Abweichungen werden durch Punktmutationen hervorgerufen, welche den Austausch einer Base bzw. eines Nukleotides gegen ein anderes Nukleotid an einer bestimmten Position der DNA beschreiben.^{5(S.1963)} Das menschliche Genom umfasst in etwa 3,5 Milliarden Basenpaare, alle 250 bis 1000 Basenpaare kommt ein SNP vor. Die Gesamtzahl der SNPs beim Menschen liegt bei mehreren 10.000, die fast gleichmäßig über das gesamte Genom verteilt sind.^{5(S.1964)} Sind in den Genen, die Arzneistoffmetabolisierende Proteine kodieren, einzelne Basen ausgetauscht, so führt dies zu einer veränderten Aminosäurezusammensetzung, was eine komplett veränderte Kinetik eines Arzneistoffes verursachen kann.^{14(S.1)} Als relevant für pharmakogenetische Überlegungen gilt ein polymorphes Gen, sobald es mit einer Frequenz von mehr als einem Prozent in einer Population existiert und mindestens ein Polymorphismus die Aktivität des betroffenen Enzyms verändert.^{7(S.6)} Aus klinischer Sicht unterscheidet man zwischen SNPs, die zu einer Funktionsänderung von Eiweißen führen, somit für die Wirksamkeit, Ansprechrate und Verträglichkeit von Medikamenten maßgeblich verantwortlich sind und solchen, die keinen Einfluss nehmen.^{1(S.19)} Die Forschungsgebiete der Pharmakogenetik und Pharmakogenomik haben sich das Ziel gesetzt, möglichst viele dieser SNPs zu identifizieren und zu kartieren, um die Wirksamkeit von Medikamente zu steigern und Krankheiten besser und erfolgreicher bekämpfen zu können. Wäre dieses Ziel erreicht, könnte man im Vorherein feststellen, welche Medikamente bei der erkrankten Person am besten wirken.^{13(S.1-2)}

2.2 Prinzip der PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl.: **P**olymerase **C**hain **R**eaction, kurz PCR) ermöglicht die milliardenfache Vervielfältigung/Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen durch enzymatische Vervielfältigung,^{2(S.136)} um die DNA für weitere Analyseverfahren zugänglich zu machen. Zur Durchführung einer PCR in einem LightCycler® Instrument, dass die vollautomatische Steuerung von Temperaturzyklen gewährleistet, wird ein Reaktionsgemisch

- auch *Sample* genannt - mit folgenden Stoffen benötigt: eine geringe Menge doppelsträngige DNA, die als Grundmedium dient und vervielfältigt werden soll, eine DNA-Polymerase, Nukleotide und zwei Oligonukleotid-*Primer* (Oligonukleotide sind kurze Nukleinsäure-Fäden mit nur wenigen Bausteinen, den Nukleotiden).¹² Die DNA-Polymerase kopiert die DNA, indem sie einen neuen synthetisierten DNA-Strang aus den vier Kernbasen, den sog. Nukleotiden (Adenin A, Cytosin C, Guanin G, Thymin T) aufbaut. Es können jedoch nur die Basen A und T, sowie G und C eine Bindung eingehen. Damit die DNA-Polymerase nicht bei den hohen Temperaturen während der Amplifikation von bis zu 95°C denaturiert, wird eine hitzebeständige taq-DNA-Polymerase (**t**hermophil **a**qua) verwendet.^{2(S.136)} Die *Primer* dienen dem Zweck, nur eine kurze Sequenz des DNA-Stranges zu vervielfältigen. Sie sind zu Sequenzen beiderseits des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes - in dem der SNP liegt - (engl.: genomic target) (vgl. Anhang: Bild 1) komplementär,¹² um dort den Start- und Endpunkt für die Polymerase zu markieren. Das 3' Ende des synthetischen Oligonukleotid-*Primers* dient der DNA-Polymerase als Startpunkt,^{2(S.75)} von dem aus der restliche Einzelstrang zum Doppelstrang aufgefüllt wird. Zudem wird noch eine sequenzspezifische fluoreszenzmarkierte Sonde, die so genannte *Probe* zugegeben, die mit dem PCR Produkt hybridisiert, um anschließend die Schmelzkurvenanalyse durchführen zu können.¹² Das Prinzip der PCR Amplifikation lässt sich vereinfacht in drei Schritten erklären:

2.2.1 Trennung des DNA-Doppelstranges

Im ersten Schritt wird das Reaktionsgemisch auf 95°C erhitzt. Hierdurch werden die Wasserstoffbrückenbindungen, welche die beiden DNA-Stränge zusammenhalten aufgebrochen. Die beiden Stränge trennen sich voneinander (vgl. Anhang: Bild 2) und die DNA denaturiert.^{10(S.5)}

2.2.2 Anhaften der *Primer* auf den DNA-Einzelstrang

Im zweiten Schritt, der so genannten *Primer*hybridisierung haften sich die *Primer* nach einer Abkühlphase bei 58°C an die entsprechenden Stellen der einsträngigen DNA-Matrize (vgl. Anhang: Bild 3) um den zu reduplizierenden Bereich zu markieren.^{10(S.6)}

2.2.3 Verlängerung der DNA als Doppelstrang

Im dritten Schritt wird die Temperatur auf 72°C erhöht, eine für die Funktion der DNA-Polymerase optimale Reaktionstemperatur. Die sog. Verlängerungsphase setzt ein. Die taq-Polymerase startet am 3'-Ende des *Primers* mit der Synthese der komplementären DNA-Sequenz (DNA-Synthese) (vgl. Anhang: Bild 4), indem sie die komplementären Nukleotide an die Basen der Einzelstränge bindet und miteinander verknüpft.^{10(S.7)}

Am Ende dieses Zyklus' liegen zwei neu synthetisierte Doppelstränge vor, die zunächst noch keine definierte Länge haben (vgl. Anhang: Bild 5). Die beiden Tochter-DNA-Moleküle bestehen jeweils zur Hälfte aus der alten und der neu synthetisierten DNA. Da sie aber im nächsten Zyklus selbst als Matrizen verwendet werden und an ihren Enden die Oligonukleotidsequenz der *Primer* tragen, entstehen ab dem dritten Durchlauf nur noch Produkte gewünschter Länge. Ab dem vierten Durchlauf erfolgt eine exponentielle Amplifizierung der Zielsequenz. Nach über 35 Durchläufen liegt die DNA theoretisch 2^{35} mal vor (vgl. Anhang: Bild 6). Der Vorteil an dieser Synthesemethode ist, dass die taq-Polymerase hitzestabil ist und somit die aufeinander folgenden Denaturierungs- und Hybridisierungsschritte einander abwechseln können, ohne dass zwischendurch neues Enzym beigefügt werden muss.^{10(S.8, 9)}

2.3 Das *Probe*-Molekül

Um eine Schmelzkurvenanalyse durchführen zu können, benötigt man eine sog. *Probe*. Hierbei handelt es sich um ein kurzes, synthetisch hergestelltes DNA-Molekül. Die chemische Synthese einer *Probe* erfolgt durch gezieltes, sequenz-spezifisches Aneinanderreihen der vier möglichen DNA-Einzelbausteine. Die vergleichsweise kurze DNA-Sequenz der *Probe* (ca. 20 Einheiten) passt revers-komplementär auf einen der beiden DNA-Stränge des PCR-Produktes (vgl. Anhang: Bild 7).⁹

Eine *Probe* für die Schmelzkurvenanalyse wird so konzipiert, dass sie beim Anhaften an ihren Ziel-DNA-Strang Fluoreszenz emittiert, sie leuchtet (vgl. Anhang: Bild 8b). Solange sie sich frei in Lösung befindet fluoresziert sie nicht und ist dunkel (vgl. Anhang: Bild 8a).^{7(S.12)} Um für eine auf Fluoreszenz-Emission basierende Schmelzkurvenanalyse eingesetzt werden zu können, wird in die *Probe*-Sequenz während der Synthese ein chemisch modifizierter DNA-Baustein eingebaut.

2.3.1 Die individuelle Base mit dem Fluoreszein

Hierbei handelt es sich um einen Baustein mit einer universellen Base (Name: Simple*Probe* Label), die zu allen anderen vier Basen komplementär ist und daher flexibel eingesetzt werden kann. Dieser modifizierte, fluoreszierende Oligonukleotid-Baustein ist folgendermaßen aufgebaut (vgl. Anhang: Bild 9): ein Fluoreszein-Molekül ist über die Kombination aus zwei funktionalisierten Linkermolekülen an die universelle Base Nitroindol gebunden. Linker Nr. 1 verbindet Fluoreszein über eine Imminogruppe (NH) und mehrere Methylengruppen (CH₂) mit Linker Nr. 2, einer Propargylamminogruppe.^{7(S.15)} Linker Nr. 2 ist also auf einer Seite – wiederum über eine Imminogruppe – kovalent mit Linker Nr. 1 und auf seiner anderen Seite mit einem C-Atom der universellen Base Nitroindol verbunden.⁹

Die Kombination aus Immino- und Methylengruppen (Linker Nr. 1) sorgt für die räumliche/sterische Flexibilität, der funktionelle Linker Nr. 2 dient zur starren Verknüpfung an das Nitroindol. Die Nitroindolgruppe ist die Base des modifizierten DNA-Bausteins (sog. Nukleotid) X. Die Base ist N-glycosidisch mit dem Zucker Desoxyribose verknüpft. Innerhalb eines DNA-Stranges sind die Desoxyribose-Einheiten jeweils über eine Phosphatgruppe miteinander verbunden.⁹ Bei der chemischen DNA-Synthese werden immer die 5'-OH Gruppen des Zuckers des vorhergehenden mit den 3'-OH Gruppen des Zuckers des nachfolgenden Bausteins über diese Phosphatgruppe verbunden (vgl. Anhang: Bild 9)^{10(S.7)} (in der Natur, bzw. bei der enzymatischen Synthese ist die Richtung genau umgekehrt).

Um letztendlich für eine Schmelzkurvenanalyse eingesetzt werden zu können, müssen folgende Zustände einer *Probe* klar voneinander unterscheidbar sein: das Molekül liegt entweder ungebunden, frei in Lösung vor oder gebunden an die DNA-Zielsequenz (vgl. Anhang: Bild 8). *Probes*, die über das Simple*Probe* Labeling-Konzept aufgebaut sind können eindeutig zwischen obigen Zuständen unterscheiden.^{7(S.12)} Der Mechanismus kann wie folgt beschrieben werden:

Das Fluoreszein besitzt eine Gruppe delocalisierter Elektronen, welche eine Elektronenwolke bilden und kann somit leicht angeregt werden. Durch Anregung mit linear polarisiertem Licht aus einer Xenon-Lampe (483nm), wird die Elektronenwolke nach Aufnahme der Energie in einen energetisch angeregten Zustand übergeführt. Da dieser energiereichere Zustand nur metastabil ist, wird die aufgenommene Energie in Fluoreszenz-Quanten (533nm) abgegeben, um wieder in den energieärmeren, stabileren Grundzustand zu gelangen (vgl. Anhang: Bild 10, 11). Das durch die Fluoreszenz-Quanten entstandene Licht wird mit Hilfe einer CCD-Kamera gemessen. Dies ist jedoch nur möglich, wenn die *Probe* an den DNA-Strang gebunden ist, denn wenn sich diese frei in Lösung befindet, passiert folgendes: die Interaktion Nitroindol-Base mit Partner-Base (A, G, C oder T) wird aufgehoben. Die *Probe* orientiert sich sterisch neu, das Fluoreszein klappt in eine Ebene über den Nitroindol Grundkörper. Es entsteht eine sterisch begünstigte Interaktion zwischen dem Fluoreszein und dem Nitroindol. Es herrschen hydrophobe Van der Waals-Kräfte, sowie ein elektrostatischer Ladungstransfer vom Fluoreszein zum Nitroindol (engl.: Charge-Transfer/Photo-Electron-Transfer). Die NO₂-Gruppe des Nitroindols zieht die delocalisierten Elektronen des Fluoreszeins an sich, reduziert damit stark deren Bewegungsfreiheit und *beult* die Wolke nach unten aus. Das Fluoreszein kann nun, unabhängig von der Energieeinstrahlung durch die Xenon-Lampe nicht mehr angeregt werden. Die *Probe* wird dunkel, da das Fluoreszein kein Licht mehr emittiert. Wenn die *Probe* gebunden ist fluoresziert sie, da der Fluoreszein-Farbstoff frei von den oben beschriebenen Interaktionen

ist und nicht über die Nitroindol-Base geklappt ist. Das heißt, dass zwischen Fluoreszein und Nitroindol im gebundenen Zustand keine Ladungstransfer-Interaktion vorliegt, die das Fluoreszein dunkel macht. Der Grund hierfür besteht darin, dass Nitroindol als universelle Base an seinen gegenüberliegenden Partner im PCR-Produkt-Strang bindet (A, G, C oder T) und diese Bindung stärker ist, als die Charge-Transfer-Bindung zu Fluoreszein. Daher ist das Fluoreszein auf der anderen Seite frei, sich anregen zu lassen, Lichtquanten aufzunehmen und anschließend in Form von Fluoreszenz wieder zu emittieren.⁹

2.3.2 Bindungsarten/-möglichkeiten der *Probe* auf den DNA-Strang

Die *Probe* hybridisiert mit dem DNA-Bereich, in dem der SNP vorliegt. Je nachdem wie der Polymorphismus (SNP) aussieht, entsteht zwischen der *Probe* und dem DNA-Einzelstrang entweder eine korrekte Bindung *perfect match* (auch *match* genannt) oder eine unkorrekte Bindung, ein *missmatch* aufgrund einer Fehlbasenpaarung an der polymorphen Stelle (vgl. Anhang: Bild 12, 13).^{7(S.13)} Im Gegensatz zum *missmatch* - der instabil und kaum hitzebeständig ist – charakterisiert die Bindungsart eines *perfect matches* eine höhere Hitzebeständigkeit. In Folge dessen löst sich die *Probe* beim Erhitzen erst bei höheren Temperaturen ab.⁹

Im Beispiel (vgl. Anhang: Bild 12) liegt ein SNP an dritter Stelle vor, die Base Adenin A wurde gegen die Base Guanin G ausgetauscht, hierdurch entsteht ein *missmatch*.

2.4 Durchführung/Prinzip der Schmelzkurvenanalyse

Die Durchführung von Schmelzkurvenanalysen, welche auf Fluoreszenz-Emission basieren, ermöglicht die Bestimmung von SNPs in einem bestimmten Genabschnitt. Wichtigster Bestandteil dieser Analyse ist das *Probe*-Molekül. Dieses kann, wie in Kap. 2.3.2 beschrieben - je nachdem wie der SNP in der zu untersuchenden Sequenz aussieht - unterschiedliche Bindungen mit dem DNA-Strang eingehen. Das Prinzip der Schmelzkurvenanalyse beruht darauf, dass die *Probe* nur im gebundenen Zustand fluoresziert und die Bindungsarten, je nachdem ob *match* (vgl. Anhang: Bild 14, Allel 1) oder *missmatch* (vgl. Anhang: Bild 13, Allel 2) eine unterschiedliche Hitzebeständigkeit haben.

Die Vorbereitung der Analyse beginnt damit, dass im finalen Zyklus der PCR-Amplifikation im LightCycler® Instrument die Temperatur auf 95°C erhöht wird. Während der PCR gebildete Doppelstränge werden durch Hitzedenaturierung in zwei Einzelstränge geteilt. Daraufhin wird die Temperatur schnell auf 50°C gesenkt und eine Minute bei dieser Temperatur gehalten. Durch schnelles Abkühlen auf die 50°C soll erreicht werden, dass sich möglichst viele *Probe*-Moleküle auf einem vorliegenden PCR-Produkt-Einzelstrang zwischen den beiden *Primern* binden können (vgl. Anhang: Bild 14, 50°C). Da die *Probe*-Moleküle im Verhältnis zu den DNA-Einzelsträngen kleiner und somit schneller sind, haben diese einen reaktions-technischen Vorteil. Die beiden PCR-Produkt-Einzelstränge streben zwar auch danach sich

wieder zusammen zu lagern, sind aber aufgrund ihrer Größe - im Vergleich zur Bildung eines Komplexes aus einem PCR-Produkt-Einzelstrang und einer kurzen *Probe* - benachteiligt.⁹

Die Vorbereitung für die Schmelzkurvenanalyse ist abgeschlossen. Es ist eine maximale Fluoreszenz-Emission (FE) mit einer CCD-Kamera im LightCycler® Instrument messbar, da möglichst viele *Probe*-Moleküle auf den DNA-Strang gebunden sind.

Die Schmelzkurvenanalyse läuft jetzt an: während die Reaktionsansätze nun langsam von 50°C auf 95°C erhitzt werden, wird die Fluoreszenz pro Anstieg der Temperatur um 0,1°C/sek gemessen. Allmählich brechen die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen *Probe* und DNA aufgrund von Temperaturerhöhung auf. Die *Probe* beginnt sich von ihrem PCR-Produkt-Strang los zu lösen (vgl. Anhang: Bild 14, 57°C). Je nachdem, ob zwischen *Probe* und DNA ein *match* oder *missmatch* vorliegt, löst sich die *Probe* bei unterschiedlichen Temperaturen ab. Liegt ein *match* vor, so ist die Bindung sehr stabil und hitzebeständig, die *Probe* haftet sehr lange auf der Zielsequenz und fluoresziert (vgl. Anhang: Bild 14, Allel 1). Die Bindungsart eines *missmatches* ist in Folge einer Basenfehlpaarung sehr instabil, das *Probe*-Molekül löst sich schon früher ab, die Fluoreszenz erlischt (vgl. Anhang: Bild 14, Allel 2). Je höher die Temperatur, desto mehr *Probe*-Moleküle gehen frei in die Lösung über, desto weniger *Probe* leuchtet noch. Das Ganze ist nun wie eine einfache chemische Reaktion zu betrachten, die über die Temperatur gesteuert wird.

Komplex [(PCR-Produkt-Einzelstrang)+(Probe)] ----- > freier Einzelstrang + freie Probe

Bei 50°C liegt das Gleichgewicht sehr weit auf der linken Seite, es ist eine maximale FE messbar. Bei >90°C liegt das Gleichgewicht auf der rechten Seite, da sich die *Probe* aufgrund der nun hohen Temperatur frei in Lösung befindet und keine Fluoreszenz emittiert (vgl. Anhang: Bild 14, 90°C).

2.5 Auswertung der Schmelzkurven

Die Auswertung der Analyse erfolgt mit Hilfe der Graphen, welche die FE in Abhängigkeit zur Temperatur darstellen. Diese Graphen werden Schmelzkurven genannt (engl.: *Melting Curves*). Zu Beginn weisen alle Graphen einen maximalen FE-Wert auf, da noch alle *Probe*-Moleküle gebunden sind. Mit steigender Temperatur löst sich immer mehr Sensorsonde und die Fluoreszenz erlischt zunehmend, der Graph fällt (vgl. Anhang: Bild 15).

Am Wendepunkt der aufgezeichneten Schmelzkurve sind dann noch 50 Prozent der Sensorsonden an die Ziel-DNA gebunden (Komplex - linke Seite) und 50 Prozent abgelöst (freie Produkte - rechte Seite).⁹ Die Temperatur am Wendepunkt der Schmelzkurve wird als Schmelztemperatur (T_m) der Sonde bezeichnet (vgl. Anhang: Bild 15). Jedes DNA-Produkt hat seinen eigenen spezifischen Schmelzpunkt.

Für eine bessere Auswertung wird computergestützt die negative Ableitung der Fluoreszenz nach der Temperatur berechnet und als die sog. abgeleitete Schmelzkurve graphisch dargestellt. Die Schmelztemperatur einer Sonde ist dann durch ein Maximum gekennzeichnet, den sog. *Melting Peak* (vgl. Anhang: Bild 15). Meist ist die Probe so konzipiert, dass sie mit der DNA-Sequenz ohne SNP ein *match* ausbildet. Dieser führt aufgrund der sehr stabilen Bindung zu einem hohen T_m , der *Peak* steht weit rechts (vgl. Anhang: Bild 16, rechts Allel B/B). Befindet sich unter der Sensorsonde in der Ziel-DNA eine Mutation, so kommt es dort zu einem *missmatch*, die *Probe* löst sich früher ab, die T_m der Sensorsonde verschiebt sich somit zu niedrigeren Temperaturen (vgl. Anhang: Bild 16, links Allel A/A). Anhand der Verschiebung der *Peaks* und dem Vergleich der unterschiedlichen T_m -Werte kann dann bestimmt werden, ob ein *match* oder ein *missmatch* vorliegt.¹⁰ Liegt ein *missmatch* vor, so weist die DNA-Sequenz ein SNP auf. Bei heterozygoten DNA-Proben liegen zwei verschiedene Allele vor und entsprechend werden zwei Schmelzpunkte gemessen (vgl. Anhang: Bild 16, Mitte Allel A/B). Die unterschiedlichen Schmelztemperaturen stehen dann charakteristisch für je einen Genotypen (vgl. Anhang: Bild 16, T(1)=Allel A/A homozygot, T(2)=Allel B/B homozygot, T(1)T(2)=Allel A/B heterozygot).

2.6 Das LightCycler® 480 Instrument

Das LightCycler® Instrument ist ein PCR-Gerät zur Quantifizierung der DNA. Des Weiteren ermöglicht es die Erstellung von Schmelzkurvenanalysen, die auf Fluoreszenz-Emission basieren und der Detektion von SNPs dienen. Der LightCycler® besteht aus einem Thermocycler, einer optischen Einheit (engl.: Optics), einer Xenon-Lampe (engl.: Lamp Unit), einer CCD-Kamera, einem Netzteil (engl.: Power Supply) und einem Probenkarussell (engl.: Multiwell Plate, Loading Slot) (vgl. Anhang: Bild 17).^{8(S.4)} Das Probenkarussell fasst 96 Kapillaren mit einem maximalen Fassungsvermögen von 20µl. Raumluft wird mit Hilfe eines Ventilators in das Gerät geleitet und durch eine Heizspirale erwärmt. Während der PCR-Schritte reguliert der Thermocycler die zuvor in der zugehörigen Software (LightCycler® 480 Software Release 1.2.0.0625) eingestellten Temperaturen. Die Optische Einheit (vgl. Anhang: Bild 18) besteht aus einem Filter, der das Licht der Xenon-Lampe filtriert (engl.: Excitation filter wheel) und nur linear polarisiertes Licht von 483nm auf das Probenkarussell mit den Kapillaren schickt.^{8(S.7)} Das Reaktionsgemisch wird in eine Platte mit 96 Kapillaren gegeben, die auf das Probenkarussell gestellt wird. Gebündelt trifft das Licht auf die Kapillarspitze und regt das Fluoreszein an. Mittels einer CCD-Kamera werden Fluoreszenz-Quanten (533nm), die von der Kapillarspitze ausgehen gemessen.^{8(S.7)} Um eine einwandfreie Detektion zu gewährleisten, befindet sich in der optischen Einheit vor der Kamera ein Filter (engl.: Detection filter wheel), der nur Licht der Wellenlänge 533nm passieren lässt.^{8(S.6)}

Abhängig von der Anzahl der Zyklen dauert eine vollständige PCR weniger als eine Stunde, die Schmelzkurvenanalyse je nach Einstellung der Temperaturschritte ca. zehn Minuten.

3. Schlüsselproteine für den Arzneimittelmetabolismus

Es gibt in unserem Genom etwa ein Dutzend Proteine, die sich auf die Verstoffwechslung von Medikamenten, dem sog. Arzneimittelmetabolismus auswirken.^{4(S.7)} So wird die Geschwindigkeit, mit der Medikamente aus dem Körper eliminiert werden, durch die Aktivität der Arzneimittel abbauenden Enzyme bestimmt. Als Ursache für die von Patient zu Patient sehr unterschiedliche Intensität und Dauer von Wirkungen und Nebenwirkungen eines Medikaments, bei gleicher Dosierung, gilt die Variabilität der Funktion der ZytochromP450-Enzyme.^{3(S.497)} Diese Enzyme katalysieren den Metabolismus einer Anzahl klinisch relevanter Medikamente und gelten somit als Schlüsselproteine.

3.1 Die ZytochromP450 - Enzymfamilie

Die ZytochromP450-Enzymfamilie (engl.: Cytochrome, kurz CYP)^{3(S.500)} spielt im menschlichen Körper eine herausragende Rolle als Teil der Biotransformation.^{3(S.498)} Hierunter versteht man die Aktivierung und Deaktivierung von Fremdstoffen und endogenen Substanzen.¹² Dies geschieht, indem in der Leber wasserunlösliche in wasserlösliche, inaktive Substanzen umgewandelt und vom Organismus ausgeschieden werden.¹² „Biochemisch gesehen handelt es sich hierbei um Monooxygenasen, die in der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert sind.“^{13(S.4)} Variationen in den Genen der ZytochromP450-Enzyme tragen maßgeblich zur interindividuellen Variabilität der Kinetik von ca. 30 Prozent aller in der Leber verstoffwechselten Arzneimittel bei.^{6(S.506)} „Mutationen im Zytochrom-P450-Gen führen zu verminderter oder fehlender Synthese des Enzyms in der Leber.“^{3(S.498)} Erhalten Patienten mit Enzymdefekten (vgl. Kapitel 2) - ausgehend durch Mutationen - die zum völligen Funktionsverlust oder einer erheblich herabgesetzten Aktivität des Enzyms führen, die Standarddosis eines Medikaments, kommt es zur Kumulation (Anreicherung eines Medikamentes im Körper)⁹ des Organismus. Daraus resultieren verstärkte Wirkungen, Nebenwirkungen oder Toxizität.^{3(S.498)} Beim Menschen konnten bis heute 49 SNPs in Genen des CYP-450-Systems identifiziert werden.^{13(S.5)}

3.2 Das ZytochromP450 2C9 (CYP2C9) – Enzym

Das Enzym CYP2C9 gehört zur zweiten Genfamilie-CYP2C der ZytochromP450-Enzymfamilie.^{3(S.501)} Es katalysiert den Arzneimittelmetabolismus der Medikamente: *Warfarin*, *Diclofenac*, *Celecoxib* und *Tolbutamid* (vgl. Anhang: Bild19).^{3(S.500)} Genetische Varianten in den Genen von dem primär in der Leber lokalisierten CYP2C9-Enzym tragen maßgeblich zur interindividuellen Variabilität der Kinetik von 30 Prozent aller in der Leber verstoffwechselten

Arzneimittel bei.^{3(S.501)} Das CYP2C9 Gen setzt sich aus insgesamt neun Exons zusammen und kodiert für ein Hämprotein von 490 Aminosäuren.¹²

3.3 Genprodukte des CYP2C9 Enzyms

Unser Erbgut besitzt einen doppelten Boden, d.h. jede Doppelhelix ist zweimal vorhanden. Bei der Befruchtung der Eizelle wird an uns je eine DNA von mütterlicher und väterlicher Seite vererbt. Eventuell vorhandene SNPs werden folglich auch weitervererbt. Der Genotyp beschreibt die Gesamtheit der Erbfaktoren eines Lebewesens^{2(S.17)} und richtet sich somit nach dem der Eltern.

Im CYP2C9 kodierenden-Gen, Exon3 Abschnitt 430 können drei verschiedene Genotypen auftreten (vgl. Anhang: Bild 20):

Im ersten Fall spricht man von einem homozygoten Wildtyp, da die Basenabfolge in beiden Allelen C/C der natürlichen entspricht. Der Normalfall bei der weißen, mitteleuropäischen Bevölkerung ist Wildtyp/Wildtyp. Personen mit jenem Genotyp können ein von diesem Enzym verstoffwechseltes Medikament mit schneller Geschwindigkeit metabolisieren, man bezeichnet sie phänotypisch als sog. schnelle Metabolisierer (engl.: *Extensive Metabolizer*).^{5(S.1965)}

Der zweite Fall charakterisiert einen heterozygoten Genotyp, da zwei unterschiedliche Allele C/T vorhanden sind. Ein DNA-Strang enthält eine mutierte Base, der zweite Strang entspricht dem Wildtypen, somit ist diese DNA heterozygot Mutant/Wildtyp. Hier kann nur noch teilweise ein intaktes Protein gebildet werden, für den Metabolismus von Medikamenten bedeutet dies, dass dieser langsamer als bei den *Extensive-Metabolizer* verläuft. Solche Personen werden phänotypisch als intermediäre Metabolisierer (engl.: *Intermediate Metabolizer* bezeichnet).^{4(S.8)}

Im dritten Fall liegen zwei mutierte DNA-Stränge T/T vor, dies charakterisiert einen homozygot Mutanten Genotyp. Da das mutante Genmaterial nicht der Normalform entspricht, kann kein intaktes CYP2C9 Enzym gebildet werden (vgl. Kapitel 2). Medikamente, welche von diesem Enzym metabolisiert werden, können nicht schnell genug abgebaut werden.^{4(S.8)} Folgen: (vgl. Kapitel 3.1) Sie werden phänotypisch als sog. langsame Metabolisierer (engl.: *Poor-Metabolizer*) bezeichnet.^{5(S.1965)} Es würde eine deutlich geringere Dosis des Medikaments als gewöhnlich ausreichen, um die selben therapeutischen Wirkungen wie bei Personen mit dem Wildtyp Genotyp zu erzielen.⁹

Der sog. CYP2C9-*Poor-Metabolizer* wird durch zwei Punktmutationen bedingt, die zum Austausch der Aminosäuren:

Arg144 zu Cys144 durch Austausch der Base 430 C zu T¹¹ (CYP2C9 Exon3, auch CYP2C9*2 genannt) und

Ile359 Leu359 durch Austausch der Base 1075 von A zu C¹¹ (CYP2C9 Exon7, auch CYP2C9*3 genannt) führen.^{3(S.501)}

„Die Allelfrequenzen in der deutschen Bevölkerung liegen bei elf Prozent bzw. sieben Prozent. Homozygote Träger, die den Phänotyp des *Poor-Metabolizer* ausmachen, kommen mit 3,2 Prozent vor.“^{6(S.507)}

4. Material und Methoden

Es gilt nun herauszufinden, welcher Genotyp in einem kodierenden Gen vorliegt, dessen Genprodukt ein Schlüsselprotein für den Arzneimittelmetabolismus ist. Hierfür werden die sog. Exons eines Genabschnittes untersucht, da diese der Teil der DNA sind, die ein funktionelles Protein entstehen lassen.

In dieser Arbeit sollen zwei Exons des für den Arzneimittelmetabolismus relevanten Schlüsselprotein CYP2C9 auf mögliche Mutationen untersucht werden, d.h. es wird durch diesen Versuch herausgefunden, welcher Genotyp im Cyp2C9-kodierenden Gen vorliegt. Je nach vorhandenen SNPs wird die Aminosäuresequenz des Proteins verändert. Daraus folgt, dass entweder ein intaktes-, ein herabgesetztes- oder kein korrektes CYP2C9 Enzym gebildet werden kann. Diese unterschiedliche Enzymtätigkeit - mit den daraus resultierenden Folgen für die Geschwindigkeit, mit der ein durch das CYP2C9 Enzym verstoffwechseltes Medikament im Körper metabolisiert werden kann - gibt Auskunft darüber, wie gut dieser Arzneistoff wirkt.

In den nun folgenden Versuchen wird der Abschnitt Exon3 (Ex3) und Exon7 (Ex7) des CYP2C9 Enzyms untersucht. Das DNA-Material, das sog. *Template* stammt von 96 anonymen Spendern. Die Sequenzanalyse des CYP2C9-kodierenden Gens erfolgt mittels der Genotypisierungsmethode mit fluoreszenzmarkierten Sonden. Hierzu wird das DNA-Material zuerst durch die PCR-Amplifikation vervielfältigt und anschließend mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse ausgewertet. Um diesen Genotypisierungsprozess durchführen zu können wird folgender Reaktionsansatz benötigt:

4.1 Herstellung des Reaktionsansatzes

Für den Genotypisierungsprozess ist ein Reaktionsansatz nötig, der sowohl als Nährmedium für die PCR-Amplifikation dient, als auch für die Schmelzkurvenanalyse geeignet ist. Der Reaktionsansatz enthält noch kein DNA-Material und wird als *Puffer* bezeichnet.

Der Ansatz für die beiden Versuche in Exon3 und Exon7 unterscheidet sich nur in den zugegebenen *Primern*. Es werden für jeden DNA-Abschnitt individuelle Primer benötigt, die zu den Basen – links (*forward primer*) und rechts (*reverse primer*) - der zu untersuchenden Sequenz komplementär sind. So wird nur die gewünschte Sequenz des DNA-Materials

vervielfältigt, um auf vorhandene SNPs untersucht werden zu können (vgl. Anhang: Bild1). Die DNA-Polymerase, sowie die Nukleotide sind im *HP Master-Mix* enthalten. Wasser wird benötigt, damit ein für die Enzyme optimaler pH-Wert herrscht.¹²

Ansatz für 96 Kapillaren à 18µl:

<i>HP Master-Mix</i>	10µl	x	96	=	960µl
<i>Forward primer</i>	2µl	x	96	=	192µl
<i>Reverse primer</i>	2µl	x	96	=	192µl
<i>Probe</i>	2µl	x	96	=	192µl
H ₂ O	2µl	x	96	=	192µl
ε	18µl	x	96	=	1728µl

4.2 Das PCR-Protokoll

In der Software des LightCycler® Instruments muss vor Beginn der PCR-Amplifikation die Anzahl, sowie die Temperaturen der einzelnen PCR-Zyklen und der Schmelzkurvenanalyse festgelegt werden. Ein Zyklus setzt sich aus den drei Schritten der PCR zusammen.

Die PCR-Zyklen werden wie folgt festgelegt:

10' (min) bei 95°C: Enzyme werden aktiviert	} x 45 Zyklen
15" (sek) bei 95°C: Trennung des DNA-Doppelstranges	
15" (sek) bei 58°C: Anhaften der Primer auf den DNA-Einzelstrang	
15" (sek) bei 72°C: Verlängerung der DNA als Doppelstrang	

anschließend erfolgt die Schmelzkurvenanalyse:

1' (min) bei 95°C:	Trennung der DNA-Doppelstränge
1' (min) bei 50°C:	Anhaften der Probe
danach um 0,1°C/sek. bis auf 95°C:	Probe schmilzt ab
abkühlen auf 40°C:	Abkühlphase

4.3 Genotypisierung eines Polymorphismus im Cyp2C9 Enzym Exon3

Der Versuch genotypisiert das Cyp2C9-Enzym kodierende Gen auf Exon3, Base 430 hinsichtlich eines Polymorphismus.

Es werden 96 Kapillaren mit je 18µl des Reaktionsansatzes mit Hilfe einer Pipette befüllt. Zur einfacheren Handhabung sind die 96 Kapillaren nebeneinander in eine Plastikplatte eingepreßt. Die Nummerierung der Kapillaren erfolgt von links nach rechts, Zeile für Zeile. Es wird noch 2µl genetisches Material, das sog. *Template* hinzugegeben, in jede Kapillare das

DNA-Material einer anderen Person. *Puffer* und *Template* zusammen ergeben das Reaktionsgemisch. Es befindet sich in jeder Kapillare 20µl *Sample* (18µl *Puffer* + 2 µl *Template*).

Die Platte mit den Kapillaren wird mit einer Folie verklebt, um Verdunstung zu verhindern. Anschließend wird die Platte zentrifugiert, um die Reagenzien gut zu vermischen und auf das Probenkarussell des LightCyclers® gestellt. Der PCR-Lauf beginnt, die Schmelzkurvenanalyse erfolgt direkt im Anschluss.

Auswertung:

Zu Beginn der Analyse bei 50°C weisen alle Graphen einen maximalen FE-Wert auf (vgl. Anhang: Bild 21). Mit Zunahme der Temperatur bis 56°C ist nur ein minimales Absinken aller Graphen erkennbar, ab diesem Zeitpunkt fallen die roten Graphen schnell von ca. 12 – 16 FE auf 10 – 14 FE bei 58°C ab (vgl. Anhang: Bild 22). Der erste Schmelzpunkt (T_m) der roten Graphen liegt bei ca. 57°C. Ab hier ist eine Stagnation im Abfall der Graphen erkennbar. Erst beim zweiten T_m , bei ca. 64,5°C fallen die roten Graphen erneut rapide auf 6 – 8 FE ab, wo die Graphen ihr Minimum erreicht haben.

Die blauen Graphen fallen bis zur Temperatur von ca. 63°C nur langsam, übersteigen sie diesen Wert, fallen sie schneller - je nach Ausgangswert der FE von 11 – 15 FE, einheitlich auf 7 – 8,5 FE bei 65,5°C - ab (vgl. Anhang: Bild 23). Der T_m der blauen Graphen liegt bei 64,5°C. Das unterschiedliche Ausgangsniveau und der leicht unterschiedliche Kurvenverlauf sind abhängig von der Menge an genetischem Material zu Beginn der Analyse. Unabhängig von der Menge an vorhandenem *Template* weisen alle Graphen des selben Genotyps einen identischen T_m auf (vgl. blauer Graph, beginnend bei 4 FE).

4.4 Genotypisierung eines Polymorphismus im CYP2C9 Enzym Exon7

Dies ist der zweite Versuch, der analog zum Versuch in Exon3 durchgeführt wird. Hier wird der Abschnitt Exon7 des CYP2C9 Enzyms auf eine Mutation in Base 1075 untersucht.

Es wird mit dem selben Reaktionsgemisch wie im ersten Versuch gearbeitet, nur die *Primer* sind zu Basen in Exon7 links und rechts zur Base 1075 komplementär. Die *Templates* werden analog zur Belegung im Versuch in Exon3 in die Kapillaren auf der Platte pipettiert.

Auswertung:

Zu Beginn ist wieder ein maximaler FE-Wert bei allen Graphen erkennbar (vgl. Anhang: Bild 24). Nur der grüne Graph weist kaum FE auf, da zu wenig *Template* vorhanden war.

Die roten Graphen fallen bis zur Temperatur von ca. 60°C nur langsam, übersteigen sie diesen Wert, fallen sie schnell von ca. 12 – 15 FE auf 9 – 13 FE bei 62°C ab (vgl. Anhang: Bild 25). Der erste T_m der roten Graphen liegt somit bei 61°C. Ein zweiter schneller Abfall

von FE ist ab 66°C erkennbar. Am Flachpunkt des Abfalls der FE liegt der zweite Tm der roten Graphen mit 67°C.

Die blauen Graphen fallen bis 60°C nur geringfügig, bei ca. 61°C dann am schnellsten von ca. 11 – 16 FE auf 6 – 10 FE bei 62°C (vgl. Anhang: Bild 26). Der Tm der blauen Graphen wird durch den Wendepunkt bei 61°C charakterisiert.

5. Analyse der vorhandenen SNPs anhand von Schmelzkurven

Eigentlicher Sinn der Versuche ist die Auswertung der Genotypen. Dies geschieht mit Hilfe der *Melting-Peaks*, wie in Kap.: 2.4.1 beschrieben.

Versuch in Exon3:

Im Graphen der *Melting-Peaks* (vgl. Anhang: Bild 27) in Exon3 weisen die roten Graphen zwei *Peaks* auf, bei 57°C und 64,5°C (vgl. Anhang: Bild 28). Die *Probe* ist in diesem Versuch der Bindung C/C angepasst, hier bildet sie einen *perfect match*, der *Peak* entspricht dem Tm der Sonde. Der erste *Peak* weist darauf hin, dass ein *missmatch* vorliegt, da sich die *Probe* schon vor dem Tm der Sonde ablöst. Es liegt eine mutierte Base - in diesem Fall: T - vor. Der zweite *Peak* entspricht dem Tm der Sonde, es liegt folglich die Base C an Position 430 vor. Da zwei verschiedene Allele vorliegen, ist der Genotyp T/C heterozygot.

	1. <i>Peak</i>		2. <i>Peak</i>
<i>Probe</i>	-----G-----		-----G-----
DNA	-----T-----	T/C heterozygot Mut/Wt	-----C-----
	<i>missmatch</i>		<i>match</i>

Die *Melting-Peaks* der blauen Graphen (vgl. Anhang: Bild 29) weisen einen *Peak* bei 64,5°C auf. Da dies dem Tm der Sonde bei einem *perfect match* entspricht, muss das Allel C/C vorliegen. Der Genotyp ist somit homozygot Wildtyp.

<i>Probe</i>	-----G-----		-----G-----
DNA	-----C-----	C/C homozygot Wt	-----C-----

Versuch in Exon7:

Die roten Graphen der *Melting-Peaks* für Exon7 (vgl. Anhang: 30, 31) weisen zwei *Peaks* auf, bei 61°C und 67°C. Die *Probe* ist in Exon7 der Bindung C/C angepasst, in diesem Fall also dem Mutanten, da die Wt Base 1075 in Exon7 Adenin ist. Da der erste *Peak* einen

niedrigeren T_m , als der T_m der Sonde bei 67°C aufweist, muss ein *missmatch* vorliegen. Es liegt in Allel 1 folglich A vor, da die Probe nur mit C einen *match* bilden kann. Beim zweiten *Peak* liegt ein *match* vor, also der SNP zum Mutanten C. Die roten Graphen charakterisieren einen heterozygoten Genotyp, da zwei unterschiedliche Allele A/C vorliegen.

<i>Probe</i>	-----G-----		-----G-----
DNA	-----A-----	A/C heterozygot Wt/Mut	-----C-----

Die blauen Graphen weisen einen *Peak* bei 61°C auf (vgl. Anhang: Bild 32). Somit ist der T_m der blauen Graphen niedriger als der T_m der Sonde (vgl. Anhang: Bild 30). Es liegt ein *missmatch* vor. Da jedoch nur ein *Peak* zu sehen ist, entspricht dies dem Allel A/A in beiden Gen-Loci. Der Genotyp ist homozygot Wildtyp.

<i>Probe</i>	-----G-----		-----G-----
DNA	-----A-----	A/A homozygot Wt	-----A-----

Konkret auf das CYP2C9-Enzym bezogen ergibt sich aus der Auswertung der 96 DNA-Samples, dass 19 der anonymen Probanden ein SNP in Exon3 (vgl. Anhang: Bild 33, 34) und neun ein SNP in Exon7 (vgl. Anhang: Bild 35, 36) besitzen, all jene Personen die den Genotyp heterozygot Wt/Mut aufweisen. Bei allen anderen liegt der Genotyp homozygot Wildtyp vor. Von einem Probanden konnte der Genotyp in Exon7 nicht bestimmt werden.

Bei den Probanden mit SNP kann bei der Proteinbiosynthese kein korrektes Protein gebildet werden, da der DNA-Strang in eine falsche Aminosäure übersetzt wird. Sie besitzen eine herabgesetzte Enzymtätigkeit und werden phänotypisch als intermediate Metabolisierer bezeichnet.

Weisen Personen einen SNP in Exon3 und Exon7 auf, je nachdem ob homo- oder heterozygot, so wird ihre Enzymtätigkeit des CYP2C9 Enzyms weiter drastisch herabgesetzt. Insgesamt lag bei den Versuchen ein Genmaterial auf Position 36 vor, dass in beiden Abschnitten einen heterozygoten Genotyp, also je ein mutiertes Allel aufweist (vgl. Anhang: Bild 37). Diese eine Person metabolisiert folglich durch CYP2C9 Enzyme verstoffwechselte Medikamente erheblich langsamer als die anderen Probanden. Es könnten die selben therapeutischen Erfolge mit einer deutlich geringeren Dosis der Arznei erzielt werden.

Unter allen Probanden konnte jedoch kein *Poor-Metabolizer* - der in beiden Gen-Loci zwei mutante Allele aufweist - gefunden werden.

Bezogen auf den Metabolismus eines vom CYP2C9 Enzym verstoffwechselten Medikamentes (*Warfarin, Doclofenac...*) hätten diese genetischen Unterschiede der 96 Probanden zur Folge, dass einer der Probanden sehr wahrscheinlich mit Nebenwirkungen aufgrund von Kumulation zu rechnen hätte (SNP in beiden Allelen), 27 Personen leichte Nebenwirkungen aufgrund verminderter Metabolismusgeschwindigkeit (SNP in einem Allel) und nur 67 Personen das Medikament normal verstoffwechseln könnten (vgl. Anhang: Bild 38, 39).

6. Diskussion

In dieser Versuchsreihe konnte nachgewiesen werden, dass die genetischen Unterschiede der 96 untersuchten Personen Einfluss auf den Metabolismus eines vom CYP2C9 Enzym verstoffwechselten Medikamentes ausüben. Die optimale Wirkung wäre bei mehr als einem Drittel der Personen nicht erzielt worden (vgl. Anhang: Bild 39). Eine vorausgehende Untersuchung des Genmaterials könnte eventuell durch Verabreichen eines anderen Medikamentes diesen Personen Nebenwirkungen ersparen und noch viel wichtiger: eine optimale Wirkung der Arznei garantieren.^{15(S.3)} „Durch die Berücksichtigung individueller genetischer Unterschiede könne man letztendlich erfolgreichere und preiswertere Therapien erwarten und möglicherweise sogar die Entstehung von Krankheiten verhindern.“^{15(S.1)} Es zeigt sich, dass schon heute große Pharma-Unternehmen wie Hoffman-La Roche und Pfizer bei der Suche nach neuen Wirkstoffen die Pharmakogenetik mit einbeziehen. So bringen sie erste Medikamente auf den Markt, auf deren Beipackzetteln genetische Polymorphismen als Gegenindikationen vermerkt sind. Die Gebrauchsinformation des Anti-Rheumatikums *Celecoxib* von Pharmacia vermerkt: „Patienten, die bekanntermaßen ein Cyp2C9-Enzymsystem mit verminderter Aktivität haben, sollten mit Vorsicht behandelt werden.“^{4(S.13)} „We used to think our future was in the stars. Now we know it is in our genes.“^{4(S.14)}: was die Nobelpreisträger James Watson und Francis Crick bei ihrer Entdeckung der DNA-Doppelhelixstruktur 1962 nur vage erahnen konnten und auch Friedrich Vogel schon 1958 vermutete, bewahrheitet sich: Die Zukunft der Menschheit liegt in den Genen.

Machen sich die Pharma-Konzerne diese Erkenntnis zu Nutze, wird der altbekannte Beipackzettel wohl bald überflüssig werden. So könnten wir vielleicht eines Tages mit einer genauen Sequenzanalyse unserer DNA in die Apotheke gehen (vgl. Anhang: Bild 40), um das richtige Wundermittel für unsere Wehwehchen zu bekommen. Unsere Gene wüssten dann wohl besser als der Beipackzettel, wie eine nebenwirkungsfreie Dosierung auszusehen hat...

7. Literaturverzeichnis

1. Bachmann A., Faisst K., Oggier W., Pauli-Magnus C., Probst-Hensch N., Rippe K. P., Völger M., Pharmakogenetik und Pharmakogenomik, in: TA-SWISS Studie des Zentrums für Technologiefolgen-Abschätzungen, TA 48/2004, Mai 2004, S.15 - 57
2. Bochter R., Hofmann H., Hupfer K., Biologie 1, Oldenburg Verlag, Oktober 2000, S. 74, 75, 136
3. Eichelbaum M., Marx C., Schwab M., Zanger U.M., Pharmakogenetik der Zytochrom-P-450-Enzyme, in: Deutsches Ärzteblatt 22. Februar 2002, Jg. 99, Heft 8, Stuttgart2001, S. A 497 - 508
4. Meyer-Lüerßen D., Arzneimittelforschung, in: Diagnostik im Gespräch, VDPH Verband der Diagnostica-Industrie e.V. Ausgabe 3-2002, Frankfurt am Main, September 2002, S. 6 - 14
5. PD Dr. med. Pauli-Magnus C., Pharmakogenetik und Pharmakogenomik, in: Schweizerische Ärztezeitung, Ausgabe 37-2004, Zürich 2004, S. 1963 - 1974
6. Prof. Dr. Dr. Cascorbi I., Stand der Pharmakogenomik und deren zukünftige Rolle für die Arzneitherapie, in: Der Internist, Ausgabe 4-2002, Springer-Verlag 2002, Greifswalde, S. 506 - 510

Weitere Informationsquellen:

7. Dr. Fröhlich T., Genotyping of SNPs via Fluorescent Melting Curve Analysis, PowerPoint Präsentation, Roche Applied Science, Penzberg 2002 – frei übersetzt
8. Dr. Fröhlich T., LightCycler® 480 System, PowerPoint Präsentation, Roche Applied Science, Penzberg 2003 – frei übersetzt
9. Dr. Fröhlich T., mündliche Informationen (Tel: 08856 60 6760)
10. Dr. Fröhlich T., PCR, PowerPoint Präsentation, Roche Applied Science, Penzberg 2003 – frei übersetzt
11. Seller M., Cytochrome P450 2C9 PowerPoint Präsentation, Roche Applied Science, Penzberg – frei übersetzt
12. Seller M., mündliche Informationen (Tel: -2661)

Roche-Internes Informationsmaterial:

13. Baron D., Single Nucleotid Polymorphism, Therapie nach Maß, Roche Diagnostics, Penzberg 2003
14. Gensthaler B. M., Polymorphismen, Biochips als Spürhunde, Roche Diagnostics, Penzberg
15. Lindpaintner, Roche will Medizin nach Maß, Erfolgreiche Jagd nach Erbgut-Varianten, Strategische Verzahnung von Diagnose und Therapie Roche Roundtable Genetik und Genomik, Basel Mai 2000

8. Danksagung und Erklärung

Der Firma Roche Diagnostics danke ich für Bereitstellung der Laborräume und der Materialien.

Herrn Dr. Thomas Fröhlich und seiner Mitarbeiterin Frau Monika Seller danke ich für die Einarbeitung in die Methodik und die gewährte fachliche und menschliche Unterstützung bei der Erstellung dieser Facharbeit.

„Ich erkläre hiermit, dass ich die Facharbeit ohne fremde Hilfe angefertigt und nur die im Literaturverzeichnis angeführten Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.“

_____, den _____
Ort Datum

Unterschrift des Schülers

9. Anlagen

Bild 1: Zu amplifizierender Bereich - genomic target ^{frei verändert nach 7(S.13)}

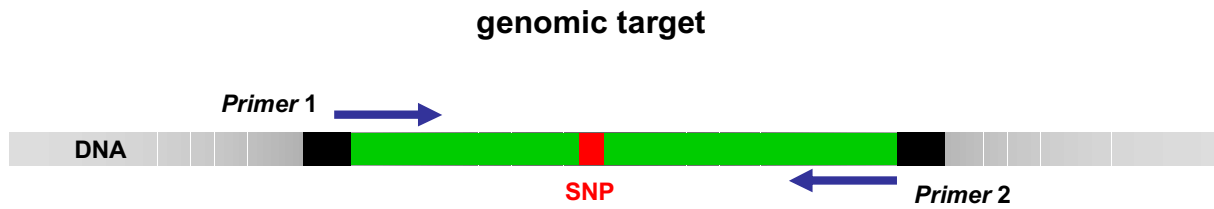


Bild 2: Trennung des DNA-Doppelstranges ^{10(S.5)}

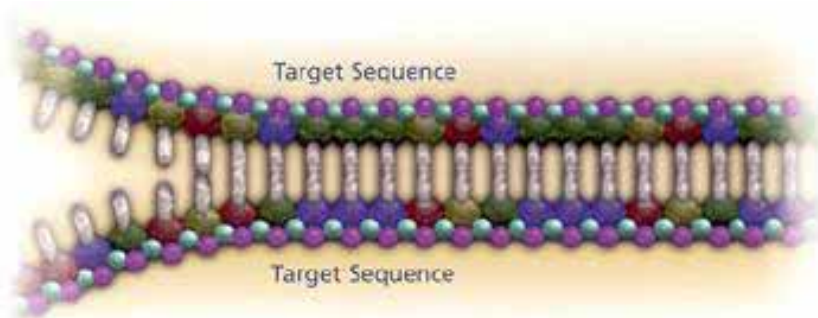


Bild 3: Anhaften der *Primer* auf die Einzelstränge ^{10(S.6)}

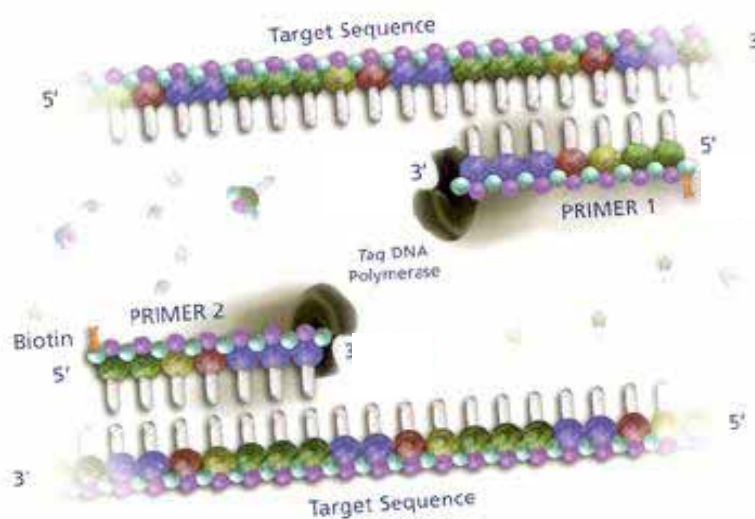


Bild 4: Auffüllen der DNA zum Doppelstrang^{10(S.7)}

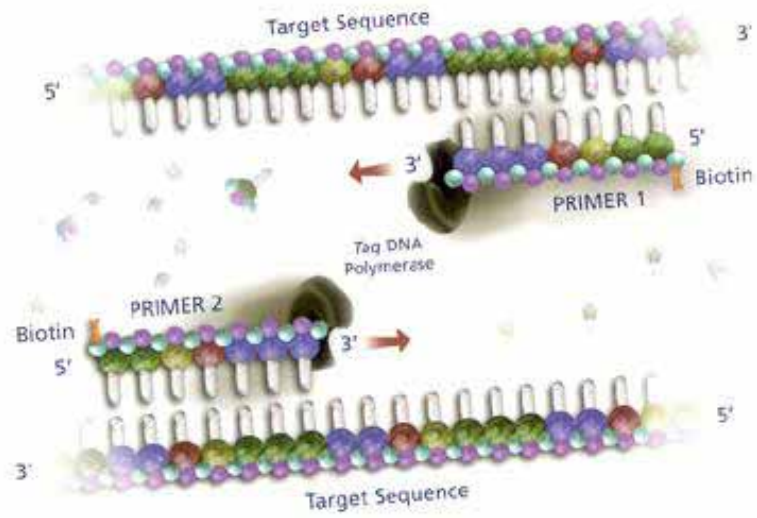


Bild 5: Neu Synthetisierte DNA-Doppelstränge^{10(S.8)}

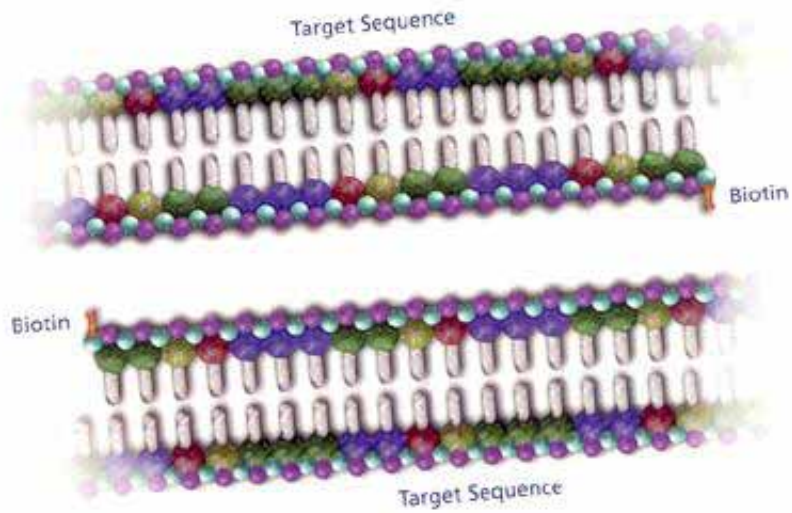


Bild 6: Schema der Exponentiellen Vervielfältigung der DNA während einer PCR^{10(S.11)}

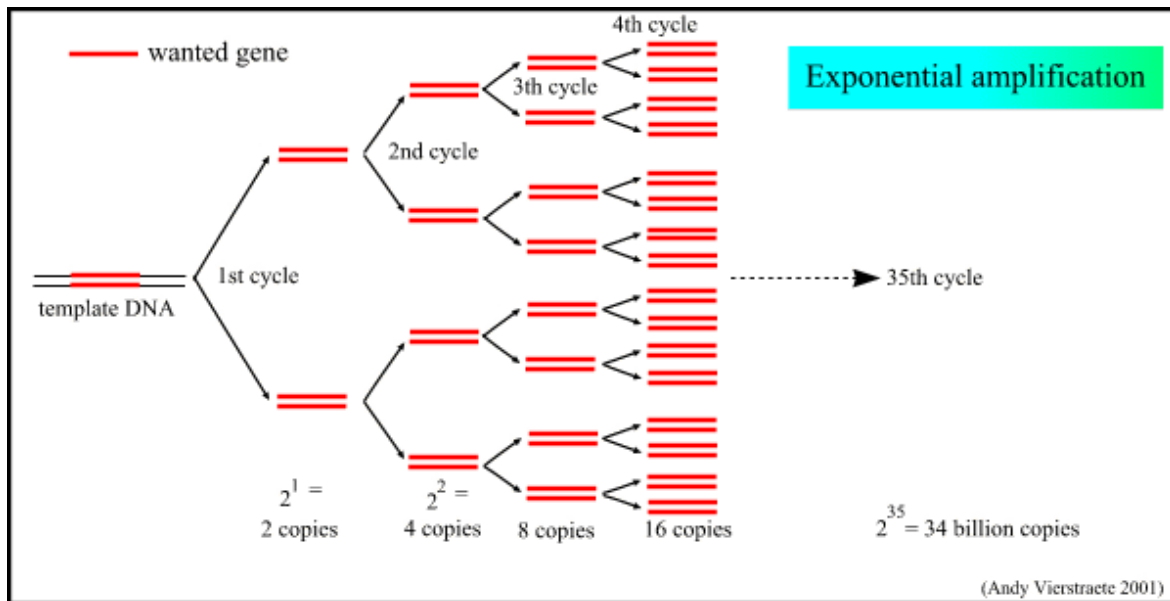


Bild 7: Das *Probe*-Molekül mit der individuellen Base X mit dem Fluoreszein, gebunden auf den DNA-Strang⁹

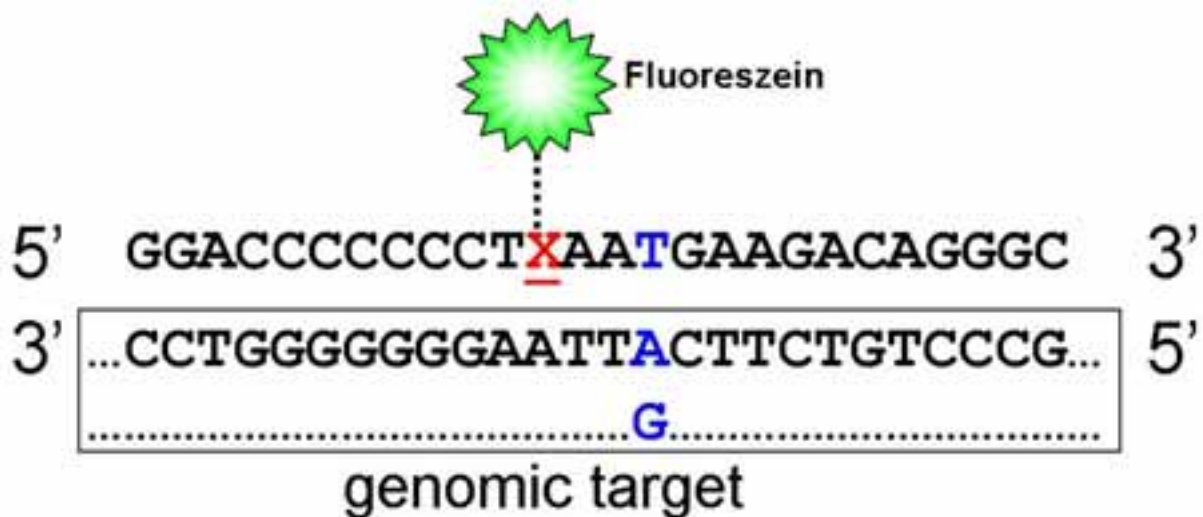


Bild 8: Prinzip der Fluoreszenz-Emission des *Probe-Moleküls*^{7(S.14)}

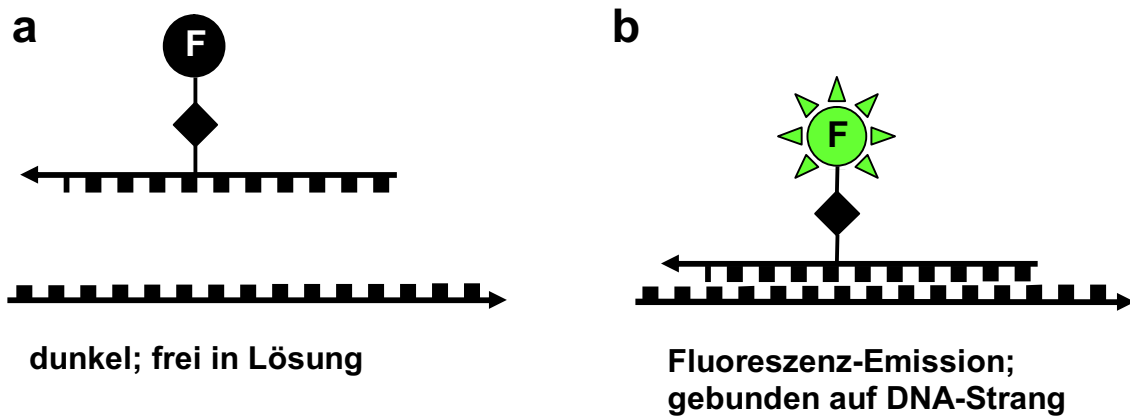


Bild 9: Aufbau des *Probe-Moleküls*^{frei verändert nach 7(S.15)}

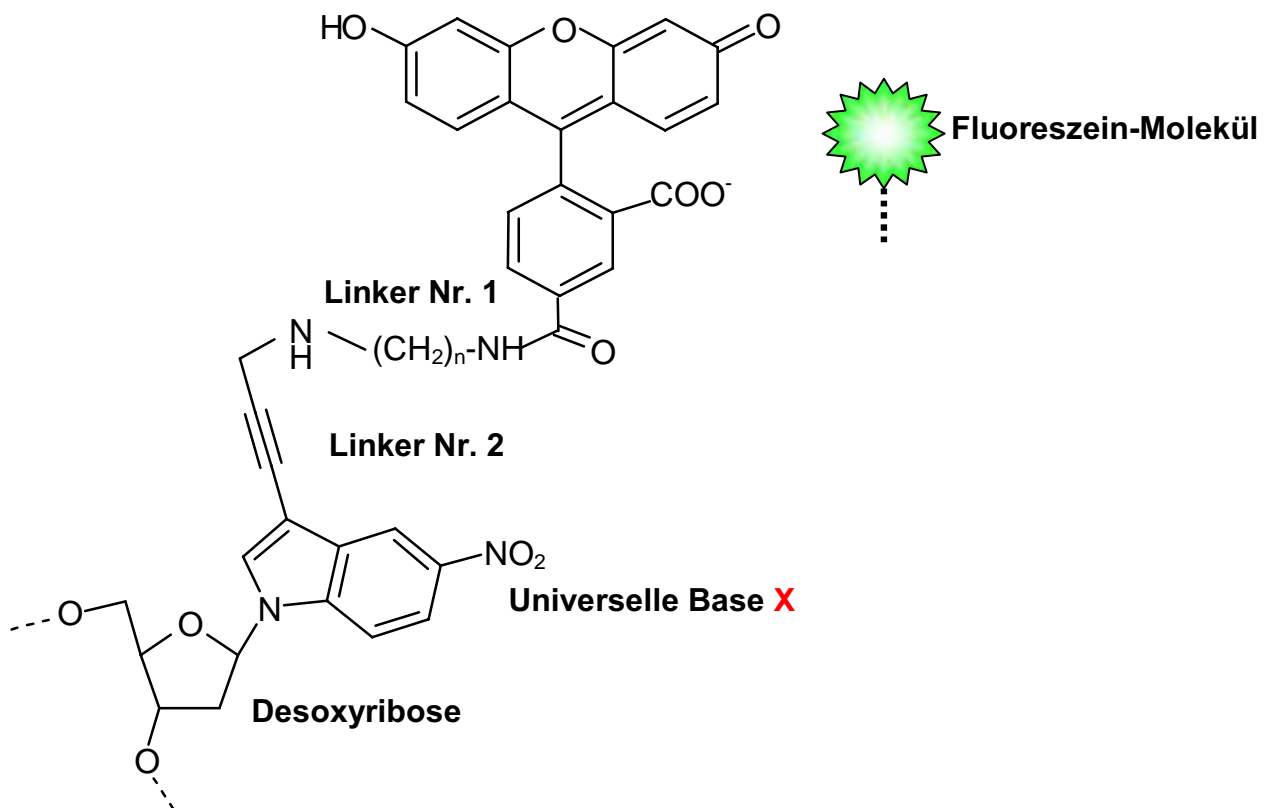


Bild 10: Prinzip der Fluoreszenz-Emission der SimpleProbe^{7(S.12)}

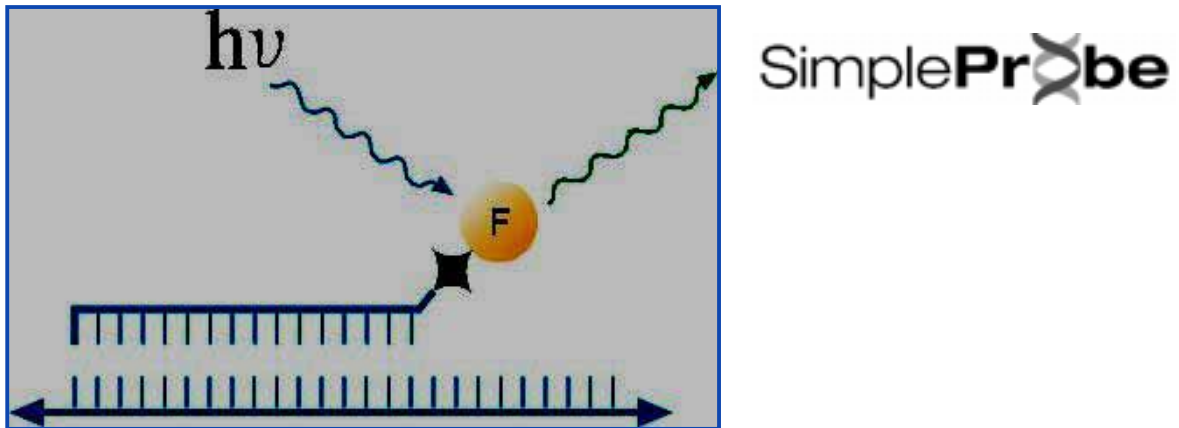


Bild 11: Energieschema der Fluoreszenz-Emission

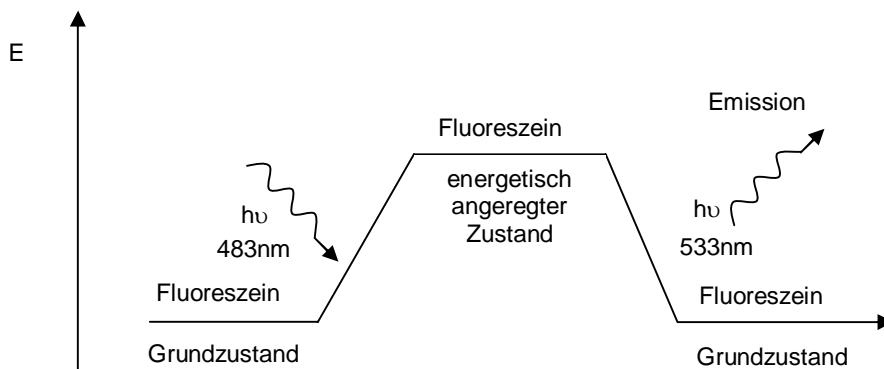


Bild 12: Entstehung eines *missmatches* durch einen SNP an dritter Stelle

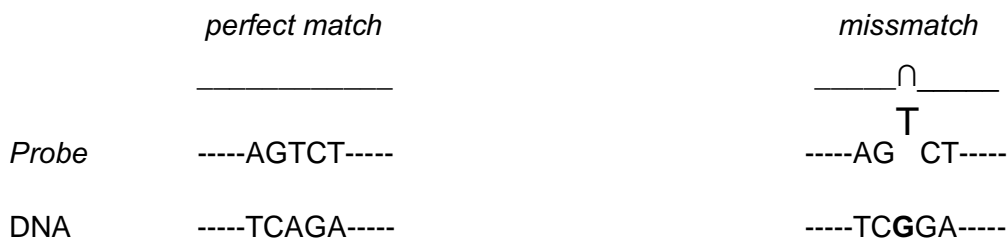


Bild 13: Schema der hybridisierung von *Probe* und DNA^{7(S.13)}



Bild 14: Schema vom Ablösen der *Probe* nach Temperaturerhöhung^{frei verändert nach 7(S.14)}

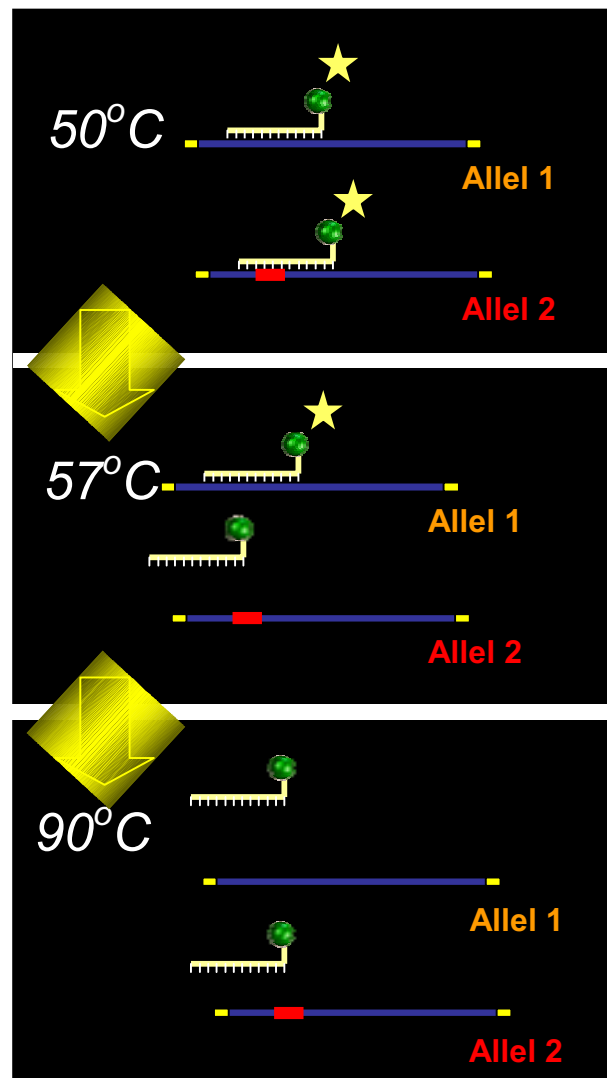


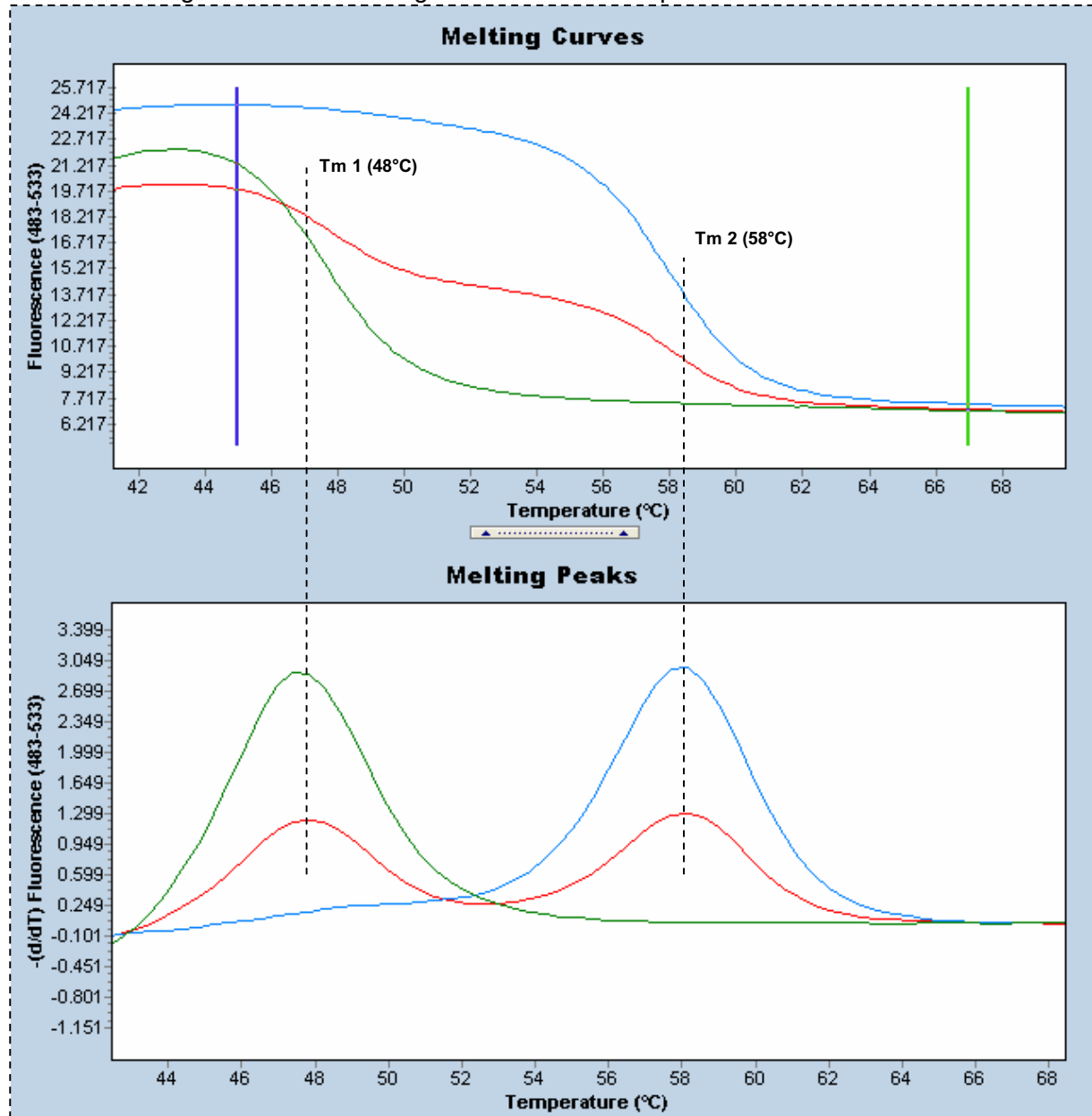
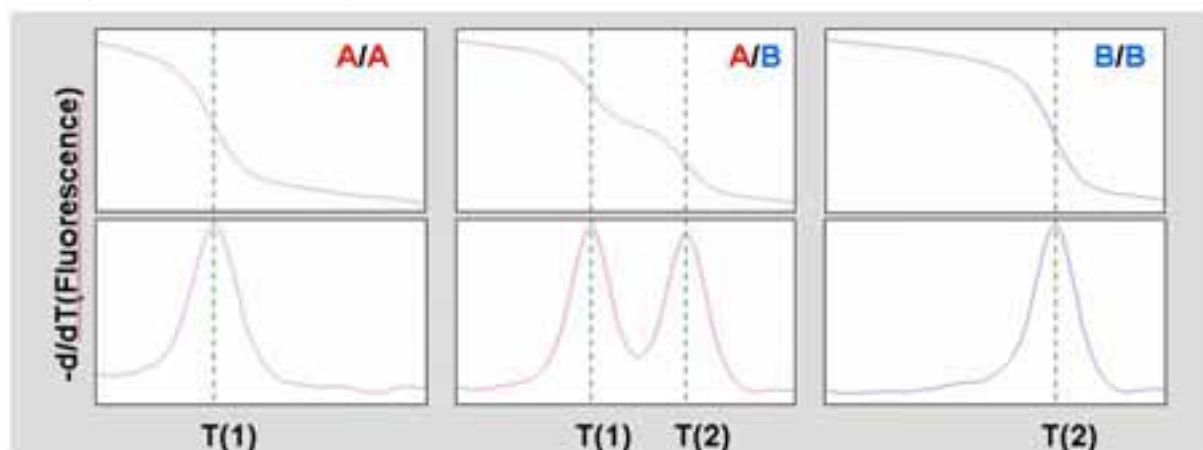
Bild 15: Melting Curves und Melting Peaks mit Schmelzpunkten T_m Bild 16: Unterschiedliche Kombinationsmöglichkeiten der Allele A und B, dargestellt in Melting Curves und Melting Peaks^{7(S.13)}

Bild 17: Aufbau des LightCycler® Instruments^{8(S.4)}

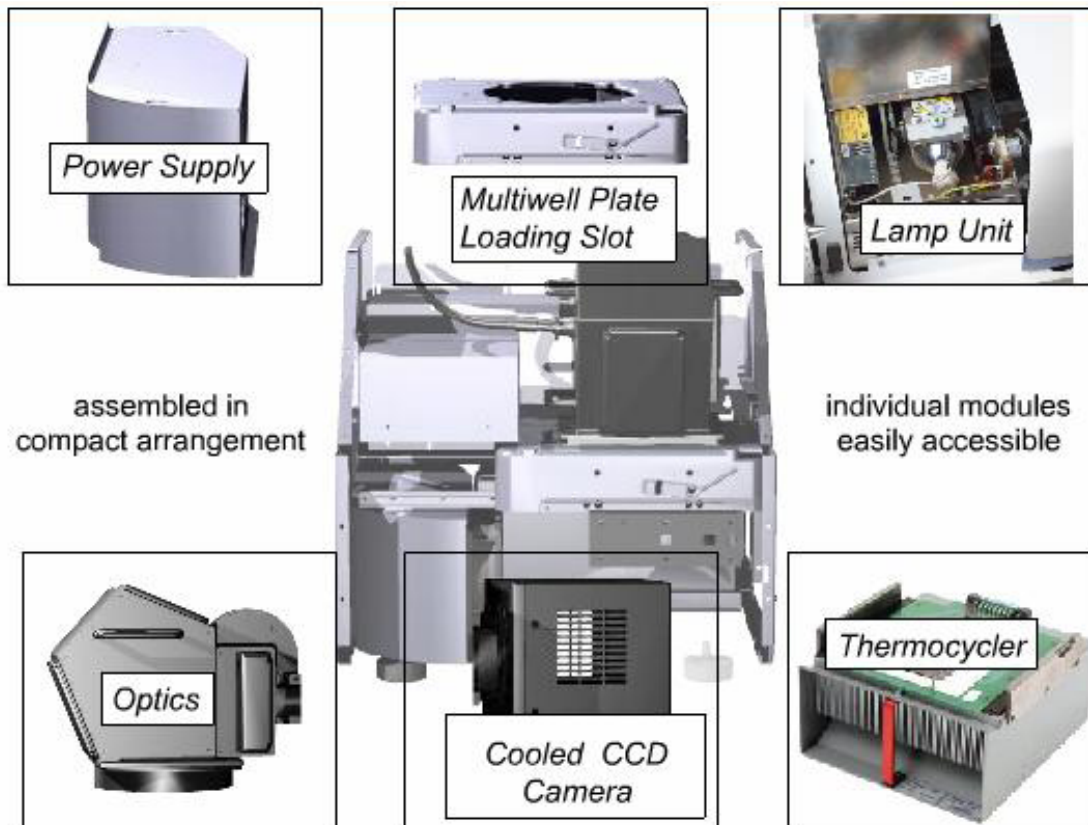


Bild 18: Optische Einheit (Optics) des LightCycler® Instruments^{8(S.6)}

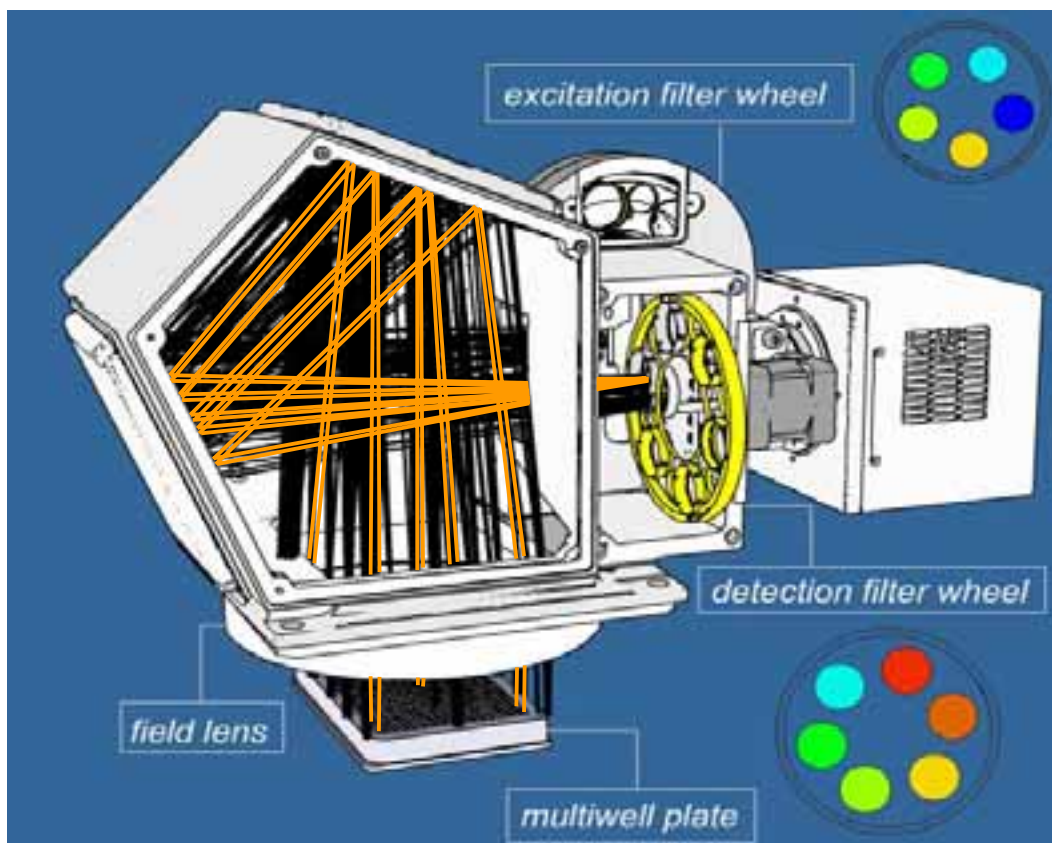


Bild 19: Systematik der menschlichen ZytochromP450-Enzyme^{3(S.500)}

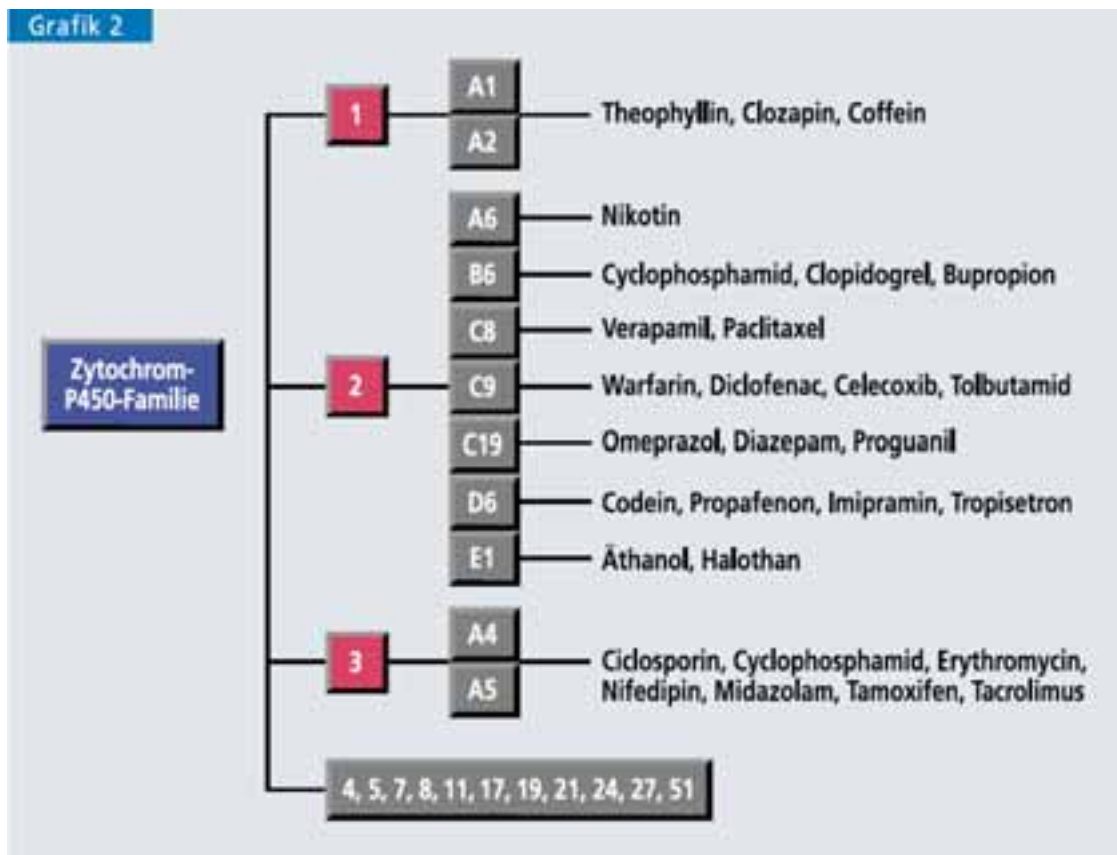
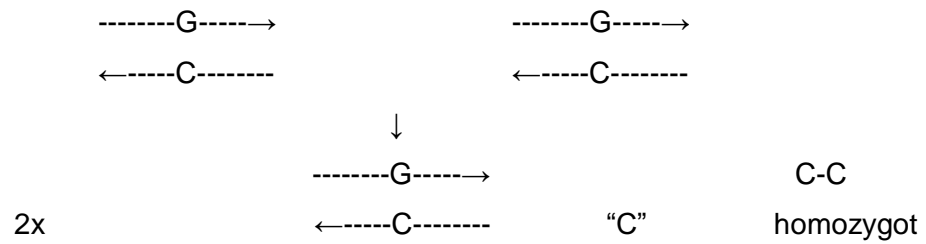
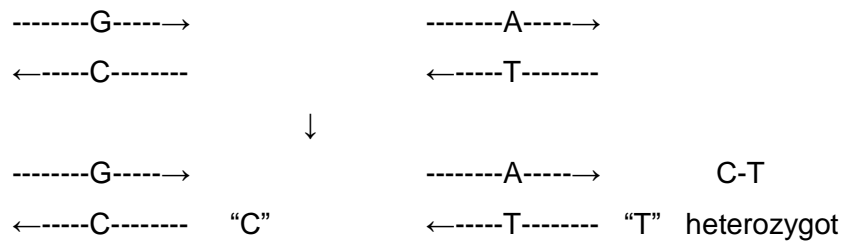


Bild 20: Mögliche Genprodukte im CYP2C9 Enzym

♀

♂

1. Fall: Von beiden Eltern erhalten wir in Exon3, Genabschnitt 430 [G C]

2. Fall: Von einem Elternteil erhalten wir an dieser Stelle [G C],
vom anderen Elternteil jedoch [A T].

3. Fall: Von beiden Elternteilen erhalten wir [A T].

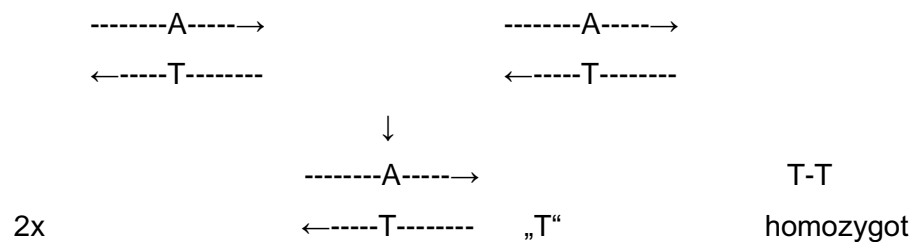


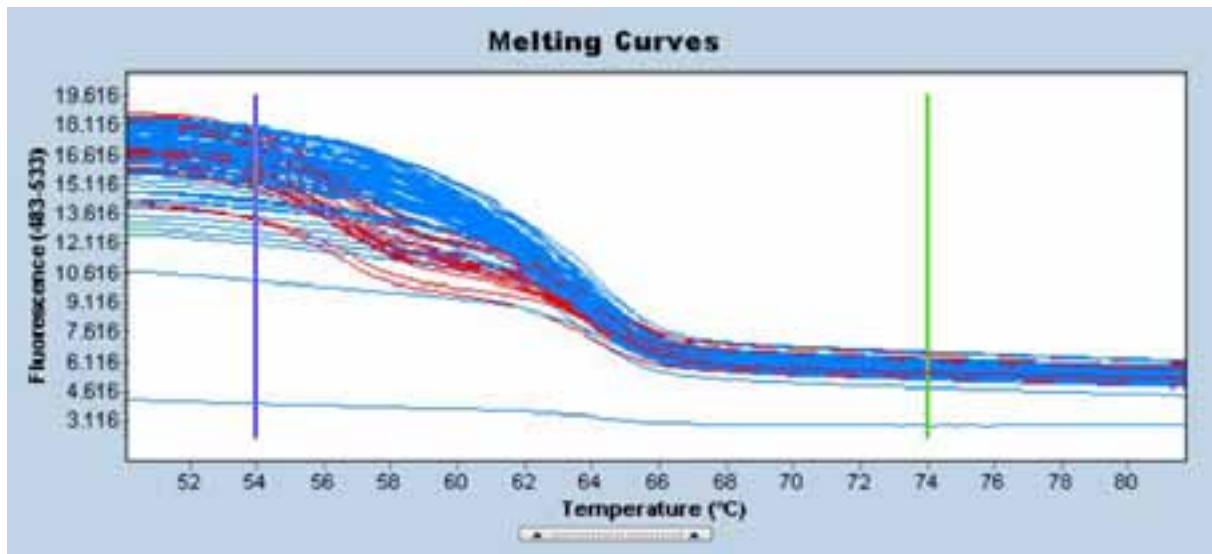
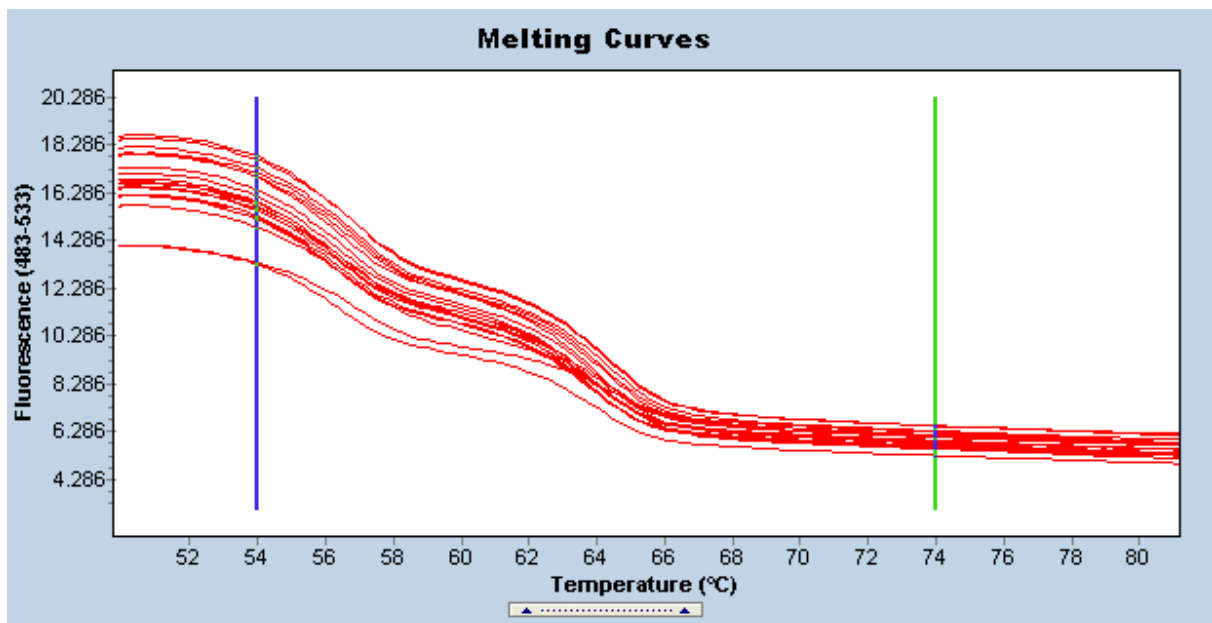
Bild 21: *Melting Curves* Exon3 – gesamt**Bild 22:** *Melting Curves* Exon3, rote Graphen - heterozygot

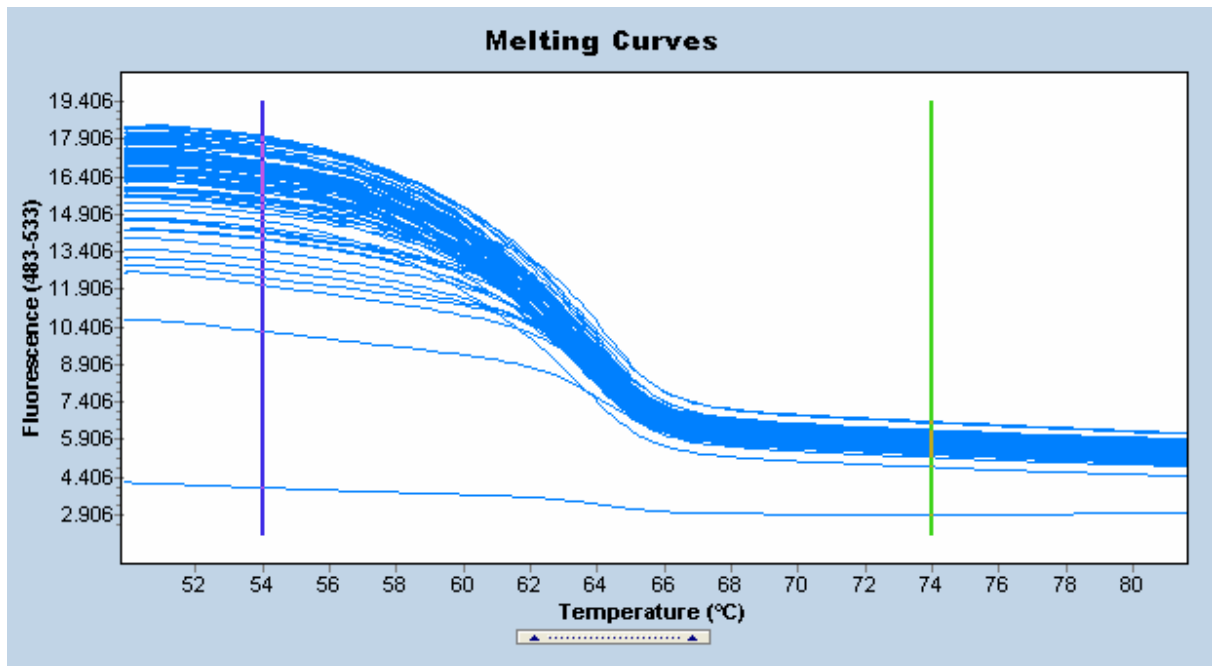
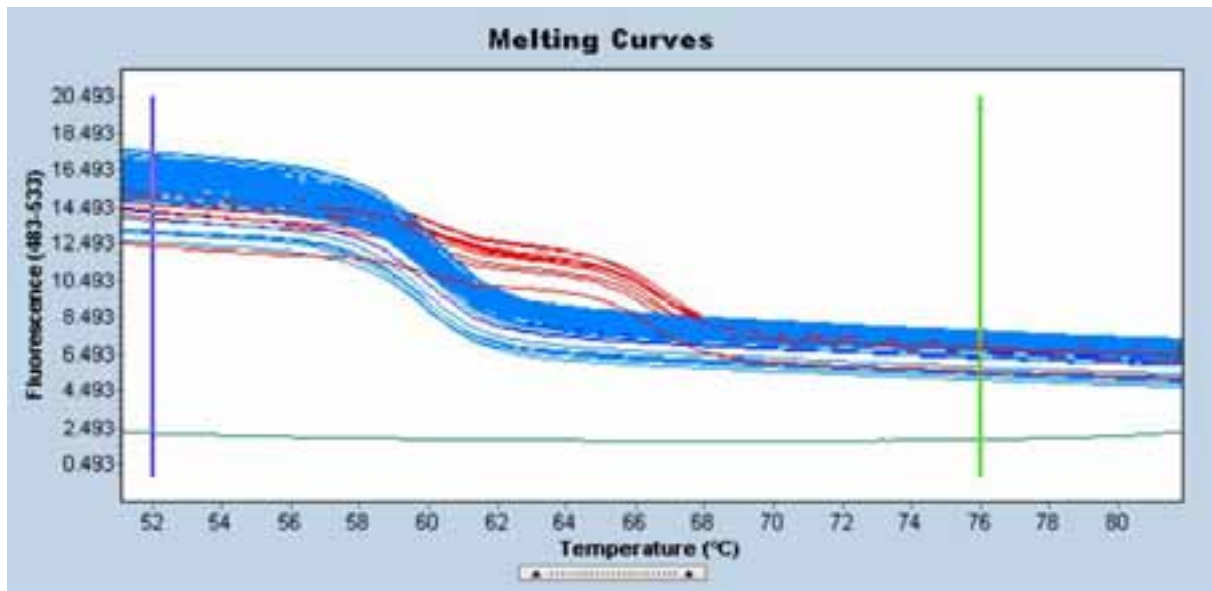
Bild 23: *Melting Curves* Exon3, blaue Graphen - homozygot**Bild 24:** *Melting Curves* Exon7 – gesamt

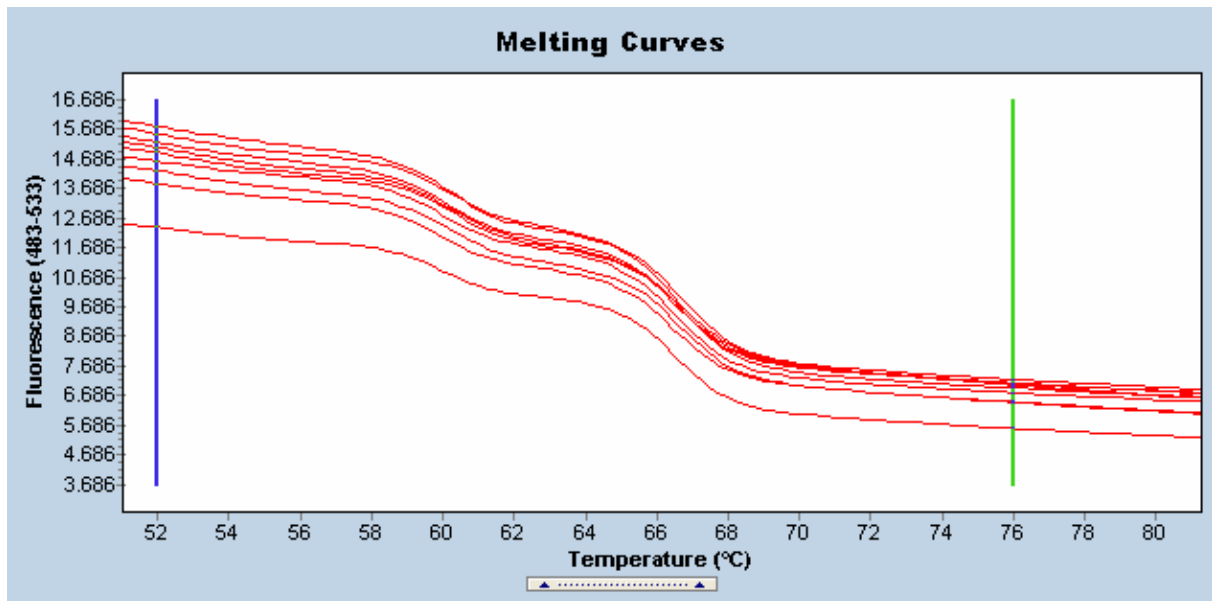
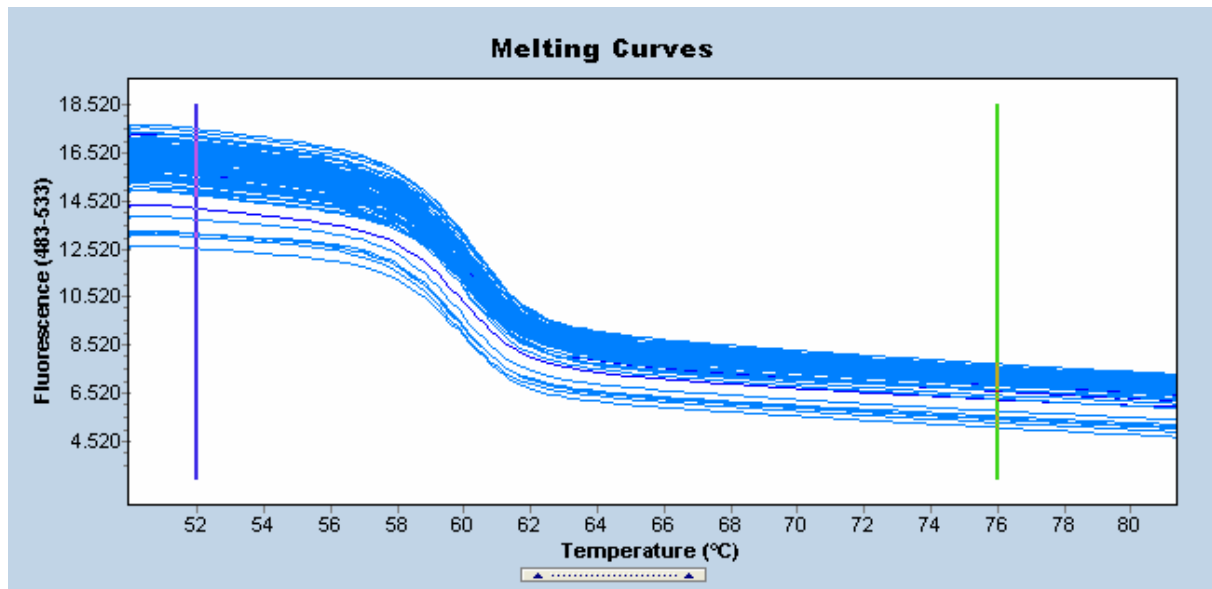
Bild 25: *Melting Curves* Exon7, rote Graphen - heterozygot**Bild 26:** *Melting Curves* Exon7, blaue Graphen - homozygot

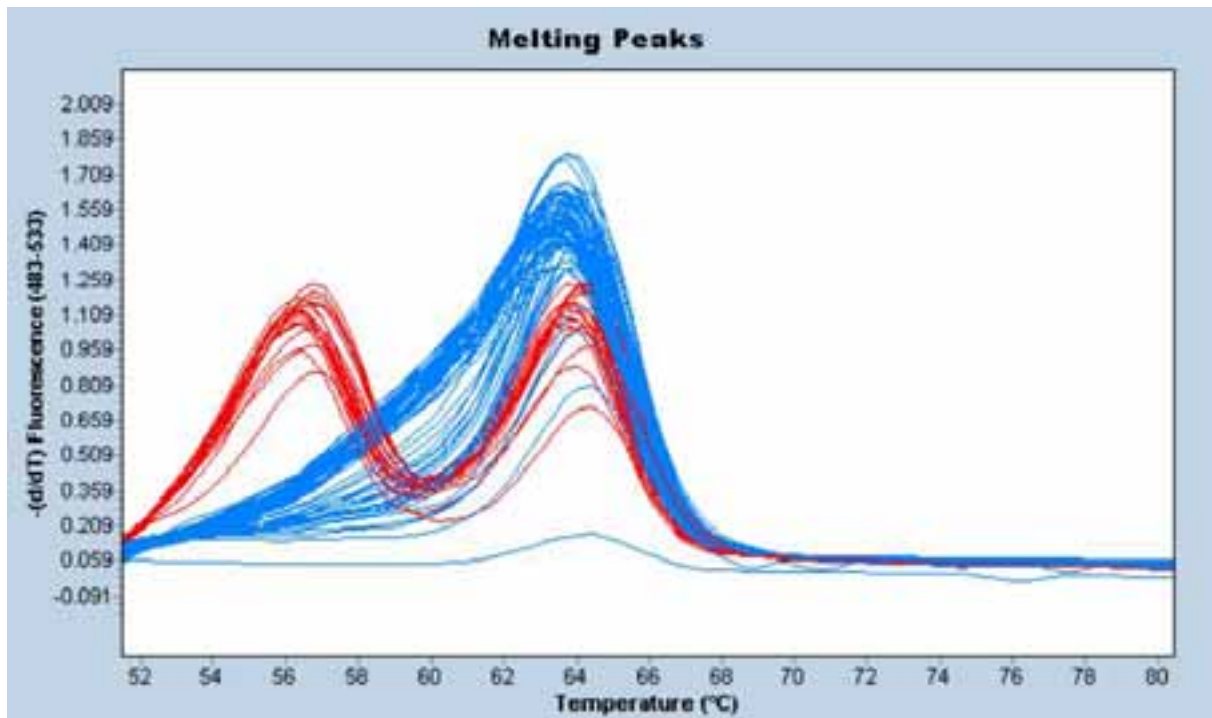
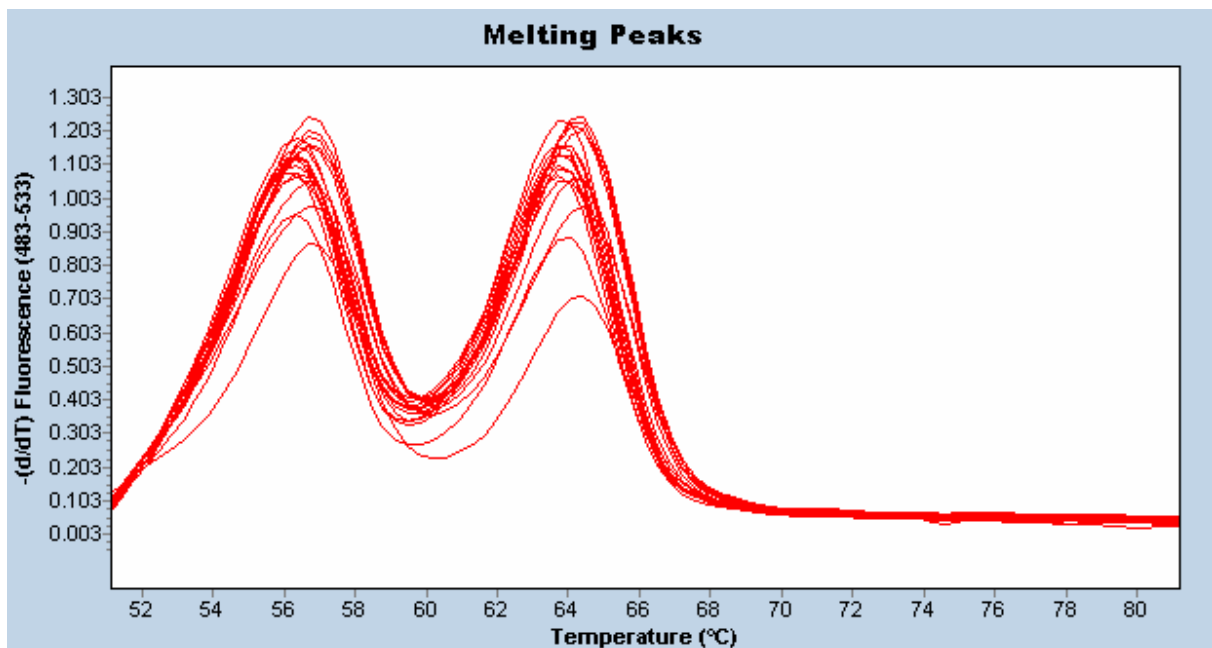
Bild 27: *Melting Peaks Exon3 – gesamt***Bild 28:** *Melting Peaks Exon3, rote Graphen - heterozygot*

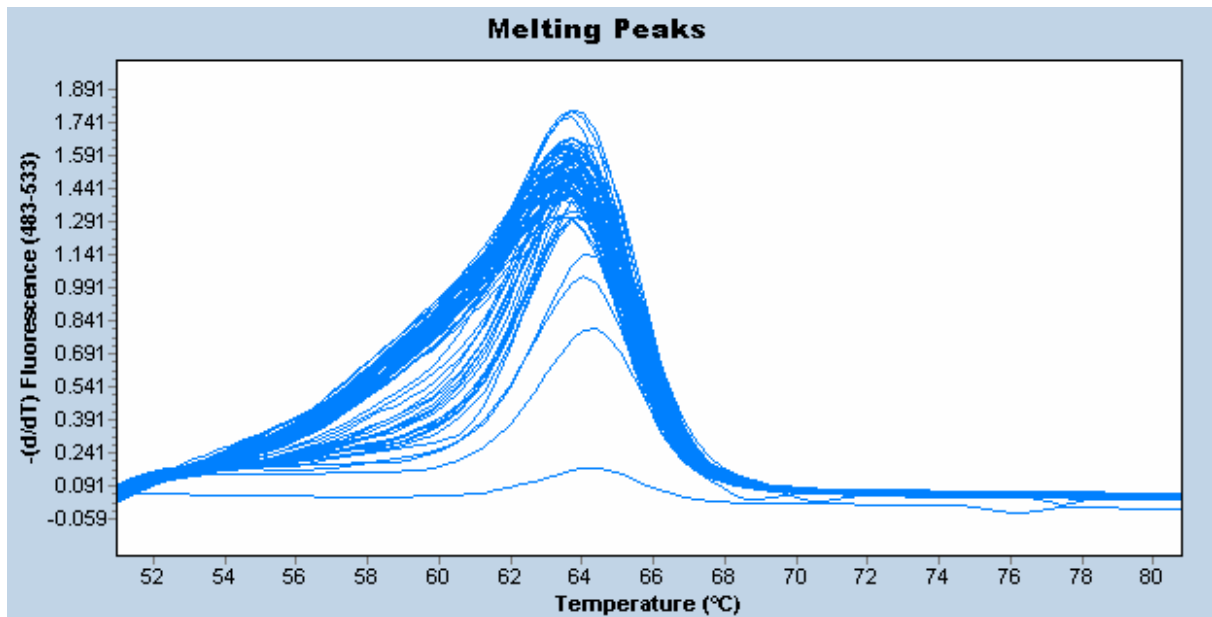
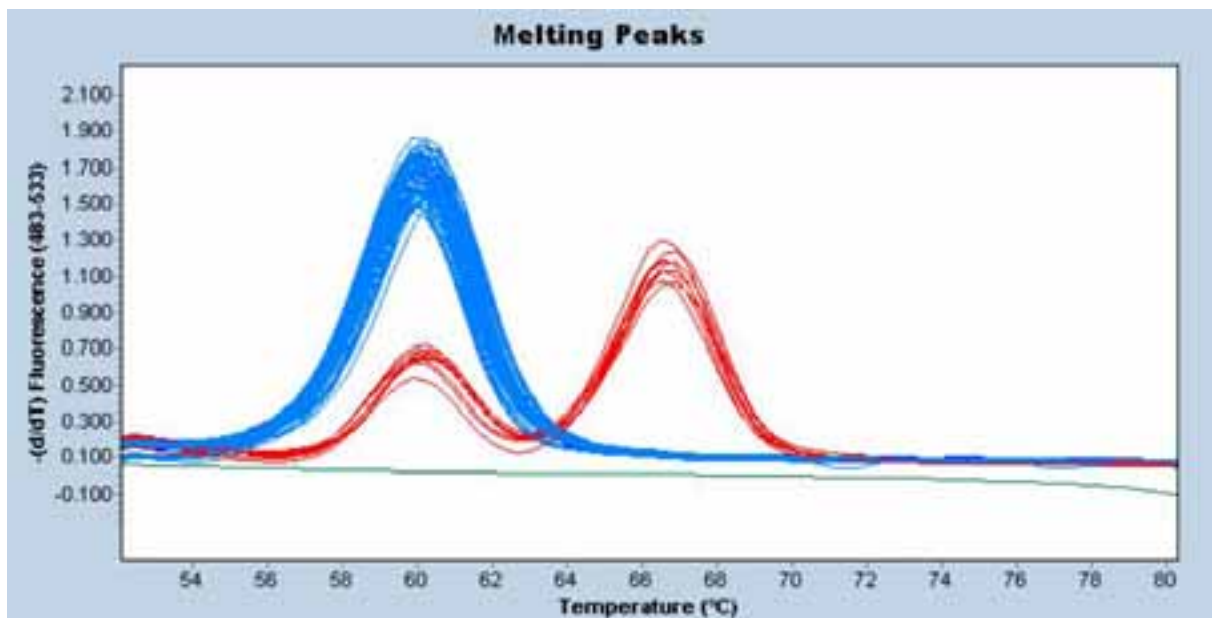
Bild 29: *Melting Peaks Exon3*, blaue Graphen - homozygot**Bild 30:** *Melting Peaks Exon7*, gesamt

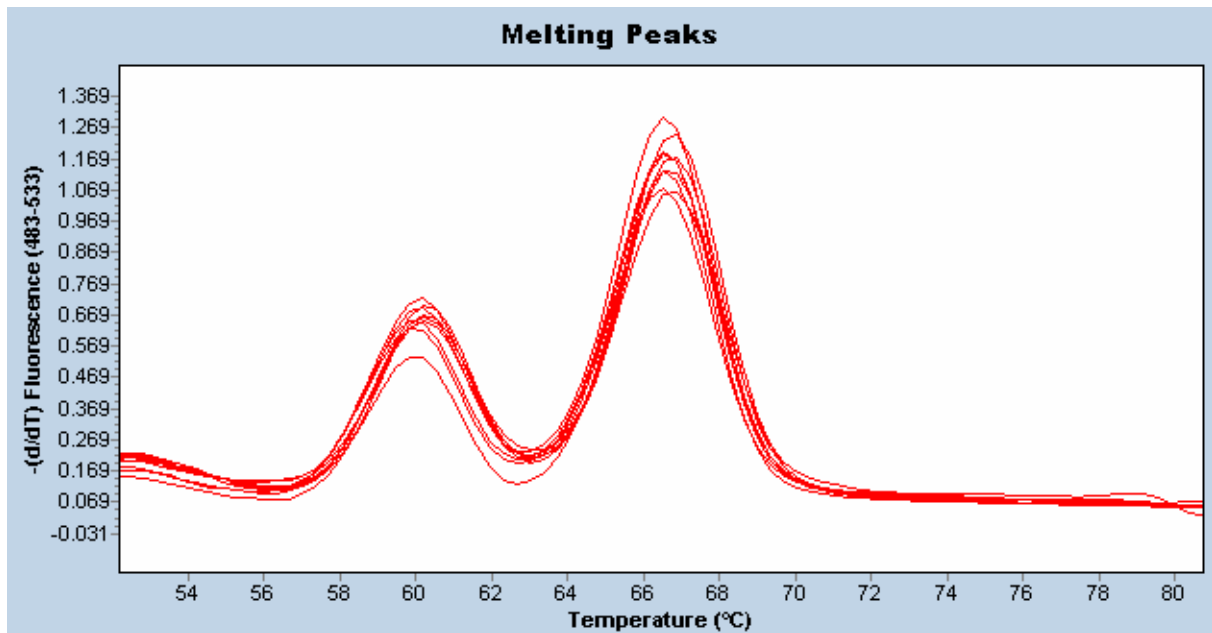
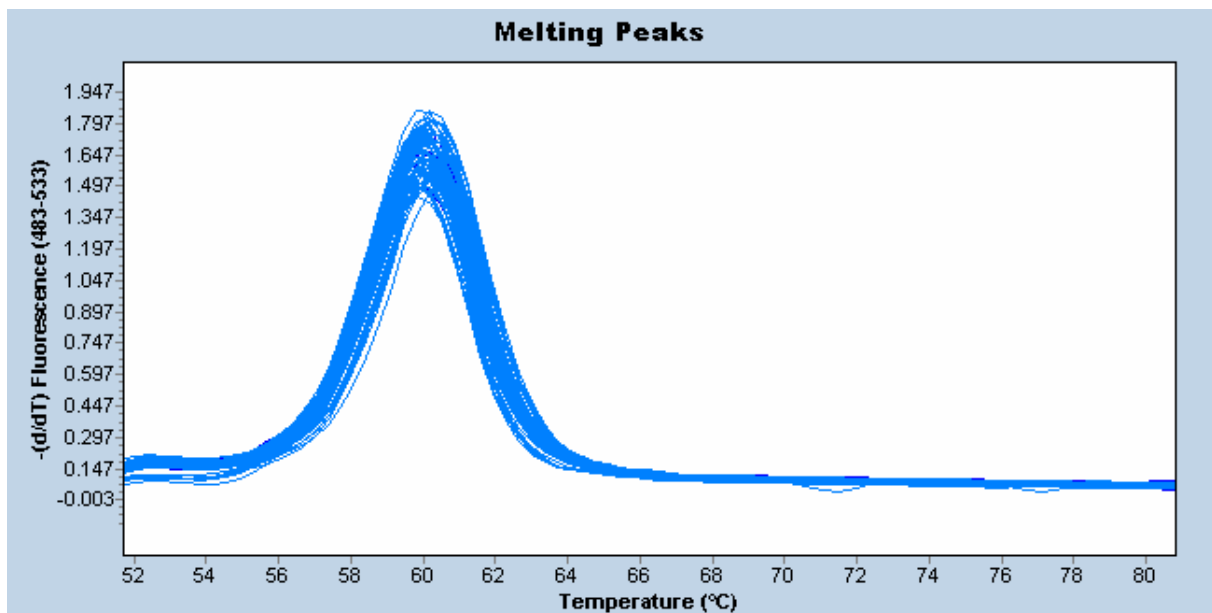
Bild 31: *Melting Peaks Exon7, rote Graphen - heterozygot***Bild 32:** *Melting Peaks Exon7, blaue Graphen - homozygot*

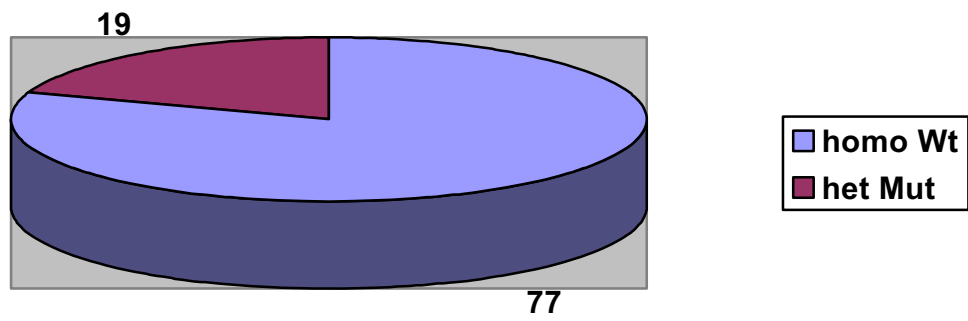
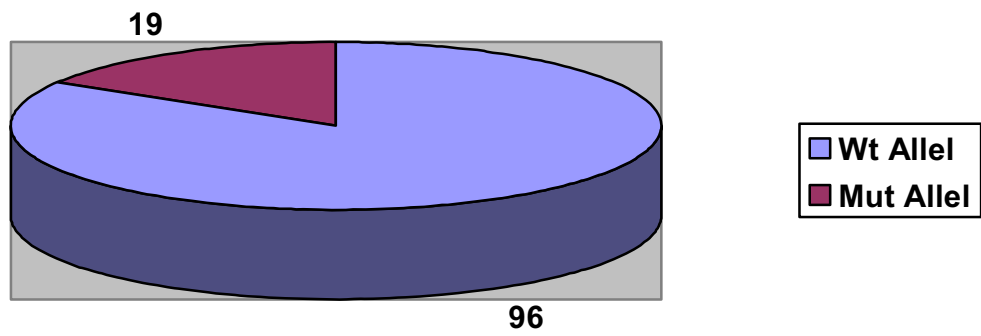
Bild 33: Verteilung der Genotypen im Versuch in Exon3**Bild 34:** Anteil von Mutierten- und Wildtyp- Allelen in Exon3

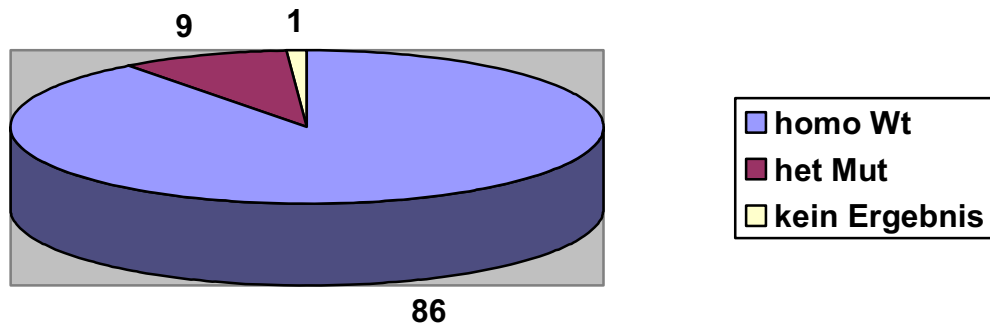
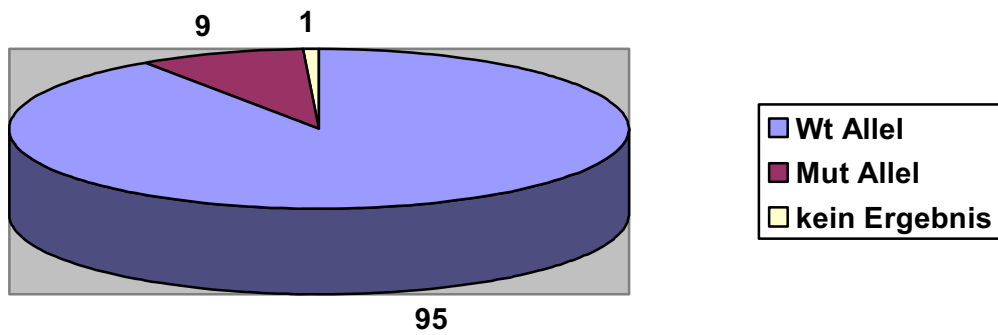
Bild 35: Verteilung der Genotypen im Versuch in Exon7**Bild 36:** Anteil von Mutierten- und Wildtyp- Allelen in Exon7

Bild 37: Das DNA-Material auf Position 36 ist in beiden Versuchsreihen heterozygot



Bild 38: Vorhandene SNPs, gemeinsam in Exon3 und Exon7 aller Probanden

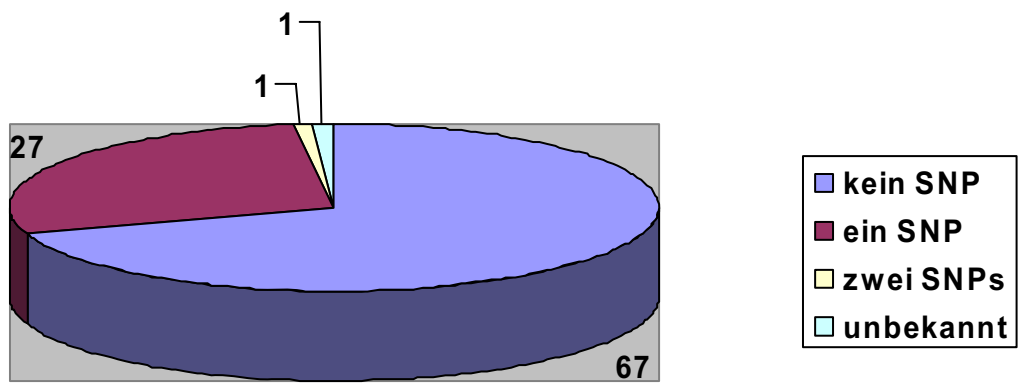


Bild 39: Wahrscheinlichkeit von auftretenden Nebenwirkungen aller Probanden

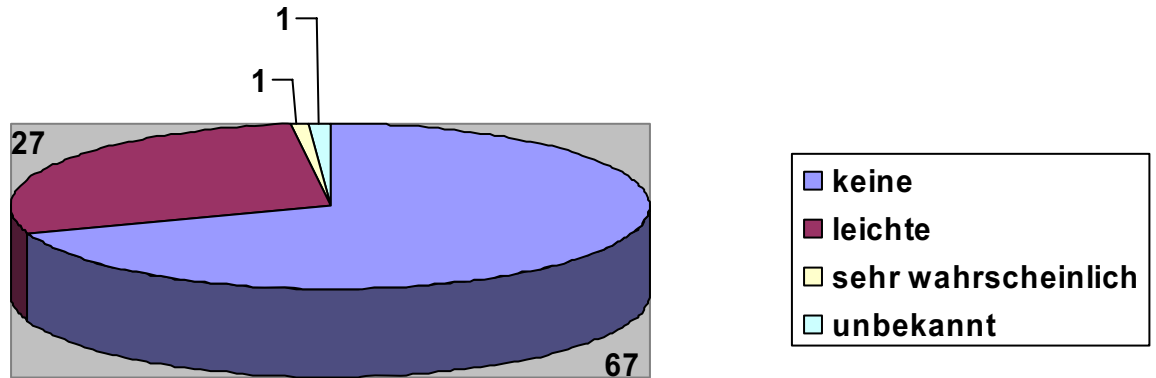


Bild 40: Die Apotheke der Zukunft^{1(S.17)}

