

**Kandidatengene in der Schmerztherapie: Untersuchungen zum
 μ -Opioidrezeptor und zum Cytochrom P4502D6**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Bettina Bayerer
aus
Worms

Bonn 2005

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Referent: Prof. Dr. Frank Stüber
2. Referent: Prof. Dr. Volker Herzog

Tag der Promotion: 28.11.05

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2005

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
A	Asparagin (Asn)
A,C,G,T	Basen: Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatcyclase
AK	Antikörper
ALAS	5-Aminolevulinate Synthase
API	Aktivator Protein-1
SP-1/3	Stimulating Protein 1/3
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
ca.	zirka
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CO ₂	Kohlendioxid
CP	Crossing Point
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
CYP2D6	Cytochrom P450 2D6
D	Asparaginsäure
ddH ₂ O	zweifach-deionisiertes Wasser
del	Deletion
Dig	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
E	Effizienz
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Extensive Metabolizer
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
F	Fluoreszenz
FKS	Fötale Kälberserum
fmol	Femtomol
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
GRE	Glucocorticoid-responsive Element
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
hMOR	human µ-Opioidrezeptor
i.v	intravenös
IL-4	Interleukin-4
ins	Insertion

kb	Kilobasen
konz.	konzentriert
M6G	Morphin-6-Glucuronid
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
MOR	μ -Opioidrezeptor
mRNA	messenger-RNA
mt	Mutation
MW	Mittelwert
MZF1	Myeloid Zink-Finger 1
n	Anzahl
NFkB	Nuklear-Faktor-kappa B
ng	Nanogramm
PCA	patientenkontrollierte Analgesie
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PM	Poor Metabolizer
pmol	Pikomol
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
RT-PCR	Echtzeit-PCR
SEM	Standard Error of the Mean
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms/ Einzelnukleotidpolymorphismen
STAT6	Signal Transducer and Activator of Transcription 6
Tab.	Tabelle
T _m	Schmelztemperatur
TNF	Tumornekrose Faktor
U	Enzymeinheit
UM	Ultra-Rapid Metabolizer
UTR	untranslated region
UV	ultra-violett
V	Volt
verd.	verdünnt
wt	Wildtyp
YY1	Ying und Yang Faktor 1
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Schmerz	1
1.2 Pharmakologische Schmerztherapie.....	4
1.3 Pharmakogenetik	6
1.4 Cytochrome und CYP2D6.....	7
1.4.1 CYP2D6	9
1.5 μ -Opioidrezeptor (MOR)	10
1.5.1 Genomische Struktur des MORs	11
1.6 Fragestellungen	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Zellkultur humaner Zelllinien.....	17
2.2 DNA-Isolierung.....	17
2.3 RNA-Isolierung	17
2.4 cDNA-Synthese.....	18
2.5 Echtzeit-PCR	18
2.5.1 Relative Quantifizierung	19
2.5.1.1 Standards	19
2.5.1.2 Erstellung des „Fit Coefficient File“	21
2.5.1.3 Kalibrator.....	21
2.5.1.4 Quantifizierungsläufe	22
2.5.1.5 Auswertung.....	23
2.5.2 Genotypisierung	24
2.5.2.1 CYP2D6-Varianten	24
2.5.2.2 MOR-Varianten.....	29
2.6 Reportergen-Konstrukte	31
2.6.1 Plasmid Konstruktion	32
2.6.2 Mutagenese.....	34
2.6.3 Transfektion.....	37
2.6.4 Luciferase-Assay	37
2.7 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)	38
2.7.1 Nuklearextraktion.....	38
2.7.2 Proteinbestimmung.....	38

2.7.3 Doppelstrangsynthese und Markierung der Oligonukleotide.....	38
2.7.4 Gelshift-Reaktion	39
2.7.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Blot	39
2.7.6 Chemilumineszenz Detektion.....	40
2.7.7 Detektion von MZF1-Transkripten	40
2.8 Verwendete Programme und Datenbanken	41
3. Ergebnisse	42
3.1 Genotypisierung von PM-assoziierten Variationen des CYP2D6 bei Schmerzpatienten ..	42
3.1.1 Präamplifikat	42
3.1.2 Genotypisierung mittels Echtzeit-PCR.....	43
3.1.2.1 CYP2D6 *3 und *7	43
3.1.2.2 CYP2D6 *4, *6 und *8	45
3.1.2.3 Weitere Genotypen.....	48
3.1.3 Genotypisierung der Variante *5 mittels konventioneller PCR.....	49
3.1.4 Allelhäufigkeiten im Patientenkollektiv.....	50
3.1.5 Einfluss des CYP2D6-Genotyps auf die postoperative Analgesie mit Tramadol..	50
3.2 Untersuchungen zur Regulation des MORs	52
3.2.1 Reportergen-Konstrukte	52
3.2.1.1 Luciferase-Aktivität der Wildtyp-Konstrukte	54
3.2.1.2 Mutagenese.....	54
3.2.1.3 Luciferase-Aktivität der Promotor-Konstrukte mit Variante	57
3.2.2 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)	60
3.2.2.1 Variante G-554A	60
3.2.2.2 Variante A-1320G	61
3.2.3 Relative Quantifizierung des MORs mittels Echtzeit-PCR.....	63
3.3 Genotypisierung des MORs	66
3.3.1 Promotorvarianten	66
3.3.2 Variante A+118G	67
3.3.3 Allelhäufigkeiten der Varianten im Patientenkollektiv	68
3.4 Übersicht der Ergebnisse.....	69
4. Diskussion.....	70
4.1 Genotypisierung von CYP2D6.....	70
4.1.1 Methoden zur Genotypisierung	71
4.1.2 Genotypisierung und Allelfrequenzen.....	72

4.1.3 Einfluss des CYP2D6 Genotyps auf die postoperative Analgesie mit Tramadol ..	73
4.2 Untersuchungen zur Regulation des μ -Opioidrezeptors (MOR).....	74
4.2.1 Reportergene.....	75
4.2.2 Quantifizierung.....	81
4.3 Genotypisierung des MORs	83
5. Ausblick.....	87
6. Zusammenfassung.....	88
7. Literatur.....	90
8. Lebenslauf.....	105
9. Kongressbeiträge und Veröffentlichungen zu dieser Arbeit.....	106

1. Einleitung

1.1 Schmerz

Schmerzen gehören zu den häufigsten körperlichen Beschwerden und treten oft als Symptome bzw. Begleiterscheinungen einer lokalen Gewebsschädigung oder einer Krankheit auf. Die Fähigkeit zur Schmerzempfindung stellt eine wichtige Warnfunktion vor Verletzungen dar. Wird der Schmerz nicht ausreichend behandelt, so kann dieser ohne physiologischen Nutzen infolge von Chronifizierungsvorgängen selbst zur Krankheit werden. Nach Pathophysiologie oder Schmerzursache, lassen sich verschiedene Schmerztypen differenzieren.

Nach pathophysiologischen Aspekten lässt sich der Schmerz in die zwei Kategorien nozizeptiver und neuropathischer Schmerz klassifizieren. Der nozizeptive Schmerz wird aufgrund seines Entstehungsortes nochmals in somatischen und viszeralen Schmerz unterschieden (Hall and Sykes, 2004).

Der somatische Schmerz lässt sich in Oberflächenschmerz und Tiefenschmerz differenzieren und entsteht durch die Erregung somatischer Nozizeptoren in Haut, Skelettmuskeln, Gelenken, Knochen und Bindegewebe. Der Oberflächenschmerz ist im Wesentlichen mit der Haut assoziiert und gut lokalisierbar. Der Tiefenschmerz ist mit Skelettmuskeln, Gelenken, Knochen und Bindegewebe assoziiert, schwer lokalisierbar und strahlt meist in die Umgebung aus. Eine besondere Form des Tiefenschmerzes ist der Kopfschmerz, der in seiner vielfältigen Form wohl die häufigste Schmerzform darstellt (Zenz and Jurna, 1993; Mutschler, 2001).

Der viszerale Schmerz (Eingeweide-Schmerz) wird durch Nozizeptoren vermittelt, die im Gastrointestinal-, Respirations- und Urogenitaltrakt sowie im kardiovaskulären System lokalisiert sind (Strumpf et al., 2005). Er ist schlecht lokalisierbar und wird häufig als dumpf und in die Tiefe gehend beschrieben (Zenz and Jurna, 1993).

Der neuropathische Schmerz entsteht durch die direkte Erregung nervaler Strukturen. Er wird oft als stechend, brennend oder elektrisierend beschrieben. Er ist im Unterschied zu den Nozizeptorschmerzen nicht von externen Reizen abhängig und kann oft in einem scharf begrenzten Bereich, dem Innervationsgebiet des betroffenen Nervs lokalisiert werden (Zenz and Jurna, 1993).

Nach Schmerzursache lassen sich drei Schmerztypen unterscheiden (Abb. 1):

Der nozizeptive Schmerz entsteht als Warnsignal bei thermischen, mechanischen, chemischen oder elektrischen Reizen auf gesundes Gewebe. Die Schmerzreaktion wird aktiviert

durch die Erregung sensorischer Nervenendigungen, den Nozizeptoren, welche ab einer spezifischen Reizschwelle stimuliert werden. Diese Reizschwelle muss hoch genug sein, damit sie nicht bei normalen Aktivitäten überschritten wird, aber auch so sensitiv sein, dass der Schmerz vor einer Gewebsschädigung auftritt (Scholz and Woolf, 2002).

Der inflammatorische Schmerz entsteht durch die Freisetzung chemischer Mediatoren (z.B. Zytokine, Wachstumsfaktoren) aus beschädigten und inflammatorischen Zellen bei Gewebsschädigungen durch Infektionen, Ischämie, Tumorwachstum, autoimmune Prozesse oder mechanische Einflüsse (Boddeke, 2001; Mantyh et al., 2002). Einige inflammatorische Mediatoren verursachen eine Schmerzempfindung, indem sie direkt Nozizeptoren aktivieren. Andere Mediatoren bewirken zusammen eine Sensibilisierung des somatosensorischen Nervensystems und ermöglichen dadurch eine leichtere Aktivierung der Schmerzweiterleitung (Scholz and Woolf, 2002).

Ein neuropathischer Schmerz entsteht durch Beschädigung oder Dysfunktion des peripheren oder zentralen Nervensystems und ist charakterisiert durch eine Kombination aus neurologischen Defiziten und Schmerz.

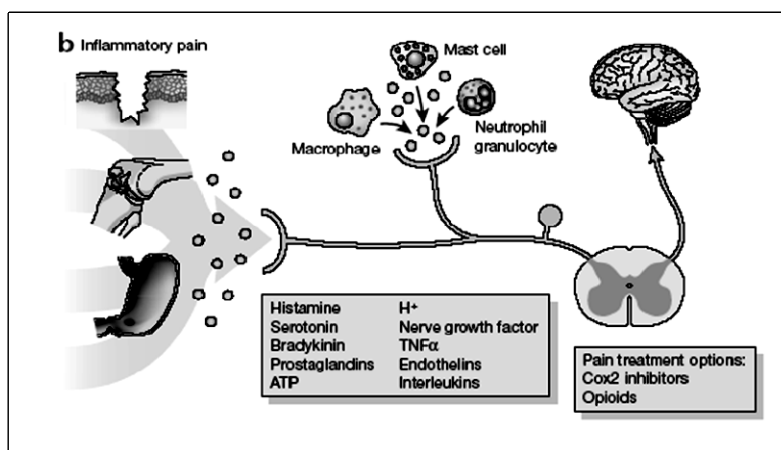
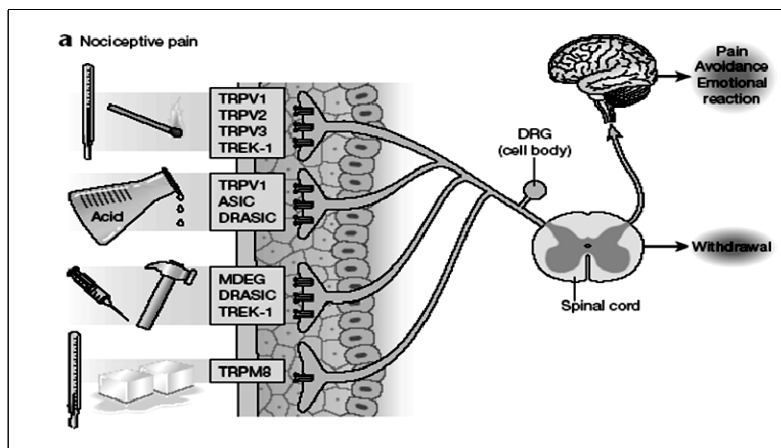
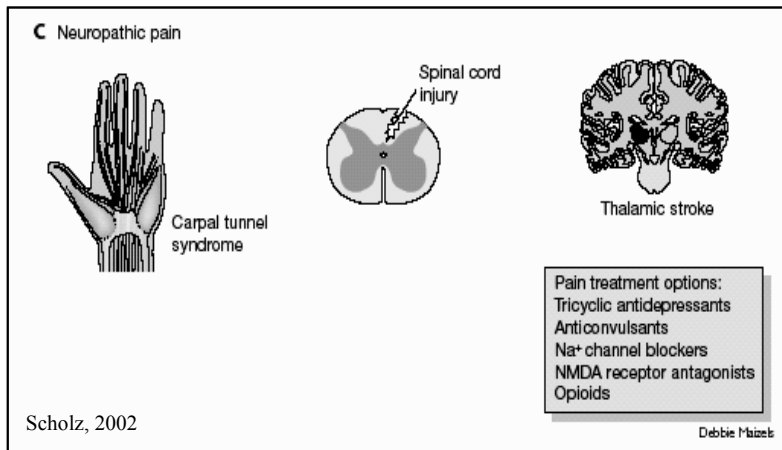


Abbildung 1:

Nozizeptiver, inflammatorischer und neuropathischer Schmerz:

a) Nozizeptiver Schmerz: Die Stimulation der Nozizeptoren (durch Hitze, Kälte, mechanische und chemische Stimuli) wird in elektrische Signale umgewandelt und über das Rückenmark zur Hirnrinde geleitet, wo die Schmerzempfindung stattfindet.

b) Inflammatorischer Schmerz: Gewebeschäden, Entzündungen sowie Tumorzellen setzen chemische Mediatoren frei, welche die Nozizeptoren direkt aktivieren oder die Empfindlichkeit der Neurone im Nervensystem verändern.



c) Neuropathischer Schmerz: Dieser entsteht durch Beschädigung oder Dysfunktion des Nervensystems.

Nozizeptiver, inflammatorischer und neuropathischer Schmerz resultieren aus diversen Mechanismen. Einige dieser Mechanismen lassen sich eindeutig einem Schmerzereignis zuordnen, andere stellen sich in multiplen klinischen Syndromen dar. Bei manchen Patienten wird der Schmerz von einem einzigen Mechanismus verursacht, bei anderen liegen dem Schmerz multiple Mechanismen zugrunde. So kann das gleiche Symptom durch eine Anzahl von Mechanismen generiert werden, bzw. ein einzelner Mechanismus unterschiedliche Symptome verursachen. In jedem Fall gilt es, für den jeweiligen Patienten die geeignete Schmerztherapie zu finden, um eine Chronifizierung der Schmerzen zu vermeiden.

Schmerzmessung:

Schmerz ist ein subjektives, sensorisches und emotionales Erlebnis und kann nur subjektiv bestimmt werden. Um den Schmerz zu messen, haben sich bisher folgende Verfahren bewährt:

Die visuelle Analogskala, ein 100 mm langer Strich, auf dem der Patient seine Schmerzen zwischen 0 = kein Schmerz und 100 = stärkster vorstellbarer Schmerz einordnet sowie die numerische Analogskala, auf welcher der Patient eine Zahl zwischen 0 und 10 für seine Schmerzen angibt (Abb. 2). Eine weitere Möglichkeit besteht durch eine verbale Zuordnungsskala. Mit Hilfe dieser Maßsysteme kann eine Einordnung und letztendlich auch Messung der Schmerzen des jeweiligen Patienten erfolgen (A.Beyer, 2001; Simanski and Neugebauer, 2002).

Schmerzbehandlung kann demnach in Individualtherapie erfolgen, so dass Analgetikum, Applikationsform, Dosierung sowie Dosierungsintervall individuell auf den einzelnen Patienten abgestimmt werden.

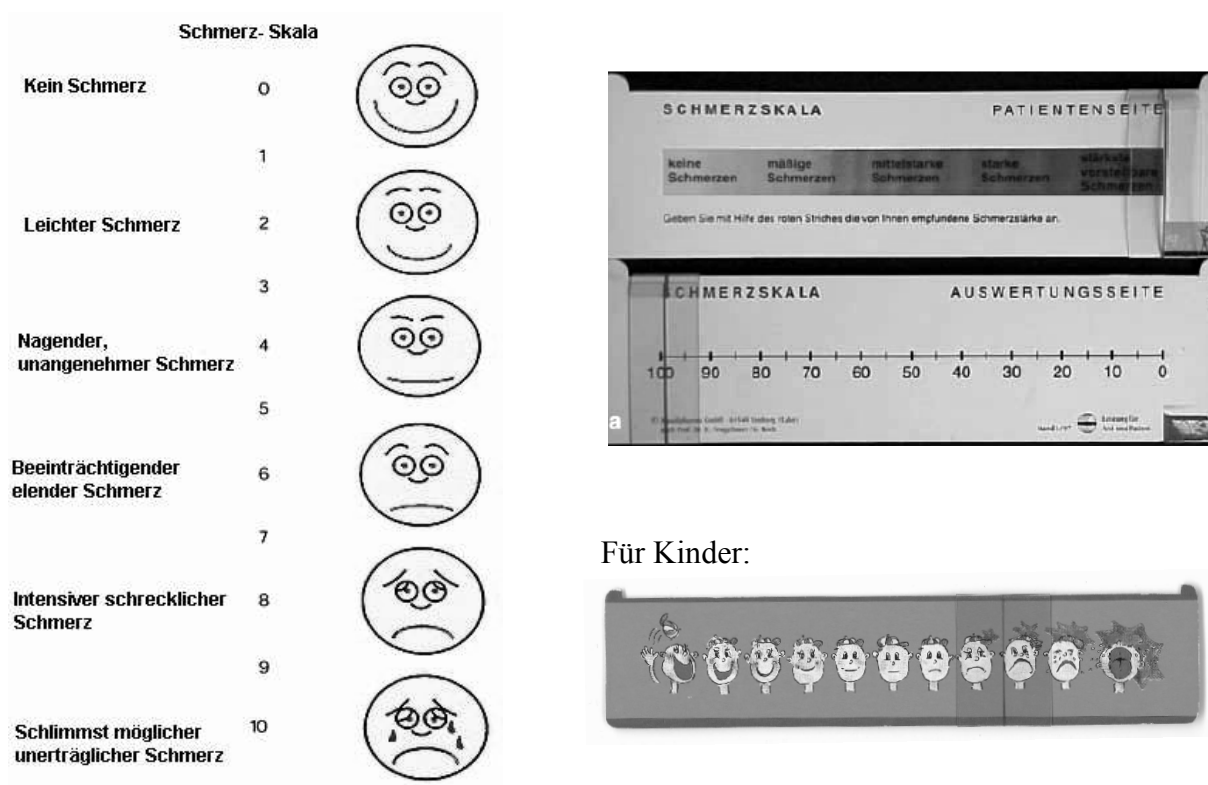


Abbildung 2: Verschiedene Schmerzskalen, wie sie bei der Schmerzmessung verwendet werden

1.2 Pharmakologische Schmerztherapie

In der pharmakologischen Schmerztherapie unterscheidet man im Wesentlichen zwei Gruppen, die Nichtopioidanalgetika und die Opioidanalgetika.

Nichtopioidanalgetika: Nichtopioidanalgetika werden in saure und nichtsaure Analgetika in Abhängigkeit von ihrem pKa-Wert unterteilt. Während sich saure Analgetika überwiegend in Geweben mit niedrigen pH-Wert anreichern (Entzündungsprozesse, Niere, Magen), verteilen sich nichtsaure Analgetika ubiquitär im Körper. Die sauren Analgetika umfassen die nicht-steroidalen Antiphlogistika NSAID (nonsteroidal anti-inflammatory drugs) z.B. Diclofenac und Acetylsalicylsäure. Die nichtsauren Analgetika untergliedern sich chemisch in die Gruppen der Pyrazolone (Hauptvertreter: Metamizol) und der Aniline (Hauptvertreter: Paracetamol) (Brack et al., 2004).

Opioidanalgetika: Opioidanalgetika sind charakterisiert durch ihre pharmakologischen Unterschiede, welche sich aus ihren Interaktionen mit den Opioidrezeptoren (μ , δ und κ) ableiten. Die klassischen Opioidanalgetika (z.B. Morphin) wirken als volle Agonisten an den Opioidrezeptoren, vor allem am μ -Opioidrezeptor. Durch Abwandlungen in der Molekül-

struktur gelangt man zu Verbindungen, welche an den verschiedenen Opioidrezeptoren, zum Teil unterschiedlich, voll-agonistisch/antagonistisch oder partial-agonistisch/antagonistisch, wirken. Reine Antagonisten, wie Nalaxon, binden an alle drei Opioidrezeptortypen und können die Wirkung der Agonisten blockieren oder aufheben. Verbindungen mit partieller agonistischer bzw. antagonistischer Wirkung werden als Analgetika eingesetzt. Meist wird bei diesen Substanzen jedoch nicht die maximale Wirkung eines vollen Agonisten erreicht (Mutschler, 2001; Inturrisi, 2002).

Die pharmakologische Schmerztherapie richtet sich nach dem Stufenschema der Weltgesundheitsorganisation (WHO) für die Therapie von Tumorschmerzen (Abb. 3).

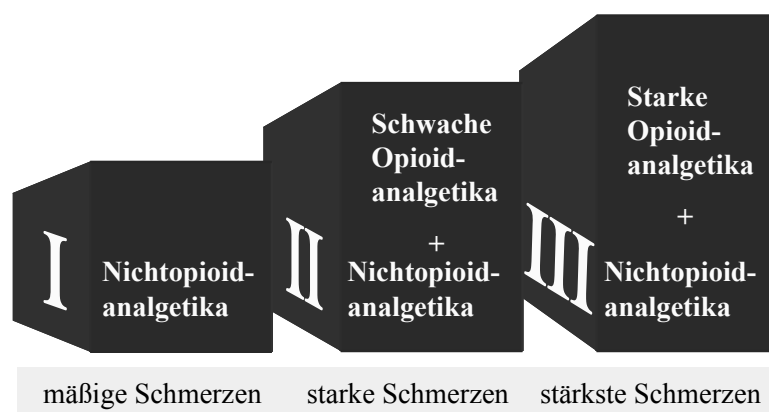


Abbildung 3: WHO-Stufenschema

Hierbei ist eine Behandlung für leichte bis mäßige Schmerzen (Stufe I) mit Nichtopioid-analgetika vorgesehen. Bei einer nicht ausreichenden Analgesie mit Analgetika der Stufe I und für mittelgradige Schmerzen (Stufe II) wird die Kombination eines Nichtopioidanalgetikums mit einem schwachen Opiat empfohlen. Für starke Dauerschmerzen und einer nicht ausreichenden Analgesie durch Stufe II Analgetika soll ein Austausch des „schwachen“ Opiates gegen ein starkes Opiat erfolgen (Stufe III) (A.Beyer, 2001).

1.3 Pharmakogenetik

Viele Pharmaka variieren in ihrer Medikamentenwirkung und Verträglichkeit von Mensch zu Mensch. Ursache dafür ist das genetische Profil jedes einzelnen Individuums. So können sowohl Gene, welche direkte Zielmoleküle oder Transportproteine von Pharmaka kodieren, individuell verändert sein, als auch Gene, welche Enzyme kodieren, die den Metabolismus von Pharmaka im Körper steuern.

Genetische Veränderungen treten in Form von Deletion, Insertion, Inversion oder Duplikation auf. Sie können das gesamte Gen, einen Genabschnitt, oder aber nur eine einzelne Base betreffen. Diese so genannten Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (engl.: single nucleotide Polymorphisms, SNPs), sind die häufigsten Varianten im menschlichen Genom. Die Anzahl der SNPs im menschlichen Genom beläuft sich wahrscheinlich auf mindestens 15 Millionen. Dabei ist eine Variante als SNP definiert, wenn sie eine Allelfrequenz von mindestens 1% in der Bevölkerung hat (Botstein and Risch, 2003).

Die Auswirkungen von SNPs können weit reichend sein. Sie können eine veränderte Transkription und Translation bewirken, einen Aminosäureaustausch oder einen „unplanmäßigen“ Transkriptionsstop herbeiführen, die Stabilität der RNA beeinflussen sowie einen Einfluss auf das RNA-Spleißen haben (Bond et al., 1998; Soyama et al., 2002; Pan et al., 2002; Yamaguchi et al., 2002; Capon et al., 2004; Mottagui-Tabar et al., 2005). Somit können SNPs letztendlich zu einer Veränderung in der Proteinexpression, Proteinstruktur und Proteinfunktion führen (Abb. 4).

<p>AGGCTCAATGAAATAAAAGATATATTTGGGATCAATACT</p> <p>AGGCTCAATGAAATACAAGATATATTTGGGATCAATACT</p> <p>R L N E I K D I F G I N T</p> <p>R L N E I Q D I F G I N T</p> <p style="text-align: center;">DIE<u>S</u>ONNE</p> <p style="text-align: center;">DIE<u>T</u>ONNE</p> <p style="font-size: small;">modifiziert nach Höhe, 2003</p>
--

Abbildung 4:
Analog zur deutschen Sprache, kann ein SNP an entsprechender Stelle zu Veränderungen in Struktur, Funktion oder Expression des Genproduktes führen.

Die meisten SNPs sind jedoch funktionell neutral, so dass im ersten Schritt einer Genotyp-Phänotyp-Beziehung so genannte „Kandidatengene“ und deren Variationen identifiziert und charakterisiert werden müssen. Als Kandidatengene bezeichnet man Gene, welche Zielmoleküle, Transportproteine oder am Metabolismus beteiligte Enzyme von Pharmaka kodieren, bzw. bei der Entstehung von Krankheiten von Bedeutung sind.

Für den Bereich der Schmerztherapie sind besonders solche Kandidatengene und deren genomische Variationen zu beachten, welche an Schmerzwahrnehmung, Modulation und Therapie beteiligt sind. So zählen z.B. die Gene von Cannabinoid-, NMDA-, Dopamin- und Serotoninrezeptoren ebenso zu diesen Kandidatengenen wie die Gene von Ionenkanälen, dem P-Glycoprotein und dem Serotonin- und Dopamintransporter (Stamer et al., 2005). Für die Wirksamkeit von Opioidanalgetika sind besonders die Gene des Enzyms CYP2D6 und des μ -Opioidrezeptors von großem Interesse.

1.4 Cytochrome und CYP2D6

Die Aktivität von metabolisierenden Enzymen bestimmt die Geschwindigkeit, mit welcher Medikamente in ihre funktionellen Metaboliten umgewandelt, oder aus dem Körper eliminiert werden. Bei diesen durch metabolisierende Enzyme katalysierten Biotransformationen wird im menschlichen Organismus zwischen Phase-I- und Phase-II-Reaktionen differenziert (Abb. 5).

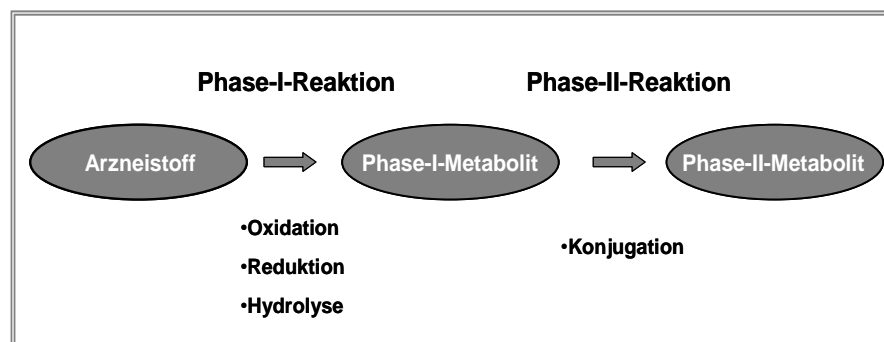
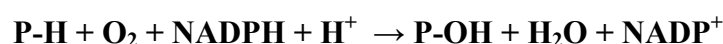


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Biotransformation

In Phase-I-Reaktionen werden die Pharmakonmoleküle oxidativ, reduktiv oder hydrolytisch verändert. In Phase-II-Reaktionen erfolgen Konjugationsreaktionen, bei denen polare, negativ geladene, körpereigene Substanzen (z.B. Glukuronsäure, Aminosäuren) an das Pharmakonmolekül bzw. an den Phase-I-Metaboliten gekoppelt werden.

Von größter Bedeutung für die Biotransformation sind Oxidationsreaktionen. Hierbei sind Monooxygenasen, welche Hämoproteine vom Typ des Cytochrom P450 enthalten, von großer Wichtigkeit. Durch die Monooxygenasen wird ein Sauerstoffatom von einem Sauerstoffmolekül in den Fremdstoff (P-H) eingebaut und das andere zu Wasser reduziert (Abb. 6) (Mutschler, 2001).



Die Mitglieder des Cytochrom P450-Systems sind zu 70-80 % an allen Phase I abhängigen

Metabolisierungen von klinisch angewandten Medikamenten beteiligt (Abb. 7) (Evans and Relling, 1999).

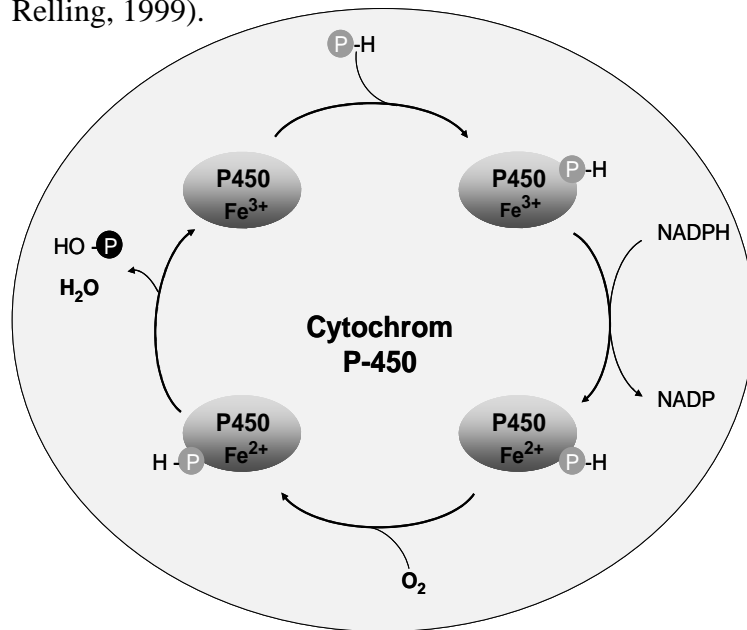


Abbildung 6: Schematisch dargestellter Mechanismus der Oxidation eines Pharmakons (P) durch das Cytochrom P450

Cytochrom P450-Enzyme kommen ubiquitär in Bakterien, Pflanzen sowie Tieren vor und sind in der Membran des endoplasmatischen Retikulums der Zelle verankert. Der höchste P450-Enzymgehalt im menschlichen Organismus befindet sich in der Leber. Zurzeit sind im humanen Genom 57 aktive Gene, welche Cytochrom P450-Enzyme kodieren, bekannt (<http://drnelson.utmem.edu/cytochromep450.html>). Von diesen sind für den Arzneistoffwechsel besonders die Isoformen der Genfamilien 1, 2 und 3 relevant (Ingelman-Sundberg, 2004).

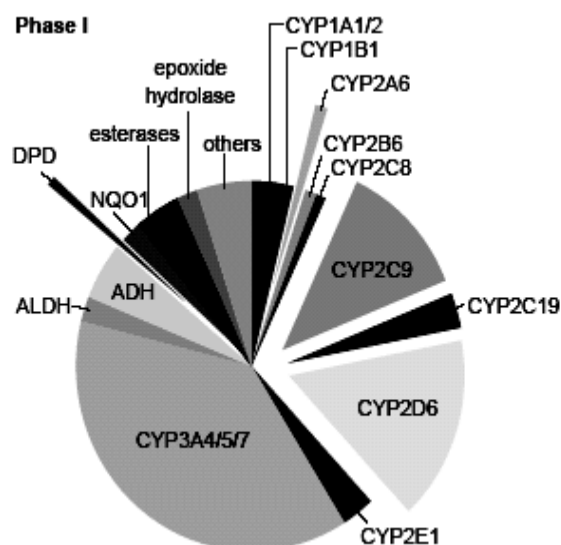


Abbildung 7: Beteiligte Enzyme des Phase-I-Metabolismus (Evans and Relling, 1999)

Die Einteilung der Cytochrom P450-Gene erfolgt aufgrund von Sequenzhomologien in Genfamilie, Subfamilie und deren Isoformen. Die Familien werden durch arabische Zahlen, die Subfamilien mit einem Buchstaben und die jeweilige Isoform wieder mit einer Zahl

gekennzeichnet. Als Abkürzung für Cytochrom P450 wird CYP verwendet (z.B. CYP2D6) (van der and Steijns, 1999).

1.4.1 CYP2D6

Die Isoform CYP2D6 der Cytochrom P450-Familie ist an der Metabolisierung von ca. 25% aller bekannten Medikamente in der Leber beteiligt. Bisher wurden mehr als 48 unterschiedliche Arzneimittelsubstrate für dieses Enzym identifiziert (Ingelman-Sundberg, 2004). Dazu zählen auch einige Analgetika (z.B. Codein, Tramadol) und Koanalgetika (Antidepressiva).

CYP2D6 ist ein hoch polymorphes Isoenzym, von dem einige der bekannten Genvariationen (<http://www.imm.ki.se/CYPallels/>) zu einer erniedrigten oder fehlenden Enzymfunktion führen (Abb. 8). Bei der Mehrzahl der beschriebenen Variationen sind einzelne Basen durch Austausch oder Deletion betroffen. Jedoch sind auch die Deletion (*5), sowie Duplikationen des gesamten Gens beschrieben (Gaedigk et al., 1991; Johansson et al., 1993).

Bis zu 10 % der Kaukasier sind Träger von nicht funktionellen CYP2D6-Allelen (Sachse et al., 1997). Individuen, welche Träger von zwei inaktiven Allelen sind, werden als „Poor Metabolizer“ (PM) bezeichnet. Man unterscheidet hierbei zwischen homozygoten Defektallelträgern und heterozygoten, „compound“, Defektallelträgern, welche zwei unterschiedliche inaktive Allele aufweisen.

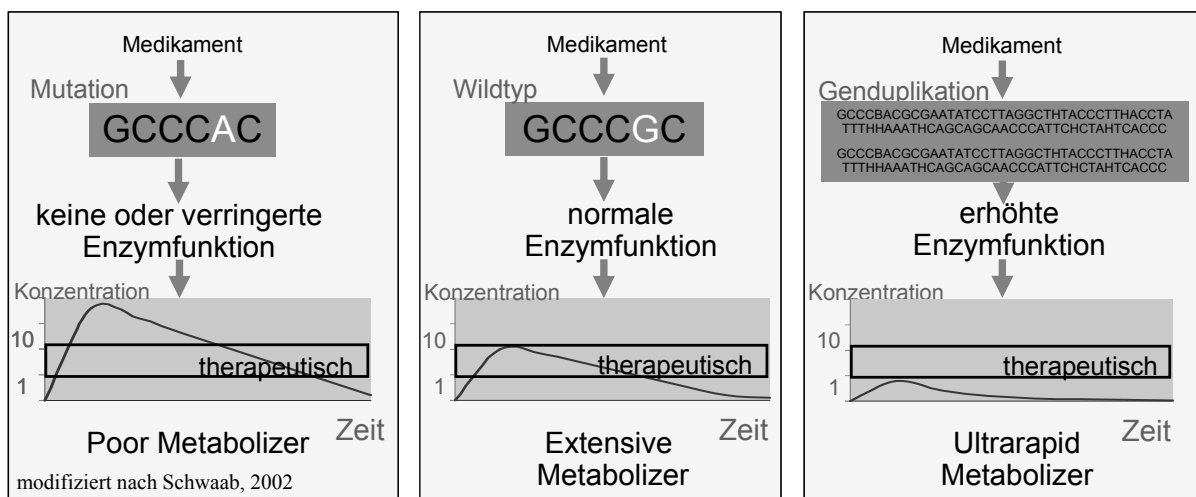


Abbildung 8: Polymorphismen des CYP2D6-Gens und ihre Konsequenzen für den Metabolismus von CYP2D6-Substraten

Bei Poor Metabolizern kann es durch die eingeschränkte Eliminierung der betroffenen Medikamente zur Anreicherung des Wirkstoffes und daraus resultierenden Nebenwirkungen kommen. Andererseits kann bei Poor Metabolizern die gewünschte Wirkung eines Medikamentes ausbleiben, bzw. reduziert sein. So ist z.B. für die analgetische Wirkung von Codein CYP2D6 maßgeblich beteiligt, da Codein als „Prodrug“ von CYP2D6 in seinen aktiven Metaboliten Morphin umgewandelt wird (Poulsen et al., 1996a). Da CYP2D6 Poor Metabolizer kein Morphin aus Codein bilden können, bleibt bei ihnen die analgetische Wirkung aus (Poulsen et al., 1996a; Eckhardt et al., 1998).

Umgekehrt kann als Ursache für eine ausbleibende therapeutische Wirksamkeit das gesamte CYP2D6-Gen in vervielfältigter Form vorliegen. Individuen, welche bis zu dreizehn aktive CYP2D6-Tandemrepeats aufweisen (Lundqvist et al., 1999), zeigen eine sehr schnelle Metabolisierung der betroffenen Substrate und werden deshalb als „Ultraprapid Metabolizer“ (UM) bezeichnet. Dies betrifft 4-5% der kaukasischen Bevölkerung (Stamer et al., 2005).

1.5 μ -Opioidrezeptor (MOR)

Der μ -Opioidrezeptor (MOR) bildet zusammen mit dem κ - und δ -Opioidrezeptor sowie den endogenen Opioiden das Opioidsystem. Die meisten Opioidanalgetika wirken am MOR. Bei Knockout Mäusen führt das Fehlen des MORs zum völligen Verlust der bedeutendsten pharmakologischen Effekte nach Morphinverabreichung, wie Analgesie und Atemdepression (Kieffer, 1999). Pharmakodynamische Variabilität von Opioiden am MOR kann durch individuelle Unterschiede in Rezeptoraffinität, Rezeptoraktivität, Rezeptordichte sowie Postrezeptormechanismen verursacht sein.

Die Opioidrezeptoren gehören zur Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren und teilen mit anderen Rezeptoren dieser Gruppe folgende Charakteristika: sie besitzen sieben Transmembrandomänen mit dem N-Terminus im Extrazellulärbereich und dem C-Terminus im intrazellulären Bereich; innerhalb der Membran sind die Domänen ringförmig angeordnet; sie interagieren mit heterotrimerischen G-Proteinen, um das Bindungssignal in die Zelle zu übertragen (Pasternak, 2001).

G-Proteine bestehen aus einer α -, β - und γ -Untereinheit. Die α -Untereinheit besitzt eine Bindestelle für GDP bzw. GTP, während die β - und γ -Untereinheiten das G-Protein in der Membran verankern. Im Ruhezustand ergeben die Untereinheiten einen nicht mit dem Zielrezeptor verbundenen Proteinkomplex, in welchem GDP an die α -Untereinheit gebunden ist. Bei Stimulation des Rezeptors vereinigt sich zunächst das G-Protein mit dem Rezeptor

und es erfolgt ein Austausch von GDP zu GTP. Daraufhin trennt sich das G-Protein vom Rezeptor und zerfällt in α - und $\beta\gamma$ -Einheit. Die GTP enthaltende α -Untereinheit bindet an ein Effektorprotein und ändert dessen Aktivität. Durch die Hydrolyse von GTP zu GDP wird die Reaktion beendet und das System kehrt in den Ruhezustand zurück (Abb. 9) (Mutschler, 2001; Voet and Voet, 1994).

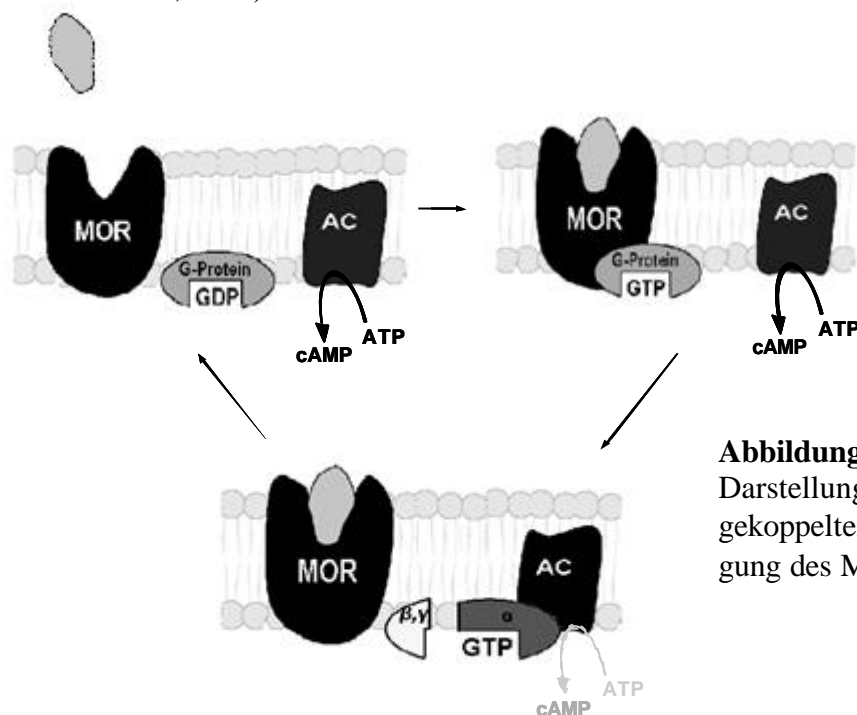


Abbildung 9: Schematische Darstellung der G-Protein gekoppelten Signalübertragung des MORs

Von allen Opioidrezeptoren ist bekannt, dass sie G-Protein gekoppelt, nach Stimulation Adenylatcyclasen hemmen. Sie bewirken über eine Erniedrigung der Öffnungswahrscheinlichkeit von Calciumkanälen präsynaptisch eine Hemmung der Transmitterfreisetzung und postsynaptisch, hauptsächlich über eine Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit von Kaliumkanälen, eine Hyperpolarisation der Neurone (Sharma et al., 1977; Hescheler et al., 1987; North et al., 1987).

1.5.1 Genomische Struktur des MORs

Obwohl multiple Rezeptoren aufgrund von pharmakologischen Unterschieden vermutet wurden, konnte nur ein Gen für die Kodierung des MORs identifiziert werden. Das ursprünglich beschriebene MOR-Gen (*MOR-1* bzw. *OPRM1*) enthält vier Exons. Bei der Maus wurden mittlerweile insgesamt 14 Exons und eine große Anzahl von Spleißvarianten identifiziert (Pan et al., 1999; Pasternak, 2004). Beim Menschen wurden bisher zwei zusätzliche Exons und drei Spleißvarianten entdeckt. Bei diesen Spleißvarianten des humanen MOR-Gens sind die ersten drei Exons identisch. Der Unterschied entsteht durch

alternatives Spleißen an der Position des vierten Exons (Bare et al., 1994; Pan et al., 2003). Ob das humane MOR-Gen ein ebenso extensives „Spleißverhalten“ aufweist wie das der Maus, und ob die unterschiedlichen Spleißvarianten zu den pharmakologischen Unterschieden der MOR vermittelten Analgesie beitragen, bleibt weiterhin zu klären.

Ursachen für individuelle Unterschiede in der analgetischen Wirkung von Opioiden bzw. deren Nebenwirkungen werden unter anderem durch den Einfluss von Polymorphismen innerhalb des MOR-Gens vermutet. Es konnten Varianten im Bereich der 5'-flankierenden Sequenz, in kodierenden Regionen sowie in den Intronbereichen des MOR-Gens gefunden werden (Abb. 10) (Hoehle et al., 2000; LaForge et al., 2000; Mayer and Holtt, 2001). Hierbei wurden alleine 28 SNPs bzw. kurze Insertionen/Deletionen im Bereich der 5'-flankierenden Sequenz des MOR-Gens beschrieben (Hoehle et al., 2000).

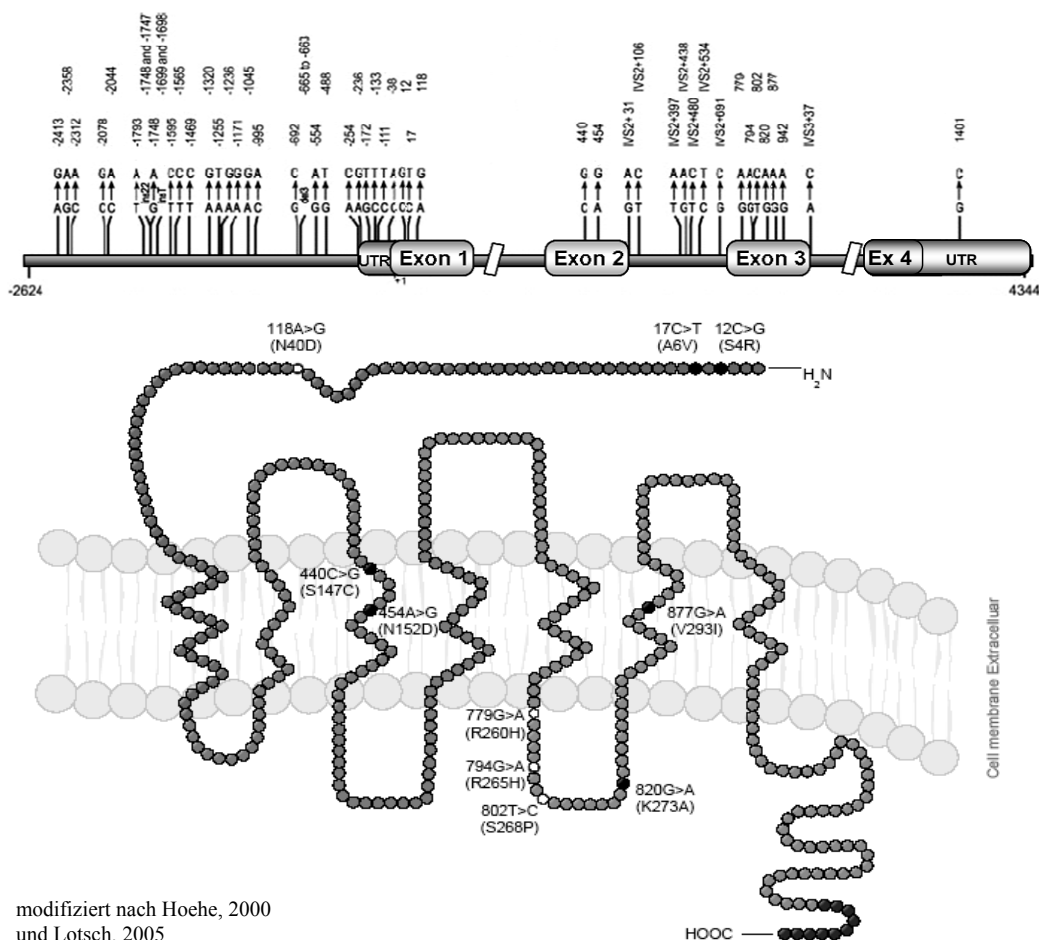


Abbildung 10: Genomische Variationen des MORs

Einige dieser Variationen wurden bereits näher charakterisiert. Besonders Varianten, die einen Aminosäureaustausch verursachen, waren hierbei von großem Interesse. So wurde z.B. für die Variante Asp40, welche durch einen A/G Basenaustausch an Position +118 entsteht, eine erhöhte β -Endorphin Affinität beobachtet (Bond et al., 1998). Ebenso zeigte sich bei

Trägern dieser Variante eine verminderte Potenz von Morphin-6-Glucuronid (M6G) (Lotsch et al., 2002a). M6G ist ein Abbauprodukt von Morphin, welches ebenfalls analgetisch wirksam ist und über die Niere ausgeschieden wird. Bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion kann sich M6G im Körper anhäufen und so zu erheblichen Nebenwirkungen führen. Zwei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion zeigten unter Morphinmedikation eine ausreichende Analgesie und hohe M6G Plasmakonzentrationen. Der Patient mit dem Wildtyp-Allel für die Position +118 hatte jedoch zentralnervöse Nebenwirkungen, während der Träger der Variante Asp40 keine Beschwerden aufwies. So könnte die Variante Asp40 ein schützender Faktor vor M6G vermittelter Opioidtoxizität sein (Lotsch et al., 2002b).

Durch Assoziationsstudien wurde für die Varianten T-1793A, -1699insT, A-1320G, C-111T, und C+17T ein Zusammenhang mit Heroin-/Kokain-Abhängigkeit entdeckt und die Variante C-2044A mit Alkohol-/Opioid-Abhängigkeit assoziiert (Hoehe et al., 2000; Luo et al., 2003). Die molekularen Effekte der meisten Promotorvarianten des MOR-Gens wurden bisher jedoch noch nicht funktionell charakterisiert.

1.6 Fragestellungen

Opioide gehören zu den wichtigsten Medikamenten in der Schmerztherapie. Jedoch können individuelle Unterschiede in der Effektivität und den Nebenwirkungen dieser Medikamente bei einigen Patienten zu bedeutend geringeren Erfolgen in der Schmerztherapie führen.

Durch die hier vorliegende Arbeit sollen neue Kenntnisse über den Einfluss von genomischen Varianten auf die Opioid-Schmerztherapie gewonnen werden. Hierfür sollen Genvarianten des metabolisierenden Enzyms CYP2D6 sowie des μ -Opioidrezeptors untersucht werden. Demnach gliedert sich die Arbeit in zwei Themenschwerpunkte:

- ◆ Schwerpunkt **CYP2D6**:

Entwicklung einer schnellen und zuverlässigen Methode zur Detektion von PM-assoziierten Varianten mittels Echtzeit-PCR.

Darüber hinaus soll mit dieser Methode die Genotypisierung eines Patientenkollektives erfolgen.

- ◆ Schwerpunkt **μ -Opioidrezeptor**:

Der Einfluss von Promotorvarianten auf die Regulation des MORs soll untersucht und die Häufigkeit von funktionellen genomischen Varianten bei Schmerzpatienten ermittelt werden.

2. Material und Methoden

Materialien und Reagenzien	Methode	Hersteller
Zelllinien: U937, SH-SY5Y SK-N-AS, SK-N-DZ, SK-N-FI	Zellkultur	DSMZ ATCC/LGC (Promochem)
Zellkulturflaschen	Zellkultur	Nunc
6 well Platten	Zellkultur-Transfektion	Greiner
DMEM-Medium	Zellkultur	Gibco
FKS	Zellkultur	Biochrom AG
Penicillin/Streptomycin	Zellkultur	Gibco
Zellschaber	Zellkultur	Nunc
Kryovials	Zellkultur	Nalge Company
VenorGeM	Mykoplasmentest	Minerva Biolabs GmbH
Petrischalen	Zellkultur-E.coli	Greiner
LB Agar	Zellkultur-E.coli	Sigma
LB Broth	Zellkultur-E.coli	Sigma
Bacto Tryptone	Zellkultur-E.coli	DIFCO
Bacto Yeast Extrakt	Zellkultur-E.coli	DIFCO
Ampicillin	Zellkultur-E.coli	Sigma

Tabelle 1: Verwendete Materialien für die Zellkultur

Geräte	Hersteller	Chemikalien	Hersteller
Labofuge 400R	Heraeus	Ammoniumpersulfat	Sigma
Biofuge fresco	Heraeus	Ethidiumbromid	Sigma
Brutschrank	Heraeus	NaCl	Merk
Laminar-Flow Hera Safe	Heraeus	Kcl	Merk
LightCycler Instrument	Roche	MgCl ₂	Merk
LC Carousel Centrifuge	Roche	Tris	Sigma
GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer	EDTA	Sigma
GelDoc 1000	BioRad	Ethanol	Merk
Power Rac 3000	BioRad	Isopropanol	Merk
Mikrowelle	Siemens	Glycerin	Merk
LB 960 Luminometer	Berthold	IPTG	Sigma
Kodak X-OMAT 5000RA	Kodak	X-Gal	Sigma
Photometer	Hewlett Packard	Polyacrylamid	Sigma
UV-Stratalinker	Stratagene	TEMED	Sigma
Elektrophoresekammern	BioRad	TBE	Sigma
Trans-Blot SD Semi-dry Transfer	BioRad	Glucose	Sigma
Cell		DMSO	Sigma
Unimax 1010	Heidolph	20xSSC	Sigma
Thermomixer	Eppendorf	2-Mercaptoethanol	Sigma

Tabelle 2: Verwendete Geräte

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

Materialien und Reagenzien	Methode	Hersteller
Puregene DNA Isolierungs Kit	DNA-Isolierung	Gentra
RNeasy Mini Kit	RNA-Isolierung	Qiagen
QIAshredder	RNA-Isolierung	Qiagen
cDNA Synthesis Kit for RT-PCR	cDNA-Synthese	Roche
LightCycler-h-ALAS Housekeeping Gene Set	RT-PCR	Roche
LightCycler -FastStart DNA Master Hybridization Probes	RT-PCR	Roche
LightCycler -FastStart DNA Master ^{Plus} SYBR Green I	RT-PCR	Roche
LightCycler-DNA Master Hybridization Probes	RT-PCR	Roche
LightCycler Capillaries	RT-PCR	Roche
LightCycler Relative Quantification Software	RT-PCR	Roche
Primer	Quantifizierung PCR/Mutagenese/Sequenzierung	Sigma Genosys Biosource
Sonden / Primer	Genotypisierung	TIB Molboil
Expand Long Template PCR System	RT-PCR	Roche
AmpliTaq Polymerase	PCR	Applied Biosystem
dNTP Set	PCR	Amersham Bioscience
Pfu DNA Polymerase	PCR	Promega
QIAquick PCR Purification Kit	Aufreinigung PCR-Produkt	Qiagen
QIAEX II Gel Extraction Kit	Isolierung von DNA aus Agarose Gelen	Qiagen
Agarose	DNA-Detektion Auftrennung von DNA- Fragmenten	Biozym
Nco I, Kpn I, Hind III	Restriktionsverdau	New England Biolabs
pGEM-T Easy Vector System	Klonierung	Promega
pGL3-Vektor	Klonierung/Luciferase-Assay	Promega
pRL-TK Vektor	Luciferase-Assay	Promega
E. coli JM 109	Transformation	Promega
High Pure Plasmid Isolation Kit	Plasmidisolierung	Roche
QIAfilter Plasmid Midi-Kit	Plasmidisolierung	Qiagen
GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System	Mutagenese	Invitrogen
Transfectam	Transfektion	Promega
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Luciferase-Assay	Promega
NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents Kit	Nuklearproteinextraktion	Pierce
BCA Protein Assay Kit	Proteinbestimmung	Pierce
DIG Gel Shift Kit, 2nd Generation	EMSA	Roche
DIG Wash and Block Buffer Sets	EMSA	Roche
Membran: Nytran Super Charge	EMSA	Schleicher und Schuell
Chemiluminescent Detection Film	EMSA	Roche
NFkB p50 Antikörper	EMSA	Santa Cruz
NFkB p65 Antikörper	EMSA	Santa Cruz
ZFP42(MZF1) Antikörper	EMSA	Abgent

Tabelle 4: Verwendete Materialien und Reagenzien

Untersuchungen am Probenmaterial von Probanden erfolgten mit vorheriger Genehmigung durch die Ethikkommission sowie dem schriftlichen Einverständnis der Probanden.

Alle Versuche wurden mit gereinigten und autoklavierten Materialien bzw. sterilen Einwegplastikwaren, die prinzipiell RNase frei sind, durchgeführt. Im Umgang mit Zellkulturen wurde stets unter sterilen Bedingungen gearbeitet.

2.1 Zellkultur humaner Zelllinien

Die hier beschriebenen Zelllinien wurden zur Gewinnung von DNA, RNA und Nuklear-extrakt eingesetzt. Zusätzlich wurde die SH-SY5Y Zelllinie für transiente Transfektionen verwendet.

Alle Zelllinien wurden regelmäßig auf eventuelle Mycoplasmenkontaminationen getestet.

Die Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen in DMEM-Medium kultiviert, welches mit 10 % FKS und 1% Penicillin/Streptomycin supplementiert wurde. Die Kulturen wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und in einer mit 5% CO₂ angereicherten Atmosphäre inkubiert.

2.2 DNA-Isolierung

Zur Gewinnung von genomischer DNA wurden je 300µl EDTA-Blut eingesetzt. Die DNA-Isolierung erfolgte mit dem Puregene Genomic DNA Purification Kit (Gentra) und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die gewonnene DNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

2.3 RNA-Isolierung

Für die Gewinnung von Gesamt-RNA wurde der RNeasy Mini Kit (Qiagen) verwendet. Die Isolierung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierfür wurden abgeerntete und pelletierte U937, SH-SY5Y, SK-N-AS, SK-N-DZ und SK-N-FI Zellen verwendet. Zur Homogenisierung der Proben wurden QIAshredder (Qiagen) eingesetzt. Die gewonnene RNA wurde bei -80°C schockgefroren und aufbewahrt.

2.4 cDNA-Synthese

Zur reversen Transkription der isolierten RNA in cDNA wurde der 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (Roche) verwendet.

Ansatz zur cDNA-Synthese:

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
10x Reaktions-Puffer	2 μ l	1x
25 mM MgCl ₂	4 μ l	5 mM
dNTP-Mix	2 μ l	1 mM
Random Primer p(dN) ₆	2 μ l	3,2 μ g
RNase Inhibitor	1 μ l	50 U
AMV Reverse Transkriptase	0,8 μ l	\geq 20 U
RNA	8,2 μ l	-
Endvolumen	20 μl	-

Tabelle 5: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese

Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers (Roche). Die gewonnene cDNA wurde im Anschluss jeweils 1:2 mit ddH₂O verdünnt und bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

2.5 Echtzeit-PCR

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht es, in vitro bestimmte Nukleotidsequenzen spezifisch zu vervielfältigen. Bei der Echtzeit-PCR (engl.: Real-Time-PCR, RT-PCR) kann diese Vervielfältigung in Echtzeit verfolgt werden. Die Messung der Produktzunahme erfolgt durch Fluoreszenzlicht, welches in Abhängigkeit zur Produktmenge erzeugt wird (Heid et al., 1996). Dies ermöglicht es die exponentielle Phase der Reaktion zu identifizieren und für eine Quantifizierung der Templatemenge zu nutzen. In der flourometrischen Echtzeit-Detektion unterscheidet man zwei Methoden:

1. Sequenzspezifische Detektion mit SYBR-Green I

SYBR-Green I ist ein Cyaninfluoreszenzfarbstoff, der sequenzspezifisch in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA bindet. Es lässt sich bei 497nm maximal anregen und erreicht, gebunden an DNA, bei 521 nm seine maximale Emission (Roche, 1999). Die Spezifität der Amplifizierung wird bei dieser Methode alleine durch die Primer bestimmt. Jedoch lässt sich durch eine produktcharakteristische Schmelzkurve das Amplifikat von Artefakten unterscheiden (Bustin, 2000).

2. Sequenzspezifische Detektion mit fluorophormarkierten Sonden

Hierbei werden PCR-Produkte sequenzspezifisch detektiert, indem fluorophormarkierte Oligonukleotide an eine Zielsequenz innerhalb des PCR-Produktes hybridisieren. Eine Möglichkeit zur Erzeugung sequenzspezifischer Fluoreszenzsignale ist die Verwendung von Hybridisierungssonden. Diese bestehen aus zwei markierten Oligonukleotiden, welche benachbart an die Zielsequenz hybridisieren, so dass der Donorfluorophor der einen Sonde in räumlicher Nähe des Akzeptorfluorophors der anderen Sonde positioniert ist. Die beiden Sonden können dadurch im angeregten Zustand über Fluoreszenz Resonanz Energietransfer (FRET) miteinander interagieren. Zur Anregung wird Licht in einer Wellenlänge verwendet, welches nur vom Donorfluorophor (Fluoreszein) absorbiert wird. Befindet sich nun das Oligonukleotid mit dem Akzeptorfluorophor (LightCycler-Red) in direkter Nachbarschaft findet, ein Fluoreszenz Resonanz Energietransfer vom Donor auf den Akzeptor statt. Dieser kann nun die übertragene Energie als Fluoreszenzlicht abgeben (Wittwer et al., 1997).

2.5.1 Relative Quantifizierung

Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression eines Zielgenes mit der Expression eines nicht regulierten Haushaltsgenes normalisiert. Dabei wird nicht die absolute Startkopienzahl bestimmt, sondern die Expression wird auf ein zweites, ubiquitäres und unreguliertes Gen bezogen (Pfaffl, 2004).

2.5.1.1 Standards

Zielgen (MOR-Gen):

Für die Konstruktion des MOR-Standards wurde eine konventionelle PCR durchgeführt. Die hierfür verwendeten Primer, welche auch in den anschließenden Quantifizierungsläufen verwendet wurden, binden spezifisch an Sequenzabschnitte des zweiten und dritten Exons des MOR-Gens. Nach einer Überprüfung im Agarose-Gel wurde das PCR-Produkt aufgereinigt (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen) und entsprechend den Angaben des Herstellers in den pGEM-T Easy Vektor (Promega) kloniert. Das hieraus gewonnene Plasmid pGEM-MR4/5 wurde durch PCR und Sequenzierung (4baseLab) auf Einbau und Sequenzübereinstimmung überprüft. Zusätzlich wurde, nach einer Linearisierung des Plasmids (NcoI, New England Biolabs) mittels Gelelektrophorese kontrolliert, dass nur eine Kopie des Genabschnittes eingebaut wurde.

Reaktionsansatz zur Herstellung der MOR-Standards:

1. PCR:

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
ddH ₂ O, steril, PCR-rein	40 µl	-
10 x PCR-Puffer	5 µl	1x
dNTP	2 µl	100 µM
Primer: MR4	0,5 µl	0,25 µM
Primer: MR5	0,5 µl	0,25 µM
AmpliTaq Polymerase	0,5 µl	2,5 U
cDNA	5 µl	-
Endvolumen	50 µl	-

Tabelle 6: PCR-Reaktionsansatz

PCR-Programm:

1 Zyklus	95°C	1:30 min
35 Zyklen	95°C	20 sec
	57°C	20 sec
	72°C	20 sec
1 Zyklus	72°C	4:00 min
1 Zyklus	4°C	∞

Tabelle 7: PCR-Programm zur Erstellung des MOR-Standards

2. Restriktion:

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
ddH ₂ O, steril	38 µl	-
NEB-4	5 µl	1x
Nco I	2 µl	20 U
Plasmid	5 µl	5 µg
Endvolumen	50µl	-

Inkubation:
2-3h bei 37°C

Tabelle 8: Reaktionsansatz Restriktionsverdau

Effizienzvergleich:

Da für die Quantifizierung cDNA verwendet werden sollte, die Standardreihe jedoch mit einem Plasmid hergestellt wurde, musste vor der eigentlichen Quantifizierung sichergestellt werden, dass die Amplifikation aus cDNA und Plasmid mit der gleichen Effizienz (E) erfolgt. Hierfür wurden von cDNA und Plasmid jeweils 3-4 Verdünnungsstufen hergestellt

und in eine RT-PCR unter den Bedingungen der Quantifizierungsläufe als Template eingesetzt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass $\Delta E \leq 0,02$ ist.

Die Effizienz errechnet sich aus der Formel: $E = 10^{-1/\text{Steigung}}$

Anschließend wurden 6 Verdünnungsstufen des Plasmidstandards (10^{-6} - 10^{-11}) hergestellt. Mit diesen wurde eine RT-PCR unter den Bedingungen der MOR-Quantifizierungsläufe durchgeführt und als MOR-Standardlauf gespeichert. Hierbei wurden jeweils vier Ansätze pro Verdünnungsstufe in die RT-PCR eingesetzt.

Haushaltsgen:

Zur relativen Quantifizierung der MOR-Expression auf RNA-Ebene in den vier Neuroblastomzelllinien, wurde das Haushaltsgen ALAS (5-Aminolevulinat-Synthase) gewählt. In Vorversuchen konnte in den vier Neuroblastomzelllinien keine Regulierung von ALAS festgestellt werden. Zur Herstellung des Haushaltsgen-Standards wurde aus der 5×10^6 ALAS-RNA (im LightCycler-h-ALAS Housekeeping Gene Set Kit (Roche) enthalten) cDNA synthetisiert. Von dieser wurden 5 Verdünnungen (5×10^5 - 5×10^1) hergestellt und jeweils vier Ansätze pro Verdünnung in eine RT-PCR eingesetzt. Diese RT-PCR wurde unter den Bedingungen der Haushaltsgen-Quantifizierungsläufe durchgeführt und als Haushaltsgen-Standardlauf gespeichert.

2.5.1.2 Erstellung des „Fit Coefficient File“

Der Fit Coefficient File beschreibt die Kinetik während einer PCR und errechnet sich aus den Standard-Verdünnungsreihen (Roche, 2001).

Mit der LightCycler Relative Quantification Software (Roche) wurde der Fit Coefficient File erstellt, indem der MOR- und der Haushaltsgen-Standardlauf als „dual color experiment“ in die Software geladen und von dieser verrechnet wurden. Das Ergebnis wurde anschließend als Fit Coefficient File gespeichert.

2.5.1.3 Kalibrator

Der Kalibrator wird als Probe in jeder Quantifizierungs-PCR mitgeführt und dient zur Normalisierung der Endergebnisse. Hierbei wird das Verhältnis von Zielgen/Haushaltsgen der Proben durch das Verhältnis Zielgen/Haushaltsgen des Kalibrators dividiert. Daher ist es notwendig, dass der Kalibrator ein konstantes Verhältnis von Zielgen/Haushaltsgen aufweist.

In den durchgeführten Quantifizierungsläufen wurde die cDNA der SH-SY5Y Zelllinie (1:25 verdünnt) als Kalibrator eingesetzt.

2.5.1.4 Quantifizierungsläufe

Zur Quantifizierung der MOR-Expression auf RNA-Ebene in den vier Neuroblastomzelllinien SH-SY5Y SK-N-AS, SK-N-DZ und SK-N-FI wurde von jeder Zelllinie über 5-6 Passagen RNA isoliert, diese in cDNA transkribiert und anschließend in der RT-PCR quantifiziert. Hierbei wurden die Zielgenläufe mit SYBR-Green I durchgeführt, während die Transkripte des Haushaltsgens ALAS mit Sonden detektiert wurden. Die Amplifizierung der Zielgen und Haushaltsgen Transkripte erfolgte in getrennten PCR-Läufen:

Durchführung der Zielgenläufe:

Verwendete Primer:

	Bezeichnung	Sequenz (in 5' → 3' Richtung)
	MR4:	CAGATGCCTTAGCCACCAGTA
	MR5:	GCGCAAGATCATCAGTCCATA

Tabelle 9: verwendete Primer für die Quantifizierung

RT-PCR

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
ddH ₂ O, steril, PCR-rein	10 µl	-
Primer: MR4	0,5 µl	0,25 µM
Primer: MR5	0,5 µl	0,25 µM
LC-FastStart DNA Master ^{plus} SYBR Green I, 5 x konz.	4 µl	1 x
cDNA	5 µl	-
Endvolumen	20 µl	-

Tabelle 10: PCR-Reaktionsansatz Quantifizierung

PCR-Programm:

1 Zyklus	95°C 10 min	Denaturierung
50 Zyklen	95°C 15 sec	Amplifikation
	60°C 5 sec	
	72°C 16 sec	
	81°C 0 sec → Detektion	
1 Zyklus	95°C 0 sec	Schmelzkurve
	55°C 15 sec	
	98°C 0 sec	
1 Zyklus	40°C 30sec	Kühlung

Tabelle 11: PCR-Programm Quantifizierung

Durchführung der **Haushaltsgenläufe**:

RT-PCR:

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
ddH ₂ O, steril, PCR-rein	8,6 µl	-
MgCl ₂ (25mM)	2,4 µl	4 mM
h-ALAS Detection Mix, 10x konz.	2 µl	1 x
LC-FastStart DNA Master Hybridization Probes, 10 x konz.	2 µl	1 x
cDNA	5 µl	-
Endvolumen	20 µl	-

Tabelle 12: PCR-Reaktionsansatz Haushaltsgen

PCR-Programm:

1 Zyklus	95°C 10 min	Denaturierung
45 Zyklen	95°C 10 sec	→ Detektion Amplifikation
	57°C 15 sec	
	72°C 15 sec	
1 Zyklus	95°C 0 sec	Schmelzkurve
	50°C 15 sec	
	98°C 0 sec	
1 Zyklus	40°C 30sec	Kühlung

Tabelle 13: PCR-Programm Haushaltsgen

Bei der Beladung des LightCycler Rotors wurde darauf geachtet, dass den Proben im Zielgen- und Haushaltsgenlauf die gleiche Rotorposition zugeteilt wurde. Von allen Proben wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt, vom Kalibrator eine Dreifachbestimmung.

2.5.1.5 Auswertung

Die Auswertung der Quantifizierungsläufe erfolgte mit der LightCycler Relative Quantification Software (Roche). Hierbei wurde der jeweilige Zielgenlauf mit dem dazugehörigen Haushaltsgenlauf und dem abgespeicherten Fit Coefficient File in das Programm geladen und mit diesem die „Normalisierte Ratio“ berechnet. Das Ergebnis drückt sich in folgender Formel aus:

$$\text{Normalisierte Ratio} = \frac{\text{Konzentration Zielgen (Probe)}}{\text{Konzentration Haushaltsgen (Probe)}} : \frac{\text{Konzentration Zielgen (Kalibrator)}}{\text{Konzentration Haushaltsgen (Kalibrator)}}$$

2.5.2 Genotypisierung

Die untersuchten Einzel-Nukleotid-Polymorphismen wurden mittels Echtzeit-PCR und anschließender Schmelzkurvenanalyse detektiert. Hierfür wurden Sondensysteme verwendet, welche jeweils aus zwei sequenzspezifischen und fluorophor markierten Oligonukleotiden bestanden (siehe 2.4).

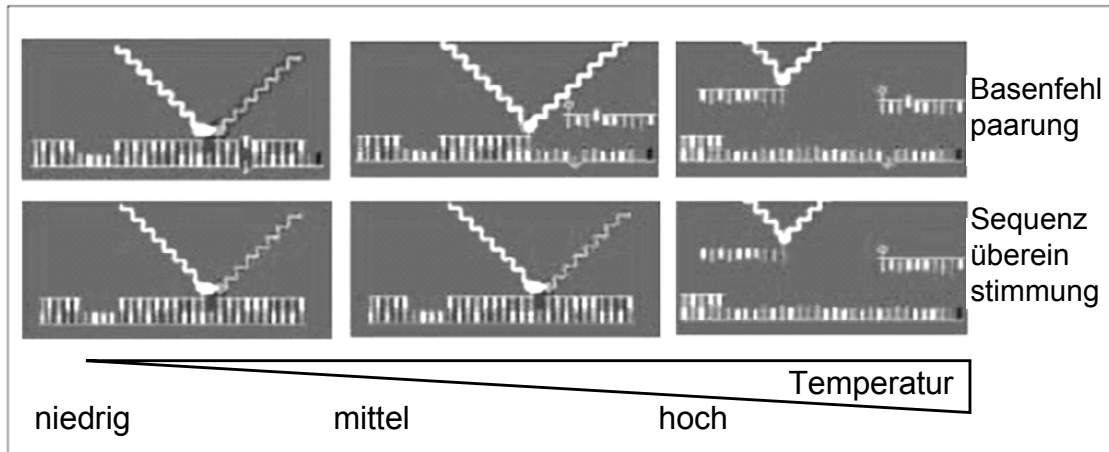


Abbildung 11: Funktionsprinzip der Sondensysteme

Bei dieser Methode hybridisiert die so genannte Sensorsonde genau im Bereich der Variante an die Zielsequenz. Im Anschluss an die PCR wird in der Schmelzkurvenanalyse die Schmelztemperatur des Sonden-Zielsequenz Hybrids bestimmt. Hierbei löst sich das Sonden-system mit einer destabilisierenden Basenfehlpaarung bei einer niedrigeren Schmelztemperatur (T_m) ab als bei völliger Übereinstimmung mit der Zielsequenz (Abb. 11) (Roche, 2000). Dieses zeigt sich in der ersten Ableitung der Schmelzkurve durch einen im Temperaturbereich verschobenen Fluoreszenzpeak. Bei einem heterozygoten Mutationsträger erhält man zwei Peaks: einen bei niedrigerer Temperatur (mit Basenfehlpaarung) und einen bei höherer Temperatur (völlige Sequenzübereinstimmung) (Abb. 12)

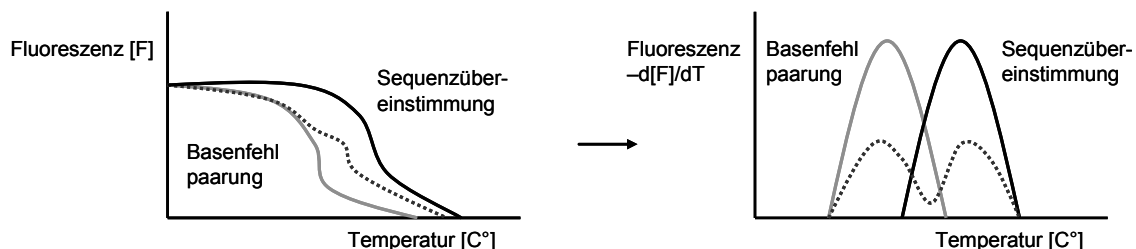


Abbildung 12: Prinzip der Schmelzkurvenanalyse

2.5.2.1 CYP2D6-Varianten

Von den sechs genomischen Varianten von CYP2D6, welche in dieser Arbeit untersucht wurden, wurden fünf Varianten mittels Echtzeit-PCR mit anschließender Schmelzkurven-

analyse detektiert. Hierbei wurden die Allele *3 und *7 zusammen in einer Reaktion detektiert (Abb.13A) und die Allele *4, *6 und *8 zusammen in einer zweiten Reaktion analysiert (Abb.13B). Für beide Reaktionen wurden LightCycler-Red640- und LightCycler-Red705 markierte Hybridisierungs sonden eingesetzt. Die verwendeten Hybridisierungs sonden und Primer wurden von TIB Molbiol konstruiert und hergestellt. Um die Amplifikation der Pseudogene CYP2D7 und CYP2D8 zu vermeiden, wurde von allen untersuchten Patientenproben ein Präamplifikat mittels konventioneller PCR erzeugt, welches für die Genotypisierung als Template eingesetzt wurde.

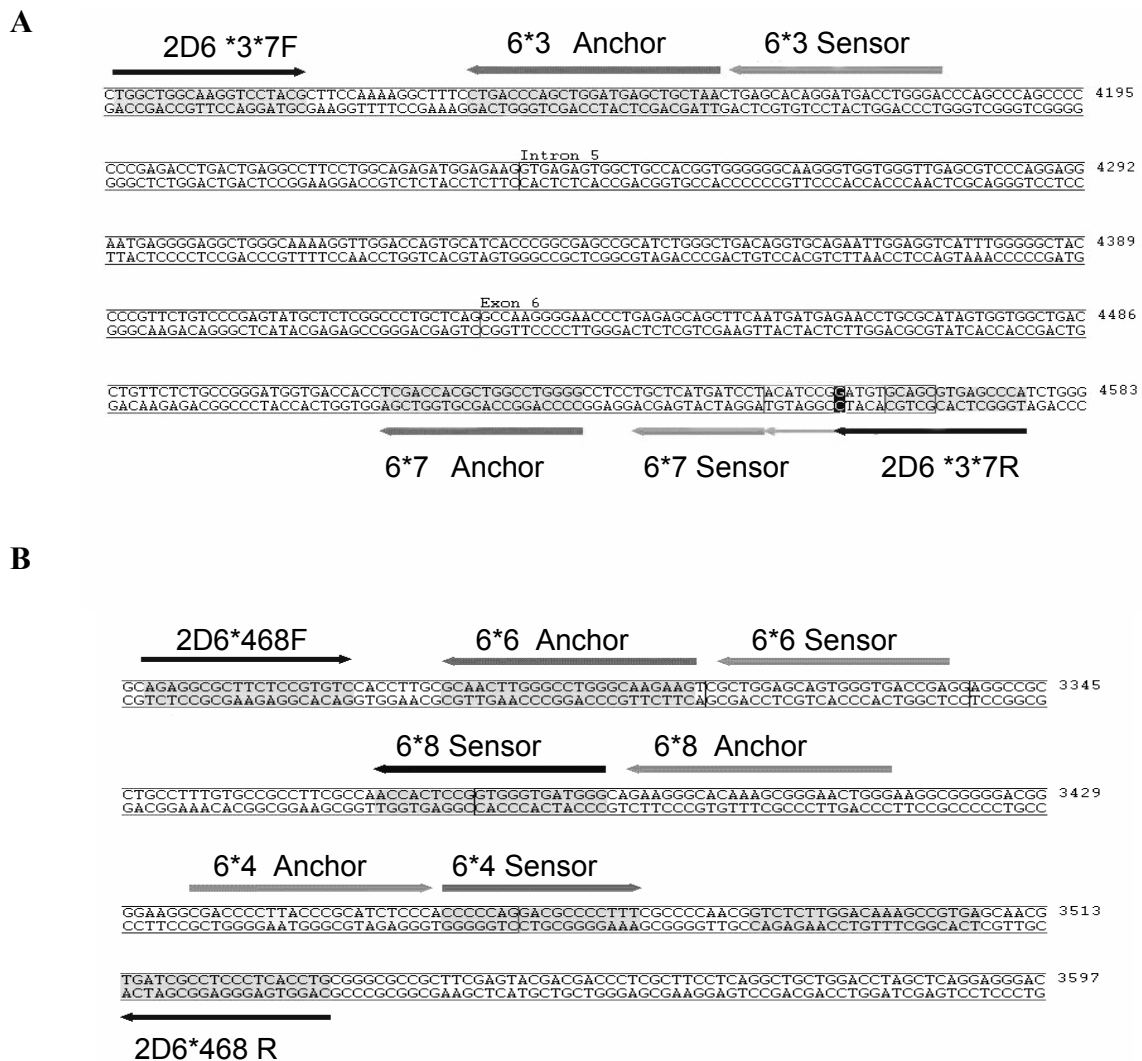


Abbildung 13: Lage der Primer und Hybridisierungs sonden

Zur Analyse der sechsten genomischen Variante, dem Allel *5, wurde die PCR-Methode nach Steen (Steen et al., 1995) mit anschließender Detektion im Agarose-Gel gewählt.

Durchführung:

PCR-Präamplifikat:

Das Präamplifikat wurde mit den dargestellten CG3/CG4 Primern (Tab. 14) aus genomischer DNA nach Stüven amplifiziert (Stüven et al., 1996). Dieses 1654 bp große PCR-Fragment wurde als Template (1:40 verdünnt) in die Genotypisierungen mittels Echtzeit-PCR eingesetzt.

Verwendete Primer und Sonden:

Bezeichnung	Position Mutation	Sequenz (in 5' → 3' Richtung)
CG3		CAAGGTGGATGCACAAAGAGT
CG4		ACACTCCTTCTTGCCTCCTAT
2D6*3*7F		TGGCTGGCAAGGTCCTACG
2D6*3*7R		TGGGCTCACGCTGCACATT
*3 Sensor	A 2637 del	TCCCAGGTCATCCGTGCTCA X
*3 Anchor		LC Red705-TTAGCAGCTCATCCAGCTGGGTCAG p
*7 Sensor	A 3023 C	ACATTCGGAGGTAGGATCATGAGCA X
*7 Anchor		LC Red640-CCCCAGGCCAGCGTGGTCGA p
2D6*4*6*8F		AGAGGCGCTTCTCCGTGTC
2D6*4*6*8R		CAGGTGAGGGAGGCGATCA
*4 Sensor	G 1934 A	LC Red640-CCCCAAGACGCCCCCTTT p
*4 Anchor		CGACCCCTTACCCGCATCTCCC X
*6 Sensor	T 1795 del	CCTCGGTCACCCACTGCTCCAGC X
*6 Anchor		LC Red640-CTTCTTGCCCAGGCCCAAGTTGC p
*8 Sensor	G 1846 T	LC Red705-CCCATCACCCACAGGAGTGGTT p
*8 Anchor		CCCAGTTCCCGCTTTGTGCCCTTC X
P *5F del		ACCGGGCACCTGTACTCCTCA
P *5R del		GCATGA GCTAAGGCACCCAGAC
P kontroll 5Fdel		CGTCTAGTGGGGAGACAAAC

Tabelle 14: Verwendete Sonden und Primer zur Detektion der CYP2D6-Varianten. Die Nummerierung der Nukleotidpositionen erfolgte nach Kimura (Kimura et al., 1989).

RT-PCR *3*7	Komponenten	Volumen	Endkonzentration
	ddH ₂ O, steril, PCR-rein	7,4 µl	-
	MgCl ₂ (25mM)	1,6 µl	3 mM
	LightCycler-DNA Master Hybridization Probes (10x konz.)	2 µl	1 x
	Primer 2D6*3*7F	0,5 µl	0,5 µM
	Primer 2D6*3*7R	0,5 µl	0,5 µM
	*3 Sensor	1,5 µl	0,15 µM
	*3 Anchor	1,5 µl	0,15 µM
	*7 Sensor	1,5 µl	0,15 µM
	*7 Anchor	1,5 µl	0,15 µM
	Präamplifikat (1:40 verd.)	2 µl	-
	Endvolumen	20 µl	-

Tabelle 15: PCR-Reaktionsansatz zur Detektion von CYP2D6*3 und *7

PCR-Programm:

1 Zyklus	95°C 30sec	Denaturierung
35 Zyklen	95°C 3 sec	→ Detektion Amplifikation
	65°C 10 sec	
	72°C 20 sec	
1 Zyklus	95°C 20 sec	Schmelzkurve
	40°C 20 sec	
	95°C 0 sec	
1 Zyklus	40°C 30sec	Kühlung

Tabelle 16: PCR-Programm zur Detektion von CYP2D6*3 und *7

RT-PCR
*4*6*8:

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
ddH ₂ O, steril, PCR-rein	4,4 µl	-
MgCl ₂ (25mM)	1,6 µl	3 mM
LightCycler-DNA Master Hybridization Probes (10x konz.)	2 µl	1 x
Primer 2D6*4*6*8 R	0,5 µl	0,5 µM
Primer 2D6*4*6*8 F	0,5 µl	0,5 µM
*4 Sensor	1,5 µl	0,15 µM
*4 Anchor	1,5 µl	0,15 µM
*6 Sensor	1,5 µl	0,15 µM
*6 Anchor	1,5 µl	0,15 µM
*8 Sensor	1,5 µl	0,15 µM
*8 Anchor	1,5 µl	0,15 µM
Präamplifikat (1:40 verd.)	2 µl	-
Endvolumen	20 µl	-

Tabelle 17: PCR-Reaktionsansatz zur Detektion von CYP2D6*4, *6 und *8

PCR-
Programm:

1 Zyklus	95°C 30sec	Denaturierung
30 Zyklen	95°C 3 sec	→ Detektion Amplifikation
	60°C 10 sec 72°C 12 sec	
1 Zyklus	95°C 20 sec	Schmelzkurve
	40°C 20 sec	
	95°C 0 sec	
1 Zyklus	40°C 30sec	Kühlung

Tabelle 18 PCR-Programm zur Detektion von CYP2D6*4, *6 und *8

PCR *5:

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
ddH ₂ O, steril, PCR-rein	15,9 µl	-
Puffer 1 (Roche)	2,5 µl	1 x
P *5F del	0,25 µl	0,1 µM
P *5R de	0,25 µl	0,1 µM
P kontroll 5Fdel	0,25 µl	0,1 µM
dNTP	3,6 µl	360 µM
Enzym: Expand (Roche)	0,25 µl	0,875 U
genomische DNA	2 µl	200 ng
Endvolumen	25 µl	-

Tabelle 19: PCR-Reaktionsansatz zur Detektion von CYP2D6*5

PCR-Programm:

1 Zyklus	94°C 2:00 min
35 Zyklen	96°C 10 sec
	66°C 20 sec
	68°C 9:00 min
1 Zyklus	68°C 7:00 min
1 Zyklus	4°C ∞

Tabelle 20: PCR-Programm zur Detektion von CYP2D6*5

Die Auswertung dieser PCR erfolgte über die Auftrennung in einem 0,9% igem Agarose-Gel für 120 min bei 80V und der Visualisierung durch Ethidiumbromid.

2.5.2.2 MOR-Varianten

Die drei untersuchten genomischen Varianten des MOR-Gens wurden mittels Echtzeit-PCR mit anschließender Schmelzkurvenanalyse detektiert.

Die Varianten G-554A und A-1320G wurden durch zwei PCR-Reaktionen zusammen in einer Kapillare detektiert (Abb. 14A/B) und der Polymorphismus A+118G alleine, in einer zweiten Kapillare, analysiert (Abb. 14C). Für die Reaktionen wurden LightCycler-Red640- und LightCycler-Red705 markierte Hybridisierungs sonden verwendet, welche zusammen mit den dazugehörigen Primern von TIB Molbiol konstruiert und hergestellt wurden.

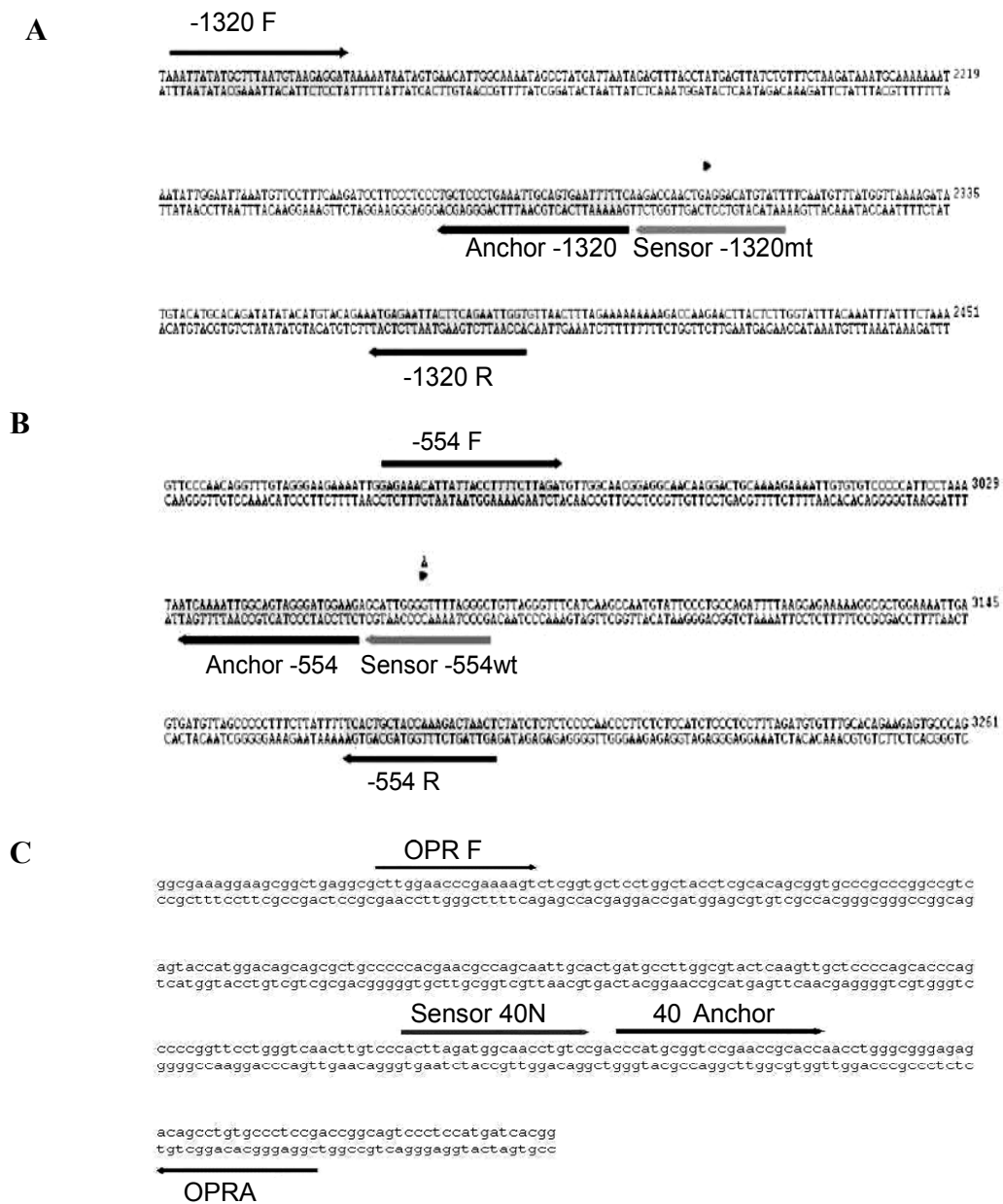


Abbildung 14: Lage der Primer und Hybridisierungssonden

Durchführung:

Verwendete Primer und Sonden:

Bezeichnung	Position Mutation	Sequenz (in 5' → 3'Richtung)
-1320 F		AATTATATGCTTTAATGTAAGAGGAT
-1320 R		ACCAATTCTGAAGTAATTCTCAT
Sensor-1320mt	A -1320 G	AATACATGTCCCCAGTTGGTCT—FL
Anchor-1320		LC Red640-GAAAAATTCACTGCAATTTTCAGGGAGCA--PH
-554 F		GAGAAACATTATTACCTTTTCTTAGA
-554 R		AGTTAGTCTTTGGTAGCAGTGA
Sensor-554wt	G -554 A	GCCCTAAAACCCCAATGC—FL
Anchor-554		LC Red705-CTTCCATCCCTACTGCCAATTTTGAT--PH
OPR F		GCTTGGAACCCGAAAAGTCT
OPR A		GGAGGGCACAGGCTGTCTCT
Sensor40N	A +118 G	CACTTAGATGGCAACCTGTCC--FL
40Anchor		LC Red640-CCCATGCGGTCCGAACCGCACCA--PH

Tabelle 21: Verwendete Sonden und Primer zur Detektion der MOR-Genvarianten. Die Nummerierung der Nukleotidpositionen erfolgte nach Hoehe (Hoehe et al., 2000).

RT-PCR

-1320/-554:

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
ddH ₂ O, steril, PCR-rein	2,8 µl	-
MgCl ₂ (25mM)	3,2 µl	5 mM
LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes (10x konz.)	2 µl	1 x
Primer -1320 F	0,5 µl	0,5 µM
Primer -1320 R	0,5 µl	0,125 µM
Primer -554 F	0,5 µl	0,5 µM
Primer -554 R	0,5 µl	0,125 µM
Sensor-1320mt	2 µl	0,2 µM
Anchor-1320	2 µl	0,2 µM
Sensor-554wt	2 µl	0,2 µM
Anchor-554	2 µl	0,2 µM
genomische DNA	2 µl	200 ng
Endvolumen	20 µl	-

Tabelle 22: PCR-Reaktionsansatz zur Detektion von G-554A und A-1320G

PCR-Programm:

1 Zyklus	95°C 10 min	Denaturierung
50 Zyklen	95°C 15 sec	→ Detektion Amplifikation
	50°C 10 sec	
	72°C 10 sec	
1 Zyklus	95°C 10 sec	Schmelzkurve
	40°C 120 sec	
	80°C 0 sec	
1 Zyklus	40°C 20sec	Kühlung

Tabelle 23: PCR-Programm zur Detektion von G-554A und A-1320G

RT-PCR +118:

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
ddH ₂ O, steril, PCR-rein	8 µl	-
MgCl ₂ (25mM)	2 µl	3,5 mM
LightCycler-DNA Master Hybridization Probes (10x konz.)	2 µl	1 x
Primer OP17	1 µl	0,25 µM
Primer OPR A	1 µl	1 µM
Sensor40N	2 µl	0,2 µM
40Anchor	2 µl	0,2 µM
genomische DNA	2 µl	200 ng
Endvolumen	20 µl	-

Tabelle 24: PCR-Reaktionsansatz zur Detektion von A+118G

PCR-Programm:

1 Zyklus	95°C 10 min	Denaturierung
30 Zyklen	95°C 3 sec	→ Detektion Amplifikation
	63°C 10 sec	
	72°C 10 sec	
1 Zyklus	95°C 20 sec	Schmelzkurve
	40°C 20 sec	
	90°C 0 sec	
1 Zyklus	40°C 30sec	Kühlung

Tabelle 25: PCR-Programm zur Detektion von A+118G

2.6 Reporter-gen-Konstrukte

Die Anwendung von Reporter-gen-Assays ermöglicht es, regulatorische Elemente von Genen zu identifizieren und zu untersuchen. Die dabei verwendeten Reporter-gen-Konstrukte

bestehen aus der kodierenden Sequenz des „Reporters“, einem fluoreszierenden Protein oder einem Enzym (z.B. Luciferase) und einem Teil der regulatorischen Sequenz des zu untersuchenden Genes. Beide Elemente sind integriert in ein resistenztragendes Plasmid.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) gearbeitet. Ein 2577 bp großer Abschnitt aus dem Bereich der 5'-flankierenden Region des humanen MOR-Gens sowie eine Serie von 5'-Deletionen dieses Sequenzabschnittes wurden in einen pGL3-Luciferase Vektor (Promega) kloniert. Durch gerichtete Mutagenese wurden anschließend weitere 8 Konstrukte mit je einem Polymorphismus hergestellt. Die jeweiligen Reporter-Gen-Konstrukte wurden zusammen mit einem pRL-tk Kontrollvektor (Promega) in die MOR exprimierende Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y transient kotransfiziert. Anschließend wurden die aus den Transfektionsansätzen gewonnenen Lysate in einem Dual-Luciferase-Assay eingesetzt.

2.6.1 Plasmid Konstruktion

Zur Amplifizierung der 5'-flankierenden Sequenzabschnitte des humanen MOR-Gens wurde aus peripherem Blut isolierte DNA (2.2) verwendet. Zur Amplifizierung des 2577 bp großen Promotorfragments sowie der 5'-Deletionsfragmente, welche alle am 3'-Ende bis zur Position -32 reichten und die wichtigsten Transkriptionsstartpunkte umfassten, wurde der Primer OL zusammen mit dem je nach Fragment zugehörigen Primer OU1-OU6 (siehe Tab. 28) in die jeweilige PCR eingesetzt.

PCR

OU1-OU6

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
ddH ₂ O, steril, PCR-rein	20,25 µl	-
<i>Pfu</i> DNA Polymerase 10x Puffer	2,5 µl	1x
dNTP	1 µl	100 µM
Primer: OL	0,5 µl	0,5 µM
Primer: OU1-OU6	0,5 µl	0,5 µM
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	0,25 µl	0,5-0,75 U
genom. DNA	1 µl	100 ng
Endvolumen	25 µl	-

Tabelle 26: PCR-Reaktionsansatz zur Amplifizierung der 5'-Deletionsfragmente

PCR-Programm:

1 Zyklus	95°C	1:30 min
2 Zyklen	95°C	30 sec
	63°C	20 sec
33 Zyklen	72°C	2:30 min
	95°C	20 sec
	68°C	20 sec
1 Zyklus	72°C	2:30 min
1 Zyklus	72°C	10 min
1 Zyklus	4°C	∞

Tabelle 27: PCR-Programm zur Amplifizierung des 2577 bp großen Promotorfragments

Die 5'-Deletionsfragmente wurden unter ähnlichen Bedingungen, mit angepassten Annealingtemperaturen und verkürzten Extensionszeiten, durchgeführt. Zum Erhalten der *Hind* III und *Kpn* I Restriktionsstellen wurden bei allen Reaktionen zwei Zyklen mit niedrigeren Annealingtemperaturen vorgeschaltet.

Verwendete Primer:

Bezeichnung	Sequenz (in 5' → 3'Richtung)	Produktgröße	Plasmidbezeichnung	Promotorposition
OL	CCCAAGCTTGGGTAGCCAGGAGCACCGAGAC			
OU1	GGGGTACCCCGCCAGTGAAGAGACCTAC	328 bp	pGL3-328 bp	-364 → -36
OU2	GGGGTACCCCTCAAATTGGCAGTAGGGA	552 bp	pGL3-552 bp	-588 → -36
OU3	GGGGTACCCCTCCCTGCTCCCTGAAA	1329 bp	pGL3-1,3 kb	-1365 → -36
OU4	GGGGTACCCCGCAGACCTCCCTTAGGAAC	2577 bp	pGL3-2.6 kb	-2613 → -36
OU5	GGGGTACCCTACTGGATGCCACAACCTT	849 bp	pGL3-849 bp	-885 → -36
OU6	GGGGTACCCTCAGGGCAAATTTAGGTCA	2059 bp	pGL3-2,06 kb	-2095 → -36
OU7	GGGGTACCCCTTCCAGCCTCCGAATACC	263 bp	pGL3-263 bp	-299 → -36

Tabelle 28: Verwendete Primer zur Amplifizierung des 2577 bp großen Promotorfragmentes und der 5'-Deletionsfragmente. Die unterstrichenen Sequenzen zeigen die *Kpn*I und *Hind* III Restriktionsstellen.

Restriktionsverdau:

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
ddH ₂ O, steril	38 µl	-
NEB-2	5 µl	1x
<i>Hind</i> III	1 µl	20 U
<i>Kpn</i> I	2 µl	20 U
Plasmid	5 µl	5 µg
Endvolumen	50 µl	-

Inkubation:
über Nacht bei 37°C

Tabelle 29: Reaktionsansatz Restriktionsverdau

Anschließend wurden die PCR-Produkte einem A-Tailing unterzogen, in einen TA-cloning Vektor pGEM-T Easy kloniert und in kompetente JM109 *E. coli* Zellen transformiert. Die gesamte Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben (Promega). Bei der Transformation wurde der Hitzeschock jedoch nach Standardprotokollen (Sambrook and Russel, 2001) auf 90 Sekunden verlängert. Positive Kolonien wurden weiter kultiviert und deren Plasmid-DNA mit dem High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) isoliert. Mit den rekombinanten pGEM-T Easy Plasmiden wurde ein *Hind* III / *Kpn* I Restriktionsverdau durchgeführt, die Restriktionsfragmente im Agarose-Gel differenziert und mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen) isoliert. Danach wurden die isolierten Promotorfragmente jeweils in einen promotorlosen pGL3-basic Vektor subkloniert, in JM109 *E. coli* Zellen vervielfältigt und anschließend isoliert. Die Inserts der daraus gewonnenen pGL3-Plasmide (Tab. 28) wurden zur Verifizierung der Sequenz und der Ausrichtung innerhalb des Plasmids in beide Richtungen sequenziert (4baselab).

Von den plasmidtragenden *E. coli* Zellen wurden zusätzlich Glycerinstocks hergestellt, indem 0,5 ml der jeweiligen Kultur in einem Volumenverhältnis von 1:1 mit sterilem 50% igen Glycerin vermischt und bei -80°C gelagert wurden. Zur Gewinnung größerer Plasmid-DNA Mengen wurden neue Kulturen aus den Glycerinstocks herangezogen und aus diesen mit dem QIAfilter Plasmid Midi-Kit nach Herstellerangaben (Qiagen) die Plasmid-DNA präpariert.

2.6.2 Mutagenese

Für die gerichtete Mutagenese wurde das GeneTailor Site-Directed Mutagenesis System (Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet und die methylierten Wildtyp-Vektoren pGL3-552 bp, pGL3-1,3 kb und pGL3-2,06 kb eingesetzt. Die Mutagenesereaktion wurde

mit zwei sich überlappenden Primern durchgeführt (Tab. 33), wobei ein Primer die gewünschte Mutation enthielt. Im Anschluss wurden die jeweiligen Produkte in DH5 α -T1 *E. coli* (Invitrogen) transformiert und mit dem High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) isoliert. Die Inserts der hieraus gewonnenen Plasmide wurden in voller Länge und in beide Richtungen sequenziert, um den Einbau der „gewünschten“ Mutation zu überprüfen, sowie den Einbau von weiteren Mutationen auszuschließen. Im Anschluss wurden die Promotorfragmente mit Mutation erneut mittels *Hind* III / *Kpn* I Restriktionsverdau und Ligation in einen pGL3-basic Vektor subkloniert, um eventuelle Polymerasefehler der Mutagenesereaktion in den Plasmidelementen auszuschließen. Neben Transformation in JM109 *E. coli* Zellen, Kultivierung und Plasmidpräparation wurden auch von diesen Kulturen Glycerinstocks hergestellt. Zur Gewinnung größerer Plasmid-DNA Mengen wurden neue Kulturen aus den Glycerinstocks herangezogen und aus diesen mit dem QIAfileter Plasmid Midi-Kit nach Herstellerangaben (Qiagen) die Plasmid-DNA präpariert.

Durchführung:

Methylierung:

Komponenten	Volumen
Plasmid DNA	100 ng
Methylierungs Puffer	1,6 μ l
10 x SAM	1,6 μ l
DNA-Methylase (4U/ μ l)	1,0 μ l
Steriles, destilliertes Wasser	x
Endvolumen	16 μl

Tabelle 30: Reaktionsansatz Methylierung

Mutagenese:

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
ddH ₂ O, steril, PCR-rein	38,5 μ l	-
High Fidelity PCR Puffer 10x	5 μ l	1x
dNTP	1,5 μ l	300 μ M
MgSO ₄ (50 mM)	1 μ l	1 mM
Primer (je 10 μ M)	1,5 μ l	je 0,3 μ M
Platinum Taq High Fidelity	0,5 μ l	2,5 U
Methylierte Plasmid-DNA	2 μ l	-
Endvolumen	5 μl	-

Tabelle 31: PCR-Reaktionsansatz für die Mutagenesereaktion

PCR-Programm Mutagenese:

1 Zyklus	94°C	1:00 min
20 Zyklen	94°C	30 sec
	55°C	30 sec
	68°C	6 :30 min
1 Zyklus	68°C	10 min
1 Zyklus	4°C	∞

Tabelle 32: PCR-Programm der Mutagenesereaktion

Mutageneseprimer

Bezeichnu ng	Position Mutation	Sequenz (in 5' → 3'Richtung)	Plasmid- bezeichnug
M10U	G-172T	AGGAGAATGTCAGATGCTCA <u>T</u> CTCGGTCCCCT	pGL3-552 bp-172mut
M10L		TGAGCATCTGACATTCTCCTCTGCGTATAG	
M9U	A-236G	GCAGCGGTGCGGGGAGGTG <u>G</u> TGAGCCTCTGT	pGL3-552 bp-236mut
M9L		CACCTGCCCCGCACCGCTGCAGGAGGGGAG	
M8U	G-554A	AGGGATGGAAGAGCATTGGG <u>A</u> TTTTAGGGCTG	pGL3-552 bp-554mut
M8U		CCCAATGCTCTTCCATCCCTACTGCCAATT	
M6U	C-995A	TTTGTTTTAACAACTTCTT <u>A</u> TCAGAAGCATA	pGL3-1,3 kb-995mut
M6L		AAGAAGGTTGTAAAAACAAAACAAAATTTG	
M5U	A-1045G	GCTTTTCCTAGAATTTTTACGCTAGAAAACAG	pGL3-1,3 kb-1045mut
M5L		GTAAAAATTCTAGGAAAAGCCACATAATAT	
M4U	A-1320G	GAATTTTTCAAGACCAACTG <u>G</u> GACATGTATT	pGL3-1,3 kb-1320mut
M4L		CAGTTGGTCTTGAAAAATTCACTGCAATTT	
M3U	-1699insT	AAAGCTGATTTATAAAATGAT <u>T</u> TGACTCCAAGG	pGL3-2,06 kb-1699mut
M3L		TCATTTTATAAATCAGCTTTGTAACTTTGT	
M1U	G-1748A	CCTGTAGGGTAAAGTAACAT <u>A</u> TCCAAACTCAT	pGL3-2,06 kb-1748mut
M1L		ATGTTACTTTACCCTACAGGATGACAGTCT	

Tabelle 33: Verwendete Primer für die Mutagenesereaktionen. Die Sequenzpositionen richten sich nach Wendel und Höhe (Wendel and Hoehe, 1998).

2.6.3 Transfektion

Alle für die Transfektion verwendeten Plasmide wurden mit dem QIAfilter Plasmid Midi-Kit (Qiagen) präpariert. Die Ausbeute und die Reinheit der isolierten Plasmid-DNA wurden photometrisch ermittelt.

Zur Transfektion wurden SH-SY5Y Zellen benutzt, welche zwei Tage vor der Transfektion in 6-well Platten passagiert wurden, so dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 50%-70% aufwiesen. Die Zellansätze wurden jeweils mit 2,4 µg des Reporter-gen-Konstrukts und 0,1 µg des Renilla-Luciferase Vektors pRL-TK unter Anwendung von Transfectam (Promega) nach Herstellerangaben transfiziert. Hierbei wurde das Protokoll für Medium ohne Serum angewendet und eine Inkubationszeit von 2 Stunden gewählt. Im Anschluss wurden die Transfektionsansätze abgezogen, je 2 ml Komplett-medium/well auf die Zellen gegeben und diese für weitere 48 Stunden wachsen gelassen.

2.6.4 Luciferase-Assay

Im Luciferase-Assay wird Luciferin durch Firefly-Luciferase unter Freisetzung von Licht zu Oxyluciferin umgewandelt. Die Aktivität des jeweiligen Promotorfragmentes lässt sich im Luciferase-Assay durch die messbare Lichtemission bestimmen. Je stärker die Promotoraktivität, desto mehr Firefly-Luciferase-Protein wird gebildet, desto größer die Lichtemission. Das Einsetzen des Kontrollvektors pRL-TK, welcher die Renilla-Luciferase exprimiert, dient als interne Kontrolle und minimiert experimentelle Variabilitäten.

Der Luciferase-Assay wurde mit dem Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen aktiv lysiert und von dem gewonnenen Lysat 20 µl in den Assay eingesetzt. Die Messung erfolgte mit einem Centro LB 960 Luminometer (Berthold). Von allen Werten der transfizierten Zellen wurde der Wert der unbehandelten Zellen subtrahiert und die Luciferase-Aktivität als Verhältnis von Firefly- und Renilla-Luciferase-Aktivität dargestellt.

$$\text{Luciferase-Aktivität} = \text{Signal Firefly-Luciferase} / \text{Signal Renilla-Luciferase}$$

2.7 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Der EMSA ist eine Methode, die es ermöglicht DNA-Fragmente und DNA-Bindeproteine, welche an Protein-DNA-Wechselwirkungen beteiligt sind, zu identifizieren und zu charakterisieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden Abschnitte der 5`-flankierenden Sequenz des humanen MOR-Gens um die Positionen der Varianten G-554A und A-1320G mittels EMSA untersucht. Hierfür wurden Oligonukleotide aus der jeweiligen umgebenden Sequenz entwickelt, welche einmal die Wildtypsequenz und einmal die Mutationssequenz aufwiesen. Da die Variante G-554A in einer bekannten NFkB Bindestelle liegt (Kraus et al. 2003), wurden zusätzlich NFkB spezifische Oligonukleotide verwendet. Die jeweiligen Oligonukleotide wurden zusammen mit dem Nuklearextrakt der MOR exprimierenden Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y in den EMSA eingesetzt. Zur Durchführung der Assays wurde der DIG Gel Shift Kit, 2nd Generation (Roche) nach Herstellerangaben verwendet.

2.7.1 Nuklearextraktion

Die Nuklearproteinextraktionen wurden mit Hilfe des NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents Kit (Pierce) nach Herstellerangaben durchgeführt und die gewonnenen Proteine bei -80°C gelagert.

2.7.2 Proteinbestimmung

Die Proteinquantifizierung der Nuklearextrakte erfolgte photometrisch. Hierzu wurde der BCA Protein Assay Kit (Pierce) nach Herstellerangaben verwendet.

2.7.3 Doppelstrangsynthese und Markierung der Oligonukleotide

Die Doppelstrangsynthese der einzelsträngigen Oligonukleotiden (Tab. 34) und deren Digoxigenin-Markierung am 3`Ende wurde mit dem DIG Gel Shift Kit 2nd Generation (Roche) nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Doppelstrangsynthese wurden je 4 pmol der komplementären Oligonukleotide eingesetzt und die Effizienz der Markierung durch einen Detektions-Assay überprüft.

Verwendete Oligonukleotide:

Bezeichnung	Position Mutation	Sequenz (in 5' → 3' Richtung)
NFkB1		GCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT
NFkB2		AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC
O3a	-554 wt	GAGCATTGGGGTTTTAGGGCTGTTA
O3b		AACAGCCCTAAAACCCCAATGCTCT
O4a	G-554A	GAGCATTGGG <u>A</u> TTTTAGGGCTGTTA
O4b		AACAGCCCTAAAA <u>T</u> CCCAATGCTCT
O5a	-1320 wt	TTCAAGACCAACTGAGGACATGTATT
O5b		ATACATGTCCTCAGTTGGTCTTGAAA
O6a	A-1320G	TTCAAGACCAACTG <u>G</u> GGACATGTATT
O6b		ATACATGTCC <u>C</u> CAGTTGGTCTTGAAA

Tabelle 34: Verwendete Oligonukleotide, die Sequenzpositionen richten sich nach Wendel und Höhe (Wendel and Hoehe, 1998).

2.7.4 Gelshift-Reaktion

Die Gelshift-Reaktion wurde nach Angaben des Herstellers mit dem DIG Gel Shift Kit 2nd Generation (Roche) durchgeführt. Hierbei wurden je 112 fmol doppelsträngige und Dig-markierte Oligonukleotide zusammen mit 15 µg Nuklearextrakt von SH-SY5Y Zellen eingesetzt. Zusätzlich wurden je 0,1 µg poly L-lysine und 1µg des unspezifischen Kompetitors poly-[dCI-C)] verwendet. Um eventuelle Unterschiede in der Bindungsaktivität der DNA-Fragmente zum Proteinextrakt zwischen den Wildtypsequenzen und den dazugehörigen Sequenzen mit Variante festzustellen, wurden in den jeweiligen Reaktionen noch 2,5 – 15 pmol unmarkierte „kalte“ Sonden als spezifische Kompetitoren zugefügt.

Für Immunoshift-Experimente wurde das Nuklearextrakt zusammen mit dem entsprechenden Antikörper 30 Minuten auf Eis präinkubiert.

2.7.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Blot

Im Anschluss an die Gelshift-Reaktionen wurden die Ansätze zusammen mit 5 µl Ladepuffer auf ein 6% iges natives Polyacrylamidgel aufgetragen und in 0,5 x TBE Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte für 240 Minuten bei einer Spannung von 100V. Darauf folgend wurde ein Blot im Semi-dry-Verfahren auf eine Nylonmembran bei 25V für

50 Minuten durchgeführt. Danach wurde die Membran auf einen mit 2 x SSC durchtränkten Whatman-Filter gelegt und die Oligonukleotide durch UV-Crosslinking fixiert.

2.7.6 Chemilumineszenz Detektion

Die Detektion wurde unter Anwendung des DIG Gel Shift Kits 2nd Generation (Roche) und des DIG Wash and Block Buffer Sets (Roche) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Belichtung des Chemiluminescent Detection Films (Roche) erfolgte für 30-40 Minuten, die anschließende Entwicklung wurde mit dem Kodak X-OMAT 5000RA System vorgenommen.

2.7.7 Detektion von MZF1-Transkripten

Zur Detektion von MZF1-Transkripten wurde von der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y sowie aus Vollblut RNA isoliert, diese in cDNA transkribiert und anschließend in die Echtzeit-PCR eingesetzt. Die Auswertung der PCR erfolgte über Schmelzkurvenanalyse und Auftrennung in einem 1,5 % igen Agarose-Gel für 30 min bei 100V und anschließender Visualisierung durch Ethidiumbromid.

Verwendete Primer:

Bezeichnung	Sequenz (in 5' → 3'Richtung)
MZF1-L:	GACTCCTGGGTGGCAGCTAGA
MZF1-U:	GCCCAAGACACCTCCTAGGAC

Tabelle 35: Verwendete Primer zur Amplifizierung von MZF1-Transkripten

PCR-MZF1:

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
ddH ₂ O, steril, PCR-rein	10 µl	-
Primer: MZF1-L	0,5 µl	0,5 µM
Primer: MZF1-U	0,5 µl	0,5 µM
LC-FastStart DNA Master ^{Plus} SYBR Green I, 5 x konz.	4 µl	1 x
cDNA	5 µl	-
Endvolumen	20 µl	-

Tabelle 36: PCR-Reaktionsansatz zur Amplifizierung von MZF1-Transkripten

PCR-Programm

1 Zyklus	95°C 10 min	Denaturierung
45 Zyklen	95°C 20 sec	→ Detektion Amplifikation
	63°C 5 sec 72°C 5 sec	
1 Zyklus	95°C 10 sec	Schmelzkurve
	40°C 120 sec 99°C 0 sec	
1 Zyklus	40°C 30sec	Kühlung

Tabelle 37: PCR-Programm zur Amplifizierung von MZF1-Transkripten

2.8 Verwendete Programme und Datenbanken

Primerdesign: Oligo (MedProbe)

Sequenzanalyse: Gendoc: <http://www.psc.edu/biomed/genedoc/>

Blast (NCBI): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

Chromas: <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>

TFSEARCH: <http://mbs.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>

TESS: <http://www.cbil.upenn.edu/tess>

Statistik: GraphPad Prism 3.0

SPSS für Windows

3. Ergebnisse

3.1 Genotypisierung von PM-assozierten Variationen des CYP2D6 bei Schmerzpatienten

Um die Häufigkeit von PM-assozierten genomischen Varianten bei Schmerzpatienten zu ermitteln, wurde mittels Echtzeit-PCR und anschließender Schmelzkurvenanalyse eine zuverlässige und schnelle Methode zur Genotypisierung von fünf SNPs entwickelt.

Anschließend wurde ein Patientenkollektiv von 323 Individuen mittels dieser Methode genotypisiert. Zusätzlich wurde in diesem Kollektiv die Variante *5 (Nullallel) mittels konventioneller PCR mit anschließender Detektion im Agarose-Gel bestimmt.

3.1.1 Präamplifikat

Um eine Amplifikation der Pseudogene CYP2D7 und CYP2D8 zu vermeiden, wurde von allen untersuchten Patientenproben ein Präamplifikat mittels konventioneller PCR erzeugt. Alle PCR-Produkte zeigten nach der Auftrennung die erwartete Größe von 1,65 kb (Abb. 15) und wurden je nach Bandenstärke 1:10 bis 1:100 verdünnt in die Genotypisierungen mittels Echtzeit-PCR als Template eingesetzt.

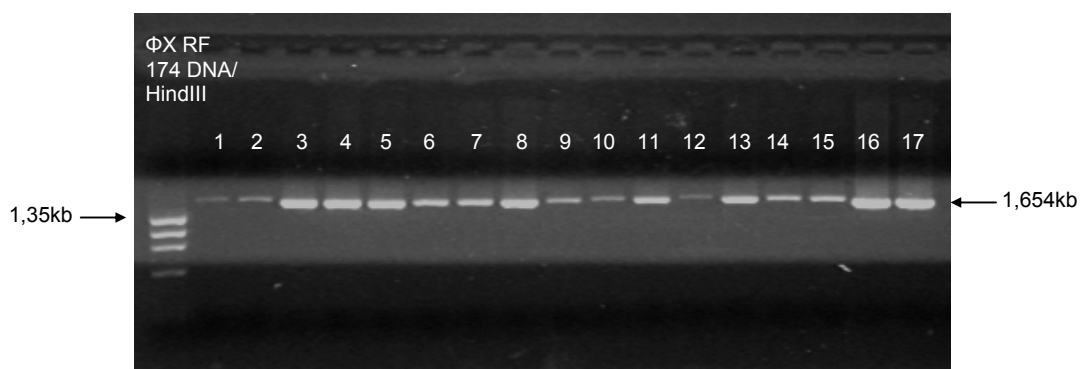


Abbildung 15: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte in einem 1% igen Agarose-Gel. Aufgetragen wurden jeweils 5 μ l PCR-Produkt sowie 0,2 ng des Standards. Alle Produkte zeigen eine Fragmentgröße von 1,65 kb.

3.1.2 Genotypisierung mittels Echtzeit-PCR

Mittels Echtzeit-PCR und anschließender Schmelzkurvenanalyse wurde ein schnelles und zuverlässiges Verfahren zur Genotypisierung von fünf mit dem PM-Genotyp assoziierten SNPs entwickelt. Die Differenzierung der jeweiligen Genotypen erfolgte durch die der PCR anschließenden Schmelzkurvenanalyse, bei welcher sich jeder mögliche Genotyp (Wildtyp, heterozygot und homozygot für die Variante) mit einem spezifischen Schmelzverhalten der Hybridisierungs sonden in Abhängigkeit zur Temperatur darstellte.

Aufgrund der räumlichen Nähe der Varianten *4, *6, und *8 bot es sich an, diese gemeinsam in einem PCR-Produkt zu analysieren und die Varianten *3 und *7 zusammen in einem zweiten PCR-Produkt zu detektieren.

3.1.2.1 CYP2D6 *3 und *7

Für die Genotypisierung dieser beiden Varianten wurde für CYP2D6*3 eine LightCycler-Red705 markierte Hybridisierungssonde und für CYP2D6*7 eine LightCycler-Red640 markierte Hybridisierungssonde eingesetzt. Hierdurch konnten die beiden Varianten in verschiedenen Fluoreszenzkanälen detektiert und differenziert werden. Für beide Varianten wurden mutationsspezifische Sonden verwendet, wodurch in der ersten Ableitung der Fluoreszenzpeak der Variante einen höheren Schmelzpunkt aufweist als der Fluoreszenzpeak des Wildtyps.

Um spezifische und eindeutige Fluoreszenzpeaks zu erhalten, wurden in der PCR verschiedene $MgCl_2$ -Konzentrationen (Abb. 16) und unterschiedliche Annealingtemperaturen (Abb. 17-19) getestet. Die Sondenspezifität für die Varianten *3 und *7 wurde anfangs in getrennten Reaktionen überprüft.

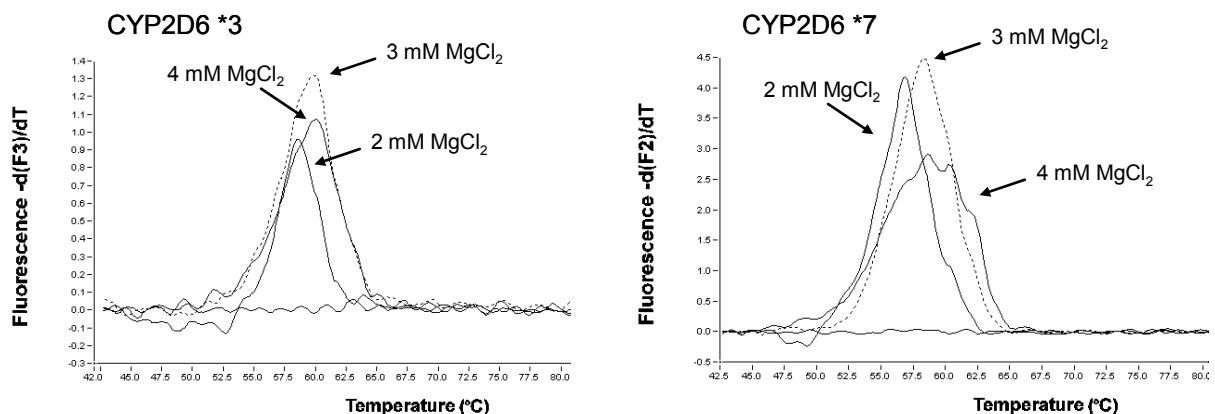


Abbildung 16: Fluoreszenzschmelzkurven nach unterschiedlichen $MgCl_2$ -Konzentrationen in den PCR-Ansätzen bei einer Annealingtemperatur von 55°C. Die $MgCl_2$ -Konzentration der gestrichelten Kurven wurde für die Genotypisierungen verwendet.

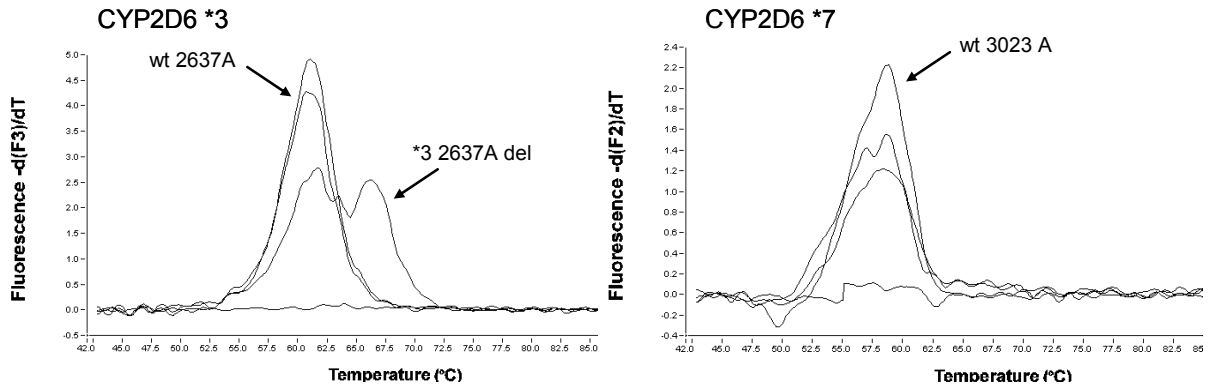


Abbildung 17: Fluoreszenzschmelzkurven nach einer Annealingtemperatur von 60°C

Die Genotypisierung des Patientenkollektivs wurde mit einer 3 mM MgCl₂-Konzentration und einer Annealingtemperatur von 65°C durchgeführt (Abb. 18, 19).

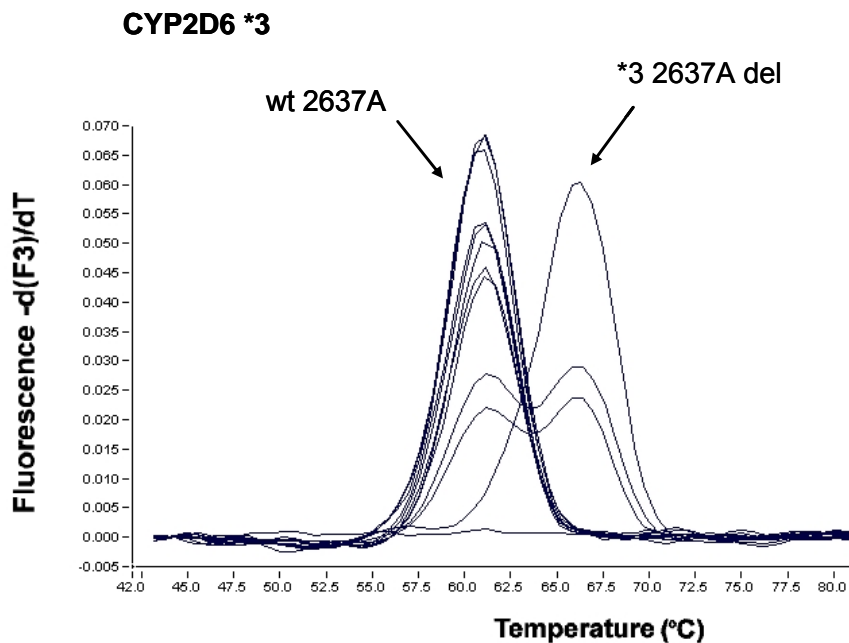


Abbildung 18: Fluoreszenzschmelzkurven zur Detektion der Variante CYP2D6 *3. Dargestellt ist die erste Ableitung der Fluoreszenz gegen die Temperatur im Fluoreszenzkanal 3 [-d(F3)/dT]. Die Schmelzkurvenanalyse zeigt acht Individuen mit einem homozygoten Wildtyp-Allel an Position 2637 (wt 2637A), ein homozygotes Individuum mit *3/*3 Genotyp (*3 2637A del), zwei heterozygote Individuen mit Wildtyp/*3 Genotyp (*3 2637A del) sowie die Negativkontrolle.

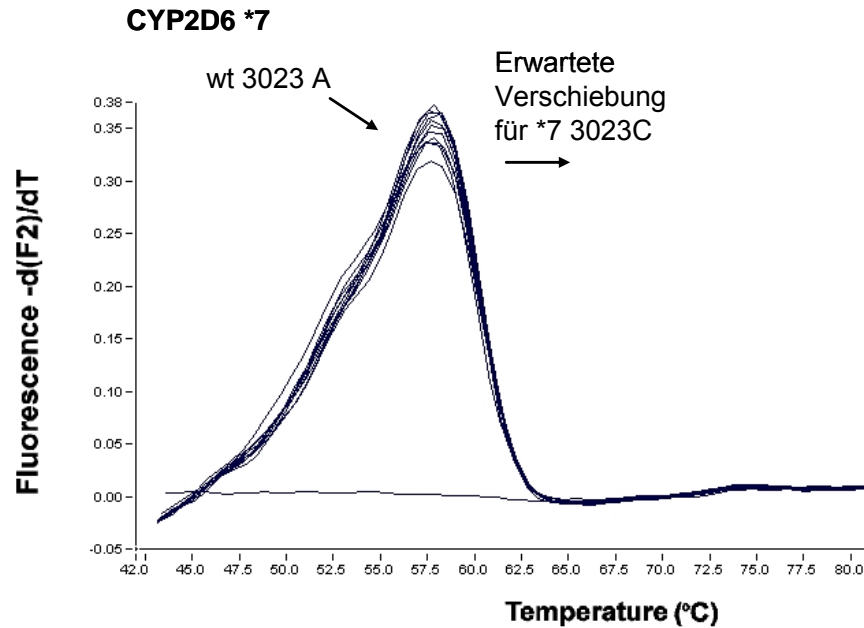


Abbildung 19: Fluoreszenzschmelzkurven zur Detektion der Variante CYP2D6 *7. Dargestellt ist die erste Ableitung der Fluoreszenz gegen die Temperatur im Fluoreszenzkanal 2 $[-d(F2)/dT]$. Die Schmelzkurvenanalyse zeigt zwölf Individuen mit einem homozygoten Wildtyp-Allel an Position 3023 (wt 3023A), die Richtung für die erwartete Verschiebung der Variante (*7 3023C) sowie die Negativkontrolle.

3.1.2.2 CYP2D6 *4, *6 und *8

Zur Genotypisierung dieser drei Varianten wurden für CYP2D6 *4 und *6 LightCycler-Red640 markierte Hybridisierungssonden eingesetzt und für CYP2D6 *8 eine LightCycler-Red705 markierte Hybridisierungssonde verwendet.

Um eine simultane Detektion von CYP2D6 *4 und *6 im Fluoreszenzkanal 2 durchzuführen, war es wichtig, dass sich die Fluoreszenzpeaks nicht überlagerten. So wurden die Sonden zur Detektion dieser Varianten anfangs in getrennten Kapillaren getestet. Hierbei zeigten sich nach Verwendung einer mutationspezifischen Sonde zur Detektion der Variante *4 deutlich differenzierbare Fluoreszenzpeaks für den Wildtyp und die Variante.

Mit einer mutationspezifischen Sonde zur Detektion der Variante *6 konnte kein eindeutiger Fluoreszenzpeak für einen homozygoten Träger dieser Variante erzeugt werden. Zudem überlagerten sich die Fluoreszenzpeaks der SONDENSYSTEME zur Detektion der Varianten *4 und *6 bei bestimmten Genotypkonstellationen (Abb. 20A). Aus diesen Gründen wurde eine wildtypspezifische und um zwei Nukleotide verlängerte Sonde zur Detektion der Variante *6 getestet. Nach Verwendung dieser Sonde zeigten sich in einem erhöhten Temperaturbereich deutlich differenzierbare Fluoreszenzpeaks für den Wildtyp und die Variante, welche sich nicht mehr mit dem Fluoreszenzpeak für die Variante *4 überlagerten (Abb. 20B).

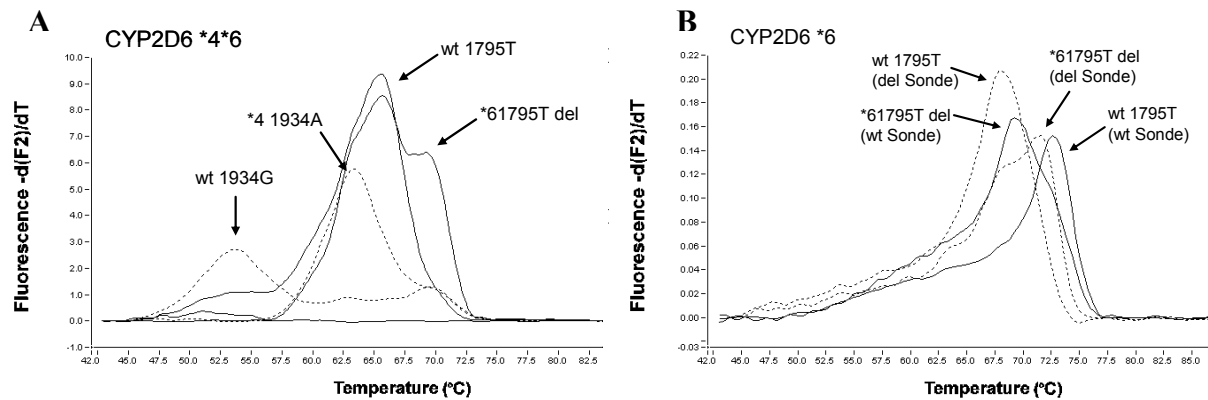


Abbildung 20: A: Fluoreszenzschmelzkurven nach getrennten PCR-Reaktionen zur Detektion der Varianten CYP2D6*4 und *6. B: Vergleich der Fluoreszenzschmelzkurven nach Verwendung der wildtypspezifischen (wt Sonde) und der mutationsspezifischen (del Sonde) Sonde zur Detektion der Variante CYP2D6*6.

Die Analyse der Variante CYP2D6*8 erfolgte im Fluoreszenzkanal 3. Die Bedingungen zur Detektion dieser Variante wurden anfangs getrennt von den Bedingungen zur Detektion der Varianten CYP2D6 *4 und *6 ausgetestet. Dabei ließ sich mit der zuerst verwendeten mutationsspezifischen Sonde kein optimales Ergebnis erzielen. Deshalb wurde eine um ein Nukleotid verlängerte und wildtypspezifische Sonde zur Detektion der Variante *8 getestet. Mit dieser Sonde ließen sich deutliche verbesserte Signale erzielen (Abb. 21), so dass diese für alle nachfolgenden Versuche weiterverwendet wurde.

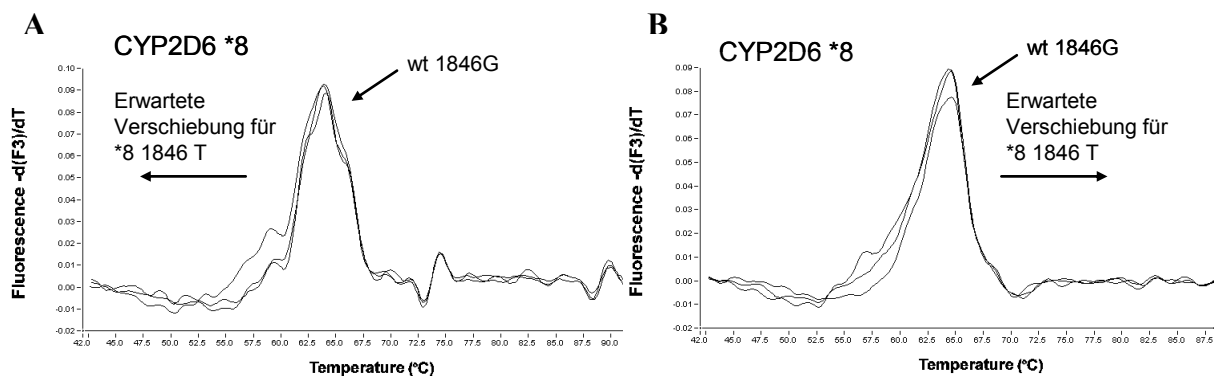


Abbildung 21: Fluoreszenzschmelzkurven der beiden getesteten Sonden zur Detektion der Variante *8. A: mutationsspezifische Sonde. B: wildtypspezifische und um ein Nukleotid verlängerte Sonde

Nachdem die Bedingungen der Einzelreaktionen ausgetestet wurden, galt es, die optimalen Bedingungen für den Gesamtansatz mit einem Primerpaar und den drei SONDENSYSTEMEN zu finden. Hierfür wurden unterschiedliche Primer-, Sonden- und $MgCl_2$ -Konzentrationen unter verschiedenen PCR-Bedingungen getestet. Die besten Ergebnisse wurden nach Verwendung von je 0,5 μM Primer, 0,15 μM Sonde und 3 mM $MgCl_2$ erzielt, so dass die Genotypisierung

rungsstudie des Patientenkollektivs unter diesen Bedingungen durchgeführt wurde (Abb. 22-24):

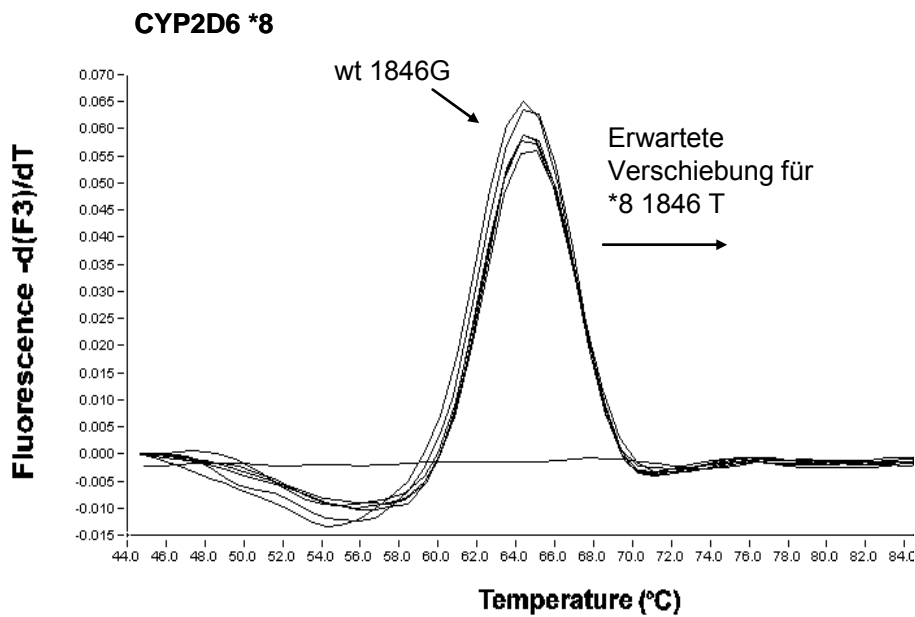


Abbildung 22: Fluoreszenzschmelzkurven zur Detektion der Variante CYP2D6 *8. Dargestellt ist die erste Ableitung der Fluoreszenz gegen die Temperatur im Fluoreszenzkanal 3 [-d(F3)/dT]. Die Schmelzkurvenanalyse zeigt sechs Individuen mit einem homozygoten Wildtyp-Allel an Position 1846 (wt 1846G), die Richtung für die erwartete Verschiebung der Variante (*8 1846T) sowie die Negativkontrolle.

Da durch die simultane Detektion von CYP2D6 *4 und *6 im Fluoreszenzkanal 2 bis zu vier verschiedene Fluoreszenzpeaks zu sehen waren, wurden bei der Genotypisierung des Patientenkollektivs zur Identifizierung der Genotypen in jedem Lauf zwei Kontrollen mitgeführt (Abb. 23).

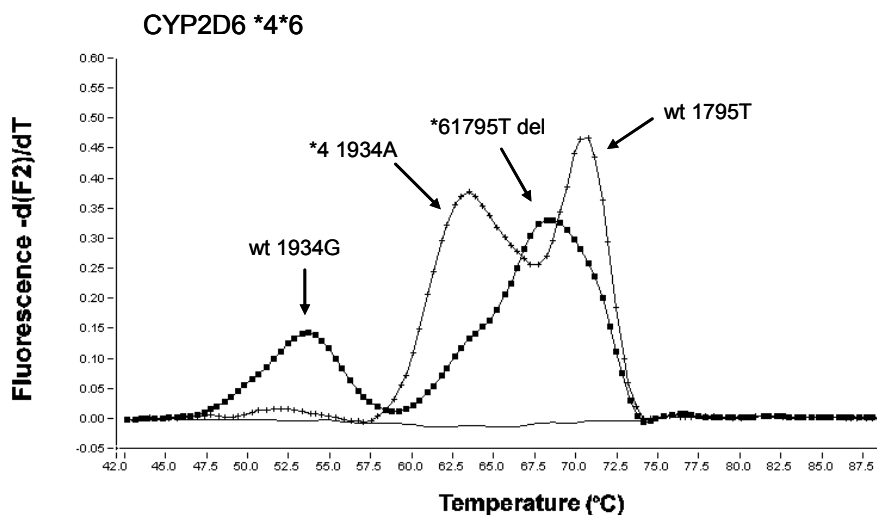


Abbildung 23: Fluoreszenzschmelzkurven der Kontrollen: 1. Kontrolle: homozygot für die Variante *4 und Wildtyp für Position 1795; 2. Kontrolle: Wildtyp für Position 1934 und homozygot für die Variante *6

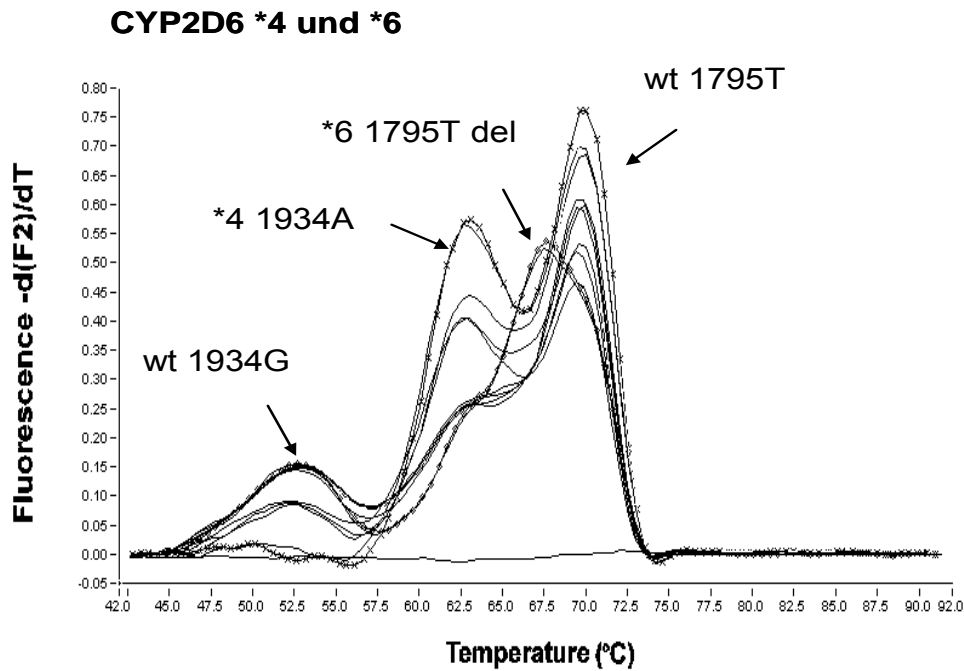


Abbildung 24: Fluoreszenzschmelzkurven zur Detektion der Varianten CYP2D6 *4 und *6. Dargestellt ist die erste Ableitung der Fluoreszenz gegen die Temperatur im Fluoreszenzkanal 2 [-d(F2)/dT] von zwölf Individuen und der Negativkontrolle. Die Schmelzkurvenanalyse zeigt fünf Individuen mit homozygoten Wildtyp-Allelen für die Positionen 1934 (wt 1934G) und 1795 (wt 1795T), zwei Individuen homozygot für das Wildtyp-Allel an Position 1934 und für die Variante *6 (*6 1795T del), zwei Individuen homozygot für die Variante *4 (*4 1934A) und für das Wildtyp-Allel an Position 1795 sowie drei Individuen heterozygot für die Variante *4 und homozygot Wildtyp für die Position 1795.

3.1.2.3 Weitere Genotypen

Bei der Genotypisierung der CYP2D6-Varianten *3 und *7 am Patientenkollektiv zeigten zwei Patienten einen um 1,8 °C verschobenen Fluoreszenzpeak im Kanal 2. Nach der Sequenzierung dieser Proben zeigte sich, dass es sich um einen G→A Basenaustausch an Position 3027 im Exon 6 handelte. Zwei weitere Individuen zeigten einen atypischen Schmelzkurvenverlauf im Kanal 2 bei der Analyse der Allele *4 und *6. Die Schmelzkurve des ersten Individuums zeigte einen Fluoreszenzpeak zwischen den Peaks für die Varianten *4 (63,9°C) und *6 (67,9°C) bei 66,3°C (Abb. 25). Die Sequenzanalyse zeigte, dass es sich in diesem Fall um einen heterozygoten Träger des *4-Genotyps handelte, der zusätzlich heterozygot für einen C→G Basenaustausch an Position 1792 im Exon 3 ist, welcher zu einem Aminosäureaustausch von Gln→Glu an Position 150 führt. Die Sequenzierung der zweiten DNA-Probe zeigte ebenso keine Deletion an Position 1795 (*6), sondern einen C→T Basenaustausch an Position 1776, der keinen Aminosäureaustausch zur Folge hat.

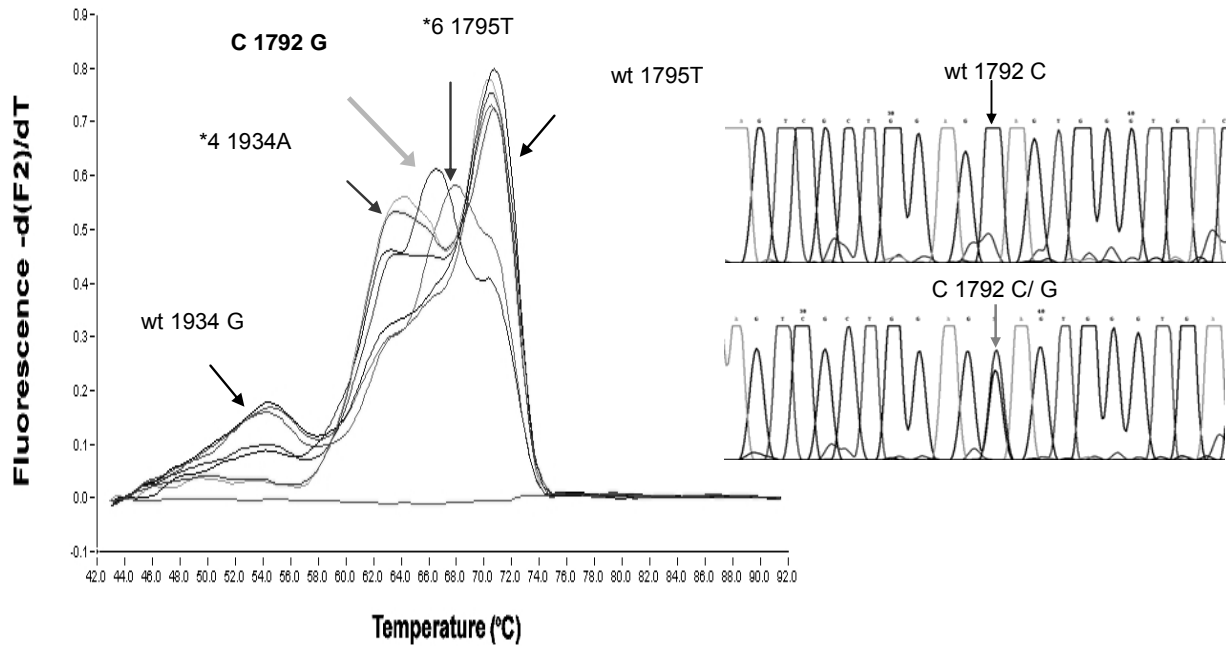


Abbildung 25: Fluoreszenzschmelzkurven zur Detektion der Varianten CYP2D6 *4 und *6. Dargestellt ist die erste Ableitung der Fluoreszenz gegen die Temperatur im Fluoreszenzkanal 2 $[-d(F_2)/dT]$ von sieben Individuen und der Negativkontrolle. Zusätzlich zu den in Abb. 24 beschriebenen Genotypen zeigt sich der Genotyp wt 1795T/C1792G, welcher im rechts abgebildeten Sequenzabschnitt einer Wildtypsequenz gegenübergestellt ist.

3.1.3 Genotypisierung der Variante *5 mittels konventioneller PCR

Zur Detektion der Variante *5 (Nullallel) wurde eine konventionelle PCR nach Steen (Steen et al., 1995) durchgeführt. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit noch ein interner Standardprimer in die PCR eingesetzt, so dass beim Vorkommen des Allels *5 ein 3,5 kb großes PCR-Produkt und für das Wildtyp-Allel ein 4,2 kb großes PCR-Produkt amplifiziert wurde.

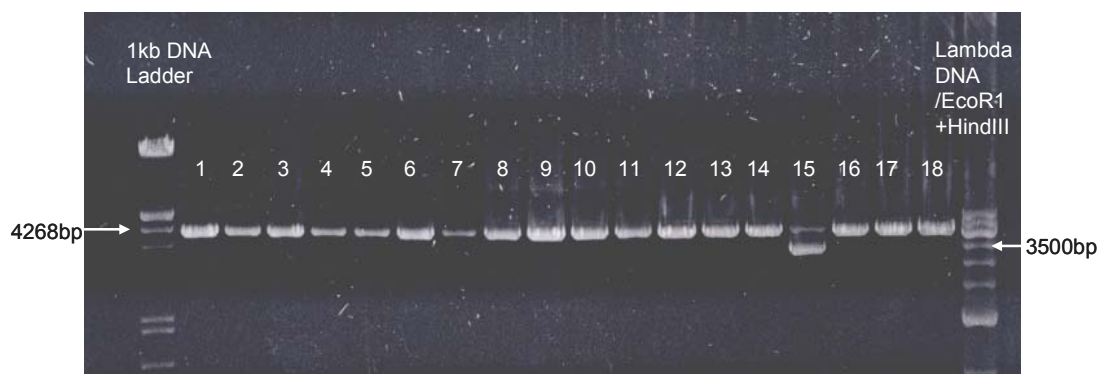


Abbildung 21: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte in einem 0,9% igen Agarose-Gel. Aufgetragen wurden 5 μ l der PCR-Produkte sowie 0,2 ng der Standards. Alle Produkte zeigen das Wildtypfragment von 4,2 kb, die Probe 15 zeigt mit einem zusätzlichen 3,5 kb Fragment einen heterozygoten Genotyp für die Variante *5.

3.1.4 Allelhäufigkeiten im Patientenkollektiv

Die Ergebnisse der Genotypisierung des Patientenkollektivs sind in Tab. 38 dargestellt. Insgesamt wiesen 10,5 % der untersuchten Individuen zwei nicht funktionelle Allele auf und wurden als Poor Metabolizer (PM) eingestuft. Von den untersuchten Individuen zeigten acht (2,5%) einen komplexeren Genotyp mit zwei verschiedenen PM-assoziierten Mutationen. Zusammen wurden vierzehn unterschiedliche Genotypen in der untersuchten Population gefunden.

Von einer Probe konnte im Präamplifikations-Assay kein PCR-Produkt amplifiziert werden. Diese Probe zeigte sich in der PCR zur Detektion des Nullallels homozygot für die Variante *5 (Nullallel). Elf Individuen wurden als heterozygot für die Variante *5 detektiert und als Extensive Metabolizer (EM) kategorisiert. Ein Individuum, welches als heterozygot für das Allel *5 detektiert wurde und für das andere Allel die Variante *6 zeigte, wurde als Poor Metabolizer eingestuft.

Von den drei zusätzlich gefundenen Varianten, zeigte der Träger der Variante C1792G ebenso den PM-Genotyp.

Genotyp	Allelhäufigkeit	in %
*3	6	0,9
*4	120	18,6
*5	17	2,6
*6	20	3,1
*7	0	0
*8	1	0,2
C1792G	1	0,2
G3027A + C1776T	3	0,5
Kollektiv	646	100

Tabelle 38: Allelhäufigkeiten der ermittelten CYP2D6-Varianten

3.1.5 Einfluss des CYP2D6-Genotyps auf die postoperative Analgesie mit Tramadol

Nach Genehmigung durch die Ethikkommission und schriftlichem Einverständnis wurden für diese Studie 300 Patienten mit einem größeren abdominalen Eingriff eingeschlossen und genotypisiert.

Vor Ende der Operation wurden 1g Metamizol, 100 mg Tramadol und 10 mg Metoclopramid i.v. infundiert. Im Aufwachraum wurde zusätzlich bei Bedarf Tramadol titriert. Die weitere

Analgesie erfolgte mit Tramadol (20 mg/ml), Metamizol (200 mg/ml) und Metoclopramid (0,4 mg/ml) als PCA über 48 Stunden. Bei unzureichender Analgesie wurde als Ausweichmedikation Piritramid i.v. titriert.

Patienten, die während der 48 Stunden keine Ausweichmedikation benötigten und mit der Schmerztherapie zufrieden waren, wurden als Responder eingestuft. Patienten, welche eine Ausweichmedikation benötigten und die Schmerztherapie negativ bewerteten, wurden als Nonresponder eingestuft. Im Anschluss wurde das Ansprechen der Medikation mit dem ermittelten CYP2D6-Genotyp verglichen (Abb. 22).

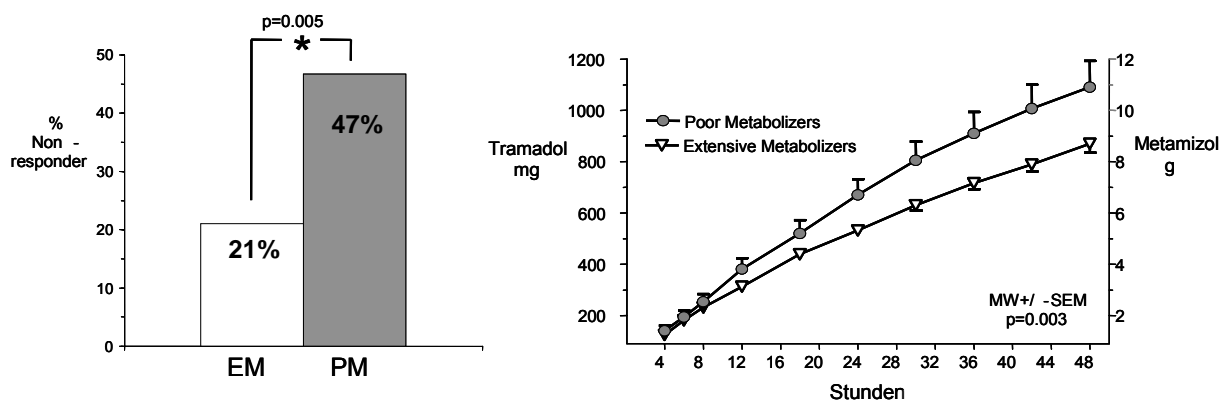


Abbildung 22: Dargestellt sind die Nonresponder (%) in Korrelation zum Genotyp sowie der kumulative Analgetikaverbrauch während der 48h PCA-Periode (MW+SEM).

Insgesamt wurden 35 Patienten als Poor Metabolizer (PM) mit zwei nicht funktionellen Allelen eingestuft und 98 Patienten zeigten einen heterozygoten Genotyp mit einem nicht funktionellen Allel. Diese wurden zusammen mit den Patienten mit zwei Wildtyp-Allelen in die Gruppe der Extensive Metabolizer (EM) eingeordnet.

Die vollständigen Daten waren für 271 Patienten verfügbar. Darunter wurden 241 Patienten der EM-Gruppe und 30 Patienten der PM-Gruppe zugeordnet. In der PM-Gruppe war der Anteil der Nonresponder (46,7%) signifikant höher als in der EM-Gruppe (21,6%, $p = 0,005$). Im Aufwachraum musste bei der PM-Gruppe mehr Tramadol titriert werden als bei der EM-Gruppe ($144,7 \pm 22,6$ gegen $108,2 \pm 56,9$ mg, $p < 0,001$). Des Weiteren benötigten PM häufiger Ausweichmedikationen im Aufwachraum und während der PCA-Periode als EM (43,3% gegen 21,6%, $p = 0,02$).

3.2 Untersuchungen zur Regulation des MORs

Zur Identifizierung regulatorisch aktiver Abschnitte in der 5'-flankierenden Sequenz des humanen MOR-Gens wurde eine Serie von 5'-Deletionen dieser Sequenz mittels Reporter-gen-Konstrukten im Luciferase-Assay untersucht. Anschließend wurden durch gerichtete Mutagenese an drei Wildtyp-Konstrukten acht weitere Promotor-Konstrukte mit je einem SNP hergestellt und ebenfalls im Luciferase-Assay gemessen. Weiterführend wurde der Einfluss der Varianten G-554A und A-1320G auf das Bindungsverhalten von DNA-Fragmenten an Transkriptionsfaktoren mittels electrophoretic mobility shift assay (EMSA) charakterisiert. Zusätzlich wurden individuelle Unterschiede der Expression des MORs auf der RNA-Ebene in humanen Neuroblastomzelllinien mittels quantitativer Echtzeit-PCR untersucht.

Alle Sequenzangaben beziehen sich auf die veröffentlichte Sequenz von Wendel und Höhe (Wendel and Hoehe, 1998).

3.2.1 Reporter-gen-Konstrukte

Um regulatorisch aktive Promotorabschnitte des MOR-Gens zu detektieren, wurde ein 2577 bp Abschnitt aus dem Bereich der 5'-flankierenden Region des humanen MOR-Gens sowie eine Serie von 5'-Deletionen dieses Sequenzabschnittes amplifiziert und in einen pGI3-Luciferase Vektor kloniert. Die Promotor-Konstrukte wurden in die konstitutiv MOR exprimierende Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y transient transfiziert. Das aus den jeweiligen Transfektionsansätzen gewonnene Lysat wurde anschließend in einen Dual-Luciferase-Assay eingesetzt, um die jeweilige Promotoraktivität zu messen.

Des weitern wurden drei der Promotor-Konstrukte für Mutagenesereaktionen verwendet. Hierbei wurden acht weitere Konstrukte mit je einem bereits beschriebenen SNP des MOR-Promotors durch gerichtete Mutagenese an den jeweiligen Wildtyp-Konstrukten erzeugt. So wurden Konstrukte mit Polymorphismen an den Positionen -172, -236, -554, -995, -1045, -1320, -1699 und -1748 hergestellt. Von diesen acht Variationen befinden sich vier innerhalb von Transkriptionsfaktorbindestellen (-1699insT, C-995A, G-554A) (Hoehe et al., 2000) oder nahe an dem Haupttranskriptionsstart (A-236G) (Wendel and Hoehe, 1998). Weiterhin wurden vier Variationen eingeschlossen, welche relativ häufig (bis zu 10%) in der europäisch-amerikanischen Bevölkerung vorkommen (G-1748A, A-1320G, A-1045G, G-172T) (Hoehe et al., 2000). Die Promotoraktivität der Mutationskonstrukte wurde parallel mit den jeweiligen Wildtyp-Konstrukten im Dual-Luciferase-Assay bestimmt.

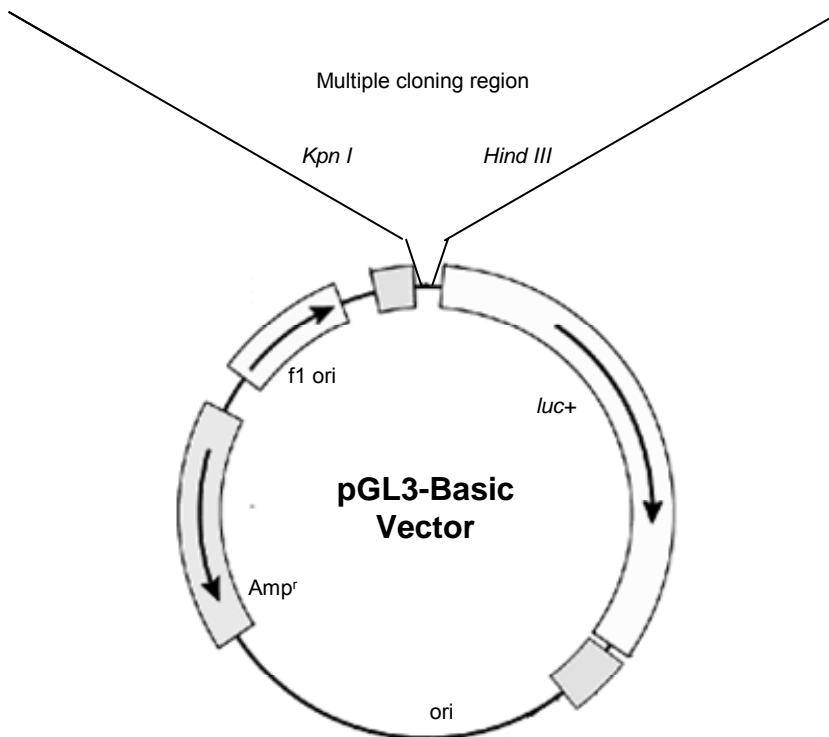
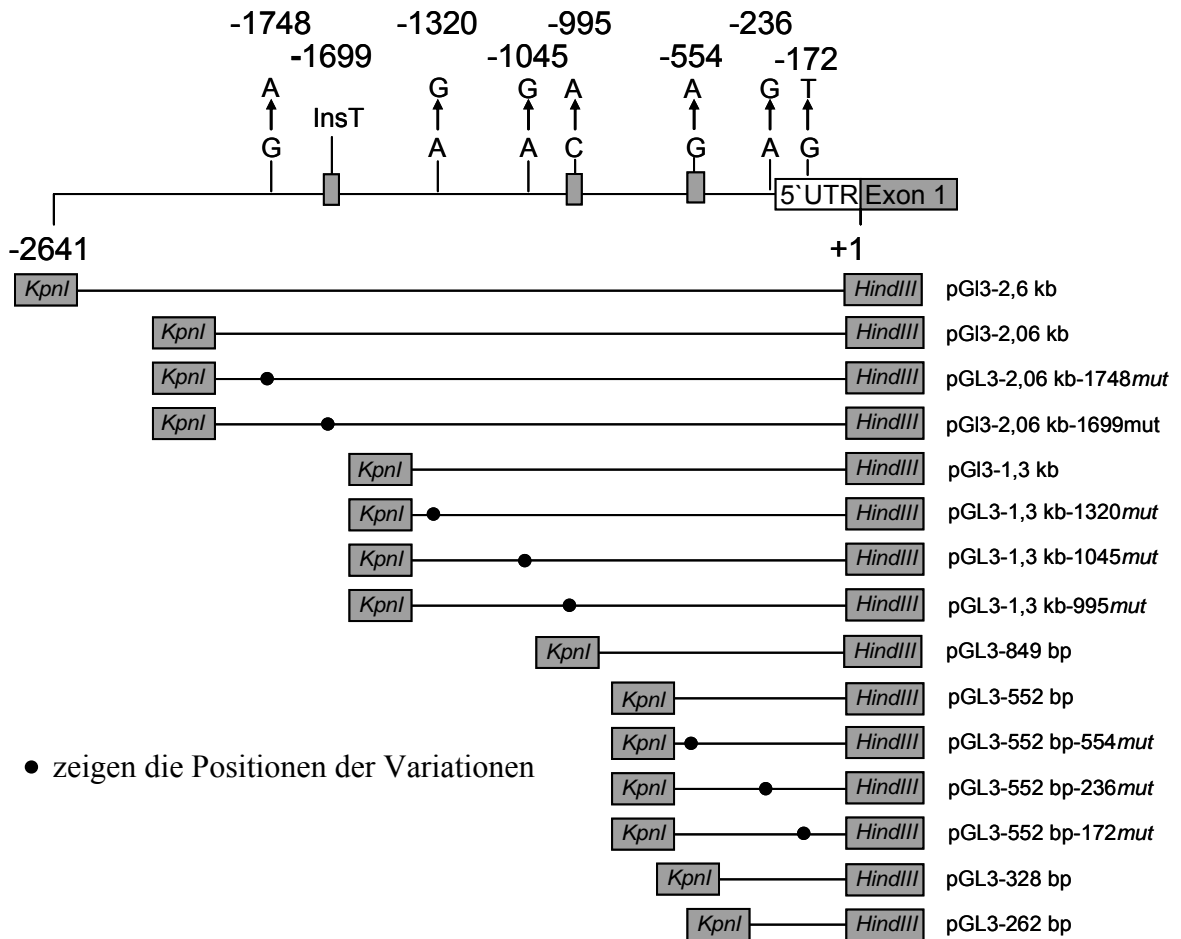


Abbildung 23: Positionen der untersuchten Variationen in der 5'-flankierenden Sequenz des humanen MOR-Gens. Variationen, die innerhalb von cis-Elementen beschrieben wurden, sind zusätzlich durch eine Box gekennzeichnet. Ebenso sind die amplifizierte 5'-Deletionsfragmente sowie die daraus erzeugten Mutagenese-Konstrukte mit ihren Restriktionsstellen dargestellt.

3.2.1.1 Luciferase-Aktivität der Wildtyp-Konstrukte

Alle Konstrukte wurden in $n \geq 5$ Transfektionsansätzen eingesetzt und im Dual-Luciferase-Assay gemessen. Die verschiedenen Promotorlängen zeigten im Luciferase-Assay eine unterschiedliche Aktivität. Hierbei zeigten die 5'-Deletionen mit 2059 bp und 552 bp Länge die größte und die Sequenzen mit 2577 bp und 328 bp Länge die niedrigste Promotoraktivität (Abb. 24).

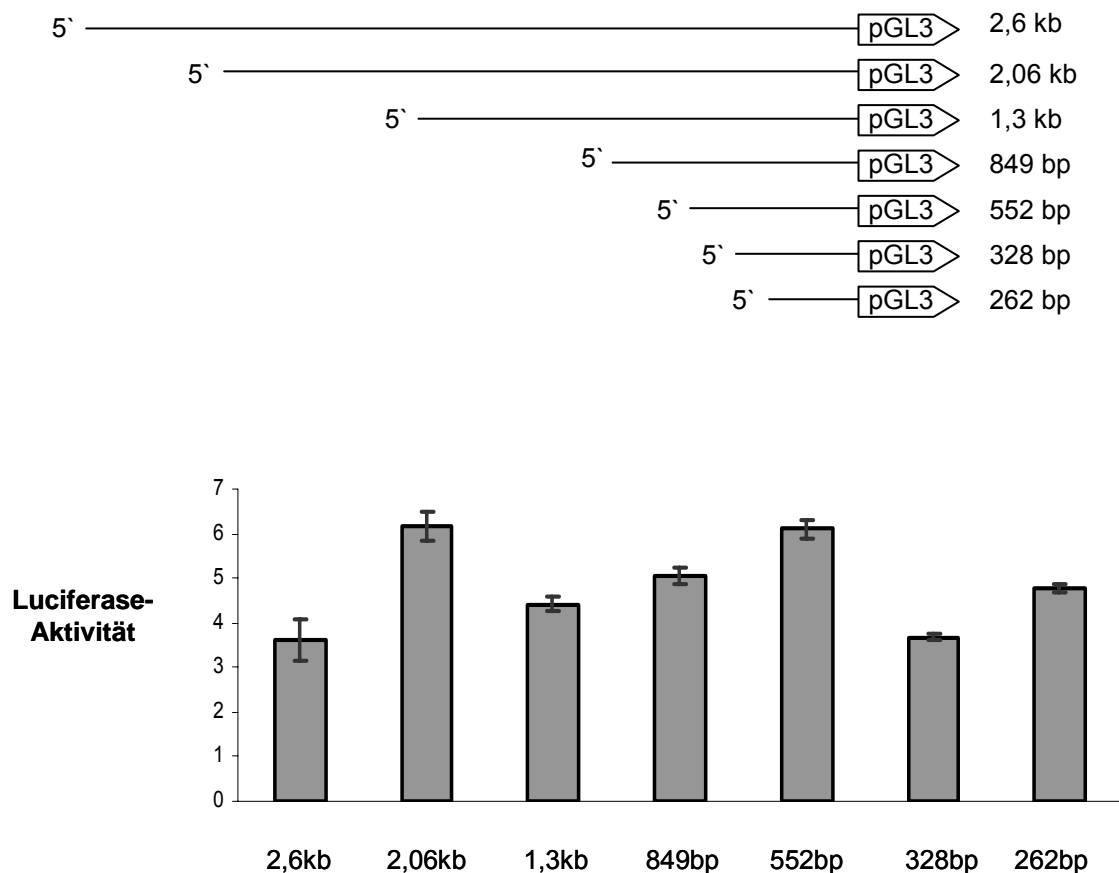


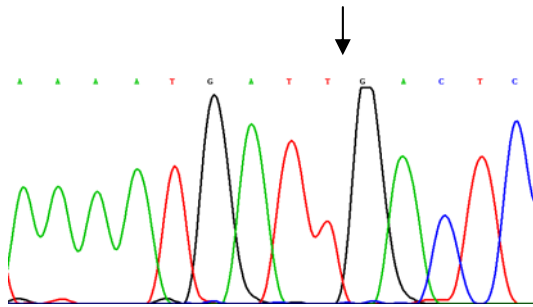
Abbildung 24: Schematische Darstellung der untersuchten Promotor-Konstrukte des MOR-Gens sowie deren im Luciferase-Assay bestimmte Aktivität (MW \pm SEM).

3.2.1.2 Mutagenese

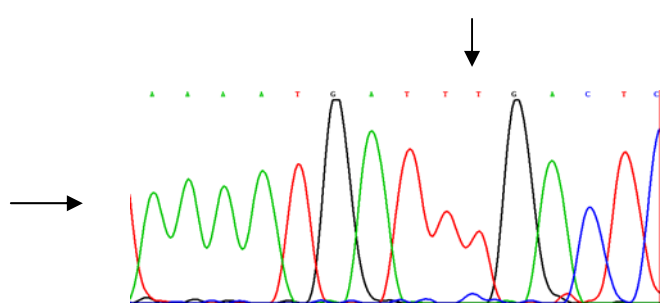
Durch gerichtete Mutagenese wurden Konstrukte mit den Variationen G-172T, A-236G, G-554A, C-995A, A-1045G, A-1320G -1699insT sowie G-1748A erzeugt (Abb. 23, 25). Für die Mutagenesereaktionen wurden die Wildtyp-Konstrukte mit den Längenfragmenten von 2,06 kb, 1,3 kb und 552 bp verwendet.

2,06 kb (OU6)

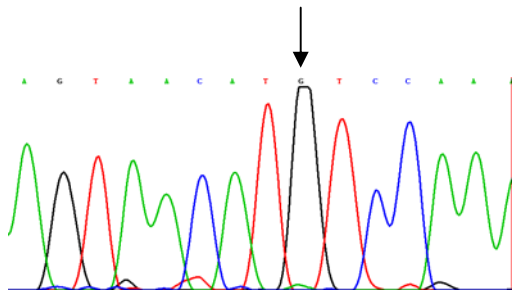
wt -1699:



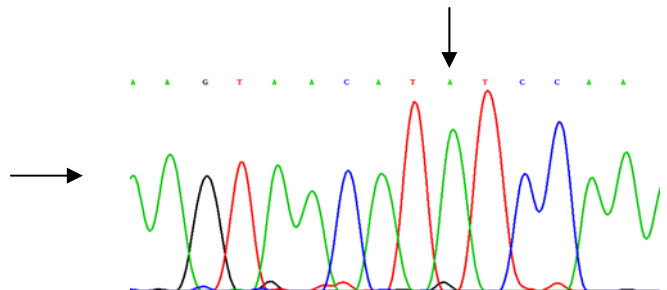
-1699 insT:



wt -1748:

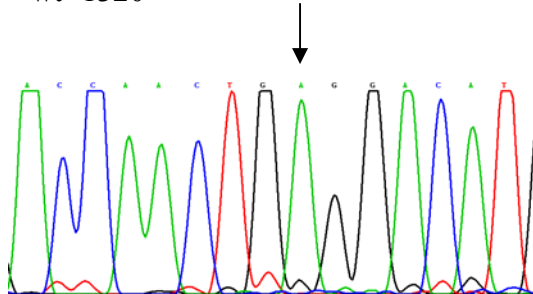


G-1748A

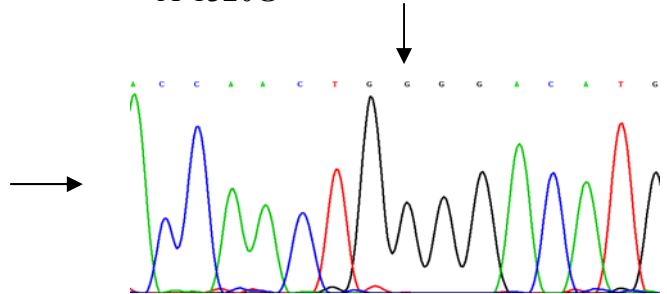


1,3 kb (OU3)

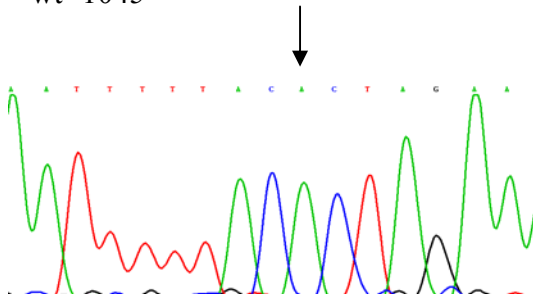
wt -1320



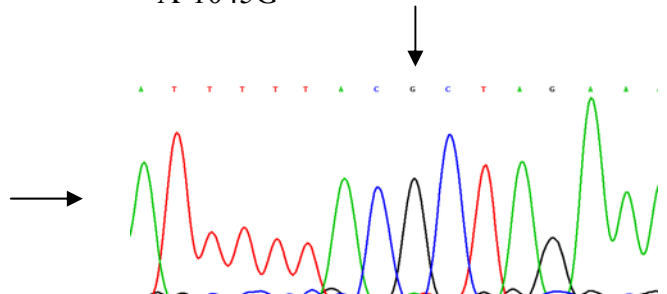
A-1320G



wt -1045



A-1045G



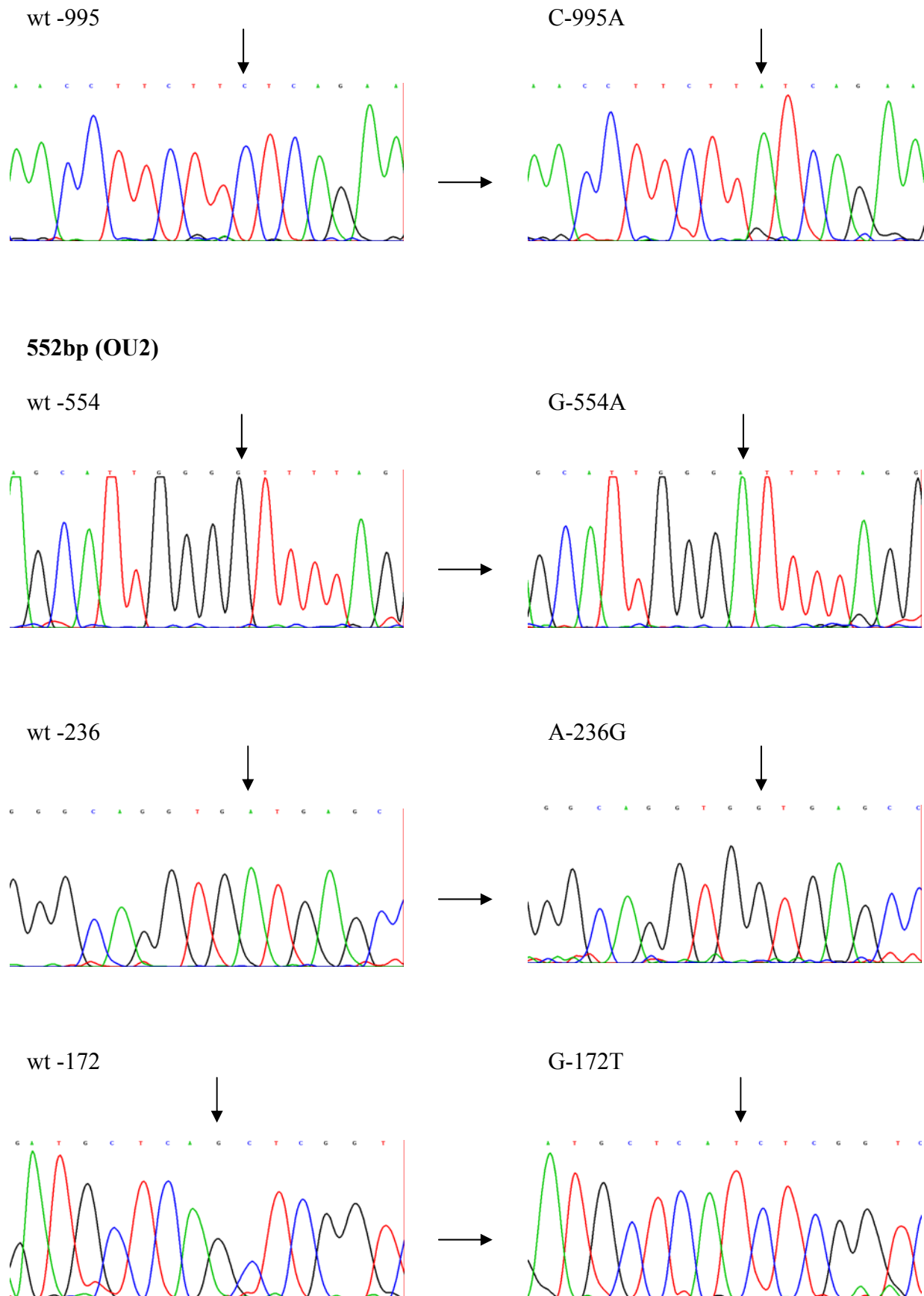


Abbildung 25: Dargestellt sind die Sequenzabschnitte der jeweiligen Mutagenesebereiche der Wildtyp-Konstrukte und den daraus abgeleiteten Konstrukten mit Variante. Die Pfeile kennzeichnen die Positionen der Varianten.

3.2.1.3 Luciferase-Aktivität der Promotor-Konstrukte mit Variante

Die Promotor-Konstrukte mit eingebauter Variante wurden parallel mit dem jeweiligen Wildtyp-Konstrukt transfiziert und im Dual-Luciferase-Assay gemessen. Die Ergebnisse wurden in Scatter Plots mit eingezeichnetem Mittelwert dargestellt.

552 bp-Konstrukte (n = 8):

Die Transfektionen des Konstrukts mit der Variante G-554A erfolgten zu einem späteren Zeitpunkt und wurden aus diesem Grund getrennt dargestellt (n = 10).

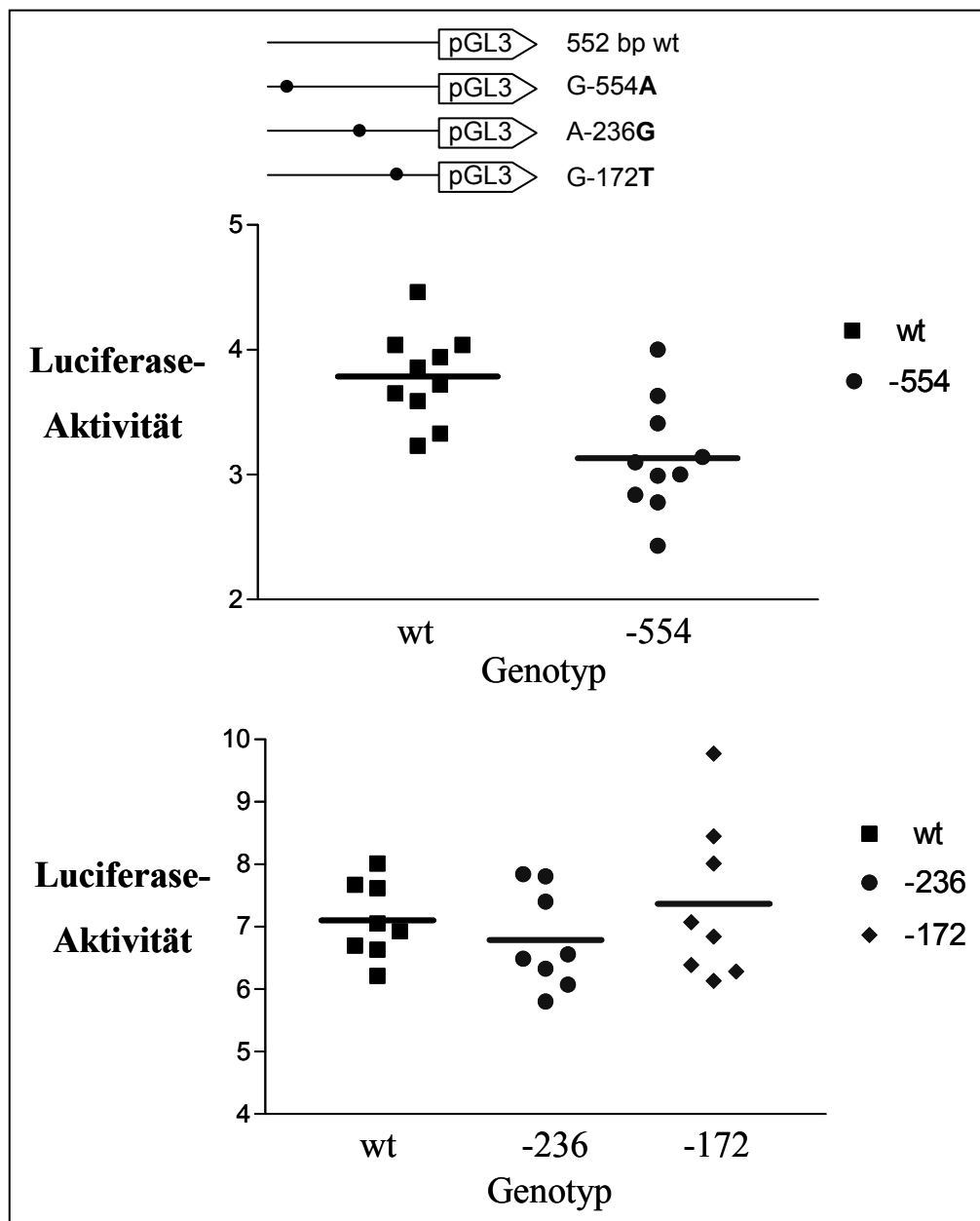


Abbildung 26: Schematische Darstellung des untersuchten 552 bp-Wildtyp-Konstrukts und den drei daraus abgeleiteten Varianten des MOR-Gens sowie deren im Luciferase-Assay gemessene Aktivität.

1,3 kb-Konstrukte (n = 8):

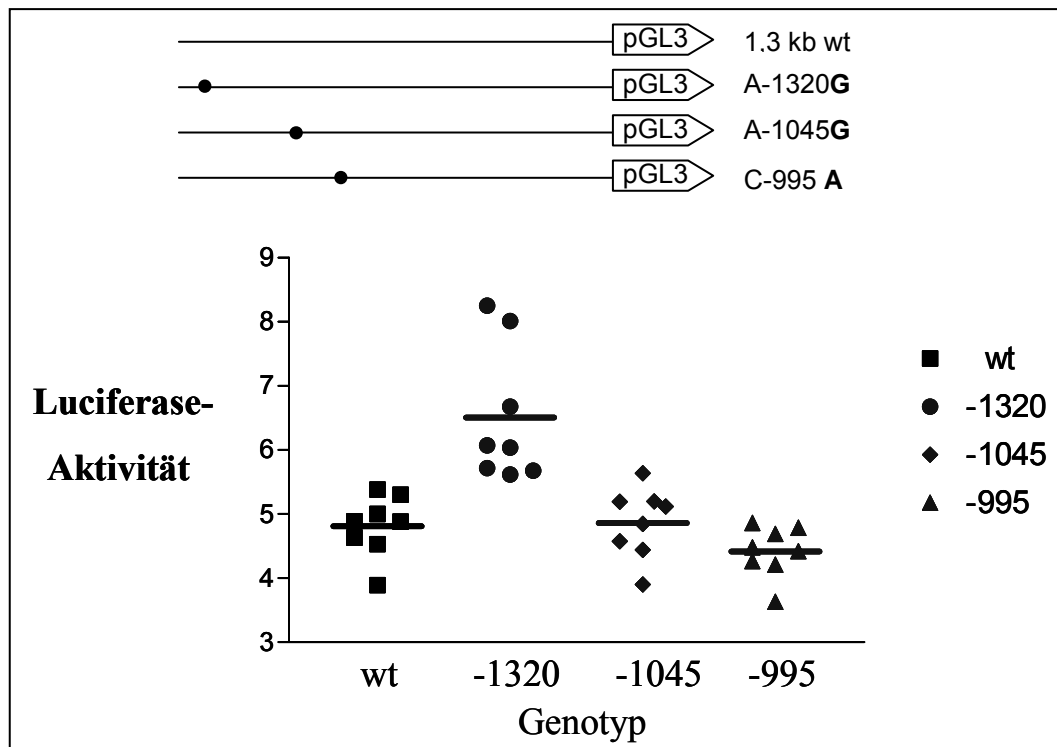


Abbildung 27: Schematische Darstellung des untersuchten 1,3 kb-Wildtyp-Konstrukts und den drei daraus abgeleiteten Varianten des MOR-Gens sowie deren im Luciferase-Assay gemessene Aktivität.

2,06 kb-Konstrukte (n = 6):

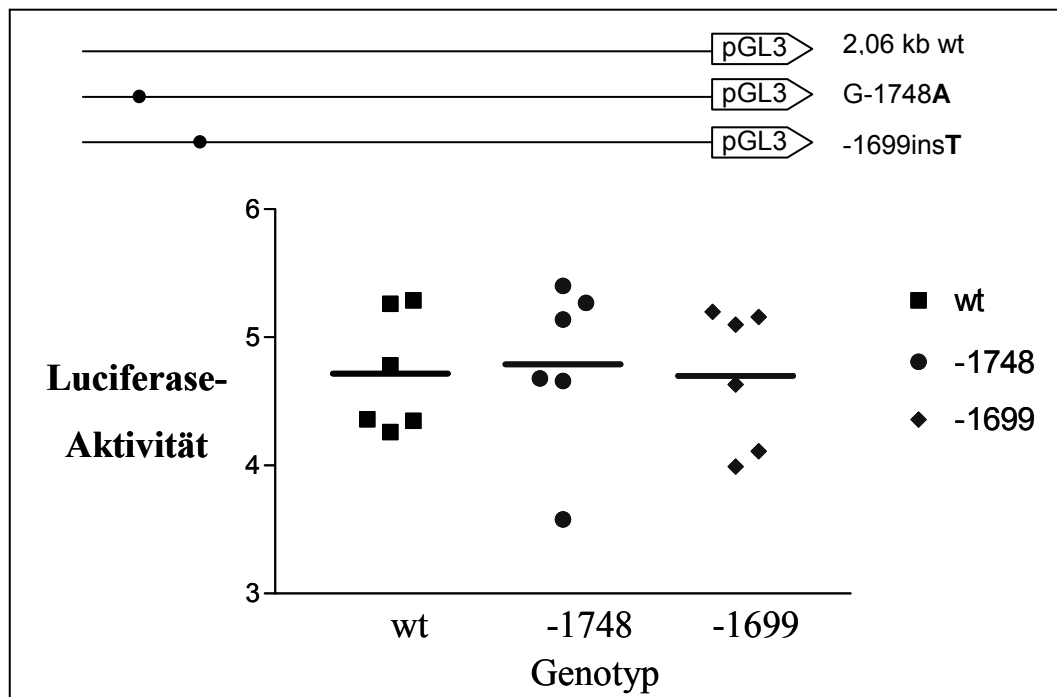


Abbildung 28: Schematische Darstellung des untersuchten 2,06 kb-Wildtyp-Konstrukts und den zwei daraus abgeleiteten Varianten des MOR-Gens sowie deren im Luciferase-Assay gemessene Aktivität.

Im ungepaarten T-Test zeigten von den 552 bp-Promotor-Konstrukten mit Variante, die Konstrukte mit den Varianten A-236G und G-172T keine signifikante Veränderung der Luciferase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Konstrukt (Signifikanzniveau $p < 0,05$). Das Promotor-Konstrukt mit der Variante G-554A zeigte gegenüber dem Wildtyp-Konstrukt eine signifikant erniedrigte Aktivität ($p = 0,002$).

Bei den 1,3 kb-Promotor-Konstrukten, ergab sich für das Promotor-Konstrukt mit der Variante A-1320G gegenüber dem Wildtyp-Konstrukt eine signifikant erhöhte Luciferase-Aktivität ($p = 0,001$). Die Konstrukte mit den Varianten A-1045G und C-995A zeigten keine signifikante Aktivitätsänderung im Vergleich zum Wildtyp-Konstrukt.

Von den Promotor-Konstrukten mit 2,06 kb Länge zeigte gegenüber dem Wildtyp-Konstrukt weder das Konstrukt mit der Variante G-1748A noch das Konstrukt mit der Variante -1699insT eine signifikant veränderte Luciferase-Aktivität.

Abweichungen der Mittelwerte gegenüber dem jeweiligen Wildtyp in %:

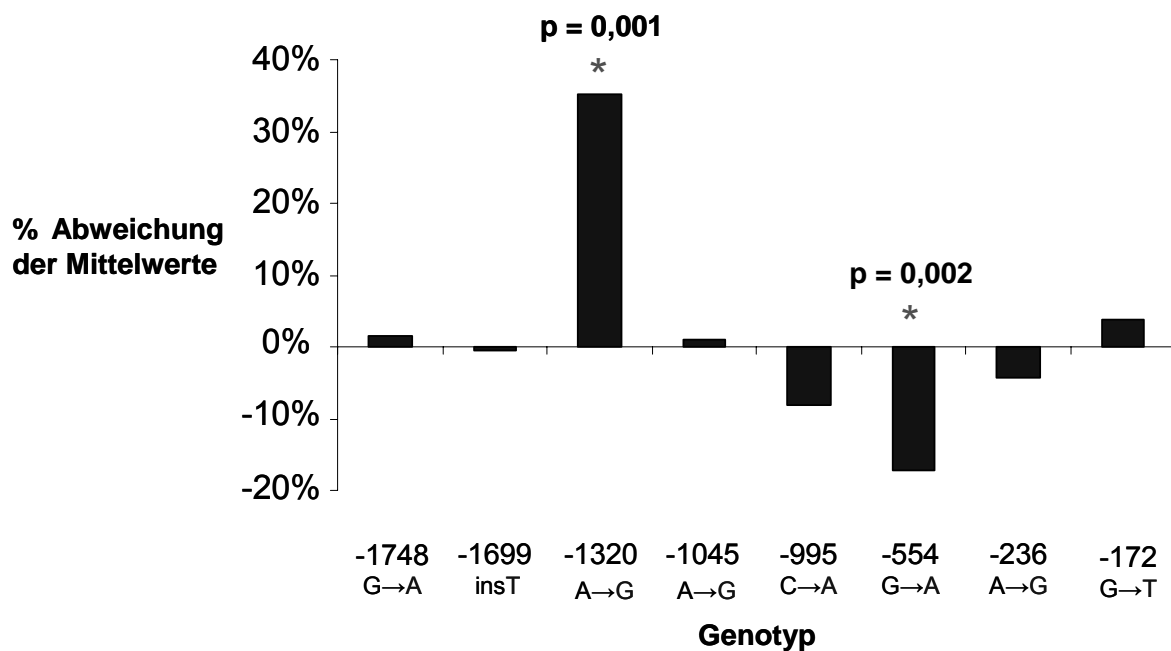


Abbildung 29: Dargestellt sind die Aktivitätsunterschiede der Promotor-Konstrukte mit Variante. Diese ergaben sich aus den Mittelwerten der Luciferase-Aktivität der Konstrukte mit Variante im Bezug zum Mittelwert des jeweiligen Wildtyps.

3.2.2 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Um den Einfluss der Varianten G-554A, A-1320G auf die cis-Aktivität ihrer Umgebungssequenz zu charakterisieren, wurden Oligonukleotide aus der jeweiligen umgebenden Sequenz des MOR-Gens sowohl mit als auch ohne Variante entwickelt. Diese Oligonukleotide wurden mit Digoxigenin markiert und zusammen mit dem Nuklearextrakt der MOR exprimierenden Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y in den EMSA eingesetzt.

3.2.2.1 Variante G-554A

Die Variante G-554A befindet sich in einer beschriebenen NFκB-Bindestelle (Kraus et al., 2003). Daher wurden zusätzlich zu den Oligonukleotiden mit der MOR-Promotorsequenz, NFκB-spezifische Oligonukleotide sowie NFκB-Antikörper gegen NFκB-P50 und NFκB-P65 eingesetzt.

In den Versuchansätzen wurden zu den Digoxigenin-markierten MOR-Promotorsonden „kalte“ (unmarkierte) NFκB-Sonde zugegeben, bzw. zur Digoxigenin-markierten NFκB-Sonde kalte MOR-Promotorsonden zugegeben. Hierbei wurden 112 fmol Digoxigenin-markierte Sonde und 0 - 2,5 - 5 - 7,5 -10- pmol kalte Sonde als Kompetitor eingesetzt.

In den durchgeführten EMSAs konnte kein eindeutiger Unterschied des Bindeverhaltens zwischen der Sonde mit und ohne Variante festgestellt werden. Bindungsunterschiede zugunsten der Variante bzw. des Wildtyps konnten in wiederholten Versuchen nicht bestätigt werden (Abb. 30).

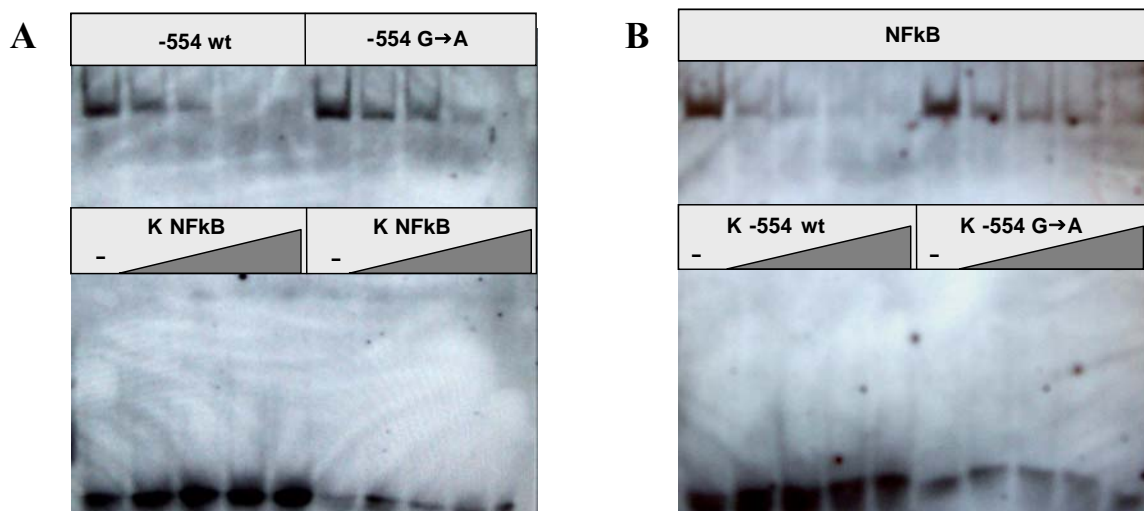


Abbildung 30: Die MOR-Promotorsonden binden NFκB in vitro. **A:** Die Wildtypsequenz (-554 wt) sowie die Sequenz mit der Variante (-554 G→A) binden an ein Protein des SH-SY5Y Nuklearextrakts und werden durch die spezifische „kalte“ NFκB-Sonde (K NFκB) verdrängt. **B:** Die spezifische Dig-markierte NFκB-Sonde wird sowohl durch die kalte Wildtyp-Sonde (K -554wt) als auch durch die kalte Sonde mit der Variante (K -554 G→A) verdrängt.

Zur Identifizierung des gebundenen Proteins wurden zusätzlich Immunoshift-Experimente durchgeführt, in welchen Antikörper gegen NFκB-P50 und NFκB-P65 jeweils 30 Minuten vor der Gelshift-Reaktion mit dem Nuklearextrakt der SH-SY5Y-Zellen präinkubiert wurden. Es konnte kein Effekt nach der Präinkubation mit dem Antikörper gegen NFκB-P65 entdeckt werden. Der Antikörper gegen NFκB-P50 zeigte ein konkurrentes Bindeverhalten zur NFκB-Sonde an das Nuklearextrakt (Abb.31). Somit scheint es sich bei dem gebundenen Protein um NFκB-P50 zu handeln.

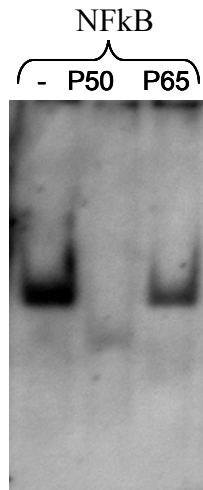


Abbildung 31: Immunoshift-Experiment mit dem Nuklearextrakt von SH-SY5Y Zellen und Dig-markierter NFκB-Sonde: **1:** Ansatz ohne Antikörper **2:** Ansatz mit NFκB-P50 Antikörper **3:** Ansatz mit NFκB-P65 Antikörper.

3.2.2.2 Variante A-1320G

Für die MOR-Promotorsequenz um die Variante A-1320G wurde bisher keine Transkriptionsfaktorbindestelle beschrieben. In den Versuchsansätzen wurden 112 fmol der Digoxigenin-markierten Sonden mit der MOR-Wildtypsequenz und der Sequenz mit der Variante A-1320G eingesetzt. Zusätzlich wurden 0 - 2,5 - 5 - 7,5 -10-15 pmol unmarkierte Wildtyp-Sonde als spezifischer Kompetitor verwendet.

In den durchgeführten EMSAs zeigten beide Sonden die gleichen Bindungscharakteristika. Sowohl die Wildtyp-Sonde als auch die Sonde mit der Variante zeigten im Polyacrylamidgel zwei Banden, wovon nur die untere Bande deutlich von der Zugabe des Kompetitors beeinflusst wurde. Nach Titration mit dem spezifischen Kompetitor konnte auch in diesem Fall kein eindeutiger Unterschied des Bindeverhaltens zwischen der Sonde mit und ohne Variante festgestellt werden (Abb. 32A).

Datenbankanalysen mit der Wildtypsequenz und der Sequenz mit der Variante zeigten, dass die Variante A-1320G eine Bindung für das Myeloid Zink Finger Protein (MZF1) begünstigen würde. Spezifische RT-PCRs identifizierten Transkripte für dieses Protein bei

den verwendeten SH-SY5Y Zellen (Abb. 33). Immunshift-Experimente mit einem nicht für EMSA getesteten MZF1-Antikörper (getestet für ELISA) gaben keine Hinweise für eine Bindung des Antikörpers an die detektierten Proteine (Abb. 32B).

MZF1-Bindemotiv: 5'-AGTGGGGANGT-3
 MOR -1320 A→G 5'-ACTGGGGACAT-3
 MOR -1320 wt 5'-ACTGAGGACAT-3

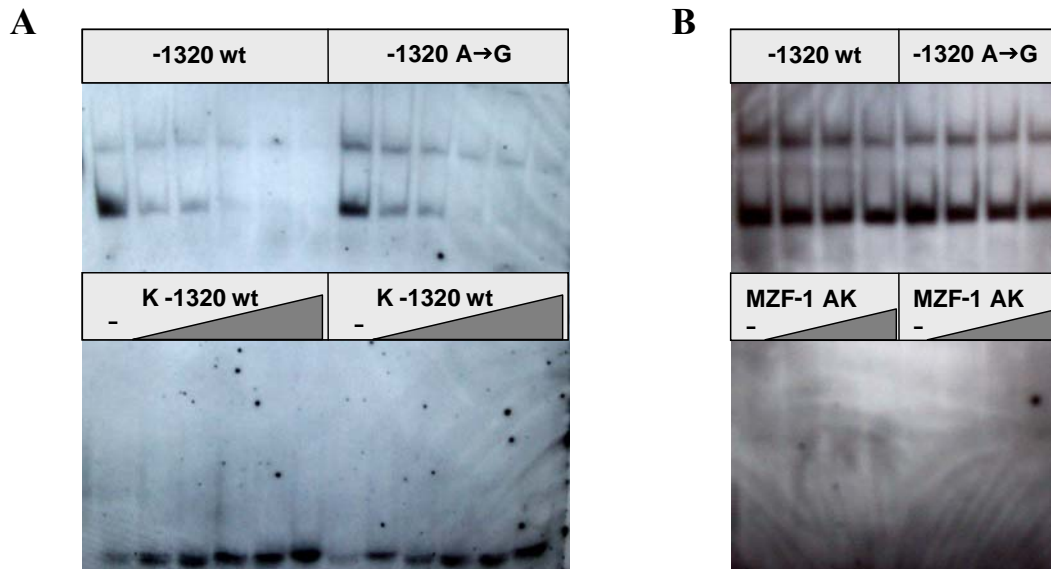


Abbildung 32: **A:** EMSA mit Dig-markierten Sonden für die Wildtypsequenz (-1320 wt) und die Sequenz mit der Variante (-1320 A→G) sowie mit kalter Wildtyp-Sonde als Kompetitor (K-1320wt). Bei beiden eingesetzten Sonden erscheinen zwei Banden. Nur die untere Bande wird durch Zugabe des Kompetitors deutlich schwächer. **B:** Immunshift-Experiment mit markierter Wildtyp- und Varianten-Sonde sowie MZF1-Antikörper (MZF-1 AK).

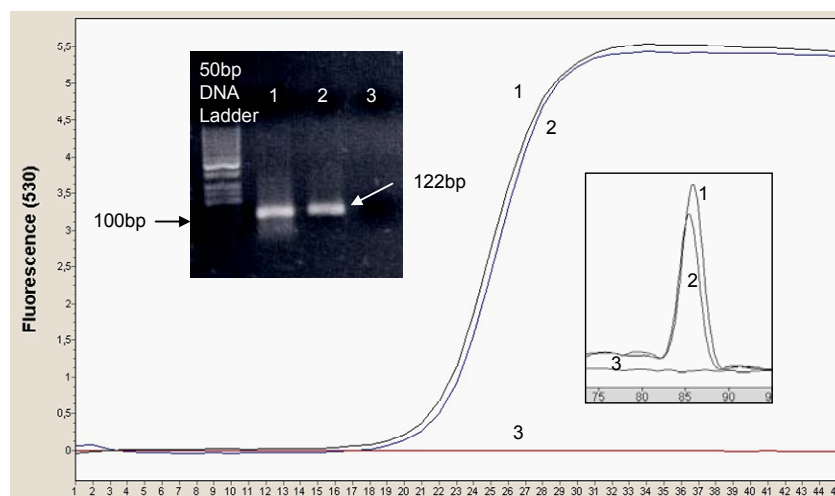


Abbildung 33: Spezifische RT-PCR zum Nachweis von MZF1-Transkripten. Die Produkte der PCR wurden zusätzlich zur Überprüfung der richtigen Größe auf ein Gel aufgetragen. Die Spuren 1 und 2 zeigen PCR-Produkte aus cDNA von SH-SY5Y Zellen (1) und Vollblut (2). Die 3. Spur zeigt die Negativkontrolle.

3.2.3 Relative Quantifizierung des MORs mittels Echtzeit-PCR

Für Expressionsanalysen des MORs auf der RNA-Ebene wurde von vier humanen Neuroblastomzelllinien die 5`-flankierende Sequenz des MOR-Gens sequenziert und auf eventuelle Sequenzunterschiede untersucht. Die vier Zelllinien stammen aus dem gleichen Gewebetyp und weisen eine gleiche Morphologie auf.

Die Sequenzanalyse der MOR-Promotorregion ergab, dass die Zelllinie SK-N-DZ den Wildtyp zu repräsentieren scheint, die Zelllinie SK-N-FI heterozygot für den Basenaustausch A-1045G ist. Keine definitive Aussage über eventuelle Sequenzunterschiede konnte für die Region -2188 - -2175 (Basenabfolge in diesem Bereich: 14 x hintereinander Adenin) bei den Zelllinien SH-SY5Y, SK-N-FI und SK-N-AS gegeben werden. Bei wiederholten Sequenzierungen der Zelllinien in diesem Bereich variierte die Anzahl der Adeninbasen zwischen 13/14-15. In Reporter-Experimenten konnte keine signifikant abweichende Promotoraktivität bei einer der Zelllinien festgestellt werden (Abb. 36). Hierbei enthielten die Promotorfragmente in den Luciferasevektoren der SH-SY5Y und SK-N-FI Zellen 15/15 x Adenin und die der beiden andern Zelllinien 14/14 x Adenin in der Region -2188 - -2175. In dem Konstrukt mit der Sequenz der SK-N-FI Zellen lag die Variante A-1045G zudem homozygot vor.

Für die relative Quantifizierung der Expression des MOR-Gens mittels Echtzeit-PCR wurden Primer verwendet, welche spezifisch an Sequenzabschnitte des zweiten und dritten Exons des MOR-Gens binden. Da die Primer in niedrigen Targetkonzentrationen Dimerprodukte bildeten, wurde die Detektion oberhalb von deren Schmelztemperatur, bei 81°C, durchgeführt. Die Expression des MOR-Gens wurde gegen das Haushaltsgen ALAS normalisiert. Die Auswertung der Quantifizierungsläufe erfolgte mit Hilfe der Relativen Quantification Software (Roche). Diese errechnet aus den Standard-PCR-Läufen den „Fit Coefficient File“, welcher die Kinetik einer PCR beschreibt (Abb. 33). Die durchgeführten Quantifizierungsläufe (Abb. 34) wurden anschließend mit diesem „Fit Coefficient File“ und dem in allen Quantifizierungsläufen mitgeführten Kalibrator verrechnet, wobei sich das Ergebnis aus folgender Formel ergibt:

$$\text{Normalisierter Ratio} = \frac{\text{Konzentration Zielgen (Probe)}}{\text{Konzentration Haushaltsgen (Probe)}} : \frac{\text{Konzentration Zielgen (Kalibrator)}}{\text{Konzentration Haushaltsgen (Kalibrator)}}$$

Die Quantifizierung erfolgte über 5-6 Passagen der Zelllinien. Zur verbesserten Illustration der Ergebnisse wurden die erhaltenen Ratien alle x 10⁶ multipliziert und logarithmisch dargestellt (Abb. 35).

Standardläufe und „Fit Coefficient File“:

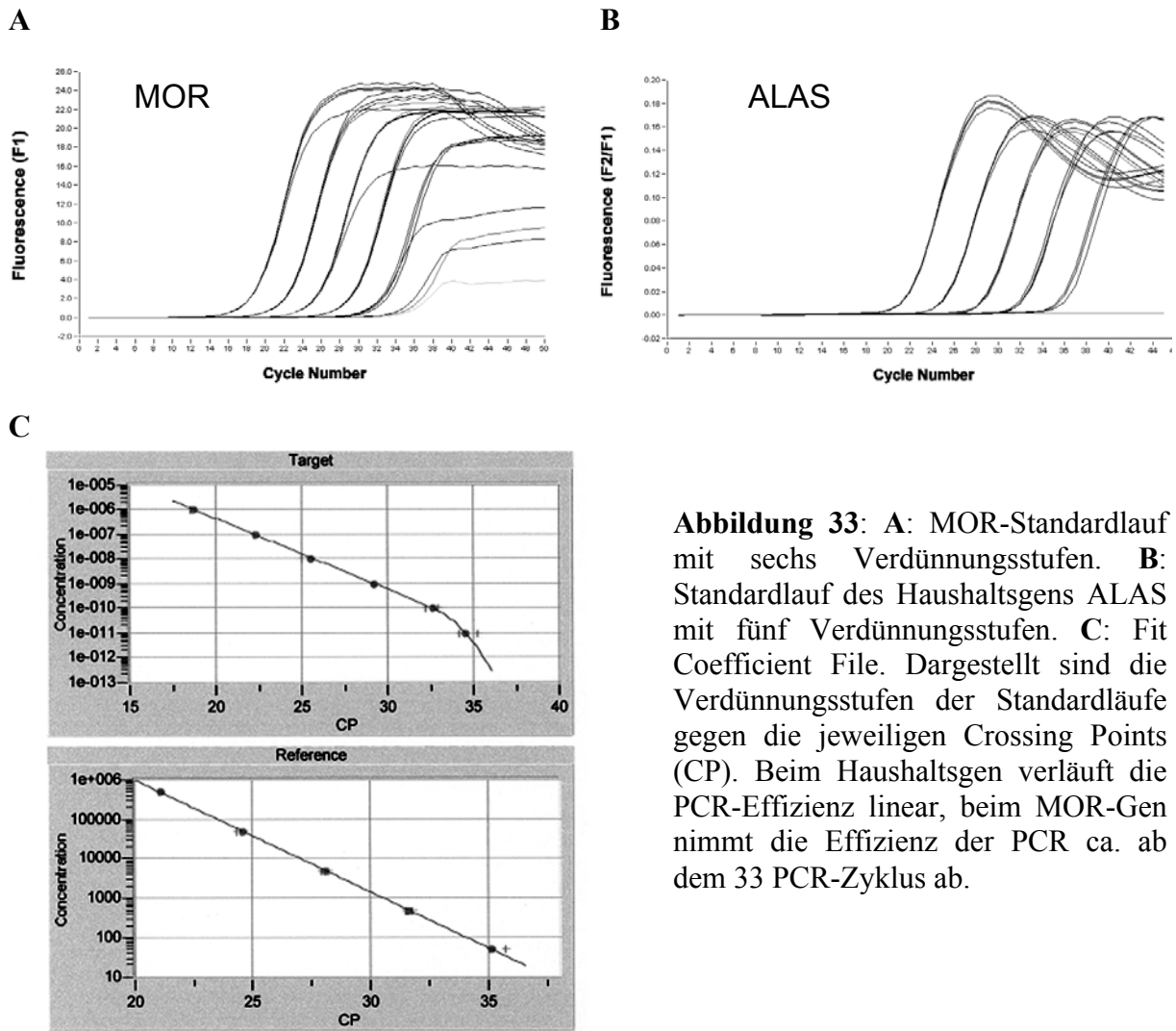


Abbildung 33: A: MOR-Standardlauf mit sechs Verdünnungsstufen. B: Standardlauf des Haushaltgens ALAS mit fünf Verdünnungsstufen. C: Fit Coefficient File. Dargestellt sind die Verdünnungsstufen der Standardläufe gegen die jeweiligen Crossing Points (CP). Beim Haushaltgen verläuft die PCR-Effizienz linear, beim MOR-Gen nimmt die Effizienz der PCR ca. ab dem 33 PCR-Zyklus ab.

Quantifizierungslauf:

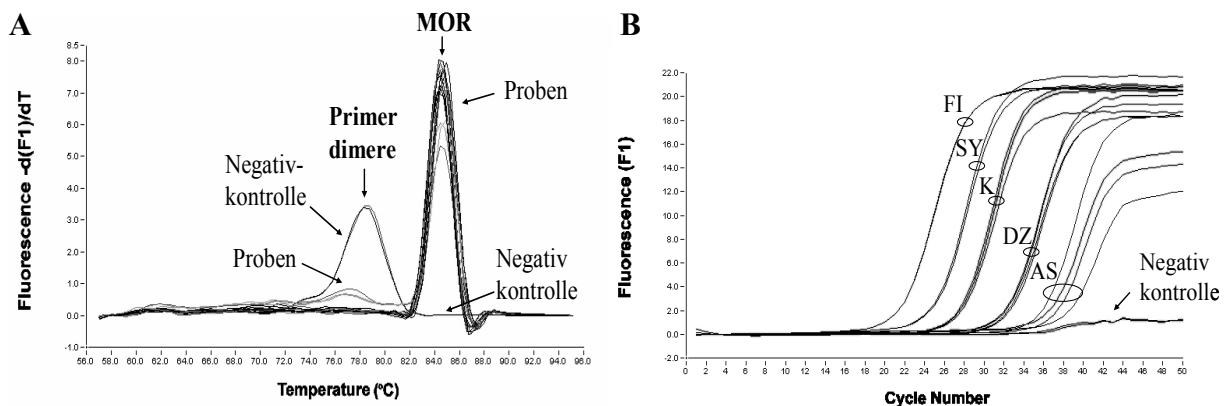


Abbildung 34: Dargestellt sind typische Ergebnisse der MOR-Quantifizierungsläufe. A: Schmelzkurvenanalyse eines MOR-Quantifizierungslaufs mit einem Primerdimerpeak bei den Negativkontrollen und niedrigen Targetkonzentrationen sowie dem MOR-Peak bei den Proben. B: MOR-Amplifikation der Zelllinien SK-N-FI (FI), SH-SY5Y (SY), SK-N-DZ (DZ), SK-N-AS (AS) sowie des Kalibrators (K) und der Negativkontrolle.

Die Quantifizierung der MOR-Expression auf der RNA-Ebene mittels Echtzeit-PCR zeigte deutliche Expressionsunterschiede zwischen den vier untersuchten Neuroblastomzelllinien. Hiernach waren bei der Zelllinie SK-N-FI die meisten Transkripte nachzuweisen und bei der Zelllinie SK-N-AS die wenigsten. Im Kruskal-Wallis Test mit anschließender Post-hoc-Analyse ergaben sich signifikante Unterschiede in der MOR-Expression zwischen den Zelllinien SK-N-FI und SK-N-AS ($p < 0,001$), SK-N-FI und SK-N-DZ ($p < 0,05$) und SH-SY5Y und SK-N-AS ($p < 0,05$).

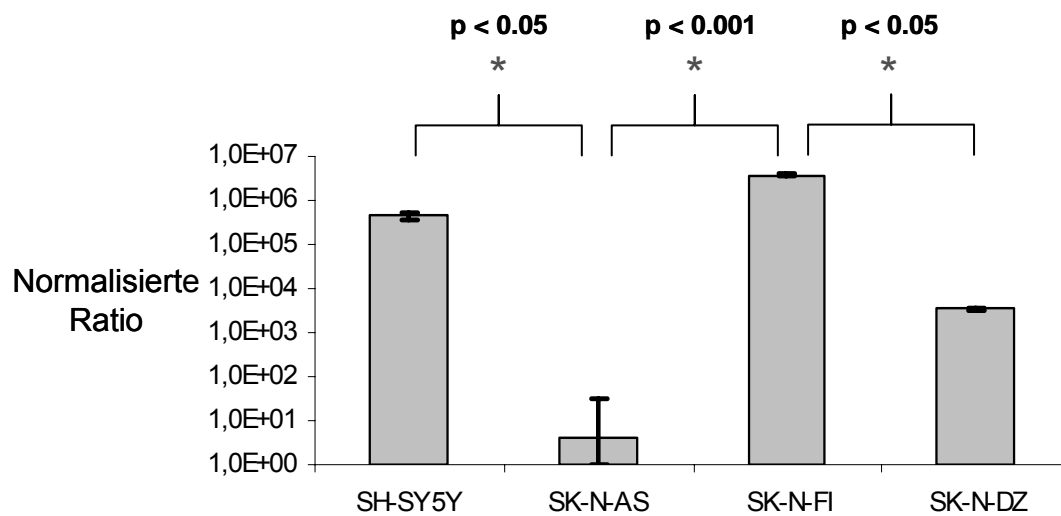


Abbildung 35: MOR-Expression der vier untersuchten Neuroblastomzelllinien auf RNA-Ebene. Dargestellt sind die Mediane (\pm SEM) der normalisierten Ratien ($\times 10^6$ multipliziert) sowie die durch den Kruskal-Wallis Test mit anschließender Post-hoc-Analyse ermittelten Signifikanzen.

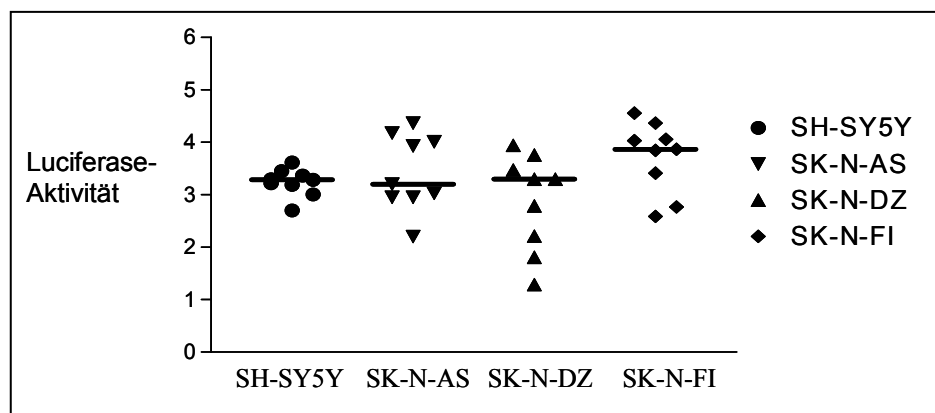


Abbildung 36: Luciferase-Aktivität der 2577 bp-Promotor-Konstrukte der Neuroblastomzelllinien

3.3 Genotypisierung des MORs

Um die klinische Bedeutung der Promotorvarianten G-554A und A-1320G zu untersuchen, wurde ein Patientenkollektiv von 747 Schmerzpatienten genotypisiert. Zusätzlich wurde an diesem Kollektiv noch die Genotypisierung der Variante A+118G durchgeführt. Diese verursacht einen Aminosäureaustausch an Position 40 von N→D und wurde mit einer veränderten Affinität für Beta-Endorphin beschrieben (Bond et al., 1998). Alle Varianten wurden mittels Echtzeit-PCR und anschließender Schmelzkurvenanalyse untersucht.

3.3.1 Promotorvarianten

Die Detektion der Varianten G-554A und A-1320G erfolgte mit zwei Primerpaaren sowie zwei Sondensystemen in einem gemeinsamen Reaktionsansatz. Für die Analyse der Variante A-1320G wurde eine LightCycler-Red640 markierte mutationsspezifische Hybridisierungssonde eingesetzt, für die Detektion der Variante G-554A wurde eine LightCycler-Red705 markierte wildtypspezifische Hybridisierungssonde verwendet. Die Differenzierung der beiden Varianten erfolgte über unterschiedliche Fluoreszenzkanäle.

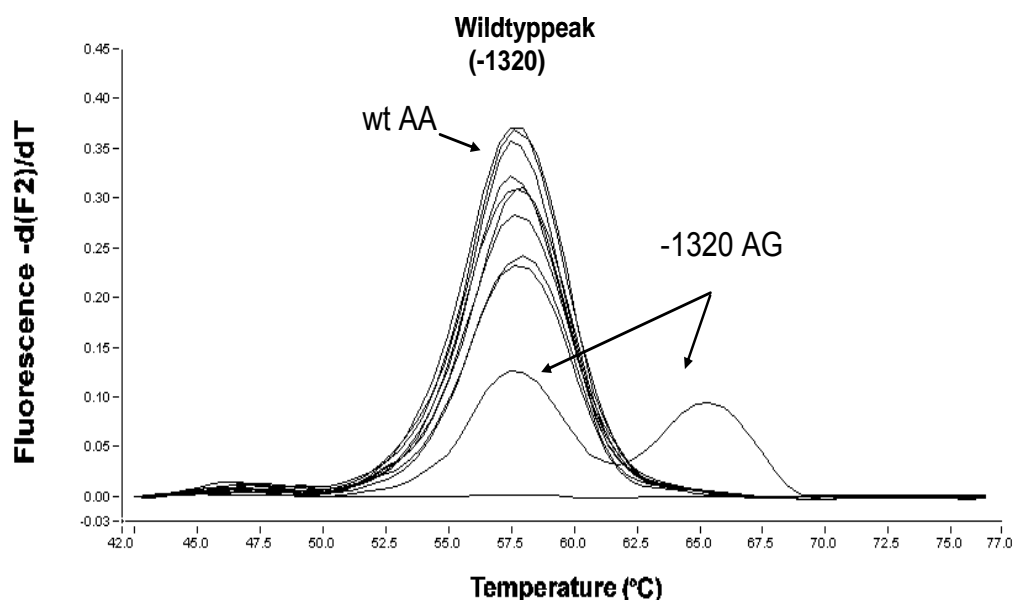


Abbildung 37: Fluoreszenzschmelzkurven zur Detektion der Variante A-1320G. Dargestellt ist die erste Ableitung der Fluoreszenz gegen die Temperatur im Fluoreszenzkanal 2 [$-d(F2)/dT$]. Die Schmelzkurvenanalyse zeigt neun Individuen mit homozygotem Wildtyp-Allel an Position -1320 (wt AA), ein heterozygoten Individuum mit Wildtyp/-1320G Genotyp (-1320 AG) sowie die Negativkontrolle.

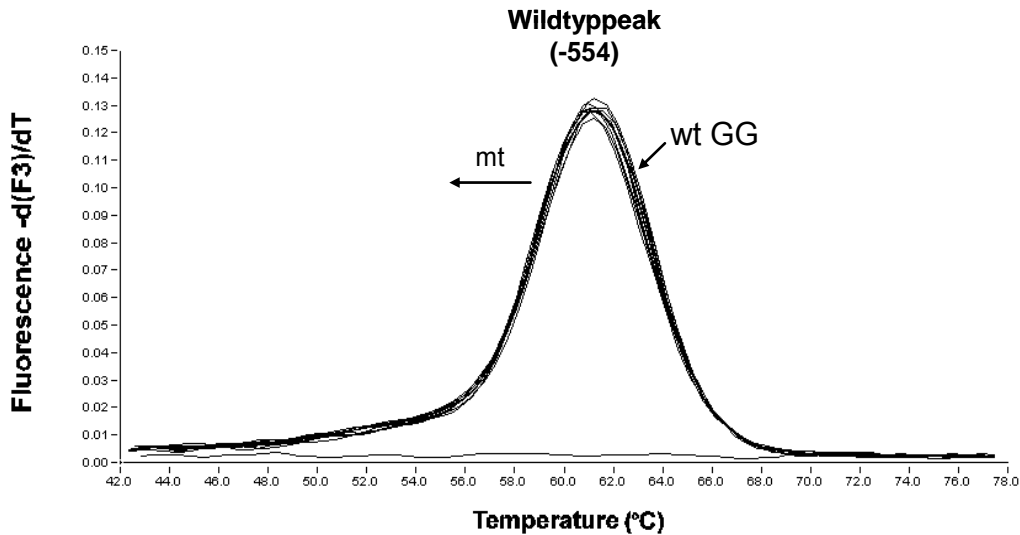


Abbildung 38: Fluoreszenzschmelzkurven zur Detektion der Variante G-554A. Dargestellt ist die erste Ableitung der Fluoreszenz gegen die Temperatur im Fluoreszenzkanal 3 [$-d(F3)/dT$]. Die Schmelzkurvenanalyse zeigt acht Individuen mit homozygotem Wildtyp-Allel an Position -554 (wt GG), die Richtung für die erwartete Verschiebung der Variante (-554 A) sowie die Negativkontrolle.

3.3.2 Variante A+118G

Für die Analyse der Variante A+118G wurde eine LightCycler-Red640 markierte, wildtypspezifische Hybridisierungssonde eingesetzt. Die Detektion erfolgte über den zweiten Fluoreszenzkanal.

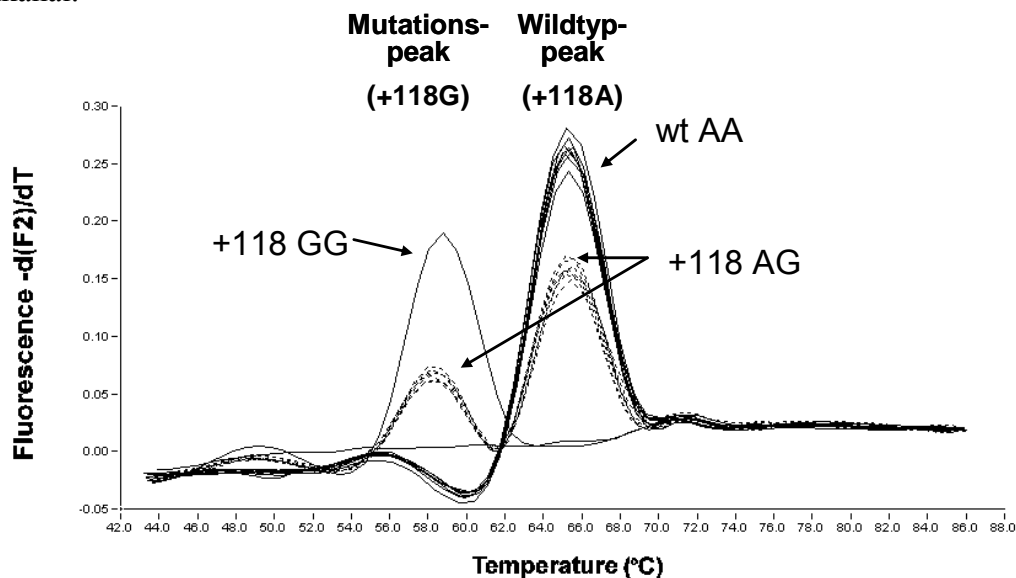


Abbildung 39: Fluoreszenzschmelzkurven zur Detektion der Variante A+118G. Dargestellt ist die erste Ableitung der Fluoreszenz gegen die Temperatur im Fluoreszenzkanal 2 [$-d(F2)/dT$]. Die Schmelzkurvenanalyse zeigt sieben Individuen mit homozygotem Wildtyp-Allel an Position +118 (wt AA), sechs heterozygote Individuen mit Wildtyp/+118 G Genotyp (+118 AG), sowie einen homozygoten Träger der Variante (+118 GG) und die Negativkontrolle.

3.3.3 Allelhäufigkeiten der Varianten im Patientenkollektiv

Die Ergebnisse der Genotypisierung des Patientenkollektivs sind in den Tabellen 39-41 dargestellt. Von allen untersuchten Individuen zeigte kein Individuum die Variante G-554A. Von der Promotorvariante A-1320G konnte ein heterozygoter Träger sowie ein homozygoter Träger identifiziert werden. Bei den Untersuchungen zur Detektion der Variante A+118G wurde eine Allelhäufigkeit von 12,5% für die Variante gefunden.

A-1320G

Genotyp	Häufigkeit	in %
AA	745	99,6
AG	1	0,14
GG	1	100
gesamt	747	100
Allel	Allelhäufigkeit	in %
A	1491	99,8
G	3	0,2
gesamt	1494	100

Tab.39:
Allelhäufigkeiten der
Variante A-1320G

G-554A

Genotyp	Häufigkeit	in %
GG	747	100
GA	-	0
AA	-	0
gesamt	747	100
Allel	Allelhäufigkeit	in %
G	1494	100
A	-	0
gesamt	1494	100

Tab.40:
Allelhäufigkeiten der
Variante G-554A

A+118G

Genotyp	Häufigkeit	in %
AA	563	76,6
AG	161	21,9
GG	11	1,5
gesamt	734	100
Allel	Allelhäufigkeit	in %
A	1285	87,5
G	183	12,5
gesamt	1468	100

Tab.41:
Allelhäufigkeiten der
Variante A+118G

3.4 Übersicht der Ergebnisse

Genotypisierung von CYP2D6 PM-assoziierten Variationen bei Schmerzpatienten:

- Mittels Echtzeit-PCR und anschließender Schmelzkurvenanalyse wurde eine zuverlässige Methode zur Detektion der PM-assoziierten CYP2D6-Varianten *3,*4,*6,*7 und *8 entwickelt.
- In der Genotypisierung eines Patientenkollektivs ergaben sich für diese Varianten sowie für die Variante *5 folgende Allelfrequenzen: 18,6 % für das Allel*4, 2,6 % für das Allel*5, 0,9 % für das Allel*3, 3,1 % für das Allel*6, und 0,2 % für das Allel*8. Zusätzlich wurden drei weitere Varianten entdeckt.
- Patienten, welche als PM identifiziert wurden, zeigten einen erhöhten Bedarf an Tramadol, um eine ausreichende Analgesie zu erlangen.

Untersuchungen zur Regulation des MOR-Expression:

- In Reporter-gen-Konstrukten mit einer Serie von 5'-Deletionen der 5'-flankierenden Sequenz des MOR-Gens, zeigten die 5'-Deletionen mit 2059 bp und 552 bp Länge die stärkste und die Sequenzen mit 2577 bp und 328 bp Länge die niedrigste Luciferase-Aktivität.
- Durch gerichtete Mutagenese wurden acht weitere Konstrukte mit je einer Promotorvariante erzeugt.

Von diesen acht Konstrukten zeigten im Luciferase-Assay die Konstrukte mit der Variante G-554A und der Variante A-1320G eine signifikant veränderte Aktivität im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp-Konstrukt.

Im EMSA konnte für beide Varianten kein verändertes Bindevverhalten im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypsequenzen an das Nuklearextrakt festgestellt werden.

In Immunoshift-Experimenten konnte eine Bindung des Antikörpers gegen NFkB-P50 an die „NFkB-/-554- Sonden“ gebundenen Proteine beobachtet werden. Es gab jedoch keine Hinweise für eine Bindung des MZF1-Antikörpers an die mit der „-1320-Sonde“ detektierten Proteine.

- Bei der relativen Quantifizierung von vier Neuroblastomzelllinien konnten signifikante Unterschiede in der MOR-Expression auf RNA-Ebene zwischen den Zelllinien SK-N-FI/SH-SY5Y und SK-N-AS sowie SK-N-FI und SK-N-DZ festgestellt werden.
- Mittels Echtzeit-PCR und anschließender Schmelzkurvenanalyse wurde eine Methode zur Detektion der MOR-Varianten A118G, G-554A und A-1320G etabliert.
- In der Genotypisierung eines Patientenkollektivs ergaben sich für diese Varianten folgende Allelfrequenzen: 0,2% für Allel -1320G, 0% für -554 A und 12,5% für 118G.

4. Diskussion

Unterschiedliche Faktoren wurden für den individuellen Verlauf einer Schmerztherapie identifiziert bzw. vermutet. Die humanen Gene des Enzyms CYP2D6 und des μ -Opioidrezeptors stellen primäre Kandidatengene für die interindividuelle Variabilität der klinischen Opiodwirkung dar.

4.1 Genotypisierung von CYP2D6

Genomische Variationen in Arzneimittel metabolisierenden Enzymen werden mit Nebenwirkungen, Unverträglichkeit und veränderten therapeutischen Effekten in Verbindung gebracht. Durch eine fehlende oder verminderte Aktivität solcher Arzneimittel metabolisierender Enzyme kann es zu einer veränderten Konzentration des jeweiligen Medikamentes im Blut kommen und dadurch zu einer ausbleibenden oder gar toxischen Wirkung beim Patienten führen.

Medikamente und Karzinogene werden nach dem Umbau durch die Enzyme des Phase I und Phase II Metabolismus aus dem Körper ausgeschieden. Von vielen der hierbei beteiligten Gene sind funktionelle Polymorphismen bekannt, was zu einer individuellen Anfälligkeit gegenüber Neurotoxinen beiträgt. So wurde CYP2D6 als Kandidatengen mit dem Auftreten von verschiedenen Krebstypen sowie mit der Parkinson Krankheit assoziiert (Roddam et al., 2000; Payami et al., 2001), wobei hier unterschiedliche Ergebnisse aus Assoziationsstudien vorliegen (Laforest et al., 2000; Payami et al., 2001).

Unterschiede im Arzneimittelmetabolismus zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen werden ebenso auf Umweltfaktoren wie auf genetische Faktoren zurückgeführt (Bertilsson, 1995). So kommt z.B. das CYP2D6 Allel *4 mit großer Häufigkeit in der kaukasischen Bevölkerung (21%), weniger häufig (4%) in der schwarz afrikanischen und nahezu überhaupt nicht in der chinesischen Bevölkerung vor (Bertilsson, 1995; Sachse et al., 1997; Bathum et al., 1999).

CYP2D6 ist ein hoch polymorphes Enzym und an der Metabolisierung von ca. 25% aller bekannten Medikamente beteiligt. Bei bis zu 10% der Kaukasier, den so genannten Poor Metabolizern (PM), liegt jedoch eine verminderte oder fehlende Enzymfunktion von CYP2D6 vor. Daher könnten Genotypisierungen von CYP2D6 in Zukunft Teil einer individuell optimierten Arzneimittelbehandlung werden. So wäre eine zuverlässige und effiziente Methode zur Genotypisierung von CYP2D6 nützlich, um eine Diagnose über den funktionel-

len Status der CYP2D6 Metabolisierung zu erhalten. Damit könnte das individuelle Risiko von unerwünschten Wirkungen, erfolglosen Therapien sowie mit dem CYP2D6 PM-Genotyp assoziierten Krankheiten identifiziert bzw. verringert werden.

Sechs der häufigsten mit dem PM-Status assoziierten genomischen Varianten des CYP2D6-Gens in der kaukasischen Bevölkerung sind die Varianten CYP2D6 *3,*4,*5,*6,*7 und *8 (van der and Steijns, 1999). Während es sich bei den Varianten CYP2D6 *3 und *6 um die Deletion einer einzelnen Base handelt, was zu einer Verschiebung des Leserasters führt, ist bei der Variante *5 das gesamte Gen deletiert. Bei den Varianten CYP2D6 *4,*7 und *8 handelt es sich um Basenpaar-Substitutionen, welche bei der Variante *4 einen Spleißdefekt, der Variante *7 einen Aminosäureaustausch und der Variante *8 ein frühzeitiges Stopkodon zur Folge haben (Kagimoto et al., 1990; Gaedigk et al., 1991; Saxena et al., 1994; Evert et al., 1994; Broly et al., 1995; Daly et al., 1996).

4.1.1 Methoden zur Genotypisierung

In früheren Studien wurde der Phänotyp durch die Verabreichung von „Testmedikamenten“ wie z.B. Spartein und Debrisoquine (Paar et al., 1997) bestimmt. Diese zeitaufwendige und komplizierte Methode zur Kalkulation der Metabolitenratio kann zudem durch andere Medikamente, welche CYP2D6 als Inhibitor oder Substrat dienen, beeinflusst werden (Lohmann et al., 2001). Da die meisten Patienten mit einer Kombination von Medikamenten behandelt werden, stellt dies in der Praxis durch die daraus möglichen Medikamenteninteraktionen keine zuverlässige Methode dar. Um die Zuverlässigkeit zu erhöhen und eine Genotypisierung zu ermöglichen, wurden PCRs mit anschließender RFLP-Analyse (Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus) entwickelt (Skoda et al., 1988). Da jedoch eine immer größere Anzahl von Variationen entdeckt wurde, mussten auch immer mehr PCR-Reaktionen mit anschließenden RFLP Analysen durchgeführt werden (Gaedigk et al., 1999). Deshalb wurden effizientere Verfahren wie allelspezifische Multiplex-PCRs, allelspezifische Multiplex-long-Template-PCRs sowie Multiplex-PCRs mit allelspezifischer Oligonukleotid-Hybridisierung entwickelt (Stuven et al., 1996; Labuda et al., 1999; Hersberger et al., 2000; Topic et al., 2000). Die Sequenzierung stellt wohl die geeignetste Methode zur Ermittlung des jeweiligen Genotyps dar. Jedoch ist auch diese Methode bei einem größeren Probenvolumen, durch ihren hohen Aufwand, eher ungeeignet. Eine neue Methode sollte einfach, effizient und kostengünstig sein.

In dieser Arbeit wurde eine Methode zur Detektion der PM-assozierten Varianten CYP2D6 *3,*4,*6,*7 und *8 mittels Echtzeit-PCR und anschließender Schmelzkurvenanalyse entwi-

ckelt. Diese Methode zeichnet sich durch ihre schnelle Durchführbarkeit und ihre hohe Sensitivität aus. Durch die Minimierung der Schritte (PCR und Detektion erfolgen direkt aufeinander ohne gelelektrophoretische Auftrennung) verringert sich zudem die Gefahr der Verwechslung und Kontamination. Die erhöhten Materialkosten gleichen sich durch die geringe Arbeitszeit und die hohe Zuverlässigkeit dieser Methode, im Vergleich zu den günstigeren Multiplex-PCR Methoden, wieder aus. Somit stellt die in dieser Arbeit etablierte Echtzeit-PCR mit anschließender Schmelzkurvenanalyse zur Detektion der CYP2D6 Varianten *3,*4,*6,*7 und *8 eine geeignete Alternative zu den bisherigen Verfahren dar.

4.1.2 Genotypisierung und Allelfrequenzen

Die Genotypisierung der 5 PM-assoziierten SNPs erfolgte durch die in der vorliegenden Arbeit entwickelte Methode, mittels Echtzeit-PCR und anschließender Schmelzkurvenanalyse. Hierbei wurden fluoreszenzmarkierte Hybridisierungs sonden eingesetzt. Die CYP2D6 Varianten *3 und *7 wurden zusammen in einer Reaktion und die Varianten *4, *6, und *8 zusammen in einer zweiten Reaktion detektiert. Zusätzlich wurde die ebenso mit dem PM-Status assoziierte Variante *5 (Nullallel) über eine konventionelle PCR nach Steen et al. (Steen et al., 1995) untersucht.

Die ermittelten Allelfrequenzen waren vergleichbar zu bereits publizierten Daten (Sachse et al., 1997; Maren et al., 1997; Griese et al., 1998). Mit der hier durchgeführten Methode wurden weitere bereits beschriebene PM-Assoziierte Varianten, die außerhalb der Sondenbereiche lokalisiert sind, nicht erfasst, wie z.B., die sehr seltenen Varianten *11 bis *16, welche eine Allelfrequenz von 0-1% (van der and Steijns, 1999) aufweisen.

Zusätzlich zu den fünf mittels Echtzeit-PCR untersuchten Varianten kann von der hier dargestellten Methode auch die seltene Variante *14 (van der and Steijns, 1999) erfasst werden, welche an der gleichen Position wie die Variante *8 lokalisiert ist und sich nur durch die ausgetauschte Base unterscheidet. Während bei Variante *8 ein Basenaustausch an Position 1846 von G nach T vorliegt, findet man bei der Variante *14 einen Austausch von G nach A an dieser Position. Da keine Positivkontrolle zur Verfügung stand, wurde die Analyse zur Detektion der Variante *14 mit einem künstlichen Oligonukleotid durchgeführt. Diese ergab unterschiedliche Schmelztemperaturen für die jeweiligen Allele *8, Wildtyp und *14, so dass diese voneinander zu differenzieren waren.

Weiterhin können mit dieser Methode im Sequenzbereich der Sondenhybridisierung auch bisher unbekannt Varianten durch die Schmelzkurvenanalyse detektiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde innerhalb der Genotypisierungsstudie zusätzlich die Variante

C1792G detektiert. Diese Variante wurde bereits mit einer Allelfrequenz von 0,3% beschrieben (Marez et al., 1997), was mit den hier ermittelten Ergebnissen übereinstimmt. Die Variante zeigte sich durch eine Abweichung des Fluoreszenzpeaks um $-1,6^{\circ}\text{C}$ vom Allel *6. Durch eine anschließende Sequenzierung konnte der Basenaustausch von C nach G an Position 1792 diesem verschobenen Schmelzkurvenverlauf zugeordnet werden. So können Veränderungen in der Schmelzkurve mit zusätzlicher Sequenzierung weitere Informationen über neue genomische Varianten geben.

4.1.3 Einfluss des CYP2D6 Genotyps auf die postoperative Analgesie mit Tramadol

In den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigte sich, dass mit dem PM-Status assoziierte Variationen einen Einfluss auf die postoperative Analgesie mit Tramadol haben. In der postoperativen Schmerztherapie hat sich der Einsatz von Tramadol im so genannten „Würzburger Schmerztröpfchen“ bewährt. Dieser besteht aus dem Opioidanalgetikum Tramadol, dem Nichtopioidanalgetikum Metamizol und einem Antiemetikum. Dabei verfügen Tramadol und Metamizol über einen unterschiedlichen Wirkmechanismus (Levy et al., 1995).

Metamizol wirkt antipyretisch, spasmolytisch und erzeugt, neben einer peripheren Wirkung, durch Hemmung der Prostaglandinsynthese auch einen zentralen Analgesieeffekt.

Tramadol ist ein Racemat, dessen analgetischer Effekt durch seine Enantiomere und Metaboliten freigesetzt wird und sowohl über einen Opioid vermittelten Mechanismus als auch über einen nicht Opioid vermittelten Mechanismus wirkt (Eggers and Power, 1995). Hierbei metabolisiert CYP2D6 Tramadol zu seinem am μ -Opioidrezeptor aktiven M1-Metabolit (+)O-Desmythel-Tramadol (Paar et al., 1992). Der antinozizeptive Effekt wird von Tramadol durch seine schwache agonistische Wirkung am μ -Opioidrezeptor initiiert. Des Weiteren wird der analgetische Effekt durch Interaktionen mit monoaminergen Neurotransmittern hervorgerufen. Tramadol hemmt die Wiederaufnahme von 5-Hydroxytryptamin (5-HT) und Noradrenalin/Norepinephrin (Reuptake-Hemmung) (Stamer et al., 2003).

Es stellt sich die Frage, in welchem Ausmaß CYP2D6-PM, bei welchen der Opioid vermittelte analgetische Effekt fehlt, in einer durch Tramadol vermittelten Analgesie beeinflusst sind. Verschiedene Studien lieferten bereits Hinweise für einen verminderten analgetischen Effekt von Tramadol bei PM. In experimentellen Schmerzmodellen wurde ein reduzierter aber messbarer analgetischer Effekt nach Tramadolverabreichung bei PM festgestellt (Poulsen et al., 1996b). Durch erhöhte Konzentrationen des aktiven M1-Metabolit (+)O-Desmythel-Tramadol im Serum von Extensive Metabolizern (EM) gegenüber PM wurde vermutet, dass die Bildung des (+)O-Desmythel-Tramadol durch CYP2D6 einen

bedeutenden Effekt des Tramadols in diesen experimentellen Schmerzmodellen darstellt. Diese Untersuchungen wurden jedoch unter Verabreichung einer einzelnen Dosis an gesunden Probanden unternommen, so dass die Frage der Beeinflussung durch den CYP2D6 PM-Status bei Tramadolverabreichung unter klinischen Aspekten weiter ungeklärt blieb.

In der in dieser Arbeit durchgeführten Studie wurden 10% der eingeschlossenen Patienten genetisch als PM identifiziert. Diese zeigten einen erhöhten Bedarf an Tramadol und benötigten wiederholte Verabreichungen um eine ausreichende Analgesie zu erlangen. Diese Ergebnisse stehen somit im Einklang mit der Hypothese eines reduzierten analgetischen Effekts von Tramadol bei PM. Die enzymatische Aktivität des CYP2D6 könnte jedoch auch durch zusätzlich verabreichte Medikamente beeinflusst gewesen sein. Ebenso werden Unterschiede in der Schmerztoleranz zwischen EM und PM diskutiert. Experimentell wurde eine verminderte Toleranz von PM gegenüber EM bei tonischen Schmerzen festgestellt (Sindrup et al., 1993). Auch die zusätzliche Verabreichung des Nichtopioids Metamizol könnte die Beurteilung der Ergebnisse durch additive bzw. synergistische Effekt erschwert haben. Bei manchen Patienten vermag Metamizol alleine schon eine ausreichende Analgesie zu bewirken.

Die Ergebnisse, der in dieser Arbeit dargestellten Studie, sprechen jedoch deutlich für einen reduzierten analgetischen Effekt von Tramadol bei PM und stehen im Einklang mit den experimentellen Schmerzstudien (Collart et al., 1993; Poulsen et al., 1996b; Paar et al., 1997).

4.2 Untersuchungen zur Regulation des μ -Opioidrezeptors (MOR)

Dem humanen MOR kommt als Target für endogen und exogen zugeführte Opioide eine besondere Bedeutung in der Schmerztherapie zu. Er vermittelt charakteristische Effekte wie Analgesie, Atemdepression, Toleranzentwicklung und Abhängigkeit. Als Mitglied der Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren ist die MOR-Signalübermittlung durch Interaktionen mit verschiedenen Effektoren sehr komplex (Law et al., 2000). Die Aktivität des MORs wird streng auf der Ebene der Transkription reguliert. So wurden räumliche (Mansour et al., 1994) und temporäre (Zhu et al., 1998) Expressionsmuster ebenso wie sich verändernde mRNA-Level bei chronischer Behandlung mit Opioidagonisten (Duttaroy and Yoburn, 2000) und Nichtopioidagonisten, z.B. Kokain und Ethanol (Azaryan et al., 1996; Winkler et al., 1998), beobachtet. Um zu verstehen, wie diese Expressionsunterschiede zustande kommen und wie der MOR reguliert wird, sind detaillierte Studien der molekularen Mechanismen, welche die Transkription des MOR-Gens regulieren, notwendig. Es hat sich immer wieder gezeigt, dass die Schmerzbehandlung mit Opioiden individuell sehr unterschiedlich anspre-

chen kann. Eine Begründung hierfür könnte eine von Mensch zu Mensch unterschiedliche Dichte an Opioidrezeptoren sein, welche die nozizeptive Reaktion auf Opioide beeinflusst. Bindungsstudien ließen Unterschiede der MOR-Expression von >45% bis >74% (unteres Drittel gegenüber oberes Drittel) in der Bevölkerung vermuten. In Studien an Mäusen zeigte sich, dass genetische Unterschiede in dieser Größenordnung sowohl die Nozizeption als auch die Wirkung von Morphin beeinflussen kann (Uhl et al., 1999).

Die Expression vieler, wenn nicht sogar der meisten Gene, unterscheidet sich von Mensch zu Mensch. Viele dieser Expressionsunterschiede werden vermutlich durch Unterschiede in den cis-aktiven DNA Sequenzen hervorgerufen, welche dazu dienen, die zelltypisch betreffende Genexpression zu regulieren (Uhl et al., 1997).

Von daher ist die Suche nach potentiellen Polymorphismen innerhalb von regulativen Sequenzen ein wichtiger Bestandteil für das Verständnis von individuellen Unterschieden in der MOR-Expression, der Nozizeption und der klinischen Opioidtherapie (Uhl et al., 1999).

Die Suche nach funktionellen Polymorphismen, welche zu solchen individuellen Unterschieden in der Genexpression beitragen, lässt sich grob in drei Schritte unterteilen: zum ersten müssen geeignete genomische Sequenzen mit den charakteristischen Transkriptionsstartpunkten und potenziell regulatorischen Regionen gefunden werden. Als zweites gilt es eine Auswahl an Polymorphismen zu treffen und die dritte Herausforderung besteht darin, den Einfluss dieser Polymorphismen auf die Expression des jeweiligen Gens zu ermitteln.

4.2.1 Reportergene

Erster Schritt:

In der vorliegenden Arbeit wurden zu Beginn der Expressionsstudien regulatorisch aktive Sequenzabschnitte in der 5'-flankierenden Region des MOR-Gens mittels Reportergen-Konstrukten detektiert. Die Konstrukte wurden transient in die humane Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y transfiziert und die Lysate im Luciferase-Assay gemessen. Da diese Zelllinie den MOR konstitutiv exprimiert (Zadina et al., 1993), stellt sie ein gutes Modellsystem für Studien über die MOR-Expression dar.

Alle getesteten Sequenzabschnitte zeigten im Luciferase-Assay eine funktionelle Aktivität. Nicht immer konnten alle Konstrukte parallel transfiziert werden. Zwischen den einzelnen Transfektionen wurden jedoch teilweise deutliche Unterschiede im Luciferase-Assay beobachtet. Aus diesem Grund wurden diese Versuche nicht statistisch analysiert, sondern nur bestimmte Paarungen miteinander verglichen.

Zur Aufklärung der genomischen Organisation des humanen MOR-Gens wurden bereits weitgehende Untersuchungen durchgeführt. Es wurde eine 2412 bp große 5'-flankierende Sequenz gefunden, mit einer Haupt- und drei Nebentranskriptionsstartpunkten (Wendel and Hoehe, 1998). Eine klassische TATA-Box wurde vergleichbar zur Maus und Ratte nicht gefunden (Min et al., 1994; Kraus et al., 1995). Auch konnten keine gewebespezifischen Elemente ermittelt werden (Andria and Simon, 1999; Xu and Carr, 2001b). Mittels Datenbankrecherche wurden einige Transkriptionsfaktorbindestellen identifiziert. Es wurden Homologien für GRE, CRE, YY1, SP-1 und AP-1 Bindestellen ermittelt (Wendel and Hoehe, 1998).

In Reporter-Experimenten wurden zwischen den Positionen -563 und -292 starke Enhancer-Regionen detektiert, während in der Region -776 bis -564 repressive Elemente vermutet wurden (Xu and Carr, 2001b). Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein. So zeigte das 552 bp-Konstrukt (Sequenzabschnitt -588 bis -36) eine erhöhte Aktivität gegenüber dem 849 bp-Konstrukt (Sequenzabschnitt -885 bis -36) und dem 328 bp-Konstrukt (Sequenzabschnitt -364 bis -36). Eine identifizierte Bindestelle für SP-1 und SP-3, in dem Sequenzabschnitt -351 bis -292, (Xu and Carr, 2001a) könnte für die erhöhte Aktivität des 552 bp-Konstruktes mitverantwortlich sein. Es wurde gezeigt, dass SP-1 als ubiquitärer Transkriptionsfaktor viele TATA-lose Promotoren, vermutlich durch Interaktionen mit der generellen Transkriptionsmaschinerie wie das TATA-Box Bindeprotein TBP und TBP assoziierte Faktoren, transaktiviert (Lania et al., 1997; Suske, 1999).

Jedoch zeigt das in der vorliegenden Arbeit gemessene 328 bp-Konstrukt (Sequenzabschnitt -364 bis -36) eine verminderte Aktivität gegenüber dem 552 bp-Konstrukt und dem kleinsten Konstrukt (263 bp-Konstrukt, Sequenzabschnitt -299 bis -36), welches den ersten Transkriptionsstartpunkt enthält (Wendel and Hoehe, 1998). Daraus schließend, könnte die SP1/SP3-Bindestelle auch als suppressives Element in der 5'-flankierenden Region des MOR-Gens wirken. Für SP-3 wurde bereits vermutet, dass es durch Protein-Protein Interaktionen mit Komponenten des Transkriptionskomplexes, als transkriptioneller Repressor, fungiert (De et al., 1996).

Weitere cis-aktive Elemente wurden in den Regionen -540 bis -501 und -694 bis -660 entdeckt. Während im Sequenzbereich -694 bis -660 suppressive Elemente gefunden wurden, wurde der Sequenzbereich von -540 bis -501 als Enhancer-Region detektiert (Xu and Carr, 2001c). Diese Region könnte für die erhöhte Aktivität des 552 bp-Konstruktes (Sequenzabschnitt -588 bis -36) von Bedeutung sein, da sie in dem 328 bp-Konstrukt nicht vorhanden ist.

Ein ähnliches Muster wie bei den 328 bp-, 552bp- und 849 bp-Konstrukten, zeigte sich in den Reporter-Experimenten dieser Arbeit für die Konstrukte mit den Sequenzabschnitten -2613 bis -36 (2,6 kb-Konstrukt), -2095 bis -36 (2,06 kb-Konstrukt) und -1365 bis -36 (1,3 kb-Konstrukt). Das 2,06 kb-Konstrukt zeigte eine deutlich erhöhte Aktivität im Vergleich zu den beiden anderen Konstrukten. Dies deutet auf suppressive Elemente in der Region -2613 bis -2096 und aktivierende Elemente im Sequenzbereich -2095 bis -1366. In der Region -1670 bis -2535 der 5'-flankierenden Region des MOR-Gens wurden Homologien für Transkriptionsfaktorbindestellen von AP-1, YY1 und GRE gefunden (Wendel, 1998). Diese könnten für die erhöhten regulatorischen Aktivitäten in diesem Bereich mitverantwortlich sein.

Zweiter Schritt:

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten acht Variationen wurden nach den Kriterien „Position in der 5'-flankierenden Region des MOR-Gens“ und „Häufigkeit“ ausgewählt. Demnach wurden zum einen Varianten ausgesucht, welche sich innerhalb von Transkriptionsfaktorbindestellen befinden (C-995A -1699insT, und G-554A) bzw. nahe an dem Haupttranskriptionsstartpunkt lokalisiert sind (A-236G) (Wendel and Hoehe, 1998; Hoehe et al., 2000; Kraus et al., 2001; Kraus et al., 2003). Zum anderen wurden Varianten gewählt, welche mit einer Frequenz zwischen 1-10 % relativ häufig in der europäisch-amerikanischen Bevölkerung vorkommen (G-1748A, A-1320G, A-1045G) (Hoehe et al., 2000).

Dritter Schritt:

Um eventuelle Einflüsse der ausgewählten Varianten auf die Expression des MOR-Gens zu ermitteln, wurden mittels gerichteter Mutagenese Reporter-Gen-Konstrukte, welche je eine dieser Varianten enthielten, erzeugt. Für die Mutagenesereaktionen wurden die Konstrukte mit den Längenfragmenten von 2,06 kb, 1,3 kb und 552 bp verwendet. Von den acht untersuchten Promotor-Konstrukten, die jeweils eine Variante enthielten, konnte bei zwei Konstrukten im Luciferase-Assay (G-554A und A-1320G) eine signifikante Veränderung der Promotoraktivität im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp-Konstrukten festgestellt werden.

Der Transkriptionsfaktor STAT6 spielt eine bedeutende Rolle in der Zellantwort auf Interleukin-4 (IL-4) (Takeda et al., 1996). Die Variante C-995A liegt innerhalb eines STAT6 Bindeelements in der 5'-flankierenden Region des MOR-Gens und reduziert das Transaktivierungspotential dieses Elementes durch IL-4 um 50 % (Kraus et al., 2001). IL-4 ist ein

multifunktionelles Zytokin, welches ein großes Spektrum an biologischen Aktivitäten zeigt (Nelms et al., 1999). Es gehört zur Gruppe der antiinflammatorischen Zytokine, da es die Produktion und Wirkung von proinflammatorischen Zytokinen hemmt, wodurch sowohl die Entzündungsreaktion als auch hyperalgetische Effekte begrenzt werden. Unter inflammatorischen Bedingungen wurde eine erhöhte Wirksamkeit von Opioiden festgestellt (Rittner et al., 2002). Ein Grund dafür könnte eine erhöhte Dichte von Opioidrezeptoren an peripheren Nervenendigungen nach einer initiierten Inflammation sein (Mousa et al., 2001). Eine Stimulation mit IL-4 induziert die MOR-Transkription in humanen Immunzellen sowie in dendritischen und neuronalen Zellen (Kraus et al., 2001). In den Reporter-Experimenten der vorliegenden Arbeit konnte kein Einfluss der Variante C-995A auf die Luciferase-Aktivität festgestellt werden. Jedoch wurden die Experimente auch ohne jede Art von Stimulation durchgeführt. So scheint die Variante C-995A unter unstimulierten Bedingungen keinen Einfluss auf die Regulation des MOR zu haben.

Sowohl die AP-1 DNA-Bindungsaktivität, als auch die AP-1 abhängige Transkription werden durch eine akute Opioidadministration verstärkt (Bilecki et al., 2004). Die T Insertion an der Position -1699 wurde innerhalb einer AP-1 Bindestelle vermutet (Hoehe et al., 2000). Immunoshift-Experimente lieferten keine Beweise für eine Ap-1 Bindung an dieser Position, deuteten jedoch auf die Bindung eines anderen Transkriptionsfaktors hin (Borner et al., 2002). Welcher Transkriptionsfaktor auch an diese Position des MOR-Gens bindet, die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen nicht auf einen Einfluss der Variante -1699 insT auf die Transkription des MOR-Gens schließen.

NFkB ist ein ubiquitärer Transkriptionsfaktor, der durch eine Vielzahl von Faktoren aktiviert wird und für die Modulation von Genen in Abhängigkeit von TNF bekannt ist (Chen et al., 1999; Baud and Karin, 2001). Es wurde gezeigt, dass TNF die Expression des MOR-Gens mittels NFkB reguliert. Dies könnte ein wichtiger Mechanismus für die inflammatorisch induzierte Aktivierung des Opioidsystems sein (Borner et al., 2002). Von sechs möglichen Bindestellen für NFkB wurden drei cis-aktive Elemente innerhalb der 5'-flankierenden Region des MOR-Gens identifiziert. Für eines dieser Elemente wurde, nach TNF-Stimulation, ein reduziertes Transaktivierungspotential durch die Variante G-554A entdeckt (Kraus et al., 2003). Eine reduzierte Promotoraktivität des Konstrukts mit der Variante G-554A im Vergleich zum Wildtyp-Konstrukt wurde auch in der vorliegenden Arbeit unter unstimulierten Bedingungen beobachtet.

Des Weiteren konnten Kraus et al. mittels electrophoretic mobility shift assay (EMSA) eine reduzierte Bindungsaktivität für die NFkB-Bindestelle mit der Variante G-554A gegenüber

dem Wildtyp feststellen (Kraus et al., 2003). Diese Beobachtungen konnten in der vorliegenden Arbeit nicht eindeutig bestätigt werden. Eine Erklärung hierfür könnten experimentelle Unterschiede sein. Vor allem die TNF-Stimulation der SH-SY5Y Zellen könnte von Bedeutung sein. Kraus et al. konnten in Immunoshift-Experimenten die Bindung von NFκB-p65 an ein Oligonukleotid mit der Position -554 nachweisen. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht festgestellt werden. Es wurde jedoch gezeigt, dass der Antikörper gegen NFκB-p50 in Konkurrenz zur NFκB-Sonde an das Nuklearextrakt bindet, was eine Bindung von NFκB-p50 an den untersuchten Sequenzabschnitt vermuten lässt.

Die fünf Mitglieder der NFκB Familie p65 (RelA), RelB, RelC, p50/p105 und p52/p100 kommen meist, als Homo- oder Heterodimer, gebunden an ein IκB-Protein, im Zytoplasma der Zellen vor. Hierbei enthalten p65, RelB, RelC starke Transaktivierungsdomänen, während p50 und p52 die Transkription im Allgemeinen nicht aktivieren (Hayden and Ghosh, 2004). Gewöhnlich lösen Induktoren eine Signalkaskade aus, wodurch IκB abgebaut und das Kernlokalisierungssignal freigelegt wird. Danach können die „freien“ NFκB-Dimere in den Zellkern gelangen und an spezifische regulatorische Sequenzen binden. In einigen Zelltypen wurden jedoch auch konstitutive DNA-Bindungsaktivitäten für NFκB-Dimere gefunden (Rayet and Gelinas, 1999). In Neuroblastomzelllinien wurden vor allem für einige „S-Typ“ Zellen konstitutive NFκB DNA-Bindungsaktivitäten unter Beteiligung von p65 und p50 entdeckt (Bian et al., 2002). Bei neuronalen Zellen (N-Typ), zu welchen die hier verwendeten SH-SY5Y Zellen gehören, konnte dies jedoch nicht beobachtet werden (Bian et al., 2002). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente deuten jedoch auf ein konstitutives Vorhandensein eines NFκB-Komplexes im Zellkern unter Beteiligung von p50 hin. Zum einen konnte eine gegenseitige spezifische Hemmung der Sonde mit der „klassischen“ NFκB-Sequenz gegenüber den Sonden mit der Sequenz des MOR-Gens mit der Position -554 beobachtet werden. Zum anderen deuten die Ergebnisse der Immunoshift-Experimente auf eine Bindung von NFκB-p50 an das Nuklearextrakt der unstimulierten SH.SY5Y Zellen hin.

Obwohl NFκB-Dimere an ein gemeinsames Sequenzmotiv binden, wurden für verschiedene Dimere geringfügige Unterschiede innerhalb des Bindemotivs gefunden (Chen et al., 1999). Von daher könnte die Variante G-554A auf die Bindung eines p50-Komplex einen geringeren oder keinen Einfluss haben, sich aber mit einer reduzierten Bindungsaktivität auf einen p65- Komplex auswirken.

In Reporter-Gen-Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde, ebenso unter unstimulierten Bedingungen, eine reduzierte Promotoraktivität des Konstruktes mit der Variante G-554A

gegenüber dem Wildtyp-Konstrukt festgestellt. Eine Vielzahl von Stressoren kann eine Aktivierung von NFκB verursachen. So könnte die Durchführung der Transfektion an sich zur Aktivierung eines p65 Komplexes geführt haben, wodurch die Ergebnisse der Reporter-Gen-Experimente unter unstimulierten Bedingungen mit den Ergebnissen von Kraus et al. übereinstimmen.

Innerhalb des MOR-Gens wurden mehrere potentielle Transkriptionsstartpunkte gefunden (Wendel and Hoehe, 1998; Xu and Carr, 2001). Die untersuchte Variante an der Position -236 liegt nahe an dem beschriebenen Haupttranskriptionsstartpunkt (Wendel and Hoehe, 1998) und könnte somit einen Einfluss auf den Initiationskomplex haben. In den Reporter-Gen-Experimenten der vorliegenden Arbeit konnte kein Einfluss dieser Variante auf die Promotoraktivität festgestellt werden.

Für die Positionen -1748, -1045 und -172 wurden bisher keine Transkriptionsfaktorbindestellen beschrieben. Für die Varianten an diesen Positionen wurden Häufigkeiten von 1-10 % publiziert (Hoehe et al., 2000; Gscheidl et al., 2000). Die Variante G-172T wurde zusätzlich in Assoziationsstudien untersucht. Es konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen dieser Variante und der Abhängigkeit von Heroin, Kokain und Alkohol gefunden werden (Hoehe et al., 2000; Gscheidl et al., 2000). In den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte ebenso kein Einfluss dieser Varianten auf die Promotoraktivität festgestellt werden.

Die zweite Variante, durch welche sich in der vorliegenden Arbeit eine signifikant veränderte Promotoraktivität zeigte, befindet sich an der Position -1320 der 5'-flankierenden Region des MOR-Gens. Trotz der signifikanten Aktivitätsunterschiede in den Reporter-Gen-Experimenten zwischen dem Konstrukt mit der Variante und dem entsprechenden Wildtyp-Konstrukt, konnte im EMSA keine veränderte Bindungsaktivität für die Varianten-Sonde gegenüber der Wildtyp-Sonde festgestellt werden. Eventuell wird für diese Aktivitätszunahme, wie sie bei dem Konstrukt mit der Variante A-1320G zu beobachten war, die Interaktion von mehreren Transkriptionsfaktoren benötigt.

Im MOR-Gen wurde bisher für die Position -1320 keine Transkriptionsfaktorbindestelle beschrieben. Bei Datenbankanalysen mit der Varianten- und der Wildtypsequenz ergab sich eine hohe Übereinstimmung für die Sequenz mit der Variante A-1320G und einer Bindestelle für das Myeloid Zinkfinger Protein MZF1. MZF1 besitzt zwei separate DNA-Bindedomänen, welche beide selektiv für eine ähnliche Konsensus-Sequenz mit einem Kernelement aus vier bis fünf Guanin-Resten sind (Morris et al., 1994). Es wurde bisher vor allem in der transkriptionellen Regulation der Hämatopoese erforscht (Morris et al., 1994; Hromas et al., 1996)

und sowohl durch repressive als auch aktivierende Eigenschaften charakterisiert (Perrotti et al., 1995; Hromas et al., 1996; Le et al., 2005). In Osteoblasten wurde eine MZF1 und SP1/SP3 vermittelte Regulation der N-cadherin Promotoraktivität beobachtet, wobei die Expression durch MZF1/SP1 erhöht wurde, SP3 dagegen antagonistisch wirkte (Le et al., 2005). Mittels Echtzeit-PCR wurden in den für die Transfektionen und EMSAs verwendeten SH-SY5Y Zellen Transkripte für MZF1 nachgewiesen. Jedoch konnte in Immunoshift-Experimenten keine Reaktion auf einen Antikörper gegen MZF1 beobachtet werden. Der hierfür verwendete Antikörper wurde jedoch nur für ELISA getestet und könnte daher ungeeignet für diese Anwendung sein. Andere Antikörper für dieses Protein sind bisher nicht verfügbar.

Weitere Transkriptionsfaktoren, welche nach Datenbankanalyse an die Position -1320 im MOR-Gen binden könnten, zeigten eine wesentlich geringere Sequenzübereinstimmung als MZF1 und vor allem deutlich geringere Unterschiede in der Bindungswahrscheinlichkeit zwischen der Varianten- und der Wildtypsequenz.

4.2.2 Quantifizierung

Die transkriptionelle Regulation ist ein wichtiger Mechanismus zur Regulation der Proteinsynthese. Eine verminderte MOR-Dichte kann auf einen reduzierten RNA-Level beruhen.

Da eine Amplifizierung von MOR-RNA aus Blutproben nicht durchführbar war, wurden zur Untersuchung möglicher Einflüsse von Promotorvarianten auf die RNA-Expression des MORs vier Neuroblastomzelllinien verwendet. Die vier Zelllinien entstammen aus dem gleichen Gewebetyp und weisen alle eine epitheliale Morphologie auf (<http://www.atcc.org>). Da die Zelllinien von vier verschiedenen Individuen abstammen, wäre es möglich gewesen, dass sich diese genotypisch in der 5'-flankierenden Region des MOR-Gens voneinander unterscheiden und sich dies in der RNA-Expression widerspiegelt.

Die Sequenzanalyse der vier Neuroblastomzelllinien zeigte jedoch keine Abweichungen in der 5'-flankierenden Region, welche auf unterschiedliche Promotoraktivitäten schließen ließen. In direkter Nachbarschaft (-2174) der nicht eindeutig zu bestimmenden Region -2188 bis -2175, wurde eine NFkB-Bindestelle identifiziert (Kraus et al., 2003). Durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Reporter-Experimente, konnten keine Rückschlüsse auf eine veränderte Promotoraktivität bei 14/14 und 15/15 x Adenin in dem Promotorbereich -2188 bis -2175 gezogen werden. Somit sollten eventuelle Sequenzunterschiede in dieser Region keine Auswirkung auf die Promotoraktivität haben. Ebenso unwahrscheinlich ist eine

Beeinflussung der Promotoraktivität durch die Variante A-1045G, welche bereits in den Reporter-gen-Experimenten untersucht wurde.

In den Ergebnissen der RNA-Quantifizierung zeigten sich jedoch signifikante Unterschiede in der MOR RNA-Expression zwischen den Zelllinien SK-N-FI / SH-SY5Y und SK-N-AS sowie SK-N-FI und SK-N-DZ.

Neuroblastomzellen lassen sich phänotypisch in neuronale (N)-, stromale (S)- und intermediate (I)-Typen differenzieren. N-Typ Zellen wachsen in schwach adhären Aggregaten aus schmalen runden Zellen mit neuritischen Auswüchsen und enthalten Enzyme, welche in die Neurotransmittersynthese involviert sind. S-Typ Zellen wachsen substratadhärent und abgeflacht und sind frei von Elementen für die Neurotransmittersynthese (Biedler et al., 1973). I-Typ Zellen teilen bestimmte Charakteristika mit S-Typ und N-Typ Zellen und können sich nach Induktion in eine der beiden Zell-Typen differenzieren (Ross et al., 1995). Von den verwendeten Neuroblastomzelllinien entsprechen die Zelllinien SK-N-DZ, SH-SY5Y sowie SK-N-FI dem N-Typ (Esumi et al., 1989; Voigt and Zintl, 2003) und SK-N-AS dem S-Typ (Bian et al., 2002). So könnten die vier Neuroblastomzelllinien aufgrund dieser Differenzierung unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen. Für das CAMTA1-Protein (Calmodulin-binding Transkriptions Aktivator 1) z.B. wurde in N-type Neuroblastomzelllinien ein hoher Level von CAMTA1 mRNA gefunden, in S-Typ Zelllinien dagegen nur ein niedriger Level (Nakatani et al., 2004). In den Quantifizierungsergebnissen der vorliegenden Arbeit, zeigt die einzige Zelllinie die dem S-Typ entspricht (SK-N-AS) gegenüber den anderen Zelllinien einen erniedrigten Expressionslevel von MOR-mRNA.

Transkriptionsfaktoren können die Transkription eines Gens fördern oder hemmen, indem sie an die entsprechenden regulatorischen Elemente des jeweiligen Gens binden. Ein anderer Mechanismus zur Hemmung der Transkription ist mit der Methylierung von CpG Cytosinen verbunden. Diese kann die Bindung von Transkriptionsfaktoren blockieren (Tate and Bird, 1993), bzw. durch Veränderungen in der Chromatinstruktur die Transkription beeinflussen (Kass et al., 1997). Bei der neuronalen Zelllinie SH-SY5Y, welche den MOR konstitutiv exprimiert, konnte in einer Studie von Andria und Simon nahezu keine CpG-Methylierung nachgewiesen werden. Dagegen zeigten zwei weitere neuronale Zelllinien, welche den MOR nicht exprimieren, die fast vollständige Methylierung einer CpG-reichen Region, welche das Startkodon umgibt. In nicht-neuronalen Zellen wurde keine Assoziation zwischen dem Methylierungsgrad und der Expression des MORs gefunden (Andria and Simon, 1999). Dies könnte eine Erklärung für den erniedrigten Expressionslevel von MOR-mRNA bei der

Zelllinie SK-N-DZ gegenüber den beiden andern N-Typ Zelllinien SH-SY5Y und SK-N-FI sein.

Jedoch könnten auch andere Aspekte für die unterschiedlichen mRNA-Level der vier Zelllinien von Bedeutung sein. Es ist nicht auszuschließen, dass weitere bisher unentdeckte Spleißvarianten des MOR-Gens existieren, welche mit den hier verwendeten Primern nicht erfasst wurden. Auch könnten weitere regulatorische Elemente außerhalb der sequenzierten 5'-flankierenden Region auf die Regulation der MOR-Expression Einfluss nehmen. Diese könnten z.B. für zelltypspezifische Unterschiede in der mRNA Stabilisierung bzw. Destabilisierung von Bedeutung sein. So werden unterschiedliche mRNA-Level für das membran-gebundene IL-1RAcP (IL-1 receptor accessory protein) in verschiedenen Zelllinien zumindest teilweise durch die mRNA-Stabilität moduliert. In diesem Fall erfolgt eine posttranskriptionale Regulierung der Expression durch destabilisierende Elemente in der 3'UTR (Jensen and Whitehead, 2004). Zwischen dem ersten und zweiten Exon des MOR Gens befindet sich ein sehr großes Intron (größer als 25 kb) (Wendel and Hoehe, 1998), welches regulatorische Elemente, oder gar ein alternatives erstes bzw. zweites Exon enthalten könnte (Andria and Simon, 1999). Auch wurden bei der Analyse des Maus MOR-Gens zwei getrennte Promotorregionen identifiziert (Ko et al., 1997).

Des Weiteren konnte bei der mRNA-Quantifizierung der Zelllinie SK-N-AS in manchen PCR-Läufen ein geringfügiges „mitmessen“ von Primerdimeren nicht ganz vermieden werden. Obwohl durch eine erhöhte Detektionstemperatur versucht wurde, dies zu umgehen, wurden in manchen Läufen, PCR-bedingt, geringe Teile des Primerdimerpeaks mitgemessen. Dies betraf jedoch nur die Zelllinie SK-N-AS, da es bei den anderen Zelllinien durch die höhere Anzahl von Transkripten nicht zur Primerdimerbildung kam. So könnte sich dieser Messfehler nur zugunsten des mRNA-Levels der SK-N-AS Zellen ausgewirkt haben, so dass ein eventuell noch größerer Unterschied im Expressionslevel der MOR-mRNA zu den anderen Zelllinien besteht.

4.3 Genotypisierung des MORs

Als Ursache von individuellen Unterschieden in der analgetischen Wirkung von Opioiden bzw. deren Nebenwirkungen werden außer genomischen Variationen in Arzneimittel-metabolisierenden Enzymen vor allem Variationen im Bereich des Opioidsystems in Betracht gezogen. Seit der MOR als wichtigstes Target für Morphin identifiziert wurde, wurde in großem Umfang nach genomischen Variationen innerhalb des MOR-Gens gesucht. Hierbei wurde eine große Anzahl von SNPs gefunden (Bergen et al., 1997; Bond et al., 1998; Hoehe

et al., 2000). Darunter wurde in den nicht-kodierenden Regionen eine größere Dichte von SNPs gefunden als in den translatierten Regionen. Zudem kommen die meisten SNPs in kodierenden Bereichen eher selten, mit Allelfrequenzen um oder unter 1%, vor (Mayer and Holtt, 2001). Eine große Übereinstimmung über die funktionelle Rolle von SNPs wurde bei Varianten ermittelt, welche den dritten intrazellulären Loop des MOR betreffen. Dieser beinhaltet einen hoch konservierten Aminosäuresequenzbereich mit einer vollständigen Übereinstimmung der Aminosäuren 248-292 in Mensch, Schwein, Maus, Ratte, Rind und Rhesus Affen (Lotsch and Geisslinger, 2005). Diese Region zeigt eine Schlüsselfunktion für die G-Protein Bindung und die Signalinduktion des MOR (Georgoussi et al., 1997). Innerhalb dieser Region ist die seltene Variante S268P lokalisiert. Diese Variante wird mit einer reduzierten G-Protein Bindung sowie einer reduzierten Rezeptordesensibilisierung in Verbindung gebracht (Koch et al., 2000). Aus dieser reduzierten Desensibilisierung könnte eine anhaltende Adenylat-Cyclase-Aktivität mit der Förderung von Kompensationsmechanismen und letztendlich eine Opioidtoleranz resultieren (He et al., 2002).

Der dritte extrazelluläre Loop des MOR hat eine bedeutende Rolle für die Bindung von Liganden (Guarna et al., 2003). Der einzige bereits bekannte SNP in diesem Rezeptor Abschnitt G942A führt jedoch zu keinem Aminosäureaustausch. Für die meisten anderen SNPs in kodierenden Regionen sind keine Informationen über ihre Auswirkungen bezüglich der Bindung von Liganden oder der Beeinflussung der Rezeptorfunktion nachgewiesen (Lotsch and Geisslinger, 2005).

Die wohl bekannteste Variante des MOR-Gens ist der SNP A+118G, der in einen Aminosäureaustausch von Asparagin zu Asparat an der Position 40 (N40D) der Aminosäuresequenz resultiert. Die vierzigste Aminosäure ist im extrazellulären Teil der ersten Transmembrandomäne lokalisiert. Einige Hinweise deuten auf veränderte klinische Reaktionen des N40D-mutierten MORs gegenüber Opioiden hin: Träger des mutanten 118G Allels benötigen mehr Alfentanyl, verspüren jedoch einen weniger nachlassenden Schmerz im Vergleich zu Trägern des Wildtyp-Allels (Caraco, Y 2001). Krebspatienten, welche homozygote Träger für das Allel 118G sind, benötigen höhere Dosen von Morphin für eine Schmerzlinderung als heterozygote Träger des Allels oder Wildtypen (Klepstad et al., 2004). Zudem wurde bei einem Patienten, mit eingeschränkter Nierenfunktion, welcher als Träger der Variante Asp40 detektiert wurde, ein Schutz vor M6G vermittelter Opioidtoxizität festgestellt (Lotsch et al., 2002b). Eine erhöhte Endorphin Affinität (Bond et al., 1998) des N40D MORs konnte nicht prinzipiell festgestellt werden (Beyer et al., 2004).

Es besteht die Annahme, dass der SNP 118 A→G von zweierlei Bedeutung für die Schmerztherapie ist: Zum einen zeigen Träger dieser Variante einen erhöhten Opioidbedarf zur Erlangung einer Analgesie, zum anderen schützt die Variante vor Nebenwirkungen der Opioidbehandlung (Lotsch and Geisslinger, 2005). Um diese Hypothese zu untermauern bzw. zu widerlegen, müssten Genotypisierungsstudien an Patientenkollektiven durchgeführt und die jeweiligen Genotypen dem Opioidverbrauch, bzw. möglichen Nebenwirkungen zugeordnet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Echtzeit-PCR und anschließender Schmelzkurvenanalyse eine Methode zur Detektion der Variante A+118G etabliert und ein Patientenkollektiv von 747 Schmerzpatienten genotypisiert. Die daraus erhaltene Verteilung der Allelhäufigkeiten entspricht der von bereits vorangegangenen Studien (Franke et al., 2001; Luo et al., 2003). Die aufwendige Zuordnung der ermittelten Genotypen zu den jeweiligen Patientendaten konnte nicht im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt werden und muss in einem weiteren Schritt erfolgen. Erst danach kann die aufgestellte Hypothese bewertet werden.

Um die klinische Relevanz für Patienten der Mutation G-554A oder A-1320G zu bestimmen, müssen Träger dieser Varianten gefunden und auf „Abweichungen“ im Opioidbedarf bzw. der Opioidwirkung untersucht werden. Die Variante A-1320G wurde bereits mit der Abhängigkeit für verschiedene Substanzen assoziiert (Hoehe et al., 2000; Luo et al., 2003), was jedoch nicht immer bestätigt werden konnte (Crowley et al., 2003). Um Träger dieser Varianten zu identifizieren, wurde in der vorliegenden Arbeit mittels Echtzeit-PCR und anschließender Schmelzkurvenanalyse eine Methode zur Detektion dieser Varianten etabliert und ein Patientenkollektiv von 747 Schmerzpatienten genotypisiert.

Über die Häufigkeit der Variante G-554A in der europäischen Bevölkerung ist bisher wenig bekannt. In einer Population von afrikanischen-Amerikanern wurde diese mit einer Häufigkeit von < 1% gefunden (Hoehe et al., 2000). Für einige Varianten gibt es jedoch große Abweichungen in der Allelfrequenz zwischen den Populationen. Bei der MOR-Variante C+17T wurde eine Häufigkeit von 19% (Hoehe et al., 2000) bei afrikanischen-Amerikanern gefunden, während sie in einer europäischen Kontrollpopulation mit einer Allelhäufigkeit von < 1% (Gscheidel et al., 2000) detektiert wurde. Auch für die Variante A-1320G wurden größere Differenzen in der Allelfrequenz zwischen einer afrikanisch-amerikanischen Population (~9%) und einer europäisch-amerikanischen Population (< 1%) beschrieben (Crowley et al., 2003).

In dem in dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektiv wurden keine Träger der Variante G-554A und je ein heterozygoter sowie homozygoter Träger der Variante A-1320G gefunden. Durch das geringe Vorkommen dieser Varianten kann innerhalb des hier untersuchten Patientenkollektivs keine Aussage über mögliche klinische Einflüsse dieser Varianten getroffen werden. Mit solch geringen Allelfrequenzen sind beide Varianten, zumindest für das untersuchte Kollektiv, klinisch eher von untergeordneter Bedeutung. Für die Population in welcher die Variante A-1320G mit ~9% vorkommt, könnten weitere Untersuchungen zur klinischen Relevanz jedoch interessant sein.

5. Ausblick

Durch das humane Genomprojekt und die Veröffentlichung der Sequenz des menschlichen Genoms wurde die Voraussetzung geschaffen, die Grundlagen der genetischen Variabilitäten des Menschen zu erforschen. Ziel der Pharmakogenetik/Pharmakogenomik ist es, die beteiligten Gene und deren Allele, welche für die individuell unterschiedliche Wirksamkeit von Arzneimitteln verantwortlich sind, zu identifizieren und langfristig die Arzneimitteltherapie individuell zu verbessern.

Für den Bereich der Schmerztherapie wurden in der vorliegenden Arbeit genomische Variabilitäten der Gene des CYP2D6 und des MORs näher untersucht. Sicherlich sind für diesen Bereich noch eine Reihe weiterer Kandidatengene, wie z.B. die Gene von Cannabinoid-, NMDA-, Dopamin und- und Serotoninrezeptoren, von großem Interesse. Die Kunst wird sein, die Gesamtheit der involvierten und klinisch relevanten Gene zu identifizieren, deren funktionelle Organisation zu verstehen und die wichtigen Varianten von den unwichtigen zu trennen.

Die Zukunft liegt hierbei in so genannten Multizenterstudien, in denen große Gruppen von gesunden und je nach Fragestellungen behandelten Individuen eingeschlossen werden können. Dadurch können durch systematische Vergleiche möglicher Kandidatengensequenzen spezifische Varianten identifiziert und mit dem Phänotyp assoziiert werden sowie letztendlich Kandidatengene identifiziert werden.

Sicherlich sind auf dem Weg zur „maßgeschneiderten“ Pille noch viele Hürden zu überwinden. So müssen zur Analyse von Genotyp-Phänotyp Beziehungen auch natürliche genomische Variabilitäten berücksichtigt werden. Dies benötigt eine hohe Anzahl von gut dokumentierten Patienten/Probanden und demnach kostengünstigere Hochdurchsatzverfahren sowie erweiterte bioinformatische Möglichkeiten, um die daraus resultierenden Datenmengen bearbeiten zu können. Am Ende stellt sich dann noch die Frage der Umsetzbarkeit durch die pharmazeutische Industrie.

Jedoch wird zukünftig für einen verbesserten Erfolg in der Arzneimitteltherapie neben den konventionellen Faktoren wie Gesundheitszustand, Alter, Geschlecht, Größe, Gewicht, Ess- und Lebensgewohnheiten die Berücksichtigung von genetischen Faktoren eine immer größere Rolle spielen.

6. Zusammenfassung

Für die Wirksamkeit von Opioidanalgetika in der Schmerztherapie sind das Enzym CYP2D6 und der μ -Opioidrezeptor als Kandidatengene von großem Interesse.

Genvarianten des metabolisierenden Enzyms CYP2D6 können zu einer erniedrigten oder fehlenden Enzymfunktion führen. Bei Poor Metabolizern (PM) kann es durch die eingeschränkte Eliminierung der betroffenen Medikamente zur Anreicherung des Wirkstoffes und daraus resultierenden Nebenwirkungen kommen. Ebenso kann bei so genannten Prodrugs die gewünschte Wirkung durch eine fehlende oder reduzierte Umwandlung in den aktiven Metaboliten ausbleiben oder reduziert sein. Die meisten Opioidanalgetika wirken am MOR. Als Ursachen für individuelle Unterschiede in der analgetischen Wirkung von Opioiden, bzw. deren Nebenwirkungen wird unter anderem der Einfluss von Polymorphismen innerhalb des MOR-Gens vermutet. In der vorliegenden Arbeit wurden Genvarianten des metabolisierenden Enzyms CYP2D6 und des μ -Opioidrezeptors untersucht sowie Methoden zu deren Detektion entwickelt.

Zur Detektion von fünf der häufigsten PM-assoziierten Varianten des **CYP2D6** (*3,*4,*6,*7 und *8) wurde mittels Echtzeit-PCR und anschließender Schmelzkurvenanalyse eine zuverlässige und schnell durchführbare Methode entwickelt. Anschließend wurde ein Patientenkollektiv mit diesem Verfahren genotypisiert. Zusätzlich wurde hierbei die ebenso mit dem PM-Status assoziierte Variante *5 (Nullallel) über eine konventionelle PCR detektiert. Die daraus ermittelten Allelfrequenzen (18,6 % für Allel*4, 2, 6 % für Allel*5, 0,9 % für Allel*3, 3,1 % für Allel*6 und 0,2 % für Allel*8) sind vergleichbar zu bereits publizierten Daten. Zudem wurden mit der in dieser Arbeit entwickelten Methode drei weitere Varianten entdeckt, von denen eine den PM-Genotyp zeigte.

Insgesamt wurden 10% der eingeschlossenen Patienten genetisch als PM identifiziert. Diese zeigten einen erhöhten Bedarf an dem Opioidanalgetikum Tramadol, um eine ausreichende Analgesie zu erlangen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Hypothese eines reduzierten analgetischen Effekts von Tramadol bei PM.

In den Untersuchungen zum **MOR** wurde aus der 5'-flankierenden Sequenz des humanen MOR-Gens zunächst eine Serie von 5'-Deletionen mittels Reporteragen-Konstrukten untersucht. Bei allen getesteten Sequenzfragmenten konnte im Luciferase-Assay eine Aktivität festgestellt werden. Zudem deuten die Ergebnisse auf verstärkende Elemente in den Regionen -365 bis -558 und -1366 bis -2095 sowie auf suppressive Elemente in den Regionen -300 bis -364, -589 bis -885 und -2096 bis -2613 hin.

Anschließend wurden mittels gerichteter Mutagenese acht weitere Reporter-gen-Konstrukte mit je einer bereits publizierten Variante der 5`-flankierenden Sequenz des humanen MOR-Gens hergestellt und ebenfalls im Luciferase-Assay gemessen. Von diesen zeigten die sechs Konstrukte mit den Varianten G-172T, A-236G, C-995A, A-1045G, G-1748A und -1699 insT keine Veränderung der Luciferase-Aktivität. Dagegen zeigte das Konstrukt mit der Variante G-554A eine verminderte und das Konstrukt mit der Variante A-1320G eine erhöhte Luciferase-Aktivität im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp-Konstrukt. Im electrophoretic mobility shift assay konnte bei beiden Varianten kein eindeutiger Unterschied in der Bindungsaktivität im Vergleich zur jeweiligen Wildtypsequenz unter unstimulierten Bedingungen festgestellt werden.

Um mögliche Einflüsse von Promotorvarianten auf die MOR RNA-Expression zu untersuchen, wurde eine relative Quantifizierung von vier Neuroblastomzelllinien durchgeführt und deren 5`-flankierende Region des MOR-Gens mittels Sequenzanalyse untersucht. Es konnten signifikante Unterschiede in der MOR RNA-Expression zwischen den Zelllinien SK-N-FI/ SH-SY5Y und SK-N-AS sowie SK-N-FI und SK-N-DZ festgestellt werden. Diese ließen sich nicht durch genetische Varianten in der 5`-flankierenden Region des MOR-Gens begründen, was auf andere regulative Mechanismen schließen lässt.

Zur Detektion der funktionellen MOR-Varianten A+118G, G-554A und A-1320G wurde mittels Echtzeit-PCR und anschließender Schmelzkurvenanalyse eine zuverlässige Methode etabliert. Durch die Genotypisierung eines Patientenkollektivs konnte für die Varianten G-554A und A-1320G eine Allelfrequenz von <1% und für die Variante A+118G von 12,8 % bestimmt werden. Durch das geringe Vorkommen der Varianten G-554A und A-1320G konnte innerhalb des hier untersuchten Patientenkollektivs keine Aussage über mögliche klinische Einflüsse getroffen werden. Ob die detektierten Träger der Variante A+118G eine veränderte Opioidmenge zur Erlangung einer Analgesie benötigen, ist in weiterführenden Studien noch zu klären.

7. Literatur

General Recommendations for LightCycler Analysis of Multiple Mutations Using Hybridization Probe Color and Melting Temperature. Roche Molecular Biochemicals Technical Note No. LC 14/2000.

A.Beyer. Medikamentöse Schmerzbehandlung von Erwachsenen.; Maßnahmen und symptomorientierte Therapie MANUAL Supportive 2001, 199-212.

Andria ML, Simon EJ. Localization of promoter elements in the human mu-opioid receptor gene and regulation by DNA methylation. *Brain Res Mol Brain Res* 1999;70:54-65.

Azaryan AV, Coughlin LJ, Buzas B, Clock BJ, Cox BM. Effect of chronic cocaine treatment on mu- and delta-opioid receptor mRNA levels in dopaminergically innervated brain regions. *J Neurochem* 1996;66:443-448.

Bare LA, Mansson E, Yang D. Expression of two variants of the human mu opioid receptor mRNA in SK-N-SH cells and human brain. *FEBS Lett* 1994;354:213-216.

Bathum L, Skjelbo E, Mutabingwa TK, Madsen H, Horder M, Brosen K. Phenotypes and genotypes for CYP2D6 and CYP2C19 in a black Tanzanian population. *Br J Clin Pharmacol* 1999;48:395-401.

Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 2001;11:372-377.

Bergen AW, Kokoszka J, Peterson R, Long JC, Virkkunen M, Linnoila M, Goldman D. Mu opioid receptor gene variants: lack of association with alcohol dependence. *Mol Psychiatry* 1997;2:490-494.

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

Beyer A, Koch T, Schroder H, Schulz S, Hollt V. Effect of the A118G polymorphism on binding affinity, potency and agonist-mediated endocytosis, desensitization, and resensitization of the human mu-opioid receptor. *J Neurochem* 2004;89:553-560.

Bian X, Opiari AW, Jr., Ratanaproeaksa AB, Boitano AE, Lucas PC, Castle VP. Constitutively active NFkappa B is required for the survival of S-type neuroblastoma. *J Biol Chem* 2002;277:42144-42150.

Biedler JL, Helson L, Spengler BA. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* 1973;33:2643-2652.

Bilecki W, Wawrzczak-Bargiela A, Przewlocki R. Activation of AP-1 and CRE-dependent gene expression via mu-opioid receptor. *J Neurochem* 2004;90:874-882.

Boddeke EW. Involvement of chemokines in pain. *Eur J Pharmacol* 2001;429:115-119.

Bond C, LaForge KS, Tian M, Melia D, Zhang S, Borg L, Gong J, Schluger J, Strong JA, Leal SM, Tischfield JA, Kreek MJ, Yu L. Single-nucleotide polymorphism in the human mu opioid receptor gene alters beta-endorphin binding and activity: possible implications for opiate addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:9608-9613.

Borner C, Hollt V, Kraus J. Involvement of activator protein-1 in transcriptional regulation of the human mu-opioid receptor gene. *Mol Pharmacol* 2002;61:800-805.

Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet* 2003;33 Suppl:228-37.:228-237.

Brack A, Rittner HL, Schafer M. [Non-opioid analgesics for perioperative pain therapy. Risks and rational basis for use]. *Anaesthesist* 2004;53:263-280.

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;96:601-603.

Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000;25:169-193.

Capon F, Allen MH, Ameen M, Burden AD, Tillman D, Barker JN, Trembath RC. A synonymous SNP of the corneodesmosin gene leads to increased mRNA stability and demonstrates association with psoriasis across diverse ethnic groups. *Hum Mol Genet* 2004;13:2361-2368.

Caraco Y. Variability in Alfentanil analgesia may be attributed to polymorphism in the μ opioid receptor. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2001;69.

Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem* 1999;45:7-17.

Collart L, Luthy C, Favario-Constantin C, Dayer P. [Duality of the analgesic effect of tramadol in humans]. *Schweiz Med Wochenschr* 1993;123:2241-2243.

Crowley JJ, Oslin DW, Patkar AA, Gottheil E, DeMaria PA, Jr., O'Brien CP, Berrettini WH, Grice DE. A genetic association study of the mu opioid receptor and severe opioid dependence. *Psychiatr Genet* 2003;13:169-173.

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;6:193-201.

De LP, Majello B, Lania L. Sp3 represses transcription when tethered to promoter DNA or targeted to promoter proximal RNA. *J Biol Chem* 1996;271:8533-8536.

Duttaroy A, Yoburn BC. In vivo regulation of mu-opioid receptor density and gene expression in CXBK and outbred Swiss Webster mice. *Synapse* 2000;37:118-124.

Eckhardt K, Li S, Ammon S, Schanzle G, Mikus G, Eichelbaum M. Same incidence of adverse drug events after codeine administration irrespective of the genetically determined differences in morphine formation. *Pain* 1998;76:27-33.

Eggers KA, Power I. Tramadol. *Br J Anaesth* 1995;74:247-249.

Esumi N, Imashuku S, Tsunamoto K, Todo S, Misawa S, Goto T, Fujisawa Y. Procoagulant activity of human neuroblastoma cell lines, in relation to cell growth, differentiation and cyto-genetic abnormalities. *Jpn J Cancer Res* 1989;80:438-443.

Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 1999;286:487-491.

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 Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1994;350:434-439.

Franke P, Wang T, Nothen MM, Knapp M, Neidt H, Albrecht S, Jahnes E, Propping P, Maier W. Nonreplication of association between mu-opioid-receptor gene (OPRM1) A118G polymorphism and substance dependence. *Am J Med Genet* 2001;105:114-119.

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;48:943-950.

Gaedigk A, Gotschall RR, Forbes NS, Simon SD, Kearns GL, Leeder JS. Optimization of cytochrome P4502D6 (CYP2D6) phenotype assignment using a genotyping algorithm based on allele frequency data. *Pharmacogenetics* 1999;9:669-682.

Georgoussi Z, Merkouris M, Mullaney I, Megaritis G, Carr C, Zioudrou C, Milligan G. Selective interactions of mu-opioid receptors with pertussis toxin-sensitive G proteins: involvement of the third intracellular loop and the c-terminal tail in coupling. *Biochim Biophys Acta* 1997;1359:263-274.

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;8:15-26.

Gscheidel N, Sander T, Wendel B, Heere P, Schmidt LG, Rommelspacher H, Hoehe MR, Samochowiec J. Five exon 1 variants of mu opioid receptor and vulnerability to alcohol dependence. *Pol J Pharmacol* 2000;52:27-31.

Guarna M, Bartolini A, Ghelardini C, Galeotti N, Bracci L, Stefano GB, Bianchi E. Anti-mu opioid antiserum against the third external loop of the cloned mu-opioid receptor acts as a mu receptor neutral antagonist. *Brain Res Mol Brain Res* 2003;119:100-110.

H.Ch.Diener, Ch- Maier. *Das Schmerztherapie Buch* 1997.

Hall EJ, Sykes NP. Analgesia for patients with advanced disease: I. *Postgrad Med J* 2004; 80:148-154.

Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 2004;18:2195-2224.

He L, Fong J, von ZM, Whistler JL. Regulation of opioid receptor trafficking and morphine tolerance by receptor oligomerization. *Cell* 2002;108:271-282.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6:986-994.

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

Hescheler J, Rosenthal W, Trautwein W, Schultz G. The GTP-binding protein, Go, regulates neuronal calcium channels. *Nature* 1987;325:445-447.

Hoehe MR, Kopke K, Wendel B, Rohde K, Flachmeier C, Kidd KK, Berrettini WH, Church GM. Sequence variability and candidate gene analysis in complex disease: association of mu

opioid receptor gene variation with substance dependence. *Hum Mol Genet* 2000;9:2895-2908.

Hoehe M , Sauer S. Kommt die maßgeschneiderte Pille? *Mensch und Umwelt* 2003;16: 39-44

Hromas R, Davis B, Rauscher FJ, III, Klemsz M, Tenen D, Hoffman S, Xu D, Morris JF. Hematopoietic transcriptional regulation by the myeloid zinc finger gene, MZF-1. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;211:159-64.:159-164.

Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25:193-200.

Inturrisi CE. Clinical pharmacology of opioids for pain. *Clin J Pain* 2002;18:S3-13.

Jensen LE, Whitehead AS. The 3' untranslated region of the membrane-bound IL-1R accessory protein mRNA confers tissue-specific destabilization. *J Immunol* 2004;173:6248-6258.

Johansson I, Lundqvist E, Bertilsson L, Dahl ML, Sjoqvist F, Ingelman-Sundberg M. Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultra-rapid metabolism of debrisoquine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:11825-11829.

Kagimoto M, Heim M, Kagimoto K, Zeugin T, Meyer UA. Multiple mutations of the human cytochrome P450IID6 gene (CYP2D6) in poor metabolizers of debrisoquine. Study of the functional significance of individual mutations by expression of chimeric genes. *J Biol Chem* 1990;265:17209-17214.

Kass SU, Pruss D, Wolffe AP. How does DNA methylation repress transcription? *Trends Genet* 1997;13:444-449.

Kieffer BL. Opioids: first lessons from knockout mice. *Trends Pharmacol.Sci* 1999; 19-26

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;45:889-904.

Klepstad P, Rakvag TT, Kaasa S, Holthe M, Dale O, Borchgrevink PC, Baar C, Vikan T, Krokan HE, Skorpen F. The 118 A > G polymorphism in the human micro-opioid receptor gene may increase morphine requirements in patients with pain caused by malignant disease. *Acta Anaesthesiol Scand* 2004;48:1232-1239.

Ko JL, Minnerath SR, Loh HH. Dual promoters of mouse mu-opioid receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;234:351-357.

Koch T, Krosiak T, Averbeck M, Mayer P, Schroder H, Raulf E, Holtt V. Allelic variation S268P of the human mu-opioid receptor affects both desensitization and G protein coupling. *Mol Pharmacol* 2000;58:328-334.

Kraus J, Borner C, Giannini E, Hickfang K, Braun H, Mayer P, Hoehe MR, Ambrosch A, Konig W, Holtt V. Regulation of mu-opioid receptor gene transcription by interleukin-4 and influence of an allelic variation within a STAT6 transcription factor binding site. *J Biol Chem* 2001;276:43901-43908.

Kraus J, Borner C, Giannini E, Holtt V. The role of nuclear factor kappaB in tumor necrosis factor-regulated transcription of the human mu-opioid receptor gene. *Mol Pharmacol* 2003;64:876-884.

Kraus J, Horn G, Zimprich A, Simon T, Mayer P, Holtt V. Molecular cloning and functional analysis of the rat mu opioid receptor gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;215:591-597.

Labuda D, Krajcinovic M, Richer C, Skoll A, Sinnett H, Yotova V, Sinnett D. Rapid detection of CYP1A1, CYP2D6, and NAT variants by multiplex polymerase chain reaction and allele-specific oligonucleotide assay. *Anal Biochem* 1999;275:84-92.

Laforest L, Wikman H, Benhamou S, Saarikoski ST, Bouchardy C, Hirvonen A, Dayer P, Husgafvel-Pursiainen K. CYP2D6 gene polymorphism in caucasian smokers: lung cancer susceptibility and phenotype-genotype relationships. *Eur J Cancer* 2000;36:1825-1832.

LaForge KS, Yuferov V, Kreek MJ. Opioid receptor and peptide gene polymorphisms: potential implications for addictions. *Eur J Pharmacol* 2000;410:249-268.

Lania L, Majello B, De LP. Transcriptional regulation by the Sp family proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29:1313-1323.

Law PY, Wong YH, Loh HH. Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000;40:389-430.:389-430.

Le MS, Fromiguet O, Marie PJ. Sp1/Sp3 and the myeloid zinc finger gene MZF1 regulate the human N-cadherin promoter in osteoblasts. *Exp Cell Res* 2005;302:129-142.

Levy M, Zylber-Katz E, Rosenkranz B. Clinical pharmacokinetics of dipyron and its metabolites. *Clin Pharmacokinet* 1995;28:216-234.

Lohmann PL, Rao ML, Ludwig M, Griese EU, Zanger UM, Morike K, Maier W, Bagli M. Influence of CYP2D6 genotype and medication on the sparteine metabolic ratio of psychiatric patients. *Eur J Clin Pharmacol* 2001;57:289-295.

Lotsch J, Geisslinger G. Are mu-opioid receptor polymorphisms important for clinical opioid therapy? *Trends Mol Med* 2005;11:82-89.

Lotsch J, Skarke C, Grosch S, Darimont J, Schmidt H, Geisslinger G. The polymorphism A118G of the human mu-opioid receptor gene decreases the pupil constrictory effect of morphine-6-glucuronide but not that of morphine. *Pharmacogenetics* 2002a;12:3-9.

Lotsch J, Zimmermann M, Darimont J, Marx C, Dudziak R, Skarke C, Geisslinger G. Does the A118G polymorphism at the mu-opioid receptor gene protect against morphine-6-glucuronide toxicity? *Anesthesiology* 2002b;97:814-819.

Lundqvist E, Johansson I, Ingelman-Sundberg M. Genetic mechanisms for duplication and multiduplication of the human CYP2D6 gene and methods for detection of duplicated CYP2D6 genes. *Gene* 1999;226:327-338.

Luo X, Kranzler HR, Zhao H, Gelernter J. Haplotypes at the OPRM1 locus are associated with susceptibility to substance dependence in European-Americans. *Am J Med Genet* 2003;120B:97-108.

Mansour A, Fox CA, Thompson RC, Akil H, Watson SJ. mu-Opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: comparison to mu-receptor binding. *Brain Res* 1994;643:245-265.

Mantyh PW, Clohisy DR, Koltzenburg M, Hunt SP. Molecular mechanisms of cancer pain. *Nat Rev Cancer* 2002;2:201-209.

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;7:193-202.

Mayer P, Holtt V. Allelic and somatic variations in the endogenous opioid system of humans. *Pharmacol Ther* 2001;91:167-177.

Min BH, Augustin LB, Felsheim RF, Fuchs JA, Loh HH. Genomic structure analysis of promoter sequence of a mouse mu opioid receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:9081-9085.

Morris JF, Hromas R, Rauscher FJ, III. Characterization of the DNA-binding properties of the myeloid zinc finger protein MZF1: two independent DNA-binding domains recognize two DNA consensus sequences with a common G-rich core. *Mol Cell Biol* 1994;14:1786-1795.

Mottagui-Tabar S, Faghihi MA, Mizuno Y, Engstrom PG, Lenhard B, Wasserman WW, Wahlestedt C. Identification of functional SNPs in the 5-prime flanking sequences of human genes. *BMC Genomics* 2005;6:18.

Mousa SA, Zhang Q, Sitte N, Ji R, Stein C. beta-Endorphin-containing memory-cells and mu-opioid receptors undergo transport to peripheral inflamed tissue. *J Neuroimmunol* 2001;115:71-78.

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M. Arzneimittelwirkungen 2001.

Nakatani K, Nishioka J, Itakura T, Nakanishi Y, Horinouchi J, Abe Y, Wada H, Nobori T. Cell cycle-dependent transcriptional regulation of calmodulin-binding transcription activator 1 in neuroblastoma cells. *Int J Oncol* 2004;24:1407-1412.

Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol* 1999;17:701-38.:701-738.

North RA, Williams JT, Surprenant A, Christie MJ. Mu and delta receptors belong to a family of receptors that are coupled to potassium channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:5487-5491.

Paar WD, Frankus P, Dengler HJ. The metabolism of tramadol by human liver microsomes. *Clin Investig* 1992;70:708-710.

Paar WD, Poche S, Gerloff J, Dengler HJ. Polymorphic CYP2D6 mediates O-demethylation of the opioid analgesic tramadol. *Eur J Clin Pharmacol* 1997;53:235-239.

Pan SS, Han Y, Farabaugh P, Xia H. Implication of alternative splicing for expression of a variant NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 with a single nucleotide polymorphism at 465C>T. *Pharmacogenetics* 2002;12:479-488.

Pan YX, Xu J, Bolan E, Abbadie C, Chang A, Zuckerman A, Rossi G, Pasternak GW. Identification and characterization of three new alternatively spliced mu-opioid receptor isoforms. *Mol Pharmacol* 1999;56:396-403.

Pan YX, Xu J, Mahurter L, Xu M, Gilbert AK, Pasternak GW. Identification and characterization of two new human mu opioid receptor splice variants, hMOR-1O and hMOR-1X. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;301:1057-1061.

Pasternak GW. The pharmacology of mu analgesics: from patients to genes. *Neuroscientist* 2001;7:220-231.

Pasternak GW. Multiple opiate receptors: deja vu all over again. *Neuropharmacology* 2004;47 Suppl 1:312-23.:312-323.

Payami H, Lee N, Zarepari S, Gonzales MM, Camicioli R, Bird TD, Sexton G, Gancher S, Kaye J, Calhoun D, Swanson PD, Nutt J. Parkinson's disease, CYP2D6 polymorphism, and age. *Neurology* 2001;56:1363-1370.

Perrotti D, Melotti P, Skorski T, Casella I, Peschle C, Calabretta B. Overexpression of the zinc finger protein MZF1 inhibits hematopoietic development from embryonic stem cells: correlation with negative regulation of CD34 and c-myb promoter activity. *Mol Cell Biol* 1995;15:6075-6087.

Pfaffl MW. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospekt-rum* 2004;10.

Poulsen L, Broesen K, rendt-Nielsen L, Gram LF, Elbaek K, Sindrup SH. Codeine and morphine in extensive and poor metabolizers of sparteine: pharmacokinetics, analgesic effect and side effects. *Eur J Clin Pharmacol* 1996a;51:289-295.

Poulsen L, rendt-Nielsen L, Broesen K, Sindrup SH. The hypoalgesic effect of tramadol in relation to CYP2D6. *Clin Pharmacol Ther* 1996b;60:636-644.

Rayet B, Gelinas C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* 1999;18:6938-6947.

Rittner HL, Brack A, Stein C. [Pain and the immune system: friend or foe?]. *Anaesthesist* 2002;51:351-358.

Roche. LightCycler Operator`s Manual. 1999.

Roche Molecular Biochemicals. General Recommendations for LightCycler Analysis of Multiple Mutations Using Hybridization Probe Color and Melting Temperature; Technical Note No. LC 14/2000

Roche. Relative Quantification. Roche Applied Science Technical Note 2001;No. LC 13/2001.

Roddam PL, Rollinson S, Kane E, Roman E, Moorman A, Cartwright R, Morgan GJ. Poor metabolizers at the cytochrome P450 2D6 and 2C19 loci are at increased risk of developing adult acute leukaemia. *Pharmacogenetics* 2000;10:605-615.

Ross RA, Spengler BA, Domenech C, Porubcin M, Rettig WJ, Biedler JL. Human neuroblastoma I-type cells are malignant neural crest stem cells. *Cell Growth Differ* 1995;6:449-456.

Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet* 1997;60:284-295.

Sambrook and Russel. *Molecular Cloning*. 2001.

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;3:923-926.

Scholz J, Woolf CJ. Can we conquer pain? *Nat Neurosci* 2002;5 Suppl:1062-7.:1062-1067.

Schwab M, Marx C, Zanger UM, Eichelbaum M, Fischer-Bosch M. Pharmakogenetik der Zytochrom-P-450-Enzyme: Bedeutung für Wirkungen und Nebenwirkungen von Medikamenten. *Deutsches Ärzteblatt* 2002; 99 (8): A-497-A504

Sharma SK, Klee WA, Nirenberg M. Opiate-dependent modulation of adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:3365-3369.

Simanski C, Neugebauer E. [Acute pain therapy and management in orthopedics]. *Orthopade* 2002;31:522-532.

Sindrup SH, Poulsen L, Brosen K, rendt-Nielsen L, Gram LF. Are poor metabolisers of sparteine/debrisoquine less pain tolerant than extensive metabolisers? *Pain* 1993;53:335-339.

Skoda RC, Gonzalez FJ, Demierre A, Meyer UA. Two mutant alleles of the human cytochrome P-450db1 gene (P450C2D1) associated with genetically deficient metabolism of debrisoquine and other drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:5240-5243.

Soyama A, Saito Y, Komamura K, Ueno K, Kamakura S, Ozawa S, Sawada J. Five novel single nucleotide polymorphisms in the CYP2C8 gene, one of which induces a frame-shift. *Drug Metab Pharmacokinet* 2002;17:374-377.

Stamer UM, Bayerer B, Stuber F. Genetics and variability in opioid response. *Eur J Pain* 2005;9:101-104.

Stamer UM, Hothker F, Lehnen K, Stuber F. [Postoperative analgesia with tramadol and metamizol. Continual infusion versus patient controlled analgesia]. *Anaesthesist* 2003;52:33-41.

Steen VM, Andreassen OA, Daly AK, Tefre T, Borresen AL, Idle JR, Gulbrandsen AK. Detection of the poor metabolizer-associated CYP2D6(D) gene deletion allele by long-PCR technology. *Pharmacogenetics* 1995;5:215-223.

Strumpf M, Willweber- Strumpf A, Zenz M. Tumorschmerz. *Deutsches Ärzteblatt* 2005: A916-A924

Stuven T, Griese EU, Kroemer HK, Eichelbaum M, Zanger UM. Rapid detection of CYP2D6 null alleles by long distance- and multiplex-polymerase chain reaction. *Pharmacogenetics* 1996;6:417-421.

Suske G. The Sp-family of transcription factors. *Gene* 1999;238:291-300.

Takeda K, Tanaka T, Shi W, Matsumoto M, Minami M, Kashiwamura S, Nakanishi K, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* 1996; 380:627-630.

Tate PH, Bird AP. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 1993;3:226-231.

Topic E, Stefanovic M, Ivanisevic AM, Blazinic F, Culav J, Skocilic Z. CYP2D6 genotyping in patients on psychoactive drug therapy. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:921-927.

Uhl GR, Gold LH, Risch N. Genetic analyses of complex behavioral disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:2785-2786.

Uhl GR, Sora I, Wang Z. The mu opiate receptor as a candidate gene for pain: polymorphisms, variations in expression, nociception, and opiate responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:7752-7755.

van der WJ, Steijns LS. Cytochrome P450 enzyme system: genetic polymorphisms and impact on clinical pharmacology. *Ann Clin Biochem* 1999;36:722-729.

Voet D, Voet J. *Biochemie* 1994.

Voigt A, Zintl F. Effects of retinoic acid on proliferation, apoptosis, cytotoxicity, migration, and invasion of neuroblastoma cells. *Med Pediatr Oncol* 2003;40:205-213.

Wendel B, Hoehe MR. The human mu opioid receptor gene: 5' regulatory and intronic sequences. *J Mol Med* 1998;76:525-532.

Winkler A, Buzas B, Siems WE, Heder G, Cox BM. Effect of ethanol drinking on the gene expression of opioid receptors, enkephalinase, and angiotensin-converting enzyme in two inbred mice strains. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22:1262-1271.

Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997;22:130-138.

Xu Y, Carr LG. Binding of Sp1/Sp3 to the proximal promoter of the hMOR gene is enhanced by DAMGO. *Gene* 2001a;274:119-128.

Xu Y, Carr LG. Functional characterization of the promoter region of the human mu opioid receptor (hMOR) gene: identification of activating and inhibitory regions. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* 2001b;47 Online Pub:OL29-38.:OL29-OL38.

Xu Y, Carr LG. Transcriptional regulation of the human mu opioid receptor (hMOR) gene: evidence of positive and negative cis-acting elements in the proximal promoter and presence of a distal promoter. *DNA Cell Biol* 2001c;20:391-402.

Yamaguchi S, Shinmura K, Saitoh T, Takenoshita S, Kuwano H, Yokota J. A single nucleotide polymorphism at the splice donor site of the human MYH base excision repair genes results in reduced translation efficiency of its transcripts. *Genes Cells* 2002;7:461-474.

Zadina JE, Chang SL, Ge LJ, Kastin AJ. Mu opiate receptor down-regulation by morphine and up-regulation by naloxone in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;265:254-262.

Zenz M, Jurna I. *Lehrbuch der Schmerztherapie* 1993.

Zhu Y, Hsu MS, Pintar JE. Developmental expression of the mu, kappa, and delta opioid receptor mRNAs in mouse. *J Neurosci* 1998;18:2538-2549.

9. Kongressbeiträge und Veröffentlichungen zu dieser Arbeit

- **Kongressbeiträge:**

Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists 2004, Poster: Variations in Transcriptional Regulation of the Human μ -Opioid Receptor Gene; Bettina Bayerer, Ulrike Stamer, Frank Stüber.

Deutscher Schmerzkongress 2004, Poster: Die Promotorpolymorphismen G-554A und A-1320G verändern die μ -Opioidrezeptorexpression; Bettina Bayerer, Ulrike Stamer, Frank Stüber.

Deutscher Schmerzkongress 2003, Poster: Einfluss von Promotorpolymorphismen auf die transkriptionelle Regulation des μ -Opioidrezeptorgens; Bettina Bayerer, Ulrike Stamer, Frank Stüber.

Deutscher Schmerzkongress 2002, Poster: Zuverlässige und schnelle Genotypisierung von Cytochrom P450 2D6 "Poor Metabolizern" mittels Echtzeit-PCR ; Bettina Bayerer, Ulrike Stamer, Frank Stüber.

- **Veröffentlichungen:**

Genomic Variations and Transcriptional Regulation of the Human μ -Opioid Receptor Gene; **Bettina Bayerer**, Ulrike Stamer, Andreas Höft, Frank Stüber (eingereicht).

Impact of CYP2D6 genotype on postoperative tramadol analgesia; Stamer UM, Lehnen K, Hothker F, **Bayerer B**, Wolf S, Hoefl A, Stuber F; Pain. 2003 Sep;105(1-2):231-8.

Rapid and reliable method for cytochrome P450 2D6 genotyping; Stamer UM, **Bayerer B**, Wolf S, Hoefl A, Stuber F; Clin Chem. 2002 Sep;48(9):1412-7.

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Frank Stüber für die Vergabe des interessanten Themas, die kompetente wissenschaftliche Betreuung der Arbeit, die vielseitige Unterstützung und die stets freundliche und motivierende Arbeitsatmosphäre.

Herrn Prof. Dr. Volker Herzog danke ich ganz herzlich für die Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit.

Bei Frau PD Dr. Ulrike Stamer bedanke ich mich für ihre weitreichende Unterstützung und für die vielen Diskussionen und Anregungen, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Stüber und Prof. Dr. Urban sowie Klaus Retzmann danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Ebenfalls möchte ich mich bei Isabelle Linden und Kerstin Baumann für das unermüdliche Korrekturlesen bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Sabine Mering, Makbule Kobilay, Angelika Zoons, Qixing Chen, Alexandra Casalter, Sven Klaschik, Malte Book, Lutz Lehmann und Isabelle Linden für die große Hilfsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit, das gemeinsame Durchleben aller Höhen und Tiefen des Laboralltages und vor allem für den vielen Spaß den wir gemeinsam hatten.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mit viel Verständnis und großer Geduld den Verlauf dieser Arbeit in allen Phasen begleitet haben.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Bettina Bayerer

Bonn, im Juli 2005