

Uit de laboratoriumpraktijk

Detectie van cytochroomP450 2D6 *5-allel met behulp van multiplex-PCR

J.E. KOOTSTRA-ROS en J. van der WEIDE

Polymorfismen in het cytochroomP450 (CYP) 2D6-gen kunnen in belangrijke mate het metabolisme van een groot aantal geneesmiddelen, waaronder veel psychofarmaca, beïnvloeden. Met een allelfrequentie van 4,5% is deletie van het CYP2D6-gen, CYP2D6*5, een veel voorkomend polymorfisme. Voor het correct vaststellen van een verlaagde metabole capaciteit voor CYP2D6-afhankelijke substraten is detectie van het CYP2D6*5-allel van belang. Dit artikel beschrijft de toepassing van een multiplex-PCR-methode voor het routinematig bepalen van de aanwezigheid van het CYP2D6*5-allel.

*Trefwoorden: Cytochroom P450; CYP2D6*5; multiplex-PCR; geneesmiddelmetabolisme*

Het merendeel van de geneesmiddelen wordt in het lichaam door enzymen behorend tot de cytochroom-P450(CYP)-familie omgezet in (beter) wateroplosbare metabolieten. In de mens zijn inmiddels meer dan 30 verschillende CYP-enzymen geïdentificeerd, ieder met verschillende, soms overlappende, substraatspecificiteiten. De activiteit van CYP-enzymen is afhankelijk van meerdere factoren, waaronder genetische aanleg, endogene factoren zoals leeftijd, geslacht en morbiditeit en exogene factoren, zoals het gebruik van co-medicatie, bepaalde voedingsstoffen en kruiden, alcoholgebruik en rookgewoonte. De belangrijkste oorzaak voor interindividuele verschillen is echter genetisch: polymorfismen in deze enzymen kunnen resulteren in een enzym met een afwijkende activiteit.

Een groot aantal antidepressiva en antipsychotica wordt gemetaboliseerd door het CYP2D6-gen. In onze instelling, GGz Meerkanten, wordt bij klinische patiënten routinematig een genotypering voor CYP2D6 uitgevoerd. Hierbij wordt de aanwezigheid vastgesteld van de allelen CYP2D6*3, *4 en *6, welke leiden tot een niet-functioneel eiwit. Wanneer deze allelen homozygoot of 'compound'-heterozygoot voor-

komen wordt er geen functioneel CYP2D6 gevormd. Dit leidt tot traag metabolisme van CYP2D6-afhankelijke substraten ('poor metabolism', PM). Daarnaast wordt vastgesteld of er sprake is van CYP2D6-genduplicatie/multiplicatie, wat leidt tot een verhoogde expressie van CYP2D6-eiwit en daarmee tot versneld metabolisme ('ultrarapid metabolism', UM). Bij circa 10% van de patiënten wordt een vertraagd metabolisme vastgesteld en bij circa 3% van de patiënten wordt een versneld metabolisme als gevolg van genduplicatie/multiplicatie vastgesteld. Wanneer patiënten met deze afwijkende genotypen behandeld worden met de normdosering van een geneesmiddel, kan dit in het geval van traag metabolisme leiden tot spiegels boven de therapeutische bovengrens, met kans op therapeutisch falen c.q. toxiciteit en in het geval van versneld metabolisme leiden tot spiegels onder het therapeutische gebied (1, 2).

Tot dusver werd niet routinematig gescreend op aanwezigheid van het CYP2D6*5-allel, welke deletie van het volledige CYP2D6-gen omvat (3). Een test om *5 mee aan te tonen was immers overbodig voor het correct identificeren van trage metaboliseerders: heterozygoot voorkomend wordt het andere niet-actieve allel als homozygoot waargenomen in PCR-assays, homozygoot voorkomend vindt er in de andere testen geen amplificatie van CYP2D6 plaats.

Aan het klinische belang van detectie van een verlaagde CYP2D6-activiteit werd tot dusver weinig aandacht geschonken. Uit een aantal recente publicaties blijkt echter dat ook vertraagd CYP2D6-afhankelijk metabolisme ('intermediate metabolism', IM) voor het geneesmiddelmetabolisme van belang kan zijn. Tot vertraagde metaboliseerders worden 'compound'-heterozygote dragers van een allel met verminderde functionaliteit, zoals onder andere CYP2D6*41, in combinatie met een niet-functioneel allel gerekend, zoals CYP2D6*3, *4, *5 of *6 (4). Uit onder andere de artikelen van Kirchheiner et al. en Steimer et al. is af te lezen dat voor een groot aantal antidepressiva en antipsychotica de normdosering voor deze groep lager zou moeten zijn dan voor mensen met een normaal metabolisme ('extensive metabolisers', EM) (5). Zo zou voor het antipsychoticum perfenazine en voor het antidepressivum imipramine de dosering voor patiënten met een vertraagd metabolisme met circa 40% verlaagd moeten worden in vergelijking met patiënten met een normaal metabo-

Klinisch Chemisch Laboratorium, St. Jansdal ziekenhuis, Harderwijk en GGz Meerkanten, Ermelo

Correspondentie: dr J. van der Weide, St. Jansdal Ziekenhuis, Klinisch Chemisch Laboratorium, Postbus 138, 3840 AC Harderwijk
Email: j.vander.weide@stjansdal.nl

Tabel 1. Overzicht van gebruikte primers

primer	ref	5' positie	sequentie	3' positie
CYP2D6*5 f 1	(8)	46	5'-ACCGGGCACCTGTACTCCTCA-3'	66
CYP2D6*5 r 1		9374	5'-GCATGAGCTAAGGCACCCAGAC-3'	9353
CYP2D6*5 f 2	(9)	43	5'-CACACCGGGCACCTGTACTCCTCA-3'	66
CYP2D6*5 r 2		9377	5'-CAGGCATGAGCTAAGGCACCCAGAC-3'	9353
CYP2D6 f		1273	5'-GTTATCCCAGAAGGCTTTCAGGCTTCA-3'	1300
CYP2D6 r		6375	5'-GCCGACTGAGCCCTGGGAGGTAGGTA-3'	6350

Primerposities primers CYP2D6*5 f1 en f2 volgens Genbank-sequentie X90926 (*CYP2D7-CYP2D6* 'intergenic region'), primerposities overige primers volgens GenBank-sequentie M33388 (*CYP2D6*-gen).

lisme. Voor de selectieve serotonineheropnameremmers paroxetine en venlafaxine is het verschil circa 20% (6, 7).

In dit licht bezien kan het dus van belang zijn ook heterozygotie veroorzaakt door *CYP2D6*5* te detecteren. Tot dusver maakten wij voor (incidentele) detectie van *CYP2D6*5* gebruik van de methode volgens Steen et al. (figuur 1a) (8). Bij deze methode wordt gebruik gemaakt van 'long PCR'-techniek. De 'annealing sites' voor de primers die voor de detectie van *5 gebruikt worden, liggen wanneer het *CYP2D6* gen aanwezig is zover uit elkaar dat er geen PCR-product gevormd wordt. Wanneer er sprake is van een gendeletie, wordt tijdens de PCR een product van 3,5 kb gevormd. Deze methode omvat echter geen interne standaard waarmee gecontroleerd kan worden op accurate PCR-amplificatie. Derhalve is deze methode niet geschikt voor routinematige genotypering. Hersberger et al. beschreven in 2001 een methode waarbij gebruik gemaakt wordt van een multiplex-PCR om gelijktijdig zowel het *CYP2D6*-gen als het *5-allel te kunnen detecteren (figuur 1b) (9). De pri-

mers om het *5-allel mee te detecteren zijn nagenoeg identiek aan de eerste methode. Door het toevoegen van een extra primerpaar wordt als het *CYP2D6*-gen aanwezig is een fragment van 5,1 kb geamplificeerd. Door de aanwezigheid van een interne controle is deze methode in de dagelijkse praktijk beter toepasbaar. In dit artikel beschrijven we de toepassing van beide methoden voor routinematige detectie van *CYP2D6*5*.

Materialen en methoden

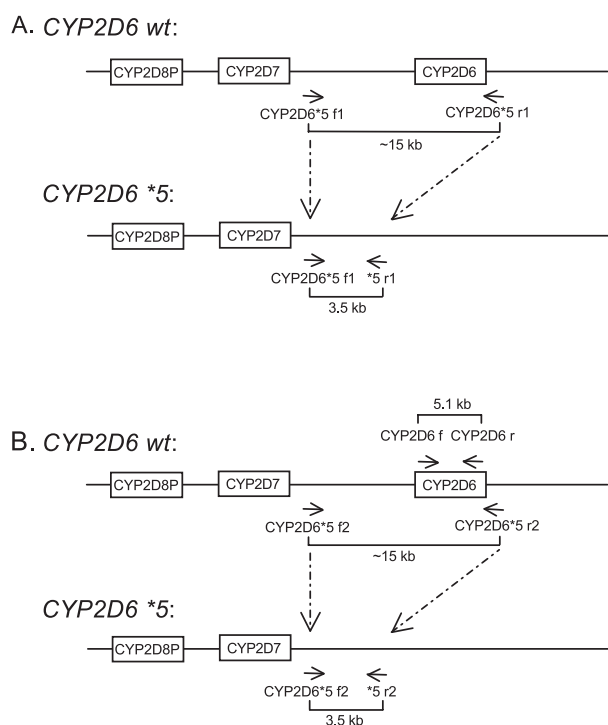
Genomisch DNA werd geïsoleerd uit 200 µl EDTA-bloed met behulp van de 'QIAamp DNA blood mini kit' (Qiagen) en opgenomen in een volume van 200 µl.

De sequenties van de gebruikte primers (Sigma-Genosys) voor de PCR-reacties staan vermeld in tabel 1. *CYP2D6*5* f 1 en r 1 (methode volgens Steen et al.) danwel *CYP2D6*5* f 2 en r 2 (methode volgens Hersberger et al.) leiden tot een PCR-product van 3,5 kb indien het *5-allel aanwezig is. Primers *CYP2D6* f en r (methode volgens Hersberger et al.) leiden tot een PCR-product van 5,1 kb wanneer het *CYP2D6*-gen aanwezig is (zie ook figuur 1). Van de primers werd 2 pmol (*CYP2D6*5* f 1 en r 1) danwel 2 pmol (*CYP2D6*5* f 2 en r 2) en 4 pmol (*CYP2D6* f en r) per PCR gebruikt. Per PCR van 25 µl werden verder gebruikt: 2,5 µl genomisch DNA, 9 nmol dNTPs, 33,8 nmol Mg(OAc)₂ en 1,5 u *rTh* XL DNA-polymerase in bijbehorende buffer (Applied Biosystems). Bij iedere test is een positieve en negatieve controle meegenomen.

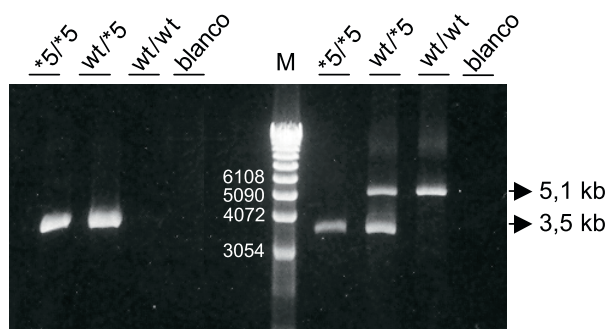
De PCRs werden uitgevoerd in een T3 thermal cycler (Biometra). Het PCR-programma was als volgt: 1 minuut denaturatie bij 93 °C, gevolgd door 35 cycli van 1 minuut 93 °C, 2 minuten 65 °C, 6 minuten 68 °C gevolgd door 7 minuten 68 °C. PCR-producten werden gescheiden en gevisualiseerd op een 1%-agarosegel met ethidiumbromide.

Resultaten

Figuur 2 toont het resultaat van de *CYP2D6*5*-PCR volgens beide methoden. Met de methode volgens Steen et al. kunnen de *5-allelen (3,5-kb-fragment) juist worden bepaald (figuur 2, links). Het grote nadeel is echter dat deze methode geen interne controle heeft op het goed verlopen van de (lange) PCR. Afwezigheid van een PCR-product kan dus het gevolg zijn van een slecht verlopen PCR. Daarnaast kan heterozygotie niet direct uit deze test afgelezen worden.



Figuur 1. Schematisch overzicht positie primers. A. Positie primers methode volgens Steen et al. (8). B. Positie primers methode volgens Hersberger et al. (9).



Figuur 2. CYP2D6*5-detectie m.b.v. long-PCR-assays. Links: Detectie CYP2D6*5-allel volgens methode Steen et al. (8), rechts: detectie CYP2D6*5-allel volgens methode Hersberger et al. (9); M: 1 kb DNA-ladder, lengte in baseparen is vermeld.

In figuur 2, rechts, zijn de resultaten van de multiplex-PCR volgens de methode van Hersberger et al. weergegeven. Bij deze methode kan er ten eerste een duidelijk onderscheid gemaakt worden tussen heterozygotie (fragment van 5,1 kb en van 3,5 kb) en homozygotie van het *5-allel (alleen 5,1-kb-fragment). Ten tweede wordt bij deze PCR altijd een PCR-product gevormd: dit vormt een goede controle op het juist verlopen van de PCR.

De multiplex-PCR wordt door ons inmiddels in de routine toegepast. Bij in totaal 830 genotyperingen is twee maal het genotype *5/*5 vastgesteld. Het *5-allel werd 70 maal heterozygoot aangetoond. Op grond hiervan is de allelfrequentie van *5 4,5%.

Conclusie

Hoewel beide methoden tot hetzelfde resultaat leiden heeft de multiplex-assay, waarmee in één PCR zowel het *5-allel als het wildtype-allel gedetecteerd kunnen worden, de voorkeur. Deze methode is eenvoudig uitvoerbaar. Met een allelfrequentie van 4,5% is *5 een van de meest voorkomende CYP2D6-polymorfismen. Gezien het groeiende belang van detectie van CYP2D6-heterozygotie voor de kliniek is het ons inziens zinvol ook *5 routinematig te bepalen bij een CYP2D6-genotypering.

Referenties

1. Sachse C, Brockmüller 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.

2. Steijns LSW, Weide J van der. Ultrarapid drug metabolism: PCR-based detection of CYP2D6 gene duplication. *Clin Chem* 1998; 44: 914-917.
3. 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.
4. Raimundo S, Toscano C, Klein K, Fischer J, Griese EU, Eichelbaum M, Schwab M, et al. A novel intronic mutation, 2988G>A, with high predictivity for impaired function of cytochrome P450 2D6 in white subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 76: 128-138.
5. Kirchheiner J, Nickchen K, Bauer M, Wong ML, Licinio J, Roots I, Brockmüller J. Pharmacogenetics of antidepressants and antipsychotics: the contribution of allelic variations to the phenotype of drug response. *Mol Psychiatry* 2004; 9: 442-473.
6. Kirchheiner J, Brøsen K, Dahl ML, Gram LF, Kasper S, Roots I, Sjöqvist F, et al. CYP2D6 and CYP2C19 genotype-based dose recommendations for antidepressants: a first step towards subpopulation-specific dosages. *Acta Psychiatr Scand* 2001; 104: 173-192.
7. Steimer W, Zöpf K, Von Amelunxen S, Pfeiffer H, Bachofer J, Popp J, Messner B, et al. Allele-specific change of concentration and functional gene dose for the prediction of steady-state serum concentrations of Amitriptyline and Nortriptyline in CYP2C19 and CYP2D6 extensive and intermediate metabolizers. *Clin Chem* 2004; 50: 1623-1633.
8. Steen VM, Andreassen OA, Daly AK, Tefre T, Børresen AL, Idle JR, Gulbrandsen AK. Detection of the poor metabolizer-associated CYP2D6(D) gene deletion allele by long-PCR technology. *Pharmacogenetics* 1995; 5: 215-223.
9. 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 multiplex long PCR. *Clin Chem* 2000; 46: 1072-1077.

Summary

*Kootstra-Ros JE and Weide J van der. Detection of cytochrome P450 2D6 *5 allele using multiplex PCR. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2005; 30: 125-127.

Polymorphisms in the cytochrome P450 (CYP) 2D6 gene can affect the metabolism of a large number of drugs, including many psychotropics, to a considerable extent. With an allele frequency of 4.5% deletion of the CYP2D6 gene, CYP2D6*5, is a common polymorphism. Detection of CYP2D6*5 is important to determine a decreased metabolic capacity for CYP2D6-dependent substrates correctly. This article describes the use of a multiplex PCR method for the routine determination of the presence of the CYP2D6*5 allele.

Key words: Cytochrome P450; CYP2D6*5; multiplex PCR; drug metabolism