

Artikelen

Detectie van het niet-functionele *CYP2D6**6 allel door middel van hybridisatie met allelspecifieke oligonucleotide probes : diagnostiek van vertraagd geneesmiddelmetabolisme

J. van der WEIDE en L.S.W. STEIJNS

Het cytochroom-P450 enzym *CYP2D6*, dat betrokken is bij het metabolisme van vele psychofarmaca, is genetisch polymorf. Er zijn diverse mutante *CYP2D6* allelen bekend, die doorgaans resulteren in een afwijkende enzymactiviteit. Een aantal van deze mutanten, de zgn. nul-allelen, veroorzaakt complete deficiëntie van *CYP2D6*, hetgeen leidt tot vertraagd geneesmiddelmetabolisme. Tot deze groep behoort ook het allel *CYP2D6**6, een *CYP2D6* variant die gekenmerkt wordt door deletie van een thymine-residu op positie 1795.

Omdat een traag geneesmiddelmetabolisme een verhoogde kans op bijwerkingen en intoxicaties geeft, is het belangrijk, vóór aanvang van farmacotherapie, te screenen op de diverse nul-allelen. Echter, tot voor kort kon het *CYP2D6**6 allel in ons laboratorium niet gedetecteerd worden. In deze studie wordt een op PCR gebaseerde methode beschreven, waarbij na amplificatie gehybridiseerd wordt met allelspecifieke oligonucleotide probes (ASOs). In een groep van 270 patiënten blijkt de prevalentie van de *CYP2D6**6 variant 2% te zijn.

Trefwoorden: debrisoquine-4-hydroxylase; genetisch polymorfisme; geneesmiddelmetabolisme; ASO hybridisatie

Het cytochroom-P450 (*CYP*) enzym debrisoquine-4-hydroxylase, ofwel *CYP2D6*, is betrokken bij het oxidatief metabolisme en de eliminatie van een groot aantal veel toegepaste geneesmiddelen, waaronder vele psychofarmaca. De activiteit van het enzym is vanwege een genetisch polymorfisme individueel bepaald: er komen diverse mutante *CYP2D6* allelen voor, die resulteren in *CYP2D6* enzymen waarvan de activiteit verhoogd, verlaagd of compleet deficiënt is. Het gevolg hiervan is dat metabole capaciteit van persoon tot persoon kan variëren, er wordt onderscheid gemaakt tussen snelle, normale en trage metaboliseerders.

Klinisch Chemisch Laboratorium, Psychiatrisch Ziekenhuis Veldwijk, Ermelo

Correspondentie: Dr. J. van der Weide, Psychiatrisch Ziekenhuis Veldwijk, Klinisch Chemisch Laboratorium, Postbus 1000, 3850 BA Ermelo.
Ingekomen: 02.07.98

Versneld *CYP2D6*-afhankelijk geneesmiddelmetabolisme komt voor bij ongeveer 2-7% van de Kaukasiëse populatie (1,2). De oorzaak is een duplicatie of amplificatie van het *CYP2D6* gen, waardoor de enzymexpressie verhoogd is. Bij deze snelle metaboliseerders zal bij normdosering van een geneesmiddel, dat substraat is voor *CYP2D6*, de serumconcentratie over het algemeen subtherapeutisch blijven: de therapie slaat niet aan en de patiënt wordt ten onrechte verdacht van therapie-ontrouw. Bij 5 tot 10% van de Kaukasiërs verloopt het *CYP2D6*-afhankelijk geneesmiddelmetabolisme uiterst traag als gevolg van deficiëntie veroorzakende mutaties op het *CYP2D6* gen (3). Hierdoor kan de serumconcentratie van bepaalde geneesmiddelen bij normdosering hoog oplopen, waardoor het risico op bijwerkingen sterk toeneemt. Door patiënten met een afwijkende metabole capaciteit te identificeren, liefst nog vóór aanvang van farmacotherapie, kunnen dosering en geneesmiddelkeuze zodanig aangepast worden dat de kans op bovengenoemde problemen minimaal is. Dit is met name van belang bij psychofarmaca, omdat daarbij een nauwe relatie tussen serumconcentratie en effect is aangetoond en omdat deze middelen veelal langdurig worden toegediend (4).

Voor de detectie van *CYP2D6* genduplicatie, geassocieerd met snel metabolisme, is recent een PCR-methode ontwikkeld, welke in ons laboratorium routinematig bij patiënten, alvorens zij op psychofarmaca worden ingesteld, wordt uitgevoerd (5). Ook is inmiddels het merendeel van de zogenaamde *CYP2D6* nul-allelen, mutante allelen die homozygoot of onderling heterozygoot voorkomend complete afwezigheid van enzymactiviteit en dus traag metabolisme veroorzaken, geïdentificeerd (tabel 1). Op PCR gebaseerde tests voor het opsporen van de meest voorkomende niet-functionele varianten *CYP2D6**3, *CYP2D6**4 en *CYP2D6**5 worden in de meeste laboratoria waar belangstelling voor farmacogenetica is, routinematig toegepast. Wanneer een patiënt op grond van dosering/spiegelverhouding of op grond van klinisch beeld van traag metabolisme verdacht wordt, wordt ook op minder frequent voorkomende *CYP2D6* nul-allelen gescreend. Deze varianten kunnen veelal, evenals *3 en *4, met behulp van PCR gevolgd door restrictie-digestie gedetecteerd worden (7,11,15). Echter deze methode is niet voor alle allelen toepasbaar,

Tabel 1. *CYP2D6* nul-allelen, karakteristieke mutatie en allelfrequentie in Kaukasiërs

Allel	karakteristieke mutatie	allelfrequentie	referentie
<i>CYP2D6*3</i>	A ₂₆₃₇ deletie	2%	(6)
<i>CYP2D6*4</i>	G _{1934A} substitutie	22%	(7)
<i>CYP2D6*5</i>	gen deletie	4%	(8)
<i>CYP2D6*6</i>	T ₁₇₉₅ deletie	2%	(9)
<i>CYP2D6*7</i>	A _{3023C} substitutie	0,1%	(10)
<i>CYP2D6*8</i>	G _{1846T} substitutie	0,1%	(11)
<i>CYP2D6*11</i>	G _{971C} substitutie	0,1%	(12)
<i>CYP2D6*12</i>	G _{212A} substitutie	0,1%	(13)
<i>CYP2D6*13</i>	hybride <i>CYP2D6/2D7</i>	0,1%	(14)
<i>CYP2D6*14</i>	G _{1846A} substitutie	0,1%	(11)
<i>CYP2D6*15</i>	T ₂₂₆ insertie	0,1%	(11)
<i>CYP2D6*16</i>	hybride <i>CYP2D6/2D7</i>	0,1%	(14)

er is bijvoorbeeld niet altijd een geschikt restrictie-enzym voorhanden. Zo ook niet voor de detectie van *CYP2D6*6*, een nul-allel dat gekenmerkt wordt door deletie van een thymine-residu op positie 1795. Deze deletie veroorzaakt een prematuur stopcodon, hetgeen resulteert in een niet-actief enzym (9). Methoden voor *CYP2D6*6* detectie, gebaseerd op allelspecifieke amplificatie (16) of op ASCR (allelspecifieke creatie restrictieplaats), waarbij door middel van PCR met een mismatch primer in geval van de deletie een extra BstNI site wordt gecreëerd (11), gaven in onze handen geen eenduidige resultaten.

Omdat, zo blijkt uit de literatuur, de prevalentie van het *CYP2D6*6* allel hoger is dan die van de andere "zeldzame" nul-allelen, allelfrequenties tot 1,8% worden gerapporteerd (9), is het van belang deze niet-functionele *CYP2D6* variant in geval van verdenking van *CYP2D6* deficiëntie eenvoudig en snel te kunnen opsporen. In de onderhavige studie wordt een op PCR gebaseerde methode beschreven waarbij, na amplificatie van een base 1795 omvattende sequentie, gehybridiseerd wordt met gelabelde allelspecifieke oligonucleotide probes (ASOs). Deze methode hebben we toegepast op 270 geanonimiseerde patiëntenmonsters om de prevalentie van het *CYP2D6*6* allel te bepalen.

MATERIALEN en METHODEN

Patiënten

Het onderzoek werd uitgevoerd bij een groep van 270 anonieme psychiatrische patiënten van West-Europese origine. Allen waren eerder gescreend op de niet-functionele varianten *CYP2D6*3*, *4 en *5 en op de *CYP2D6* genduplicatie, volgens methoden elders beschreven (5,7,15).

Methoden

Met de GenomicPrep Blood DNA Isolation Kit (Pharmacia Biotech) werd uit leukocyten genomisch DNA geïsoleerd, waarna met de primers 34F (3'-TCATGGCCACGCGCACGTGC-5') en 34R (3'-ACTCCTCGGTCTCTCGCTCC-5') een base 1795 omvattend *CYP2D6* fragment van 460 bp geamplificeerd werd. In de praktijk wordt voor de detectie van

het *CYP2D6*4* allel (G_{1934A} substitutie) dit zelfde PCR fragment gebruikt. De PCR producten werden gedenuatureerd en gespot op positief geladen nylon membranen (Boehringer Mannheim). Op twee membranen van elk 5x5 cm werden op identieke wijze 64 spots van 1 µl gemaakt: 60 monsters (geamplificeerd DNA van 60 patiënten), 2 positieve en 2 negatieve controles. Positieve controles waren digoxigenine (DIG) gelabeld controle DNA uit de DIG Nucleid Acid Detection Kit (Boehringer Mannheim) en PCR product van een patiënt waarbij door middel van sequencen heterozygotie voor de T-deletie op positie 1795 was aangetoond. Als negatieve controles werden genomen het PCR product van een patiënt waarbij op grond van sequentie-analyse aanwezigheid van de T₁₇₉₅ deletie was uitgesloten en een met afwijkende primers geamplificeerd *CYP2D6* fragment, dat bp 1795 niet omvat.

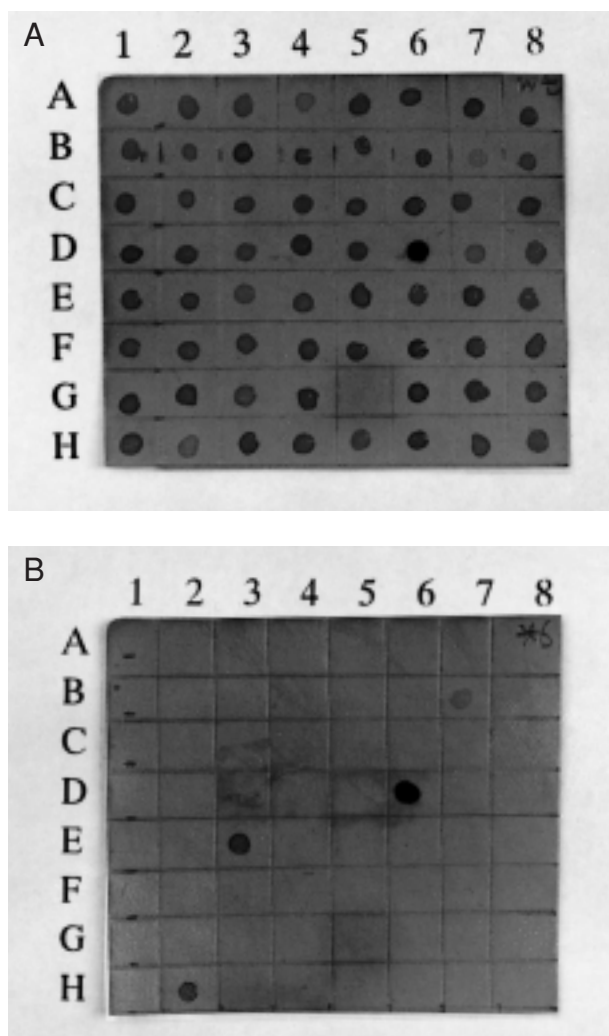
De zo genaamde dot-blots werden gedurende 30 min gebakken bij 120°C om het DNA te fixeren en vervolgens bij 51°C gedurende 2½ uur geprehybrideerd in 5 ml prehybridisatiebuffer, bestaande uit 5xSSC, 0,1% N-lauroylsarcosine, 0,02% SDS en 1% Blocking Reagent (DIG Detection Kit). Twee oligonucleotide probes, wt en mut, specifiek voor het wildtype allel (3'-TCGGTCACCCACTGCTCCAGC-5') en het *CYP2D6*6* allel met de T₁₇₉₅ deletie (3'-TCGGTCACCCCTGCTCCAGC-5') werden met behulp van de DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit (Boehringer Mannheim) gelabeld met digoxigenine volgens het bij de kit geleverde protocol. Van ofwel de wt- ofwel de mut-probe werd 30 pmol aan de blots in prehybridisatiebuffer toegevoegd, waarna incubatie volgde bij 51°C gedurende 3 uur. Na hybridisatie werden beide blots gewassen: 2 maal 5 min bij kamertemperatuur in 2x wasoplossing (2xSSC, 0,1% SDS) en 2 maal 15 min bij 51°C in 0,1x wasoplossing (0,1xSSC, 0,1% SDS). Hierop volgde de detectie, waarbij alle stappen werden uitgevoerd bij kamertemperatuur. Eerst werden de membranen gedurende 1 min geëquilibreerd in maleïnezuurbuffer (100 mM maleïnezuur, 150 mM NaCl, pH 7,5) en gedurende 30 min geblokt in 30 ml blockoplossing (1% Blocking Reagent in maleïnezuurbuffer). Vervolgens werd aan de blockoplossing 6 µl Anti-DIG-AP (DIG Detection Kit) toegevoegd. Na 30 min incubatie in deze antibody-oplossing werden de blots 2 maal 5 min gewassen in 100 ml maleïnezuurbuffer en 2 min geëquilibreerd in 20 ml detectiebuffer (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 9,5). Tenslotte werd overnacht geïncubeerd in 20 ml kleursubstraat oplossing (90 µl NBT en 70 µl BCIP oplossing (beide uit de DIG Detection Kit) in detectiebuffer). Wanneer de gewenste kleurprecipitaten gevormd waren, werden de blots gewassen met water om overontwikkeling te voorkomen. Aan de hand van het al dan niet aankleuren van de spots kon bepaald worden bij welke monsters van de T₁₇₉₅ deletie sprake is: is de mutatie homozygoot aanwezig dan geeft alleen de spot op het met de mut-probe geïncubeerde blot een kleurreactie, bij heterozygoten is op beide blots een positief signaal te zien en bij monsters zonder T₁₇₉₅ deletie is alleen de spot op het wt-probe blot aangekleurd.

RESULTATEN

De twee positieve controlespots geven op beide blots steeds een positief signaal. De negatieve controlespot met het afwijkend DNA fragment geeft nooit een kleurreactie, bij het monster zonder T₁₇₉₅ deletie is alleen op het wt-blot een signaal te zien.

Van de 270 patiënten die in het onderzoek zijn ingesloten bleken er 11 heterozygoot te zijn voor de T₁₇₉₅ deletie, kenmerkend voor het niet-functionele CYP2D6*6 allel. Twee van deze patiënten zijn tevens, zo bleek uit de vooraf uitgevoerde routinescreening, heterozygoot voor de CYP2D6*4 variant. Bij 259 patiënten was de T-deletie niet aanwezig, géén van de patiënten was homozygoot voor de mutatie. In de onderzochte patiëntengroep is de prevalentie van het CYP2D6*6 allel 2%.

In figuur 1 zijn twee identieke dot-blots te zien, de één gehybridiseerd met de oligonucleotide probe specifiek voor het wildtype allel en de ander met de CYP2D6*6 allelspecifieke probe.



Figuur 1. Dot-blots, gehybridiseerd met de wt-probe (A) en de mut-probe (B). B7 en D6 zijn de positieve controlespots, G5 en C3 zijn de negatieve controlespots met respectievelijk het afwijkende DNA fragment en het monster zonder T₁₇₉₅ deletie. De monsters E3 en H2 zijn heterozygoot voor het CYP2D6*6 allel, de overige monsters zijn alle homozygoot voor het wildtype allel.

DISCUSSIE

De beschreven PCR-ASO methode voor de detectie van de niet-functionele CYP2D6*6 variant is betrouwbaar, positieve en negatieve controles zijn ingebouwd, en niet moeilijk uitvoerbaar. Wel is de werkwijze arbeidsintensief, met name bij kleine monsteraantallen. Er kunnen echter vele monsters tegelijk worden gescreend. In deze studie is steeds met 60 monsters per blot gewerkt, maar grotere aantallen zijn makkelijk haalbaar. Omdat het 460 bp PCR fragment dat gespot wordt identiek is aan het fragment dat gebruikt wordt voor CYP2D6*4 detectie, een bepaling die bij alle nieuw opgenomen patiënten wordt uitgevoerd, is een aparte PCR voor CYP2D6*6 screening niet nodig. Het is dus denkbaar dat de routinematig verkregen PCR fragmenten batchgewijs gebruikt worden voor de ASO methode om de CYP2D6*6 variant op te sporen.

De gevonden prevalentie van het *6 allel in de patiëntengroep, 2%, komt overeen met wat in de literatuur wordt gemeld: in een Duitse onderzoekspopulatie wordt een allelfrequentie van 0,9% gevonden (11), bij een groep Europeanen is de prevalentie 1,2% (17). CYP2D6*6 komt dus aanzienlijk vaker voor dan bijvoorbeeld de nul-allelen *7, *8, *11, *12 en *14, waarvan de prevalentie slechts 0,1% is (tabel 1). Wanneer een patiënt van traag metabolisme verdacht wordt, is het zeker van belang om ook op CYP2D6*6 te screenen. Homozygoot zal CYP2D6*6 nauwelijks voorkomen, echter ook bij patiënten die meervoudig heterozygoot zijn voor CYP2D6 nul-allelen is sprake van CYP2D6 deficiëntie. Dit is in deze studie bij twee patiënten (0,75%) het geval. Beiden zijn heterozygoot voor zowel het *4 allel als het *6 allel, hebben dus geen CYP2D6 enzymactiviteit en moeten geklassificeerd worden als trage metaboliseerders van CYP2D6 substraten. In theorie zou het nog zo kunnen zijn dat in bovengenoemde gevallen de T₁₇₉₅ deletie, kenmerkend voor het *6 allel, en de G₁₉₃₄A substitutie, karakteristiek voor CYP2D6*4, zich op één en hetzelfde allel bevinden. Het andere allel zou dan géén mutatie bevatten en voor een actief CYP2D6 enzym coderen, zodat de patiënt in feite een normale metaboliseerder is. Echter, in de literatuur is van een combinatie van deze mutaties op één allel nooit melding gemaakt. Sequenzen van het CYP2D6 fragment dat beide mutaties omvat zou in deze gevallen absolute zekerheid kunnen brengen.

Samenvattend kan gesteld worden dat de PCR-ASO methode, hoewel vrij bewerkelijk, geschikt is voor detectie van de niet-functionele CYP2D6*6 variant, met name wanneer grote aantallen patiënten moeten worden gescreend. In onze patiëntenpopulatie blijkt de prevalentie van het allel, overeenkomstig met wat in de literatuur wordt vermeld, vrij laag te zijn. Screening op CYP2D6*6 zal alleen dan uitgevoerd worden wanneer een patiënt op grond van klinisch beeld of dosering/spiegelverhouding van traag metabolisme verdacht wordt. Voor het uitvoeren van dergelijke incidentele bepalingen is de blotmethode, vanwege het tijdrovende karakter, minder geschikt. Een methode gebaseerd op PCR gevolgd door restrictie-enzym

analyse, waarmee minder monsters tegelijkertijd kunnen worden bepaald, maar die minder bewerkelijk is, is hier een betere optie. Het is daarom zeker de moeite waard een dergelijke aanpak te optimaliseren.

Dankbetuiging

De auteurs danken dr. W.W. van Solinge (Eemland Ziekenhuis, Amersfoort) voor het uitvoeren van de sequentie-analyses.

Literatuur

1. Dahl ML, Johansson I, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M, Sjöqvist F. Ultrarapid hydroxylation of debrisoquine in a Swedish population. Analysis of the molecular genetic basis. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 274: 516-520.
2. Agúndez JAG, Ledesma MC, Ladero JM, Benítez J. Prevalence of *CYP2D6* gene duplication and its repercussion on the oxidative phenotype in a white population. *Clin Pharmacol Ther* 1995; 57: 265-269.
3. Alván G, Bechtel P, Iselius L, Gundert-Remy U. Hydroxylation polymorphisms of debrisoquine and mephenytoin in European populations. *Eur J Clin Pharmacol* 1990; 39: 533-537.
4. Weide J van der, Steijns LSW, Kuipers T. De invloed van genetisch polymorfisme van cytochroom-P450 enzymen op het metabolisme van psychofarmaca. *Tijdschr Psychiatr* 1997; 39: 706-711.
5. Steijns LSW, Weide J van der. Ultrarapid drug metabolism: PCR-based detection of *CYP2D6* gene duplication. *Clin Chem* 1998; 44: 914-917.
6. Kagimoto M, Heim M, Kagimoto K, Zeugin T, Meyer UA. Multiple mutations of the human cytochrome P4501-ID6 gene (*CYP2D6*) in poor metabolizers of debrisoquine. *J Biol Chem* 1990; 265: 17209-17214.
7. Gough AC, Miles JS, Spurr NK, Moss JE, Gaedigk A, Eichelbaum M, Wolf CR. Identification of the primary gene defect at the cytochrome P450 *CYP2D* locus. *Nature* 1990; 347: 773-775.
8. 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.
9. Saxena R, Shaw GL, Relling MV, Frame JN, Moir DT, Evans WE, et al. 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.
10. 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-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1994; 350: 434-439.
11. 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.
12. Marez D, Sabbagh N, Legrand M, Lo-Guidice JM, Boone P, Broly F. A novel *CYP2D6* allele with an abolished splice recognition site associated with the poor metabolizer phenotype. *Pharmacogenetics* 1995; 5: 305-311.
13. Marez D, Legrand M, Sabbagh N, Lo-Guidice JM, Boone P, Broly F. An additional allelic variant of the *CYP2D6* gene causing impaired metabolism of sparteine. *Hum Genet* 1996; 97: 668-670.
14. Daly AK, Fairbrother KS, Andreassen OA, London SJ, Idle JR, Steen VM. Characterization and PCR-based detection of two different hybrid *CYP2D7P/CYP2D6* alleles associated with the poor metabolizer phenotype. *Pharmacogenetics* 1996; 6: 319-328.
15. Wolf CR, Moss JE, Miles JS, Gough AC, Spurr NK. Detection of debrisoquine hydroxylation phenotypes. *Lancet* 1990; 336: 1452-1453.
16. Chen S, Wen-Hwei C, Blouin RA, Mao Z, Humphries LL, Craig Meek Q, et al. The cytochrome P450 2D6 (*CYP2D6*) enzyme polymorphism: screening costs and influence on clinical outcomes in psychiatry. *Clin Pharmacol Ther* 1996; 60: 522-534.
17. Marez D, Legrand M, Sabbagh N, Lo-Guidice JM, Spire C, Lafitte JJ, et al. 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.

Summary

*Impaired drug metabolism: detection of the nonfunctional CYP2D6*6 allele by an allele-specific oligonucleotide hybridisation method. Weide J van der and Steijns LSW. Ned Tijdschr Klin Chem 1998; 23: 245-248.*

The cytochrome P450 enzyme *CYP2D6*, which metabolizes many psychopharmaca, is genetically polymorphic. Several mutant *CYP2D6* alleles are known associated with various enzyme activities. Some of these mutants, the so called null alleles, cause complete *CYP2D6* deficiency resulting in extremely slow drug metabolism. *CYP2D6*6* characterized by deletion of a thymine residue on position 1795 is one of the null alleles.

As slow drug metabolism increases the risk of side effects and intoxications, screening for the null alleles prior to drug therapy is of clinical importance. Until recently, a method for the detection of *CYP2D6*6* was not available in our laboratory. In this study we describe a PCR-based method involving hybridisation with allele-specific oligonucleotide probes (ASOs). A group of 270 patients showed a prevalence of the *CYP2D6*6* allele of 2%.

Key-words: debrisoquine 4-hydroxylase; genetic polymorphism; drug metabolism; ASO hybridisation