

## Cytochrom P450 Iso-Enzym 2C19 (CYP2C19) Genotypisierung – Molekulare Untersuchung des Clopidogrel-Ansprechens

Ab sofort bietet das ZIMCL die Genotypisierung der Allele \*1, \*2, \*3 und \*17 des Cytochrom P450 Iso-Enzyms 2C19 (CYP2C19, OMIM-ID \*124020) mittels PCR und Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus(RFLP)-Analyse an.

### KURZINFO

Bedeutung von CYP2C19: Das Isoenzym CYP2C19 ist an der Metabolisierung einer Vielzahl von Medikamenten (zB des Thrombozytenaggregationshemmers Clopidogrel, Antikonvulsiva, Protonenpumpenhemmer, Antidepressiva, Barbiturate und anderen mehr) beteiligt.

Wenn genetische Varianten im CYP2C19 Gen auftreten, können diese entweder einen reduzierten (zB bei Genotyp CYP2C19\*2 oder \*3) bzw. einen gesteigerten Metabolismus (Genotyp CYP2C19\*17) der verstoffwechselten Arzneimittel verursachen. So führt beispielweise eine verminderte oder fehlende CYP2C19 Enzymaktivität zu einer Resistenz gegenüber Clopidogrel. Clopidogrel wird als Prodrug aufgenommen und erst in einem zweiten Schritt durch CYP2C19 in die aktive Form überführt. Bei reduzierter Enzymaktivität bewirkt daher die üblicherweise empfohlene Standarddosierung nicht die erforderliche Thrombozytenhemmung. Ebenso konnte für Protonen-Pumpen-Inhibitoren ein direkter Einfluss der CYP2C19-Aktivität auf Therapieerfolg sowie für Cyclophosphamid auf Nebenwirkungen (Nierenschädigungen) gezeigt werden.

Verminderung der CYP2C19-Aktivität: Unterschiede in der CYP2C19-Aktivität können genetisch durch Polymorphismen im CYP2C19-Gen bedingt sein. Die in Europa häufigsten genetischen Varianten, welche eine veränderte Enzymaktivität verursachen, sind CYP2C19\*2 (G681A) und CYP2C19\*17 (C4195T). 2-5% der Kaukasier haben eine reduzierte CYP2C19-Aktivität (Poor Metabolizer), 17% eine gesteigerte CYP2C19-Aktivität (Ultra Rapid Metabolizer).

Bedeutung der CYP2C19-Genotypen für den Clopidogrel-Metabolismus:

Eine verringerte Enzymaktivität durch CYP2C19 Loss-of-Function Polymorphismen kann laut rezenten Studien eine Therapieumstellung zur Reduktion des Risikos eines verminderten Ansprechens auf Clopidogrel erfordern. Im Gegensatz dazu kann das Vorliegen des Gain-of-function-Allels \*17 zu einer vermehrten Enzymaktivität und zu einem überschießenden Clopidogrel-Effekt (Blutungsneigung) führen:

Genotyp	Enzymaktivität	Empfohlenes Vorgehen	Evidenz
CYP2C19*1/*1	Extensive Metabolizer	Normale Dosis	Stark
CYP2C19*1/*17 CYP2C19*17/*17	Ultra Rapid Metabolizer	Normale Dosis, jedoch erhöhtes Blutungsrisiko	Stark
CYP2C19*1/*2 CYP2C19*1/*3	Intermediate Metabolizer	Prasugrel oder alternative Therapie, wenn keine Kontraindikation besteht	Moderat
CYP2C19*2/*2 CYP2C19*3/*3	Poor Metabolizer	Prasugrel oder alternative Therapie, wenn keine Kontraindikation besteht	Stark

Empfohlene therapeutische Clopidogrel-Dosis in Abhängigkeit des CYP2C19-Genotyps (Scott et al, 2011)

Indikation der CYP2C19-Genotypisierung: Die CYP2C19-Genotypisierung ist indiziert bei Patienten mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Komplikationen (zB nach ACS bei Mehrfach-Stentimplantation, bereits aufgetretener Stent-Thrombose oder bei gleichzeitig vorhandenen anderer Risikofaktoren wie Diabetes Mellitus resp. chronischen Nierenerkrankungen) vor Beginn der Clopidogrel-Therapie (Empfehlung von ACCF/AHA), bei nachgewiesener erhöhter Plättchenreaktivität, bei Auftreten von unerwünschten Wirkungen unter Clopidogrel-Therapie, bei nur eingeschränkt möglicher funktioneller Thrombozytendiagnostik (Thrombopenie, ECMO, HF etc.) sowie bei Vorliegen einer Kontraindikation für die Alternativtherapie mit Prasugrel/Efient (zB Körpergewicht <60kg oder Lebensalter >75 Jahre) zur Steuerung und Risikoabschätzung der Clopidogrel-Therapie.

Anforderung der CYP2C19-Genotypisierung: Benötigt werden 3ml EDTA-Blut. Bei längeren Transportzeiten (>30 min) ist die Probenanlieferung bei 4-8°C erforderlich (nicht frieren!). Zur Durchführung dieser Analyse ist keine Einverständniserklärung erforderlich. Bei manueller Anforderung im Feld *Zusatzanalytik* „CYP2C19-Genotypisierung“ vermerken oder online unter „CYP2C19-Genotypisierung“ anfordern. Dauer der Untersuchung: max. 1 Woche nach Probeneingang.

**Wissenschaftlicher Hintergrund:**

Die CYP2C Subfamilie besteht aus vier Isoenzymen (CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19). Die Gene der vier Isoenzyme sind auf dem Chromosom 10 in der Region 10q24.2 lokalisiert. Das CYP2C19-Gen codiert für das Cytochrom P450 Isoenzym CYP2C19, welches an der Verstoffwechslung von mehreren Medikamenten beteiligt ist. Einen Überblick über die zahlreichen CYP2C19 Substrate bietet die Tabelle 1. Varianten im CYP2C19-Gen können zu veränderter Enzymaktivität und somit verändertem Medikamenten-Abbau führen, was eine Veränderung der Therapie notwendig machen kann. Durch eine Therapieadaptierung nach erfolgter Genotyp-Bestimmung können Unterdosierung oder unerwünschte Medikamentennebenwirkungen verhindert werden. Genotyp-assoziierte Nebenwirkungen können zudem bei Komedikation von Inhibitoren oder Inducern von CYP2C19 weiter verstärkt werden.

Inhibitoren CYP2C19	Substrate CYP2C19	Inducer CYP2C19
PPIs:	PPIs: Hexobarbital	Carbamazepin
Lansoprazol	Lansoprazol Imipramin	Norethindron
Omeprazol	Omeprazol Indomethacin	Prednison
Pantoprazol	Pantoprazol R-Mephobarbital	Rifampicin
Rabeprazol	Rabeprazol Moclobemid	
	Nelfinavir	
Probenicid	Anti-Epileptika: Nilutamid	
Ticlopidin	Diazepam Primidon	
Topiramid	Phenytoin Progesteron	
	S-Mephenytoin Proguanil	
Chloramphenicol	Phenobarbital Propranolol	
Cimetidin	Teniposid	
Felbamat	Amitriptylin R-Warfarin	
Fluoxetin	Carisoprodol	
Fluvoxamin	Citalopram	
Indomethacin	Chloramphenicol	
Ketoconazol	Clomipramin	
Modafinil	Clopidogrel	
Oxcarbazepin	Cyclophosphamid	

→

↑ Gefahr der Unterdosierung oder Nebenwirkungen je nach Angriffspunkt

Tab. 1: Nach Substanzklassen geordnete Substrate, Inhibitoren sowie Inducer von CYP2C19. Quelle: [www.drug-interactions.com](http://www.drug-interactions.com)

Neben dem Wildtyp (\*1/\*1) sind 25 funktionell unterschiedlich wirksame Allelvarianten von CYP2C19 beschrieben. 2-5% der Kaukasier haben eine reduzierte CYP2C19-Aktivität (Poor Metabolizer), während bei Asiaten die Häufigkeit sogar bei 17% liegt (Brockmöller et al, 2000; Wedlund 2000). Unter Kaukasieren weisen 85% der der CYP2C19-Poor Metabolizer die homozygote \*2-Variante auf, bei Asiaten sind 100% der starken Enzymdefizienzen durch die Genotypen \*2 und \*3 verursacht. Genotyp\*2 ist damit bei Kaukasieren der häufigste Polymorphismus, der mit einer reduzierten Enzymaktivität einhergeht. Ebenfalls sehr häufig tritt der die Enzymaktivität-steigernde Genotyp\*17 bei Kaukasieren auf. Die Prävalenz der homozygoten Variante liegt bei 17% (Sim et al, 2006).

	CYP2C19 Allele	Enzymaktivität	Anteil bei Kaukasieren	Anteil bei Afrikanern	Anteil bei Asiaten
<b>*2</b>	CYP2C19*1/*1	Extensive Metabolizer	80	73	25
	CYP2C19*1/*2	Intermediate Metabolizer	15	24	58
	CYP2C19*2/*2	Poor Metabolizer	5	3	17
<b>*3</b>	CYP2C19*1/*1	Extensive Metabolizer	99	95	82
	CYP2C19*1/*3	Intermediate Metabolizer	<1	4	17
	CYP2C19*3/*3	Poor Metabolizer	<1	<1	<1
<b>*17</b>	CYP2C19*1/*1	Extensive Metabolizer	43	95	54
	CYP2C19*1/*17	Ultra Rapid Metabolizer	40	5	38
	CYP2C19*17/*17	Ultra Rapid Metabolizer	17	<1	8

Tab. 2: Prozentuelle Anteile des CYP2C19-Genotyps in einzelnen ethnischen Populationen (www.ncbi.nlm.nih.gov)

Die Allele \*2, \*3 und \*17 entstehen durch einzelne Punktmutationen der chromosomalen DNA (single nucleotide polymorphisms, SNPs). Bei CYP2C19\*2 ist im Exon5 an der Position 681 Guanin durch Adenosin ersetzt (auf Proteinebene keine Änderung an der Position 227), bei CYP2C19\*3 ist im Exon4 an der Position 636 Guanin durch Adenosin ersetzt (bewirkt auf Proteinebene an der Position 212 anstelle eines Einbaus von Tryptophan einen Transkriptionsstopp). Der Genotyp \*17 wird durch den Polymorphismus Cytosin  $\Rightarrow$  Thymin an der Position 4195 in der 5' angrenzenden regulierenden Region verursacht, was keine Änderung auf Aminosäure-Ebene sondern eine Hochregulation der CYP2C19-Expression bewirkt.

**Pharmakogenetische Bedeutung der CYP2C19-Polymorphismen \*2, \*3 und \*17**

Das Beispiel des Clopidogrel-Metabolismus veranschaulicht die große pharmakogenetische Bedeutung von CYP2C19:

Die kombinierte plättchenhemmende Therapie mit Aspirin und Clopidogrel ist wesentlicher Bestandteil der Therapie von kardiovaskulären Risiko-Patienten, da diese dem Auftreten von Thrombosen nach Stentimplantation vorbeugen kann. Bis zu 10% der Patienten zeigen jedoch nur eine unvollständige Medikamenten-Wirkung und weisen dadurch ein vierfach erhöhtes Risiko für das Auftreten von kardiovaskulären Komplikationen auf.

Ein CYP2C19-Loss-of-function-Genpolymorphismus führt mit 50% Wahrscheinlichkeit zu einer verminderten oder fehlenden CYP2C19 Enzymaktivität und damit in der Folge zu einer Resistenz gegenüber Clopidogrel. Clopidogrel wird als Prodrug im Organismus aufgenommen und durch CYP2C19 in die aktive Form überführt. Bei vermindelter Enzymaktivität reicht die üblicherweise empfohlene Standarddosierung nicht aus, weil zu wenig von der aktiven Form vorliegt, um die P2Y12 ADP-Rezeptoren der Blutplättchen ausreichend zu inhibieren. In Studien konnte festgestellt werden, dass Patienten, welche CYP2C19 Loss-of-Function Polymorphismen aufweisen, unter einer Therapie mit Clopidogrel ein signifikant höheres kardiovaskuläres Risiko aufweisen als CYP2C19-Normal-Metabolisierer (Yeong et al, 2010). Die Frage, ob bei einer intermediären Enzymaktivität eine Clopidogrel Dosissteigerung eine mögliche Therapieoption darstellt, ist derzeit umstritten und noch nicht geklärt. In ersten Pilotstudien konnte jedoch kein Benefit von 150mg gegenüber 75mg Clopidogrel bei Patienten mit intermediärer Enzymaktivität festgestellt werden (Price et al, 2011). Derzeit wird in Abhängigkeit vom CYP2C19-Genotyp folgende therapeutische Vorgangsweise empfohlen:

Genotyp	Enzymaktivität	Empfohlenes Vorgehen	Evidenz
CYP2C19*1/*1	Extensive Metabolizer	Normale Dosis	Stark
CYP2C19*1/*17 CYP2C19*17/*17	Ultra Rapid Metabolizer	Normale Dosis, jedoch erhöhtes Blutungsrisiko	Stark
CYP2C19*1/*2 CYP2C19*1/*3	Intermediate Metabolizer	Prasugrel oder alternative Therapie, wenn keine Kontraindikation besteht	Moderat
CYP2C19*2/*2 CYP2C19*3/*3	Poor Metabolizer	Prasugrel oder alternative Therapie, wenn keine Kontraindikation besteht	Stark

Tab. 3: Genotyp-abhängige Enzymaktivität und empfohlene therapeutische Clopidogrel-Dosis (Scott et al, 2011)

Die nachfolgende Übersicht zeigt die Assoziation zwischen CYP2C19 Loss-of-Function Polymorphismen und Stent-Thrombosen bei Patienten mit Koronarer Herzkrankheit unter Clopidogrel Therapie. Dargestellt sind die in verschiedenen Studien ermittelten Odds Ratios (OR) bei Vorliegen eines oder mehrerer Loss-of-Function Allele.

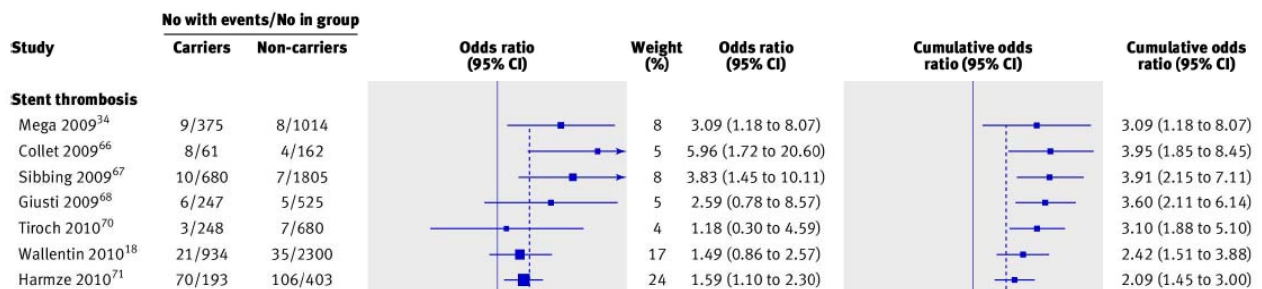


Abb. 1: Assoziation zwischen CYP2C19 Loss-of-Function Polymorphismen (PM / IM vs. Non-Carrier) und Stent-Thrombosen. Odds Ratio dargestellt jeweils für einzelne Studien und kumulativ nach schrittweiser Einbeziehung in eine gesamthafte OR (Bauer et al 2011).

Protonen-Pumpen-Inhibitoren werden ebenfalls über CYP2C19 verstoffwechselt. Hier zeigt sich, dass Individuen mit einer reduzierten Enzymaktivität (PM) ein besseres Therapieansprechen zeigen als solche mit erhöhter Enzymaktivität (UM). In diesen Fällen ist das Risiko für ein Therapieversagen erhöht (Klotz, 2006). So wird zB in der Literatur für Omeprazol bei \*17 Homozygotie im Zuge der H. pylori Eradikation die doppelte bis dreifache Dosis empfohlen (Swen et al. 2001).

In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass Cyclophosphamid, welches über CYP2C19 abgebaut wird, bei Langsam-Metabolisierern (PM) infolge der geringeren Elimination aufgrund seiner Urotoxizität häufiger zu schweren Nierenschädigungen führt (Takada et al, 2004).

#### **Indikation zur CYP2C19-Genotypisierung:**

- vor Beginn der Clopidogrel-Therapie bei Patienten mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Komplikationen wie zB nach Myocardinfarkt bei mehrfacher Stentimplantation, bei bereits aufgetretener Stent-Thrombose oder bei gleichzeitig vorhandenen anderen Risikofaktoren wie Diabetes Mellitus oder chronischen Nierenerkrankungen
- bei Vorliegen von Kontraindikationen für eine Therapie mit Prasugrel (Alter > 75, Körpergewicht <60kg) zur Risikoabschätzung der Clopidogrel-Therapie (Identifikation von PM, URM)
- bei nachgewiesener erhöhter ex vivo Plättchenreaktivität unter Clopidogrel-Therapie
- bei Auftreten von unerwünschten Wirkungen unter Clopidogrel-Therapie.
- bei klinischem Hinweis auf das Vorliegen einer unzureichenden oder überschießenden Thrombozytenaggregations-Hemmung in Situationen, in denen eine funktionelle Thrombozytenuntersuchung nicht oder nur eingeschränkt möglich ist (Thrombopenie, mechanische Beeinträchtigung der Thrombozyten durch extrakorporale Zirkulation wie ECMO, HF etc.)
- Kosten-Nutzen-Abwägung: Eine einmalige Genotypisierung zur Identifikation einer Clopidogrel-Resistenz ist verglichen mit der a priori Verschreibung der Alternativsubstanz weitaus kostengünstiger.

#### **Empfehlungen zur Stufendiagnostik:**

Im März 2010 wurde in einer Aussendung der Food and Drug Administration (FDA) in Form einer „black-box warning“ auf das verminderte Clopidogrel-Therapieansprechen bei Poor Metabolizern, auf die Möglichkeit der genetischen CYP2C19-Testung sowie mögliche alternative Therapien bei diesem Patientenkollektiv hingewiesen, ohne dass bis dato eine eindeutige Empfehlung zur generellen CYP2C19 Genotypisierung ausgegeben wurde. In zwei großen prospektiven Studien war jedoch das Vorliegen eines CYP2C19 loss-of-function-Allels der wichtigste Risiko-Faktor für eine High-On-Treatment-Platelet-Reactivity unter Clopidogrel (Jeong et al. 2010, Bonello et al. 2010), was nicht nur für eine genetische CYP2C19-Testung bei Patienten mit erhöhtem Risiko für kardiovaskuläre Komplikationen, sondern auch bei fehlendem Clopidogrel-Wirknachweis in Thrombozytenfunktions-Messverfahren (wie zB Multiplate System, Lichttransmissionsaggregometrie, VerifyNow etc) spricht. Umgekehrt geht eine gesteigerte CYP2C19-Aktivität (Genotyp \*17) mit einer verstärkten Thrombozyten-Hemmung und einem dreifach erhöhten Risiko für Blutungen einher (Harmsze et al, 2012). Daher erscheint aus heutiger Sicht die Untersuchung des CYP2C19\*17-Genotyps als molekularer Marker für ein erhöhtes Blutungsrisiko im Rahmen der CYP2C19-Genotypisierung durchaus sinnvoll und angebracht.

#### **Testprinzip:**

Die Genotypisierung erfolgt nach dem Prinzip der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-(RFLP)Analyse. Nach erfolgter PCR werden in einem zweiten Schritt die Amplifikate durch einen jeweils spezifischen Restriktionsenzym-Verdau durch das Vorliegen unterschiedlich langer DNA-Fragmente charakterisiert und klassifiziert.

**Probenmaterial:** 3 ml EDTA-Blut. Bei längeren Transportzeiten (>30 min) ist die Probenanlieferung bei 4-8°C erforderlich (nicht frieren!). Zur Durchführung dieser Analyse ist k e i n e Einverständniserklärung erforderlich!

**Anforderung:** Bei manueller Anforderung im Feld *Zusatzanalytik* „CYP2C19-Genotypisierung“ vermerken oder online unter „CYP2C19-Genotypisierung“ anfordern.

Bei Rückfragen: Tel.: 81590 (Werner Wohlfarter), 81173 (Dr. Loacker), 82549 (Prof. Weigel)

**Dauer der Untersuchung:** max. 1 Woche nach Probeneingang.


Für weitere Fragen stehen wir gerne zur Verfügung



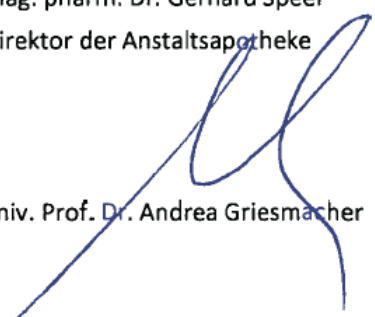
Ao. Univ. Prof. Dr. Günter Weigel



Dr. Lorin J. Loacker



Mag. pharm. Dr. Gerhard Speer  
Direktor der Anstaltsapotheke



Univ. Prof. Dr. Andrea Griesmacher

Innsbruck, im Mai 2012

**Literatur:**

- Yeong et al. Carriage of cytochrome 2C19 polymorphism is associated with risk of high post-treatment platelet reactivity on high maintenance-dose clopidogrel of 150 mg/day: results of the ACCEL-DOUBLE (Accelerated Platelet Inhibition by a Double Dose of Clopidogrel According to Gene Polymorphism) study. JACC Cardiovasc Interv. 2010 Jul;3(7):731-41.
- Bauer et al. Impact of CYP2C19 variant genotypes on clinical efficacy of antiplatelet treatment with clopidogrel: systematic review and meta-analysis. BMJ. 2011; 343: d4588.
- Brockmöller et al. Pharmacogenetic diagnostics of cytochrome P450 polymorphisms in clinical drug development and in drug treatment. Pharmacogenomics. 2000 May;1(2):125-51.
- Wedlund PJ. The CYP2C19 enzyme polymorphism. Pharmacology. 2000 Sep;61(3):174-83.
- Sim SC et al. A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. Clin Pharmacol Ther. 2006 Jan;79(1):103-13.
- Klotz U. Clinical impact of CYP2C19 polymorphism on the action of proton pump inhibitors: a review of a special problem. Int J Clin Pharmacol Ther. 2006 Jul;44(7):297-302.
- Takada et al. Cytochrome P450 pharmacogenetics as a predictor of toxicity and clinical response to pulse cyclophosphamide in lupus nephritis. Arthritis Rheum. 2004 Jul;50(7):2202-10.
- Price MJ et al. Standard- vs high-dose clopidogrel based on platelet function testing after percutaneous coronary intervention: the GRAVITAS randomized trial. JAMA. 2011 Mar 16;305(11):1097-105.
- Scott et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for Cytochrome P450-2C19 (CYP2C19) Genotype and Clopidogrel Therapy. Clin Pharmacol Ther. 2011 August; 90(2): 328–332.
- Swen JJ, et al. Pharmacogenetics: From Bench to Byte - An Update of Guidelines. Clin. Pharm. & Ther. doi:10.1038/clpt2011.34, 2011.
- Jeong et al. Carriage of Cytochrome 2C19 Polymorphism Is Associated With Risk of High Post-Treatment Platelet Reactivity on High Maintenance-Dose Clopidogrel of 150 mg/day. J Am Coll Cardiol Intv, 2010; 3:731-741.
- Bonello et al. Clopidogrel Loading Dose Adjustment According to Platelet Reactivity Monitoring in Patients Carrying the 2C19\*2 Loss of Function Polymorphism. J Am Coll Cardiol, 2010; 56:1630-1636.
- Harmsze et al. The influence of CYP2C19\*2 and \*17 on on-treatment platelet reactivity and bleeding events in patients undergoing elective coronary stenting. Pharmacogenet Genomics. 2012 Mar;22(3):169-75.