

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Bedeutung genetischer Polymorphismen im Enzym
Cytochrom P450 2B6 für Pharmakokinetik und Wirkung des
Antidepressivums Bupropion

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christian Klein

aus Bochum

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. J. Kirchheiner
2. Prof. Dr. med. J. Brockmüller
3. Prof. Dr. med. I. Roots

Datum der Promotion: 11.12.2008

1	Einleitung.....	1
1.1.	Biotransformation	1
1.1.1.	Resorption, Verteilung und Elimination von Medikamenten	1
1.1.2	Phase I- und Phase II- Reaktionen (Fremdstoffmetabolismus).....	2
1.2	Das Cytochrom P450-Enzymsystem.....	4
1.2.1	Bedeutung des Cytochrom P450 Enzymsystem für den Arzneimittelstoffwechsel	4
1.2.2	Entwicklung und Entdeckung der Cytochrom P450 - Enzyme.....	5
1.2.3	Aktivitätsunterschiede metabolisierender Enzyme	6
1.2.4	Enzyminduktion und Enzyminhibition von Cytochrom-P450-Enzymen	7
1.2.4.1	Enzyminduktion von Cytochrom-P450-Enzymen	7
1.2.4.2	Enzyminhibition von Cytochrom-P450-Enzymen	7
1.2.5	Messung der Enzymaktivität von Cytochrom-P450-Enzymen in vitro	8
1.2.6	Abschätzung der Enzymaktivität in vivo aufgrund von Phänotypisierung und Genotypisierung.....	9
1.2.6.1	Phänotypisierung.....	9
1.2.6.2	Genotypisierung	9
1.3	Das Enzym Cytochrom P450 2B6	10
1.3.1	Geschichte und Struktur des Enzyms Cytochrom P450 2B6 (CYP2B6).....	10
1.3.2	Bedeutung des Cytochroms P450 2B6 für den Arzneimetabolismus	11
1.3.3	Genetische Varianten des Cytochrom P450 2B6	12
1.4	Das Antidepressivum Bupropion.....	14
1.4.1	Einführung und Bedeutung des Antidepressivums Bupropion	14
1.4.2	Wirkungsweise und Indikation des Antidepressivums Bupropion	14
1.4.3	Nebenwirkungen von Bupropion	16
1.4.4	Pharmakokinetik von Bupropion	17

1.5	Herleitung der Aufgabenstellung.....	19
2	Material und Methoden	21
2.1.	Probandenrekrutierung und Studiendurchführung.....	21
2.1.1	Studiendesign	21
2.1.2	Probandenrekrutierung und Einschlusskriterien	21
2.1.3	Ausschlusskriterien	22
2.1.4	Art und Dosis des verwendeten Arzneimittel	23
2.1.5	Diätetische Maßnahmen.....	23
2.1.6	Überprüfung der Patientencompliance und Vorsichtsmaßnahmen.....	23
2.1.7	Studienablauf.....	24
2.1.8	Erfassung von Nebenwirkungen	25
2.1.9	Dokumentation der Studie.....	26
2.1.10	Datenschutz und Vertraulichkeit der Daten	26
2.1.11	Fehlerminimierung	26
2.1.12	Versicherungsschutz.....	26
2.1.13	Weiterverarbeitung und Aufarbeitung der Proben zur Messung der Medikamentenplasmakonzentrationen	27
2.2	Durchführung der Genotypisierung.....	27
2.2.1	Erythrozytenlyse.....	27
2.2.2	DNA-Extraktion	28
2.2.3	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	29
2.2.4	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)	31
2.2.5	Bestimmung des CYP2B6-Allels durch den PCR-RFLP-Test	32
2.3	Bestimmung von Medikamentenkonzentrationen mittels HPLC-Analyse.....	34
2.3.1	Prinzip der Bestimmung von Medikamentenkonzentrationen mittels HPLC- Analyse	34

2.3.1.1 Extraktion	34
2.3.1.2 Konzentrationsbestimmung.....	34
2.3.1.3 Durchführung der HPLC	34
2.3.1.4 Statistische Qualitätskontrolle der Analyseergebnisse.....	35
2.3.2 HPLC von Bupropion und 4-OH-Bupropion	36
2.3.2.1 Vorbereitung der HPLC von Bupropion und 4-OH-Bupropion.....	36
2.3.2.2 Durchführung der HPLC von Bupropion und 4-OH-Bupropion	37
2.3.2.3 Kalibrierstandards und Statistische Qualitätskontrolle für Bupropion und 4-OH-Bupropion	37
2.4 Analyse der Messdaten und Statistik	37
2.4.1 Pharmakokinetische Begriffe und Parameter	37
2.4.2 Analyse der Messdaten und Statistik	38
3 Ergebnisse.....	40
3.1 Ergebnisse für Bupropion	40
3.1.1 Häufigkeit und Verteilung der Aminosäurepolymorphismen und der daraus resultierenden Allelfrequenzen.....	40
3.1.2 Pharmakokinetische Parameter von Bupropion und 4-OH-Bupropion.....	43
3.1.2.1 Pharmakokinetische Parameter von Bupropion	43
3.1.2.2 Pharmakokinetische Parameter von 4-OH-Bupropion (Hydroxybupropion)	48
3.2 EKG - Veränderungen nach Einnahme von Bupropion	51
4 Diskussion	52
4.1 Diskussion der Ergebnisse von Bupropion	52
4.1.1 Bupropion als Testsubstanz für die Cytochrom P450 2B6 (CYP2B6) Aktivität ..	52
4.1.2 Auswirkungen von CYP2B6-Genpolymorphismen auf den Bupropion-Metabolismus.....	52
4.1.3 Vergleich der gefundenen Daten mit anderen klinischen Untersuchungen	53

4.2	Einfluss des CYP2B6-Genotypes auf die Expression und Funktion	54
4.3	Klinischer Bezug der Ergebnisse	57
4.3.1	Individualisierung der Pharmakotherapie	57
4.3.2	Genotypische Dosisanpassungen für Bupropion und weitere Substrate von CYP2B6.....	58
4.4	Zusammenfassung und Ausblick	60
Literaturverzeichnis.....		61
Webseiten		69
Danksagung.....		70
Erklärung an Eides Statt		71
Publikationsliste		72

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AUC	Area under the curve (Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve)
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
C_{\max}	Maximale Konzentration
Cl	Clearance
Cl/F	Clearance/bioverfügbare Fraktion (Orale Clearance)
CRP	Case Report Form (Fallbericht-Formular)
CYP	Cytochrom P-450-Enzym
CYP1A2	Cytochrom P-450-1A2
CYP2A6	Cytochrom P-450-2A6
CYP3A4	Cytochrom P-450-3A4
CYP2B1	Cytochrom P-450-2B1
CYP2B6	Cytochrom P-450-2B6
CYP2C9	Cytochrom P-450-2C9
CYP2D6	Cytochrom P-450-2D6
CYP2E1	Cytochrom P-450-2E1
d	Tag
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
Et al. (u.a.)	Et alii (und andere)
Fa.	Firma
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyrovat-Transaminase
h	Stunde
HPLC	High performance liquid chromatography (Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie)
IS	Interner Standard
i.v.	intravenös
kbp	Kilobasenpaare
kDA	Kilodalton
kg	Kilogramm
K_m	Michaelis-Konstante

l	Liter
m	Meter
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
min	Minute
Mio	Millionen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
mol	Mol
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
ns	nicht signifikant
p	Signifikanzniveau
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
RFLP	Restriction length fragment polymorphism (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus)
RNA	Ribonucleinsäure
RPLC	Reversed phase liquid chromatography (Umkehr-Phasen-Flüssigkeits-Chromatography)
S	Substrat
SA	Standardabweichung
SNP	Single nucleotide polymorphism
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
t_{max}	Zeitpunkt des Erreichen der Spitzenkonzentration
TEN-Puffer	Tris EDTA Natriumchlorid Puffer
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Umdrehungen
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
v	Volumenanteile
v_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1. Biotransformation

1.1.1. Resorption, Verteilung und Elimination von Medikamenten

Medikamente zeigen individuell sehr unterschiedliche Wirkungen und Nebenwirkungen am Menschen. Einer der Hauptgründe beruht auf den unterschiedlichen Konzentrationen bzw. Plasmaspiegeln, die am Wirkort erreicht werden. Da das Medikament meistens nicht direkt an den Wirkort appliziert wird, sondern z.B. oral zugeführt wird, muß das Medikament zunächst resorbiert und verteilt werden.

Als Resorption wird im Allgemeinen die Aufnahme eines Stoffes aus dem Magen-Darm-Trakt, aus den Atemwegen, über die Haut oder aus einem subkutanen oder intramuskulären Depot ins Blut bezeichnet (Estler, 1999). Da große Mengen des Wirkstoffes im Plasma und den übrigen Körpergeweben gebunden oder abgebaut werden können, ist der Anteil, der letztendlich die Wirkung des Fremdstoffes ausmacht, oft nur gering. Desweiteren kann auch die Umverteilung zwischen den Geweben die Konzentration am Wirkort beeinflussen.

Gleichzeitig laufen weitere Mechanismen ab, die zur Verminderung der Konzentration am Wirkort führen. Dies sind zum einen Stoffwechselfvorgänge oder Biotransformation und zum anderen die Ausscheidungsmechanismen über Harn, Faeces, Atemluft, Schweiß und Milch. Die Begriffe Biotransformation und Ausscheidung werden unter dem Begriff Elimination zusammengefasst. Nach Mutschler et al. (2001) bezeichnet Elimination alle Prozesse, die zu einer Konzentrationsabnahme des Arzneistoffes im Organismus führen.

Somit resultiert die Konzentration am Wirkort aus dem Zusammenspiel von Resorption, Verteilung und Elimination. Daher können alle Faktoren, die diese Vorgänge an irgendeinem Punkt beeinflussen, auch die Konzentration am Wirkort und damit die Wirkung eines Medikamentes beeinflussen (Forth et al., 1996).

Die Beendigung der Wirkung eines Fremdstoffes bzw. eines Medikamentes erfolgt meist durch die Biotransformation. Unter Biotransformation versteht man den biochemischen Umbau oder Metabolismus von Pharmaka (Burgis, 2001). Die Biotransformation erfolgt vorwiegend in der Leber, Niere, Lunge und im Darm. Dabei wird die Umwandlung des Fremdstoffes mit Hilfe von Enzymen katalysiert. Die dafür verantwortlichen Enzyme sind vor allem die des Cytochrom P450-Systems. Die Enzyme können spezifisch oder unspezifisch sein und unterscheiden nicht zwischen nützlichen oder schädlichen Biotransformationen.

1.1.2 Phase I- und Phase II- Reaktionen (Fremdstoffmetabolismus)

Vorraussetzung für die Ausscheidung von Pharmaka ist ihre enzymatische Umwandlung. Die meisten Pharmaka besitzen lipophile Eigenschaften. Diese lipophilen Eigenschaften begünstigen die Passage der Pharmaka durch biologische Membranen und damit auch die Resorption. Im Vordergrund der enzymatischen Umwandlung steht die Lipidlöslichkeit der Pharmaka zu vermindern und die Pharmaka in hydrophile bzw. wasserlösliche Substanzen umzuwandeln. Damit wird die Vorraussetzung geschaffen, die Pharmaka über die Nieren auszuschleiden und damit eine verbesserte renale Ausscheidung und eine Verkürzung der Halbwertszeit der Substanz zu erreichen. Die dafür verantwortlichen Enzyme sind im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und dort an den lipidhaltigen Membranen gebunden.

Das zentrale Organ dieser Stoffwechselprozesse ist die Leber, in der allein $\frac{2}{3}$ der Biotransformation stattfindet. Außerdem beteiligen sich an der Biotransformation die Lungen, die Nieren sowie das Intestinum. Diese Organe verfügen allerdings nicht über eine so große Enzymausstattung wie die Leber. Diese an der Biotransformation beteiligten Enzyme sind meist wenig substratspezifisch und nicht nur für den Metabolismus von Fremdstoffen, sondern auch für die Verstoffwechslung körpereigener Stoffe zuständig. Hinsichtlich der Aktivität der Enzyme gibt es zudem erhebliche intra- als auch interindividuelle Unterschiede.

Die Biotransformation führt meistens zu einer Verringerung der biologischen Aktivität und somit zu einer Detoxifizierung der Substrate. Andererseits kann es durch die Umwandlungsreaktionen auch zu einer Toxifizierung, bzw. zu einer Aktivierung von zuvor unwirksamen Stoffen kommen. Bei sogenannten Prodrugs ist dies ein therapeutisch genutzter Effekt.

Nach Resorption und Verteilung im Organismus entfalten Pharmaka ihre Wirkung am Arzneimittelrezeptor entsprechend den Gesetzen der Pharmakodynamik (Wirkungsmechanismus und Wirkungsqualitäten anhand von Dosis-Wirkungs-Beziehungen). Gleichzeitig beginnt, den Gesetzen der Pharmakokinetik (Wirkungsstärke und Wirkungsdauer bedingt durch Resorption, Metabolismus und Exkretion) folgend, die Biotransformation der Pharmaka und damit der Fremdstoffmetabolismus der Arzneimittel.

Zur Biotransformation gehören grundsätzlich zwei Reaktionen, die Phase-I bzw. Funktionalisierungsreaktionen und die Phase-II bzw. Konjugationsreaktionen (Tab.1)

Phase-I-Reaktionen

Oxidation	Hydroxylierung, N-Oxidation, S-Oxidation, N-Dealkylierung, O-Dealkylierung, Desaminierung, Desulfurierung, Oxidative Dehalogenierung Dehydrierung der Hydroxylgruppe Dehydrierung von Aminen N-Oxidation, S-Oxidation	Cytochrom P450 Monooxygenasen Alkohol Dehydrogenase Monoaminoxidasen Flavin-Monooxygenasen
Reduktion	Dehalogenierung von Nitrogruppen	Cytochrom P450 Monooxygenasen
Hydrolyse	Hydrolyse von Epoxiden	Epoxid-Hydrolasen
Sonstige	Oxidation von Radikalen Peroxidation	Superoxid-Dismutasen Glutathion-Peroxidasen

Phase-II-Reaktionen

Konjugation	Glucuronidierung Sulfatierung Acetylierung Methylierung Glutathion- Konjugation	UDP-Glucuronosyltransferasen Sulfotransferasen O-, N-Acetyltransferasen O-, N-, S-Methyltransferasen Glutathion-S-Transferasen
--------------------	---	--

Tabelle 1: Übersicht über die Phase-I- und Phase-II-Reaktionen der Biotransformation von Fremdstoffen und die daran beteiligten Enzymgruppen (Estler, 1999)

In den Phase-I-Reaktionen werden funktionelle Gruppen in unpolare Moleküle der Fremdstoffe eingeführt oder vorhandene funktionelle Gruppen umgewandelt. Es entstehen durch Oxidation und Reduktion zumeist hydrophilere Metabolite. In den Phase-II-Reaktionen werden die Metabolite der Fremdstoffe an polare, negativ geladene Moleküle gekoppelt (z.B. Acetyl-, Sulfat oder Glucuronylgruppen). Diese Konjugate besitzen eine vielfach höhere Polarität und somit eine stärkere Hydrophilie als die Ausgangssubstrate, was eine biliäre oder renale Ausscheidung ermöglicht.

Die zentrale Rolle bei fast allen oxidativen Reaktionen spielt dabei die Gruppe der Cytochrom P450-Enzyme.

1.2 Das Cytochrom P450-Enzymsystem

1.2.1 Bedeutung des Cytochrom P450 Enzymsystem für den Arzneimittelstoffwechsel

Bei den Enzymen des Cytochrom P450-Systems handelt es sich um Monooxygenasen. Diese sind dadurch gekennzeichnet, dass sie ein Sauerstoffatom aus dem molekularen Sauerstoff auf ihr Substrat übertragen. Das andere Sauerstoffatom wird zu Wasser reduziert (Abb. 1). Mit vergleichbarer Affinität, wie das Eisen der Häm-Gruppe dieser Enzyme molekularen Sauerstoff bindet, kann es auch Kohlenmonoxid binden und einen Komplex in der spektrophotometrischen Untersuchung mit einem charakteristischen Absorptionsmaximum bei 450 nm bilden.

Die Cytochrom P450-Enzyme katalysieren die Phase-I-Reaktion der Biotransformation. Aufgrund ihrer doppelten Funktion, der Oxidation des Substrates und der Reduktion von Sauerstoff, werden sie auch als mischfunktionelle Oxygenasen bezeichnet.

Bei der Oxidation durch Monooxygenasen müssen mehrere Komponenten zusammenwirken. Neben dem Cytochrom P450-Enzym ist ein Flavoenzym, die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase, das die Oxidation von NADPH katalysiert und die Reduktionsäquivalente auf das Cytochrom überträgt, sowie die Gegenwart von Phospholipiden, vor allem Phosphatidcholin, erforderlich (Forth et al., 1996).

Die Oxidation des Substrates erfolgt, indem nach der Aufnahme des Substrates in eine hydrophobe Bindungsstelle des Enzyms ein Elektron auf das Eisen der Hämgruppe übertragen wird. Dabei entsteht zweiwertiges Eisen, das molekularen Sauerstoff bindet. Nach der Aufnahme des Sauerstoffs wird dann das zweite Elektron übertragen und es entsteht letztlich unter Aufnahme von zwei Protonen Wasser und aktivierter Sauerstoff. Das Substrat wird nun oxidiert und liegt als Reaktionsprodukt vor. Das Enzym steht nun wieder für einen neuen Reaktionszyklus zur Verfügung (Forth et al., 1996). Die Abbildung 1 zeigt eine vereinfachte Darstellung der Reaktionsgleichung der Cytochrom P450-Enzyme.

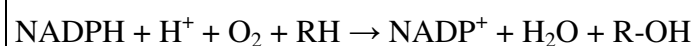


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der allgemeinen Reaktionsgleichung der Cytochrom P450-Enzyme (Chang et Kam, 1999)

Letztlich setzen die Monooxygenasen die verschiedensten Substrate um, wobei immer Sauerstoff übertragen wird. Die Reaktionsprodukte unterscheiden sich unter Umständen allerdings erheblich.

Cytochrom-P450-Enzyme kommen vorwiegend in der Leber, jedoch auch in steroidhormonproduzierenden Drüsen und anderen Organen sowie Geweben (z.B. ZNS) vor. Sie metabolisieren bevorzugt unpolare Substrate, die aliphatische oder aromatische Ringe enthalten. Hierzu gehören Arzneimittel, aber auch körpereigene Substanzen wie z.B. Steroidhormone.

Zu den für die Arzneimitteltherapie wichtigsten Cytochrom-P450-Isoenzymen zählen CYP1A2, CYP2A6, die CYP2B-Familie (2B1, 2B6), die CYP2C-Familie (2C8, 2C9, 2C19), CYP2D6, CYP2E1 und die CYP3A-Familie (3A4, 3A5, 3A7).

1.2.2 Entwicklung und Entdeckung der Cytochrom P450 - Enzyme

Die Namensgeber und Erstbeschreiber des Cytochrom P450-Systems waren Klingenberg und Garfinkel 1958. Sie erkannten als erste, daß das Eisen im Cytochrom P450-Molekül mit Kohlenmonoxid einen Komplex mit einem Absorptionsmaximum von 450 nm bilden kann. 1962 waren es dann Omura und Sato, die den Nachweis erbrachten, daß es sich beim Cytochrom P450 um ein Hämprotein handelt.

Man vermutet, daß wahrscheinlich die Enzyme des P450-Systems schon vor ungefähr 3,5 Milliarden Jahren in den einfachsten Organismen vorhanden waren (Loomis, 1988; Gonzales et al., 1994) und sie die Funktion hatten, Steroidmoleküle für die Zellmembran zu synthetisieren und zu metabolisieren (Nelson et al., 1987).

Im Laufe der Zeit entstanden die ersten Cytochrome, die organismusfremde Stoffe metabolisieren und mit der pflanzlichen Nahrung aufgenommene Stoffe entgiften konnten (Nebert, 1997; Lewis et al., 1998). Seit dieser Zeit entwickelten die Organismen immer neue Gene und Enzyme, um die größer werdende Zahl von natürlichen Substanzen abzubauen. Dieses Phänomen der Fremdstoffmetabolisation entwickelte sich im Laufe der Evolution in der Reihenfolge Fisch < Vogel < Säugetier. Dies führte dazu, daß sich die Cytochrome immer vielseitiger entwickelten und sogenannte Isoenzyme entstanden.

Mittlerweile wurden über 500 CYP-Gene in Prokaryonten und Eukaryonten identifiziert (Nelson et al., 1996). Die verschiedenen Formen des Cytochrom P450-Enzymsystems werden in einer „Super-Gen-Familie“ zusammengefaßt. Diese Enzym-Superfamilie beinhaltet mehrere Familien und Unterfamilien, die aufgrund von Strukturhomologien abgegrenzt werden. Zu einer Familie

werden Enzyme zugeordnet, die in der Aminosäurezusammensetzung zu 40 % übereinstimmen. Diese werden dann mit einer arabischen Ziffer gekennzeichnet und dem Stamm CYP angehängt, z.B. CYP2. Die Sub- bzw. Unterfamilie wird durch einen Buchstaben gekennzeichnet, wenn die Aminosäurezusammensetzung zu 55 % übereinstimmt. Zum Schluß wird wiederum mit einer Ziffer das einzelne Enzym beschrieben. So setzt sich dann also zum Beispiel das Enzym CYP2B6 zusammen.

Das Nomenklatorsystem der P450-Isoenzyme entwickelten Nebert und Gonzales 1987 und wurde von ihnen 1991 in der oben beschriebenen Form verändert. Beim Menschen wurden annähernd 20 Cytochrom P450 - Familien gefunden (Cupp et al., 1998). Besonders die ersten drei Familien spielen in der Biotransformation von Medikamenten eine bedeutende Rolle.

1.2.3 Aktivitätsunterschiede metabolisierender Enzyme

Die Ursachen von unzureichenden Arzneimittelwirkungen oder von Nebenwirkungen können in einer individuell sehr schlechten Bioverfügbarkeit oder einer extrem schnellen oder langsamen Arzneimittelausscheidung begründet sein. Eine besondere Bedeutung haben dabei die Enzyme, die an der Phase-I der Arzneimittel-Biotransformation beteiligt sind, z.B. die Enzyme des Cytochrom-P450-Systems. So kommt es bei einigen Patienten zu einer unzureichenden Arzneimittelwirkung oder es kann zu schweren Nebenwirkungen für den Patienten führen. Dies liegt daran, dass die Enzyme, die den Metabolismus der Medikamente beeinflussen, eine interindividuell sehr unterschiedliche Aktivität aufweisen. Mehrere Faktoren sind dafür verantwortlich. Neben genetischen Faktoren spielen die Induktion und die Hemmung von Enzymen eine entscheidende Rolle, die aufgrund von Umweltbedingungen, Nahrungsbestandteilen, anderen Medikamenten, Drogen und vielem mehr zustande kommen können.

Genetische Polymorphismen spielen eine besondere Rolle bei der Untersuchung der interindividuellen Variabilität der Aktivität der wichtigsten Enzyme des Cytochrom-P450-Systems. So sind für das CYP2D6 mindestens zehn funktionell bedeutende Varianten identifiziert worden (Brockmüller et al., 2000), ebenso für die Enzyme CYP2C9, CYP2C19 und CYP2A6. Im Gen für CYP2D6 bewirken die Mutationen entweder eine mangelhafte Synthese des Enzymproteins oder haben ein instabiles Enzym zur Folge. Diese Mutationen bedingen den Typ der sog. schlechten Debrisoquin-Metabolisierer, die mit etwa 10% in unserer Bevölkerung vertreten sind. Diese hydroxylieren nicht nur Debrisoquin, sondern eine ganze Reihe von

Arzneimitteln schlechter und besitzen bei normaler Dosierung ein erhöhtes Risiko von Nebenwirkungen (Forth et al., 1996).

Aufgrund dieser Ergebnisse besteht die Vermutung, dass auch für das CYP2B6 genetische Varianten bestehen. Diese Varianten wurden u.a. von Lang et al. (2001) beschrieben.

1.2.4 Enzyminduktion und Enzyminhibition von Cytochrom-P450-Enzymen

1.2.4.1 Enzyminduktion von Cytochrom-P450-Enzymen

Eine große Menge an Arzneimitteln ändert die Aktivität von Enzymen infolge von Stimulierung der Neusynthese, der Induktion. Auch verschiedene Umwelteinflüsse tragen dazu bei. Davon sind vor allem im großen Ausmaß die Enzyme der Leber betroffen. Dies hat Auswirkungen auf alle Cytochrom P450-Enzyme, auch auf das CYP 2B6, da es eine Vielzahl von Fremdstoffen metabolisiert. Die Induktion kann bei wiederholter Zufuhr von Arzneimitteln zu einer Toleranzentwicklung führen. Man spricht dann auch von einer pharmakokinetischen Toleranz. Daraus folgt, dass die Medikamente ihre Wirkung verlieren, die eigentliche Wirkung zu schnell eintritt oder in seiner Stärke begrenzt sein kann. Meist sind die Auswirkungen nach Absetzen des Induktors wieder reversibel. Ein weiteres Charakteristikum ist, dass die Induktion dosisabhängig ist (Barry et Feely, 1990). Der Induktor verändert zunächst seinen eigenen Stoffwechsel. Erst dann verändert er den Stoffwechsel aller Stoffe, die von dem induzierten Enzym metabolisiert werden. Es gibt verschiedene Mechanismen, mit denen ein Induktor eines Enzyms diesen induziert. Der häufigste Mechanismus basiert auf Interaktionen, die die Transkription der Enzyme im Zellkern beeinflusst bzw. beschleunigt.

Die Induktion eines Enzyms weist zudem individuelle Unterschiede auf. Dies kann durch verschiedene Faktoren bedingt sein, wie die unterschiedliche Grundaktivität oder durch individuelle Einflüsse wie Nikotin, Diät, zusätzliche Einnahme von Medikamenten und vieles mehr.

1.2.4.2 Enzyminhibition von Cytochrom-P450-Enzymen

Der Arzneimittelstoffwechsel kann in verschiedener Weise auch gehemmt werden. Dies kann zu gefährlichen Effekten führen, da die Arzneimittel bis hin zu toxischen Konzentrationen akkumulieren können und eine Wirkungsverlängerung und Wirkungssteigerung hervorrufen

können. Die Enzyminhibition erfolgt durch Hemmung der Proteinbiosynthese sowie durch kompetitive als auch nicht-kompetitive Verdrängung aus den Substratbindungsplätzen. Dies kann bis hin zur irreversiblen Hemmung durch reaktive Metabolite führen. Für die hepatischen Monooxygenasen, wie die Cytochrom P450-Enzyme, wird die kompetitive Verdrängung von den Substratbindungsplätzen als wahrscheinlichster Mechanismus diskutiert (Barry et Felly, 1990).

1.2.5 Messung der Enzymaktivität von Cytochrom-P450-Enzymen in vitro

Setzt man ein Organpräparat steigenden Konzentrationen eines Medikamentes aus, so läßt sich ein sogenanntes Sättigungsphänomen beobachten. Zunächst nimmt die Wirkung des Medikamentes linear zu, wird dann zunehmend geringer bis schließlich ein Grenzwert (V_{\max}) erreicht wird, ab dem durch noch so hohe Konzentrationen des Pharmakons eine weitere Wirkung nicht erreicht werden kann. Diese Tatsache und die Kenntnis darüber, daß die Wirkung der meisten Pharmaka reversibel ist und die Pharmaka Komplexe mit Rezeptoren bilden, wird allgemein durch die Michaelis-Menten-Reaktionsgleichung ausgedrückt, die Michaelis-Menten erstmals 1913 beschrieb, und die auch auf die meisten Enzymreaktionen anwendbar ist. Die Gleichung lautet:

$$v = V_{\max} \cdot [S] / ([S] + K_m)$$

v drückt dabei die Reaktionsgeschwindigkeit aus, V_{\max} steht für die Maximalreaktionsgeschwindigkeit, $[S]$ für die Substratkonzentration und K_m für die Michaeliskonstante. Die Reaktionsgeschwindigkeit nähert sich asymptotisch dem Grenzwert V_{\max} und die Michaeliskonstante K_m ist eine für jedes Enzym und jedes vom Enzym umgesetztes Substrat charakteristische Größe, die gleich derjenigen Substratkonzentration entspricht, bei der die halbmaximale Umsatzgeschwindigkeit erreicht wird. Daher lassen sich Aussagen über die Aktivität der entsprechenden Enzyme durch relativ einfache Messungen des Substratumsatzes, bei dessen Sättigung am Enzym, in vitro machen.

1.2.6 Abschätzung der Enzymaktivität in vivo aufgrund von Phänotypisierung und Genotypisierung

1.2.6.1 Phänotypisierung

In vivo kann nur eine geschätzte Angabe über die Aktivität von Enzymen gemacht werden. Bei der Phänotypbestimmung kommen spezifische Substanzen zum Einsatz. Diese Substanzen müssen bestimmte Charakteristika erfüllen. Es müssen Stoffe sein, die ausschließlich von dem zu untersuchenden Enzym, in diesem Fall CYP2B6, katalysiert werden. Der Phänotyp kann sich ändern, wenn in vivo Substrate als Inhibitoren oder Induktoren an dem gleichen Enzym wirken. Indem man die Clearance der Substanz zur Phänotypisierung bestimmt, läßt sich eine näherungsweise Aussage über die vorhandene Enzymaktivität in der Leber machen.

Für einige Enzyme hat man Testsubstanzen zur Phänotypisierung gefunden. Dies sind für das Enzym CYP2D6 z.B. Debrisoquin, Spartein und Dextromethorphan, für das Enzym CYP2C19 Mephenytoin, für das Enzym CYP2C9 Tolbutamid. Watkins (1994) beschrieb für das Enzym CYP3A4 als Phänotypisierungsubstanzen Erythromycin, Alprazolam, Midazolam, Cortisol, Nifedipin, Dapson sowie Lidocain.

In dem in dieser Arbeit untersuchten Enzym CYP2B6 sind als Phänotypisierungsubstanzen die Zytostatika Cyclophosphamid und Ifoshamid (Chang et al., 1993; Code et al., 1997; Jounaidi et al., 1998; May Manke et al., 1999; Roy et al., 1999) sowie Testosteron (Gervot et al., 1999) und das Antidepressivum Bupropion (Ekins et al., 1999; Pollock et al., 1996) beschrieben worden.

1.2.6.2 Genotypisierung

Eine Voraussetzung für die Bestimmung des Genotypes sind bekannte Polymorphismen der DNA. Unter Polymorphismen versteht man monogen vererbte Merkmale, die sich in der Bevölkerung in mindestens zwei Phänotypen manifestieren und zu mindestens 1% vorkommen. Charakteristisch für polymorphe Gene sind Abweichungen in der DNA-Sequenz, die häufig durch Punktmutationen hervorgerufen werden. Diese Punktmutationen kommen spontan oder durch äußere Einflüsse wie z.B. durch Chemikalien oder Umweltbelastungen zustande. Aufgrund dieser Einflüsse kann es zu einem Nucleotidaustausch innerhalb der genetischen Information kommen. Dies führt zu einer Veränderung der Enzymfunktion mit unterschiedlicher Aktivität. Die veränderte Variante wird als „Mutanten“-Phänotyp, der normale bzw. besonders häufige Phänotyp als „Wildtyp“ bezeichnet. Es gibt allerdings auch Mutationen, die stumm

bleiben, d.h. trotz Mutation wird ein Codon in ein synonymes Codon umgewandelt. Eine Mutation kann auch eine Veränderung der Codon-Folge in einem Gen, einem sogenannten „frame-shift“, zur Folge haben. Diese entsteht durch Insertion bzw. Addition sowie durch Deletion bzw. Verlust von einem oder mehreren Nucleotiden. Das führt letztendlich zu einer Störung des Leserasters und damit zu einer veränderten Protein-Synthese. Die unterschiedliche Enzymfunktion bewirkt einen veränderten Abbau von Substanzen. Dies kann somit zu therapeutischen Konsequenzen in der Dosierung von Medikamenten führen. So kann es zu einer reduzierten oder sogar fehlenden, aber auch verstärkten Metabolisierung von Arzneimitteln, Fremdstoffen und körpereigenen Verbindungen kommen. Die verzögerte Ausscheidung einer Substanz kann zum Auftreten von unerwarteten Nebenwirkungen, die verstärkte Metabolisierung einer Substanz sogar zu einem Wirkungsverlust führen.

Polymorphe Gene können also Enzyme mit sehr unterschiedlicher Aktivität codieren. Genetische Polymorphismen sind für einige Cytochrom P450-Enzyme bekannt, wie für das CYP 2A6, CYP 2C9, CYP 2C19 und das CYP 2D6. Für CYP 2B6 sind bisher genetische Polymorphismen von Lang et al. (2001) beschrieben worden.

1.3 Das Enzym Cytochrom P450 2B6

1.3.1 Geschichte und Struktur des Enzyms Cytochrom P450 2B6 (CYP2B6)

Das Enzym Cytochrom P-450 2B6 (CYP2B6) gehört zu der CYP 2B-Familie, die auf dem Chromosom 19 zwischen den Banden 19q12 und 19q13.2 lokalisiert ist (Miles et al., 1988; Santisteban et al., 1988; Hoffman et al., 1995). Die Sequenz von CYP2B6 ähnelt zu 75% bzw. 76% dem CYP 2B1 der Ratte und erstreckt sich über eine Region von annähernd 28 kbp, ähnlich den übrigen Cytochromen der CYP2-Familie (Lang et al., 2001). Es umfasst 9 Exons, die für ein Protein bestehend aus 491 Aminosäuren codieren (Yamano et al., 1989). Das CYP2B6-Gen ist lokalisiert innerhalb einer Gen-Gruppe von 350 kbp zusammen mit verschiedenen Genen und Pseudogenen der CYP2A, CYP2B, and CYP2F-Subfamilie sowie der CYP2B-Subfamilie. Die CYP2B-Subfamilie besteht aus dem funktionellen CYP 2B6-Gen, dem nicht-funktionellen CYP 2B7-Gen und dem CYP2B7-like-Pseudogen (Hoffmann et al., 1995; Miles et al., 1989; Yamano et al., 1989).

1.3.2 Bedeutung des Cytochroms P450 2B6 für den Arzneimittelmetabolismus

Die CYP2B6-Enzyme spielen eine wichtige Rolle in der Metabolisation von endogenen Substraten sowie von Steroiden, Fettsäuren oder Medikamenten (Ryan & Levin, 1990). Lange Zeit war das CYP2B6 eines der am wenigsten untersuchten Cytochrome. Ein Grund dafür war die Annahme, dass das CYP2B6 nur geringfügig durch die Leber exprimiert wird (Yamano et al., 1989; Mimura et al., 1993; Shimada et al., 1994) sowie die geringe Anzahl passender bzw. zur Verfügung stehender Proben (Ekins et al., 1997; Ekins & Wrighton, 1999). Mit Hilfe verschiedener Antikörper wurde das CYP2B6 in den meisten Leberproben entdeckt und eine hohe interindividuelle Variabilität in der Expressierung um das bis zu 100-fache beobachtet (Code et al., 1997; Edwards et al., 1998; Ekins et al., 1998; Gervot et al., 1999).

Extrahepatische Untersuchungen ergaben eine geringfügige Expressierung von CYP2B6 auch in Geweben wie der Niere, der Lunge, dem Intestinaltrakt, dem Uterus, in bronchoalveolären Makrophagen sowie in peripheren Blutlymphozyten (Gonzales et al., 1992; Ekins & Wrighton 1999; Gervot et al., 1999). Miksys et al. (2003) fanden heraus, dass das CYP2B6 auch im menschlichen Gehirn in den Neuronen und Astrozyten exprimiert wird. Bedeutung erfuhr CYP2B6, seitdem bekannt wurde, dass CYP2B6 in der metabolischen Aktivierung und Inaktivierung zahlreicher klinisch wichtiger Arzneimittel eine entscheidende Rolle spielt.

Dies schließt die Zytostatika Cyclophosphamid (Chang et al., 1993) und Ifosphamid (Granvil et al., 1999), das Antiöstrogen Tamoxifen (White et al., 1995; Coller et al., 2002), die Benzodiazepine Diazepam, Temazepam und Midazolam (Ono et al., 1996; Yang et al., 1998; Ekins et al., 1998) sowie den Thrombozytenaggregations-Hemmer Clopidogrel (Coukell & Markham, 1997, Richter et al., 2004) und neuere Arzneimittel wie den zyklischen Nukleotid-Phosphodiesterase-Typ-IV-Inhibitor RP 73401 (Stevens et al., 1997) ein. Weitere Substrate des CYP2B6 sind das in dieser Studie eingenommene Bupropion (Wurm et al., 1996; Hsyu et al., 1997; Faucette et al., 2000; Hesse et al., 2000; Lindley et al., 2000) sowie die Designerdrogen Methylenedioxy-methamphetamin (MDMA, „Ecstasy“) und Methylenedioxy-etham-phetamin (MDEA, „Eve“; Kreth et al., 2000). Desweiteren katalysiert CYP2B6 die N-Demethylierung der Antikonvulsiva S-Mephobarbital und S-Mephenytoin. Letzterer wird auch als Marker für die Aktivität von CYP2B6 benutzt (Heyn et al., 1996; Ekins et al., 1997; Ko et al., 1998; Kobayashi et al., 1999). Weiter Substrate des CYP2B6 sind die Antipyrene (Engel et al., 1996) sowie das tetracyclische Antidepressivum Mianserin (Koyama et al., 1996) und das Anästhetikum Propofol (Oda et al., 2001). Wie oben beschrieben ist die Substratspezifität des CYP2B6-Enzymes sehr

breit. Die Liste der exogenen Substrate vergrößert sich ständig. Zur Darstellung der Vielfalt der Substrate, Inhibitoren und Induktoren gibt die Tabelle 2 eine Auswahl wieder.

Cytochrom P450 2B6 (CYP2B6)		
Substrate	Inhibitoren	Induktoren
Bupropion, Cyclophosphamid, Efavirenz, Ifosfamid, Methadon	Thiotepa, Ticlopidin	Phenobarbital, Rifampicin

Tabelle 2: ausgewählte Substrate, Induktoren und Inhibitoren von CYP2B6 (<http://medicine.iupui.edu/flockhart/table.htm>)

1.3.3 Genetische Varianten des Cytochrom P450 2B6

Ein möglicher genetischer Polymorphismus des Enzyms CYP2B6 wurde erstmals in einer Studie von Lang et al. 2001 beschrieben. In dieser Studie wurden 35 Probanden vollständig in Bezug auf Mutationen bzw. Polymorphismen innerhalb aller 9 Exons analysiert. Es wurden 9 Punktmutationen identifiziert, von denen 5 Punktmutationen zu einem Aminosäureaustausch führen und 4 Punktmutationen „still“ verlaufen. Die 5 Polymorphismen, die beschrieben wurden, führten zu einem Aminosäureaustausch in Exon 1 (C64T, Arg²²Cys), Exon 4 (G516T, Gln¹⁷²His), Exon 5 (C777A, Ser²⁵⁹Arg und A785G, Lys²⁶²Arg) und Exon 9 (C1459T, Arg⁴⁸⁷Cys). Bei dieser Untersuchung von 215 Probanden wurden die einzelnen Mutationen in verschiedenen Frequenzen gefunden. Die Häufigkeiten der Mutationen gibt die Tabelle 3 wieder.

Punktmutationen im CYP 2B6	Häufigkeit (%)
C64T	5,3 %
G516T	28,6 %
C777A	0,5 %
A785G	32,6 %
C1459T	14,0 %

Tabelle 3: Häufigkeit der Mutationen im CYP2B6 anhand von 215 Probanden (nach Lang et al., 2001)

Nach Analyse der Verteilung der Punktmutationen bei 35 Kaukasiern wurden sechs verschiedene Allele von dem CYP2B6-Gen (CYP2B6*2 - *7) definiert. Vier dieser Allele resultieren im Endprodukt mit einem Unterschied von einer Aminosäure vom Wildtyp (CYP2B6*1), während sich ein Allel mit zwei Aminosäuren und ein Allel mit drei Aminosäuren vom Wildtyp unterscheidet. Die genaue CYP2B6-Nomenklatur der in dieser Arbeit untersuchten Allele gibt die Tabelle 4 wieder.

Allel	Protein	Nucleotidaustausch	Effekt	Enzymaktivität in vivo	Enzymaktivität in vitro
CYP2B6*1	CYP2B6.1			Normal	Normal
CYP2B6*2	CYP2B6.2	64C>T	R22C		
CYP2B6*3	CYP2B6.3	777C>A	S259R		
CYP2B6*4	CYP2B6.4	785A>G	K262R		
CYP2B6*5	CYP2B6.5	1459C>T	R487C		
CYP2B6*6	CYP2B6.6	516G>T, 785A>G	Q172H, K262R		
CYP2B6*7	CYP2B6.7	516G>T, 785A>G, 1459C>T	Q172H, K262R, R487C		

Tabelle 4: CYP2B6 Allel – Nomenklatur (nach <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2b6.htm>)

Ariyoshi et al. (2001) zeigten in einem in vitro Versuch, daß die 516G>T (Gln¹⁷²His)-Mutation die katalytische Aktivität des Enzyms CYP2B6 erhöht. Im Kontrast dazu veröffentlichten Lang et al. (2001) eine signifikant reduzierte CYP2B6-Protein-Expression und eine reduzierte S-Mephenytoin-N-demethylase Aktivität bei Trägern der 1459C>T (Arg⁴⁸⁷Cys)-Mutation (Allel *5 und *7). Sowohl diese Studie als auch eine Studie von Hiratsuka et al. (2002) zeigten, dass die 516G>T (Gln¹⁷²His)-Mutation nicht alleine vorkommt, sondern nur in Kombination mit anderen Mutationen innerhalb der kaukasischen und der japanischen Bevölkerung. Die 1459C>T (Arg⁴⁸⁷Cys)-Mutation wurde in der Japanischen Bevölkerung bei sechs Probanden (1,1%) identifiziert. Im Gegensatz dazu wurde die 1459C>T (Arg⁴⁸⁷Cys)-Mutation in 14% der Fälle bei Kaukasiern gefunden (Lang et al., 2001).

1.4 Das Antidepressivum Bupropion

1.4.1 Einführung und Bedeutung des Antidepressivums Bupropion

Bupropionhydrochlorid (= Amfebutamonhydrochlorid) ist ein Antidepressivum der Aminoketonklasse. Es ist nicht verwandt mit den bekannten trizyklischen, tetrazyklischen, selektiven Serotonin-Rückaufnahmehemmer (Richelson E., 1994) oder anderen bekannten Antidepressiva. Es wird daher weitläufig auch als atypisches Antidepressivum bezeichnet. Seit 1988 ist es in den USA zugelassen (Settle, 1998), seit dem Jahr 2000 auch in Deutschland.

Es hat zwei therapeutische Indikationen. Zum einen ist es seine antidepressive Wirkung (DeVane, 1998, Hirschfeld, 1999). Zum anderen konnte gezeigt werden, daß Bupropion zur Unterstützung bei der Nikotinentwöhnung geeignet ist (Farid & Abate, 1998; Ferry, 1999; Shiffman et al., 2000; Pierce & Gilpin, 2002).

Aktuelle Cost-Benefit-Analysen zeigen einen finanziellen Vorteil bei alleiniger Gabe von Bupropion gegenüber einer Nikotinentwöhnung durch nikotinhaltige transdermale Pflaster (NTP) bzw. der Kombination beider (Nielsen & Fiore, 2000). Orale Bupropion Kapseln enthalten 100 oder 150 mg des Wirkstoffes. Die Anfangsdosierung beträgt während der ersten sechs Tage einmal täglich 150 mg. Diese Dosierung wird dann anschließend auf zweimal täglich 150 mg heraufgesetzt. Zwischen den Einzeldosen muß eine Zeitspanne von mindestens acht Stunden liegen.

1.4.2 Wirkungsweise und Indikation des Antidepressivums Bupropion

Bupropion ist strukturell dem Diethylpropion sehr ähnlich. Es ist als 1-(3-chlorophenyl)-2-[(1,1-dimethylethyl)amino]-1-propanonhydrochlorid hergestellt worden. Es hat ein Molekulargewicht von 276,2. Die molekulare Formel lautet $C_{13}H_{18}ClNO \cdot HCl$.

Bupropion ist chemisch mit den Amphetaminen verwandt, insbesondere mit dem als Appetithemmer vermarkteten Amphetamin-Abkömmling Amfepramon. Besonderes Merkmal der Amphetamine ist der aromatische Ring, an dessen Seitenkette an einer bestimmten Position ein Stickstoffatom hängt. Auch Bupropion besteht aus einem aromatischen Ring mit einem Stickstoffatom.

Die genaue neurochemische Wirkung von Bupropion ist bisher im Detail noch nicht geklärt. Es wird angenommen, dass Bupropion seine therapeutische antidepressive Wirkung über eine

Hemmung der neuronalen Aufnahme von Noradrenalin und/oder Dopamin entfaltet (Cooper et al., 1994; Nomikos et al., 1992). Bupropion bewirkt im Rattenhirn eine ausgeprägtere Hemmung der Dopamin-Wiederaufnahme als der Noradrenalin-Wiederaufnahme [Hemmkonzentration, die für eine 50%ige Wirkung benötigt wird (IC_{50}) 2 vs. $5\mu\text{mol/l}$]; dagegen hemmt Bupropion in *in-vivo*-Modellen die Noradrenalin-Wiederaufnahme stärker als die Dopamin-Wiederaufnahme (Ascher et al., 1995). Bupropion ist außerdem ein schwacher Rückaufnahmehemmer von Serotonin in den dorsalen Raphekernen des Menschen. Es ist allerdings kein Monoaminoxidasehemmer (Ascher et al. 1995; Horst & Preskorn, 1998). Ebenso hat es eine geringe anticholinerge Wirkung (Shrier et al., 2000), sowie keinerlei antihistaminerge Wirkung (Ferris et al., 1983). Aus dem chiralen Molekül entsteht neben Threohydrobupropion und Erythrohydrobupropion das durch CYP2B6 gebildete Hydroxybupropion (Abb. 2)

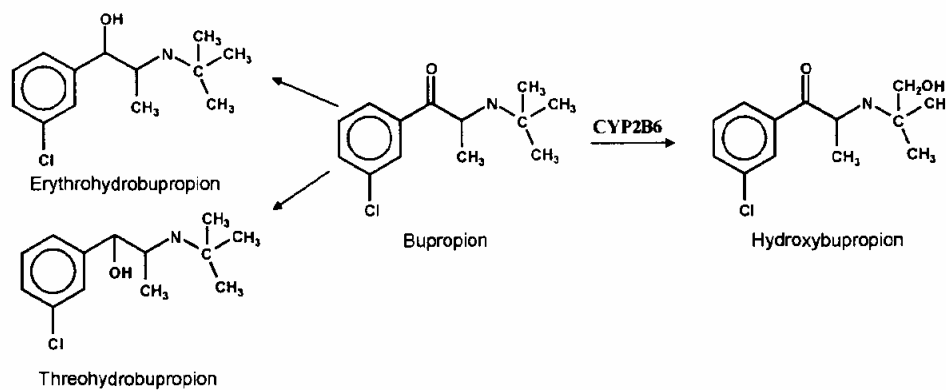


Abbildung 2: Metabolismus von Bupropion

Hydroxybupropion und Threohydrobupropion sind die aktiven Metaboliten von Bupropion. *In-vitro*-Modelle und Tiermodelle zur Untersuchung der Depression zeigten, dass diese Metaboliten pharmakologisch aktiv sind (Holm et al., 2000). Sie tragen zur therapeutischen Wirkung von Bupropion bei (Horst & Preskorn, 1998).

Auch die genaue Wirkung von Bupropion bei der Behandlung zur Nikotinentwöhnung ist im Detail noch nicht bekannt. Man nimmt an, dass Bupropion bestimmte nikotinerge Rezeptoren blockiert. Diese Blockierung der Rezeptoren könnte verantwortlich sein für die Wirkung von Bupropion bei der Behandlung von Nikotinabhängigkeit (Slemmer JE et al., 2000).

Die Erfahrungen nach Einführung von Bupropion an mehr als 6 Millionen Patienten zeigte, dass Bupropion ein sehr geringes Missbrauchspotential aufweist (Ahluwalia JS et al., 1999).

1.4.3 Nebenwirkungen von Bupropion

Als Nebenwirkungen werden zerebrale Krampfanfälle beschrieben (Chapman et Jamrozik, 2002; Wooltorton, 2002). Kontraindiziert ist daher die Einnahme bei Patienten, die an Krampfanfällen leiden oder in der Vergangenheit einen Krampfanfall durchlebt haben. Bei einer Dosis von 300 mg beträgt das Anfallsrisiko 0,4 %, und steigt auf etwa 4 % an, wenn die tägliche Dosis auf 450 bis 600 mg erhöht wird. Zum Vergleich dazu beträgt das Anfallsrisiko für das bisher am besten untersuchte Antidepressivum Imipramin 0,3 % bis 0,6 % (Rosenstein et al., 1993). Bupropion ist außerdem kontraindiziert bei Patienten mit einer derzeitigen oder früheren Diagnose einer Bulimie oder Anorexie. Bei diesen Patienten besteht die Gefahr, daß sie anfälliger für Krampfanfälle sind. Es gibt bestimmte Risikofaktoren, die zur Herabsetzung der Krampfschwelle führen. Dazu gehören:

- Schädel-Hirn-Verletzungen in der Krankheitsgeschichte,
- ein Tumor des zentralen Nervensystems (ZNS),
- gleichzeitige Verabreichung anderer Arzneimittel, von denen bekannt ist, daß sie die Krampfschwelle herabsetzen, z.B. Antipsychotika, Antidepressiva, Theophyllin oder Steroide

Daher darf Bupropion bei Patienten mit diesen Risikofaktoren nur mit äußerster Vorsicht angewendet werden. Es gibt außerdem klinische Umstände, die mit einem erhöhten Risiko von Krampfanfällen einhergehen. Dazu gehören Alkoholmissbrauch, das plötzliche Absetzen von Alkohol oder Benzodiazepinen, Diabetes, der mit zuckersenkenden Arzneimitteln oder Insulin behandelt wird, und die Anwendung von Appetitzüglern.

Bupropion wird über das Enzym CYP2B6 verstoffwechselt. Aufgrund von Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln, die über CYP2B6 verstoffwechselt werden, kann es vermehrt zu Nebenwirkungen kommen. Bei gleichzeitiger Einnahme von Orphenadrin (Arzneistoff zur Behandlung von Muskelverspannungen) oder Cyclophosphamid bzw. Ifosfamid (Arzneistoff zur Behandlung von bestimmten Krebserkrankungen) wurden Nebenwirkungen, wie z.B. Mundtrockenheit, Schlaflosigkeit oder Krampfanfälle beobachtet. Kontraindikationen bestehen in dem Vorhandensein einer Hypersensibilität oder anaphylaktische Reaktionen gegen den Wirkstoff. Als Symptome sind hier zu nennen Hautausschlag, Juckreiz oder Ödeme. Diese Nebenwirkungen sind allerdings sehr selten zu beobachten (McCollom RA et al., 2000).

Die Organverträglichkeit von Bupropion ist gut. Nur in Einzelfällen wurden z.B. ein Anstieg der Serumtransaminasen beobachtet, die zu Symptomen einer akuten Hepatitis führten (Hu KQ et al., 2000). Das Absetzen von Bupropion ließ die Werte allerdings wieder sinken.

Studien, die die Wirkung von Bupropion beim Menschen mit Herzerkrankungen untersuchten, zeigten kaum negative Effekte (Roose SP et al., 1991). Aufgrund der geringen negativen Effekte auf das Herz bietet die Einnahme von Bupropion einen Vorteil gegenüber anderen Antidepressiva. Bei Überdosierungen kam es allerdings, z.B. bei der Einnahme von 1,5 g Bupropion zur Sinustachykardie (Shrier et al., 2000) bzw. bei der Einnahme von 9,0 g Bupropion zu Störungen der Erregungsleitung (Paris PA et al., 1998).

Generell muß beim Menschen mit eingeschränkter Leber- sowie Nierenfunktion mit Nebenwirkungen gerechnet werden, da Bupropion und seine Metaboliten über die Leber verstoffwechselt und über die Nieren ausgeschieden werden. Es kann bei diesen Patienten zu erhöhtem Blut- und Gewebespiegel des Arzneistoffes und seiner Stoffwechselprodukte kommen, und somit zu möglichen Nebenwirkungen führen.

Begrenzte klinische Daten lassen auf eine höhere Nebenwirkungsrate (z.B. Übelkeit, Erbrechen, Ruhelosigkeit) bei Patienten schließen, die zusätzlich dopaminerge Medikamente wie L-DOPA nehmen (Holm und Spencer, 2000). Dies kann zum Überschuss von Dopamin führen und eine Psychose induzieren.

1.4.4 Pharmakokinetik von Bupropion

Hysu et al. (1997) untersuchten die Pharmakokinetik einer Einzeldosis Bupropion an Rauchern und Nichtrauchern. Es zeigten sich keine signifikanten pharmakokinetischen Unterschiede in den beiden Gruppen. Dies lässt die Interpretation zu, dass das Rauchen die Verstoffwechslung von Bupropion und seinen Metaboliten nicht beeinflusst.

Die Testsubstanz Bupropion erreicht ungefähr 2-3 Stunden nach der Einnahme die maximale Plasmakonzentration (C_{\max}). Wird Bupropion mit der Nahrung zu sich genommen, steigt der Wert für C_{\max} um 11% und für die totale Absorption (AUC) um 17%. Diese Verschiebung der Werte hat klinisch allerdings keinen signifikanten Effekt, d.h. die Resorption von Bupropion wird durch eine gleichzeitige Nahrungsaufnahme nicht signifikant beeinflusst. In-vitro-Tests mit Konzentrationen von 200 mg zeigten, dass Bupropion zu 84% proteingebunden wird, vor allem an das Protein Albumin. Die Metaboliten Hydroxypupropion und Threohydropropion binden nur mäßig (77% bzw. 42%). Die Halbwertszeit von Bupropion beträgt bei klinischen Dosen ungefähr

21 Stunden mit einem Schwankungsbereich von +/- 9 Stunden. Ca. 0,5% der Substanz werden unverändert mit dem Urin bzw. mit dem Stuhl ausgeschieden (Findlay JWA et al., 1981). In der Milch stillender Frauen finden sich zudem höhere Bupropion-Konzentrationen als im Plasma dieser Frauen (Briggs et al., 1993). Aufgrund dieser Tatsache soll Bupropion während der Stillzeit nicht eingenommen werden.

Nach der Einnahme von Bupropion entstehen im Körper drei pharmakologisch aktive Metaboliten. Folgende Metaboliten sind identifiziert worden:

- Hydroxybupropion, das durch die Hydroxylation der tert-butyl-Gruppe von Bupropion entsteht,
- sowie die beiden Amino-Alkohole Threohydrobupropion und Erythrohydrobupropion, ein Isomer von Threohydrobupropion.

Diese beiden Metaboliten entstehen durch die Reduktion der Carbonyl-Gruppe von Bupropion. Der Wirkstoff und seine Metaboliten unterliegen einer weiteren Biotransformation zu Meta-Chlorhippuransäure, dem Hauptmetaboliten im Urin (Wurm et al., 1996).

Die Pharmakokinetik von Bupropion unterliegt dabei einem ausgeprägten First-Pass-Stoffwechsel in der Leber. In-vitro-Studien an menschlichen Leber-Microsomen haben gezeigt, dass die Umwandlung von Bupropion in den aktiven Metaboliten Hydroxybupropion durch die Cytochrom P450-(CYP)-Isoenzyme 2B6, 1A2, 2A6, 2C9, 2E1 und 3A4 katalysiert wird (Goodale et al., 1999). In-vitro-Tests belegten dann, dass die Biotransformation von Bupropion zu Hydroxybupropion durch das Enzym Cytochrom P450 2B6 erfolgt (Hesse et al., 2000). Hingegen ist kein Enzym der Cytochrom P450-Familie an der Biotransformation von Threohydrobupropion beteiligt. An diesem Vorgang könnte die Carbonyl-Reduktase beteiligt sein (Goodale et al., 1999). Eine weitere Studie, die den Einfluß des Cytochrom P450 3A4 (CYP3A4) bei der Hydroxylation von Bupropion zu Hydroxybupropion untersuchte, stellte fest, dass CYP 3A4 die Reaktion von Bupropion zu Hydroxybupropion nicht signifikant katalysiert (Hesse et al., 2000). Diese Daten komplementieren die Ergebnisse von Studien, die die These stützen, dass CYP2B6 selektiv die Hydroxylation von Bupropion zu Hydroxybupropion katalysiert (Faucette et al., 2001).

Somit kann die Hydroxylation von Bupropion zu Hydroxybupropion als Indexreaktion für die Aktivität von CYP 2B6 genutzt werden. Die Wirkstärke der Metaboliten in bezug zu der Muttersubstanz ist noch nicht vollständig charakterisiert worden. Allerdings sind die Plasmakonzentrationen der Metaboliten höher als die Plasmakonzentration von Bupropion, und

somit klinisch von großer Bedeutung. Der Metabolit Hydroxybupropion erreicht nach einmaliger oraler Gabe nach ungefähr 6 Stunden seinen Spitzenplasmaspiegel und hat eine Halbwertszeit von ungefähr 20 Stunden, mit einem Schwankungsbereich von +/- 5 Stunden. Die totale Absorption (AUC) von Hydroxybupropion ist ca. 17fach erhöht im Vergleich zu der Muttersubstanz Bupropion. Auch die Metaboliten Threohydrobupropion und Erythrohydrobupropion erreichen ihren Spitzenplasmaspiegel ähnlich wie Hydroxybupropion nach 6 Stunden. Allerdings sind die Halbwertszeiten der beiden Metaboliten wesentlich länger. So beträgt die Halbwertszeit von Threohydrobupropion ca. 37 (+/- 13) Stunden und für Erythrohydrobupropion ca. 33 (+/- 10) Stunden. Auch die totale Absorption ist 7fach für Threohydrobupropion und 1,5fach für Erythrohydrobupropion im Vergleich mit der Substanz Bupropion deutlich erhöht.

Viele Antidepressiva werden durch das Cytochrom P 450 2D6 (CYP2D6) verstoffwechselt bzw. inhibiert. Studien, die untersuchen wollten, ob CYP2D6 auch einen Einfluss auf die Metabolisierung von Bupropion hat, zeigten, dass es nicht durch CYP2D6 metabolisiert bzw. inhibiert wird (Pollock et al., 1996). Man fand keinen Zusammenhang zwischen CYP2D6 und den Metaboliten Threohydrobupropion und Erythrohydrobupropion. Lediglich die Konzentration des Metaboliten Hydroxybupropion war bei den sog. „poor metabolizern“ von CYP2D6 stark erhöht. Obwohl Bupropion nicht durch CYP2D6 metabolisiert wird, inhibiert Bupropion und Hydroxybupropion CYP2D6. Daher kann es zu Interaktionen kommen, wenn Bupropion in Verbindung mit Medikamenten verabreicht wird, die über CYP2D6 verstoffwechselt werden, z.B. Beta-Blocker (z.B. Metoprolol), Antidepressiva (z.B. Desipramin, Imipramin, Paroxetin), Antipsychotika (z.B. Risperidon, Thioridazin). Es kann zu schwerwiegenden Nebenwirkungen kommen, wenn diese Arzneistoffe zusätzlich eine geringe therapeutische Breite aufweisen. Gegebenenfalls muss dann mit der Medikation im unteren Dosierungsbereich begonnen werden, um gefährliche Nebenwirkungen zu vermeiden.

Ergebnissen an Patienten mit affektiven Störungen zufolge induziert Carbamazepin den Metabolismus vom Bupropion (Ketter et al., 1995; Popli et al., 1995).

1.5 Herleitung der Aufgabenstellung

Es soll die Bedeutung genetischer Polymorphismen des Enzyms CYP2B6, in diesem Fall CYP2B6*1-*7) hinsichtlich der Pharmakokinetik und Wirkung des Antidepressivums Bupropion und des aktiven Metaboliten Hydroxybupropion anhand von 121 gesunden männlichen

Probanden in einer kontrollierten klinischen Studie untersucht werden. Mit dieser Studie ist beabsichtigt worden, die pharmakokinetischen Veränderungen von Bupropion in einer großen homogenen Population zu charakterisieren. Ziel ist es herauszufinden, wie viel dieser pharmakokinetischen Veränderungen durch eine Auswahl genetischer Varianten des metabolisierenden Enzyms CYP2B6 zu erklären sind.

Hauptzielgröße ist die totale Clearance von Bupropion. Diese wird errechnet aus der verabreichten Dosis und der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) von Bupropion. Die zu erwartenden Unterschiede in der AUC sollen dazu dienen, Dosisempfehlungen gemäß dem jeweiligen Genotyp aussprechen zu können.

Es soll diskutiert werden, welche Vorteile sich aus einer routinemäßigen Genotypisierung von CYP2B6 für eine medikamentöse Therapie ergeben könnten.

2 Material und Methoden

2.1. Probandenrekrutierung und Studiendurchführung

2.1.1 Studiendesign

Dieser Arbeit liegt eine kontrollierte prospektive Studie zugrunde, in deren Rahmen 121 gesunden Probanden, die in Abhängigkeit ihres CYP2B6-Genotypes analysiert wurden, über einen Zeitraum von 36 Stunden das Antidepressivum Bupropion verabreicht wurde. Die Studie wurde nach Zustimmung der lokalen Ethikkommission gemäß den Richtlinien der Good Clinical Practice am Institut für klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Charité in Berlin durchgeführt. Die teilnehmenden Probanden wurden durch die studienbetreuenden Ärzte schriftlich und mündlich aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an der Studie.

2.1.2 Probandenrekrutierung und Einschlusskriterien

Nach Vorliegen der schriftlichen Einverständniserklärung wurden freiwillige, gesunde, männliche Probanden im Alter zwischen 18 und 45 Jahren in die Studie eingeschlossen. Ein Normalgewicht $\pm 15\%$ gemäß der Broca-Tabelle, keine pathologischen Befunde bei der Blutdruckmessung, bei der EKG-Messung sowie bei der Blutuntersuchung mit Routine-Labor waren Voraussetzung zur Studienteilnahme.

Alle Teilnehmer waren Nichtraucher oder sollten mindestens 3 Monate vor Studienbeginn nicht geraucht haben.

Da sich diese Studie mit genetischen Untersuchungen zum Arzneimittelstoffwechsel befaßt, mußten alle Studienteilnehmer aus einer einheitlichen Population, in diesem Falle kaukasischer Abstammung, kommen. Damit verringert sich das Risiko systematischer Fehler in der Studie.

Es wurde eine Anamnese, eine allgemeinärztliche körperliche Untersuchung sowie ein Routinelaborscreening durchgeführt. Im Rahmen dieser Laboruntersuchung wurden als Parameter ASAT, ALAT, γ -GT, AP, Gesamt-Bilirubin, Kreatinin, Hämoglobin, Quick-Wert, Albumin, Hämatokrit, Erythrozytenzahl und die Leukozytenzahl bestimmt.

Darüber hinaus wurde ein EKG vor Studienbeginn durchgeführt. Die Probanden erhielten eine schriftliche und mündliche Erläuterung zu Studieneinschränkungen und Ernährungshinweisen.

2.1.3 Ausschlusskriterien

Frauen wurden aus dieser Studie ausgeschlossen aufgrund ihres hormonellen Status. Östrogene, speziell während der Menstruation, beeinflussen den Leberstoffwechsel und können so zu veränderten Werten führen.

Desweiteren wurden ausgeschlossen:

- Probanden mit Störung der Leber- und/oder Nierenfunktion
- Probanden mit bekannter kardialer Vorschädigung
- Probanden mit Zustand nach Operationen des Magen-Darm-Traktes außer Appendektomie
- Probanden, die innerhalb der letzten zwei Monate an einer anderen Studie teilgenommen hatten oder innerhalb der letzten vierzehn Tage vor Studienbeginn Blut gespendet haben
- Probanden, die regelmäßig zusätzliche Medikamente zu sich nehmen
- Raucher bzw. Probanden, die sonstige Formen von Drogen konsumieren
- Probanden mit sonstigen somatischen Erkrankungen (z.B. einem bekanntem Tumorleiden, Hepatitis B- oder C –Virus Infektion, HIV-Infektion, TBC, Asthma bronchiale)
- Probanden mit neurologischen (insb. Anfallsleiden) bzw. psychischen Erkrankungen
- Probanden mit Schädel-Hirn-Traumata in der Anamnese
- Probanden mit einer Arzneimittelallergie
- Probanden, bei denen ein klinischer Befund oder eine bevorstehende Therapie nach Ansicht des Studienarztes eine Teilnahme an der Studie beeinträchtigen könnte
- Probanden, die nicht kaukasischer Abstammung waren

Die Ausschlusskriterien wurden durch einen Anamnesebogen überprüft, den der Proband selbst ausfüllen und unterschreiben mußte, sowie durch eine Anamnese und körperliche Untersuchung des Studienarztes.

Die Probanden konnten auch nach Beginn der Studie noch von der Teilnahme ausgeschlossen werden, wenn:

- nicht zu tolerierende unerwünschte Nebenwirkungen durch das Medikament auftraten
- eine Erkrankung des Probanden eintrat, die eine zusätzliche Medikation erforderte
- die Compliance des Studienteilnehmers unzuverlässig war (dazu zählen das Fernbleiben von Blutabnahmen, unzuverlässige Medikamenteneinnahme, usw.)

- sonstige somatische Erkrankungen auftraten
- nachträglich festgestellt wurde, dass Einschlusskriterien nicht erfüllt wurden
- der Proband wünschte, die Studie abzubrechen

2.1.4 Art und Dosis des verwendeten Arzneimittel

Die zu untersuchenden Substanz wurde als orale Einmaldosis verabreicht. Die Probanden erhielten zu den jeweiligen Terminen 150 mg Bupropion (Wellbutrin[®] 75 mg, Fa. GlaxoWellcome). Dabei wurden den Patienten 2 Tabletten à 75 mg verabreicht.

2.1.5 Diätetische Maßnahmen

Jeweils drei Tage vor Einnahme eines Medikamentes bis nach der letzten Blutentnahme mussten die Teilnehmer auf den Genuss von Alkohol und Grapefrüchten verzichten.

Während der Dauer der Studie sollte darüber hinaus der Verzehr xanthin-haltiger Speisen (Bananen, Schokolade) und Getränke (Kaffe, Tee, Cola) aufgrund der bekannten enzyminduzierenden Wirkung von Xanthinen auf Cytochrom P450 eingeschränkt werden und zwölf Stunden vor Beginn der Studie bis nach der letzten Blutentnahme vollständig unterbleiben.

Der Gebrauch von Nikotin und Drogen war über die gesamte Dauer der Studie untersagt.

Die Probanden sollten über einen Zeitraum von 10 Stunden vor bis zwei Stunden nach Einnahme des Antidepressivums nüchtern bleiben. In dieser Zeit durfte Mineralwasser getrunken werden.

2.1.6 Überprüfung der Patientencompliance und Vorsichtsmaßnahmen

Die Studienteilnehmer verpflichteten sich nach ausführlicher Aufklärung schriftlich, die Studieneinschränkungen einzuhalten. Unmittelbar vor der Einnahme der Testsubstanz wurden die Probanden zu ihrem aktuellen gesundheitlichen Zustand sowie diätetischen Maßnahmen befragt. Sie wurden darauf hingewiesen, dass im Verdachtsfall Blut- und Urinkontrollen zur Überprüfung ihrer Angaben durchgeführt und sie im Falle eines positiven Testergebnisses mit sofortiger Wirkung aus der Studie ausgeschlossen werden würden. Die Medikamentenapplikation erfolgte im Beisein eines Arztes.

Alle Probanden waren vor Studienbeginn über die häufigsten Nebenwirkungen ausführlich aufgeklärt und schriftlich informiert worden. Ebenso wurde ihnen mitgeteilt unter welcher Telefonnummer der Studienarzt und Studienleiter während der gesamten Untersuchung erreichbar sei.

2.1.7 Studienablauf

Die Messung der Medikamentenkonzentration bei den Probanden erfolgte an zwei aufeinanderfolgenden Tagen unter der Aufsicht eines Studienarztes innerhalb von 34 Stunden. Nach den laborchemischen Voruntersuchungen und des EKG, die in der Woche vor Beginn der Studie durchgeführt wurden, wurde am Tag 1 der Studie jedem Probanden jeweils 8 ml Blut in ein EDTA-Röhrchen zur Genotypisierung, 8 ml Blut in ein EDTA-Röhrchen zur Bestimmung des Basiswertes für die pharmakokinetische Konzentrationsmessung sowie 16 ml Blut zur Messung der m-RNA in den Leukozyten in 2 Vacutainer-Röhrchen abgenommen. Anschließend wurde den Probanden unter Aufsicht eines Studienarztes eine einmalige Dosis von 150 mg des Arzneimittels Bupropion in Form von 2 oralen Kapseln à 75 mg verabreicht. Die zweite Messung erfolgte dann 2 Stunden nach der Bupropion-Einnahme. Da nach 2 Stunden mit dem ungefähren Spitzenplasmaspiegel von Bupropion im Blut zur rechnen war, wurde von jedem Probanden ein EKG geschrieben, um gegebenenfalls kardiale Veränderungen festzustellen. Im Anschluß an diese Messung durften die Studienteilnehmer essen. Nach 5 Stunden, sowie nach 9 Stunden wurde erneut Blut in ein EDTA-Röhrchen für die Bestimmung des Bupropionspiegel abgenommen. Am Tag 2 wurde den Probanden 24 bzw. 34 Stunden nach Einnahme der Testsubstanz jeweils ein EDTA-Röhrchen Blut zur Bestimmung des Plasmaspiegels von Bupropion abgenommen. Der genaue Ablauf der Studie ist in Tabelle 5 dargestellt. Das Gesamtvolumen des entnommen Blutes betrug 84 ml pro Proband.

Tag	Zeit	Arzneimittelgabe/Blutentnahme
Tag -10 bis -2	Vormittags	Anamnese, Aufklärung über die Studie, laborchemische Voruntersuchungen (Blutentnahme 12 ml), EKG
Tag 1	ca. 8:30 Uhr	Blutentnahme: 1 x 8 ml (Genotypisierung), 2 x 8 ml (zur Isolierung der m-RNA aus Leukozyten), 1 x 8 ml als Nullwert für die Pharmakokinetik
Tag 1	ca. 09:00 Uhr	Einnahme von 150 mg Bupropion
Tag 1	ca. 11:00 Uhr	Blutentnahme: 1 x 8 ml (Pharmakokinetik) und EKG
Tag 1	ca. 14:00 Uhr	Blutentnahme: 1 x 8 ml (Pharmakokinetik)
Tag 1	ca. 18:00 Uhr	Blutentnahme: 1 x 8 ml (Pharmakokinetik)
Tag 2	ca. 09:00 Uhr	Blutentnahme: 1 x 8 ml (Pharmakokinetik)
Tag 2	ca. 19:00 Uhr	Blutentnahme: 1 x 8 ml (Pharmakokinetik)

Tabelle 5: Zeitschema der Untersuchungen, Medikamenteneinnahmen und Blutabnahmen der Studie

2.1.8 Erfassung von Nebenwirkungen

Während der Kinetikmessungen aufgetretene Nebenwirkungen wurden insgesamt zweimal erhoben. Um kardiale Nebenwirkungen zu erfassen, wurde vor der Gabe von Bupropion sowie 2 h danach ein EKG geschrieben. Zur Erfassung weiterer unerwünschter Nebenwirkungen wurden die Probanden zu den gleichen Zeitpunkten bezüglich Vigilanz, Nervosität, Akkomodationsvermögen, Schüttelfrost, Schwitzen, Zittern, Kopfschmerzen, Schwindel, Herzklopfen, Übelkeit und Mundtrockenheit befragt. Alle Nebenwirkungen wurden schriftlich dokumentiert.

2.1.9 Dokumentation der Studie

Die erhobenen Daten (Anamnese, Laborergebnisse, unerwünschte Arzneimittelnebenwirkungen, Blutentnahme- und Laborprotokolle) wurden in *Case Report Forms (CRFs)* eingetragen. Diese werden für 15 Jahre zusammenhängend im Institut für Klinische Pharmakologie der Charité aufbewahrt. Eine Entnahme einzelner Blätter ist nicht gestattet.

2.1.10 Datenschutz und Vertraulichkeit der Daten

Die Probandendaten wurden in anonymisierter Form erhoben. Jeder Proband erhielt eine individuelle Code-Nummer. Die Zuordnung von Proband und Code ist nur den an der Studie mitarbeitenden Doktoranden und Ärzten bekannt und wird nicht an Dritte weitergegeben. Die Daten sind computergestützt verwaltet und gespeichert. Ein Datenzugriff Anderer auf die personenbezogenen Daten ist nur nach Genehmigung durch die Probanden selbst möglich.

2.1.11 Fehlerminimierung

Eine Blindung der Studie wurde nicht vollzogen, da die Hauptzielgröße der Studie, der Plasmamedikamentenspiegel, nicht von der subjektiven Wahrnehmung der Probanden oder Studienärzte abhängig ist. Subjektiv erhobene Daten zu den Medikamentennebenwirkungen wurden dokumentiert, besitzen jedoch keine Beweiskraft. Um die Varianz der Enzymaktivität durch andere als die genetischen Faktoren möglichst gering zu halten, wurde die Studie nach eng definierten Kriterien strukturiert. Nur Nichtraucher, Personen im Alter zwischen 18 und 45 Jahren, Männer und Körpergewicht in relativ engen Grenzen wurden in die Studie eingeschlossen.

2.1.12 Versicherungsschutz

Gemäß den Vorschriften des Arzneimittelgesetzes waren die Probanden über 1.000.000 DM (500.000 €) gegen bei Blutentnahmen möglicherweise auftretende Schäden sowie gegen die nicht therapeutisch indizierte Einnahme der Testsubstanz versichert.

Die Versicherung wurde bei der *Gerling Industrie-Service GmbH, Düsseldorf* abgeschlossen.

2.1.13 Weiterverarbeitung und Aufarbeitung der Proben zur Messung der Medikamentenplasmakonzentrationen

Die Blutproben wurden unmittelbar nach der Entnahme zehn Minuten bei 5000 U/min zentrifugiert.

Das so gewonnene Blutplasma wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C in Eppendorf-Cups gelagert.

2.2 Durchführung der Genotypisierung

Zur DNA-Extraktion wurde pro Proband etwa 5 ml venöses Blut einer aufgetauten EDTA-Monovette benötigt. Die zu untersuchende DNA konnte dann aus den kernhaltigen Leukozyten gewonnen werden.

2.2.1 Erythrozytenlyse

Zur Vorbereitung der DNA-Extraktion mussten zunächst die Leukozyten von den Erythrozyten aus dem Vollblut getrennt werden. Zuvor wurden die vorher bei -20 °C kryokonservierten Proben bei Raumtemperatur für eine Stunde aufgetaut und anschließend 5 ml des Vollblutes aus dem EDTA-Röhrchen in ein 50 ml großes Kunststoffröhrchen (Falcon-Gefäß) überführt. Nachdem alle Blutproben in die Falcongefäße überführt wurden, wurden die Gefäße mit 35 ml Ery-Lyse-Puffer versetzt und anschließend von Hand gemischt. Durch diesen Vorgang werden die kern- und DNA-losen Erythrozyten zerstört, während kernhaltige Blutbestandteile aufgrund ihrer höheren Membranstabilität intakt bleiben. Danach wurden die Proben für mindestens 30 Minuten bei 2000 U/min und 4° C (Beckmann-Zentrifuge) zentrifugiert. Damit wurde das DNA-haltige Zellsediment isoliert. Im nächsten Schritt wurde der Überstand vorsichtig abgegossen und verworfen.

Am Boden der Falcon-Gefäße befand sich das Sediment mit den kernhaltigen Zellen. Die kernlosen Zellen wurden während der Zentrifugation zerstört. Abschließend wurden alle Röhrchen mit 1,5 ml TEN-Puffer (bestehend aus Tris/HCl, EDTA und NaCl) zugesetzt und bei 20° C bis zur DNA-Extraktion eingefroren. Alle Reagenzien der Erythrozytenlyse sind in der Tabelle 6 wiedergegeben.

Puffer	Ansatz/Hersteller
10 x Erythrozytenlysepuffer	61,5 g Ammoniumchlorid (MG 53,49 g/mol)(Fa. Merck), 10 g Kohlenstoffdioxid (MG 100,15 g/mol)(Fa. Merck), 372 mg EDTA (MG 372,2 g/mol)(Fa. Calbiochem), 600 ml H ₂ O (Deionat) lösen, auf 1 Liter auffüllen und autoklavieren
1 x Erythrozytenlysepuffer	100 ml 10 x Ery-Lyse-Puffer + 900 ml H ₂ O
10 x TEN-Puffer	24,2 g Tris/HCl (MG 121,12 g/mol)(Fa. Merck), 7,4 g EDTA (MG 372,2 g/mol), 17,5 g NaCl (MG 58,44 g/mol), 600 ml H ₂ O lösen, auf 1 Liter mit H ₂ O auffüllen und autoklavieren
NaCl	Fertigprodukt der Firma Merck LOT: K22393704
1 x TEN-Puffer	100 ml 10 x TEN-Puffer + 900 ml H ₂ O

Tabelle 6: Chemikalien und Lösungen zur Lyse der Erythrozyten

2.2.2 DNA-Extraktion

Nach der Trennung der Erythrozyten von den Leukozyten in der Erythrozytenlyse musste die DNA in mehreren Schritten aus den Leukozyten herausgelöst werden.

Zunächst wurden die Zellsedimente aus der Erythrozytenlyse in sterile Plastikgefäße (PP-Röhrchen, Fa. Greiner) in jeweils 1,5 ml Lysis-Puffer und 100 µl Proteinase-K-Lösung verdaut. Anschließend verblieben sie bei 37° C für 12 h im Überkopfschüttler. Zur Ausfällung der Proteine versetzte man das Reagens mit 1,5 ml Phenol/Chloroform-Lösung (Fa. Applied Biosystems, Nr. 8). Im Anschluss wurden die Proben für 2 Stunden in den Überkopfschüttler gestellt und für 10 Minuten bei 2500 U/min bei Raumtemperatur in der Beckmann-Zentrifuge Modell GS-8R zentrifugiert.

Es entstand eine obere wässrige Phase und eine untere lipidhaltige Phase. Von der oberen wässrigen Phase wurden mindestens 2 ml mit einer Einmalpipette vorsichtig abpipettiert und im Rahmen der Chloroform-Nachextraktion mit 1,5 ml Chloroform versetzt.

Die Proben wurden für 30 Minuten in die Überkopfschüttler gestellt und dann für 10 Minuten bei 2500 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert.

Im folgenden Arbeitsschritt wurde die DNA präzipitiert. 2 ml des Überstandes wurden auf Gefäße mit vorgelegten 6 ml 96%-igen Ethanol und 100 µl 3M Natrium-Acetat (pH 5,5) überführt. Anschließend wurden alle Röhrchen fest verschlossen und mit der Hand kräftig geschüttelt, bis

die DNA ausgefällt war. Dann wurden die Proben für 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgegossen, die DNA durch Zugabe von 3 ml 70%-igem Ethanol gewaschen und anschließend wieder für 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert, um die erhaltene DNA zu reinigen. Der Überstand wurde abgegossen und die am Grund befindliche DNA auf dem Kopf stehend für 30 Minuten getrocknet.

Jedem Gefäß wurden 200 µl TE-Puffer, bestehend aus 10 mM Tris/HCl und 0,1 mM EDTA, zugesetzt und für 12 h bei 55°C geschüttelt, um die gereinigte DNA wieder zu lösen. Abschließend wurde die DNA in TEN-Puffer (10 mM Tris-Puffer/1 mM EDTA, pH 8) aufgelöst und bei 4° C bis zur PCR in sterilen Reaktionsgefäßen aufbewahrt. Die Lösungen und Chemikalien der DNA-Extraktion gibt die Tabelle 7 wieder.

Lösungen/Puffer	Ansatz/Hersteller
20 mM TRIS/HCL	20 ml 100 mM TRIS(HCL (Fa. Merck)
Proteinase-K-Lösung	Je Probe 2 mg Proteinase K (Fa. Roche) in 100ml 20 mM TRIS-HCL-Puffer
Lysis-Puffer	Fertigpuffer Fa. Applied Biosystems, Nr.9
Phenollösung	Fertigpuffer Fa. Applied Biosystems, Nr.8
Chloroform-Lösung	Fa. Merck
96%iger und 70%iger Ethanol	Fa. Merck
3 M Natriumacetat	40,8 g Natriumacetat (MG=136,1 g/mol) (Fa. Merck) + 50 ml H ₂ O, ph mit Eisessig auf 5,5 einstellen, auf 100 ml mit H ₂ O auffüllen und autoklavieren
TE-Puffer	10 mM TRIS/HCL und 0,1 mM EDTA (Fa. Calbiochem) (aus 10 ml 100 mM TRIS/HCL + 10 µl 100mM EDTA + 90 ml H ₂ O, ph mit 0,1 NaOH auf 7,6 einstellen und autoklavieren)

Tabelle 7: Chemiekalien und Lösungen zur DNA-Extraktion

2.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR ist ein in-vitro-Verfahren zur Vervielfältigung bzw. Amplifikation von DNA-Sequenzen. Bei diesem Verfahren wird das Prinzip der DNA-Polymerasen genutzt. Die DNA-Polymerasen sind in der Lage, mit Hilfe eines RNA-Einzelstrang als Matrize einen DNA-Doppelstrang herzustellen. Zur Durchführung einer PCR wird zum einen ein Thermocycler, der

die vollautomatische Steuerung von Temperaturzyklen gewährleistet, und zum anderen eine hitzestabile DNA-Polymerase (sog. *Taq*-Polymerase), die bei Temperaturen von 90-95° C nicht denaturiert, benötigt. Als Starthilfe der PCR dienen einzelsträngige Oligonukleotidprimer, die an komplementäre Enden der Sequenzen einer DNA-Matrize (Template) binden können. Die sog. *Taq*-Polymerase, eine geringe Menge doppelsträngiger DNA, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und zwei DNA-Startmoleküle werden im Rahmen der PCR in einer geeigneten Reaktionspufferlösung inkubiert. Die Aufgabe der DNA-Polymerase ist es, Primer in 5'-3'-Richtung entlang einsträngiger, denaturierter DNA-Matrizen in Vorwärts- oder Rückwärtsrichtung zu verlängern. Die Sequenzen der dabei entstehenden DNA-Abschnitte sind komplementär zu denen ihrer Matrize. Die DNA-Abschnitte werden temperaturgesteuert in Reaktionszyklen amplifiziert.

Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten. Im ersten Schritt werden beide Stränge der DNA durch Temperaturerhöhung auf 94° C getrennt (sog. Denaturierung). Nach Abkühlung auf 57-60° C binden die Primer im nächsten Schritt an die entsprechenden Stellen der einsträngigen DNA-Matrize (Hybridisierung). Im dritten Schritt erfolgt bei einer für die Funktion der DNA-Polymerase optimalen Reaktionstemperatur die Verlängerung der Primer und die Synthese komplementärer DNA-Sequenzen (DNA-Synthese). Am Ende liegen zwei neu synthetisierte Doppelstränge vor, die zunächst noch keine definierte Länge haben. Da sie aber im nächsten Zyklus selbst als Matrizen verwendet werden und an ihren Enden die Oligonukleotidsequenz der Primer tragen, entstehen ab dem dritten Durchlauf nur Produkte gewünschter Länge. Ab dem vierten Durchlauf erfolgt eine exponentielle Amplifizierung der Zielsequenz. Nach über 30 Durchläufen liegt die DNA theoretisch 2^{30} mal vor. Der Vorteil an dieser Synthesemethode ist, dass die *Taq*-Polymerase hitzestabil ist und somit die aufeinander folgenden Denaturierungs- und Hybridisierungsschritte einander abwechseln können, ohne dass zwischendurch neues Enzym beigelegt werden muss. Das Prinzip der PCR gibt die Abbildung 3 wieder.

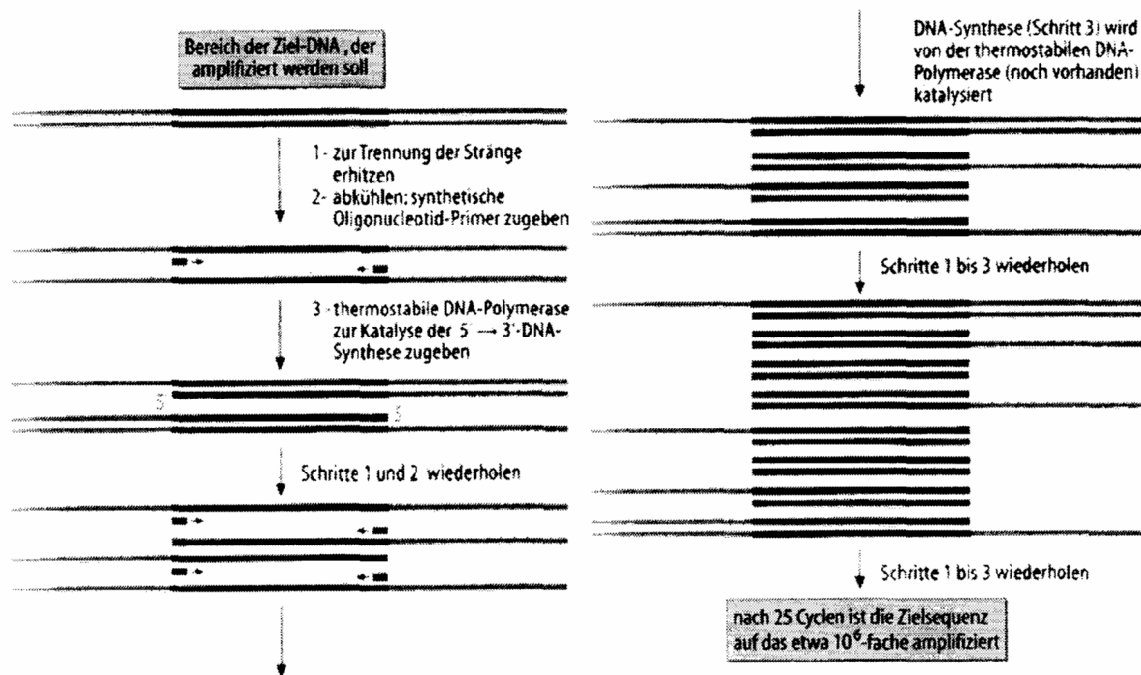


Abbildung 3: Amplifizierung einer spezifischen DNA-Sequenz durch die Polymerase-Kettenreaktion (Löffler, 2001)

2.2.4 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)

Nach der PCR wird das Verfahren der RFLP-Analyse eingesetzt. Mit Hilfe dieses Verfahrens können die Genotypen durch Basenpaarmuster ablesbar gemacht werden. Dafür werden bestimmte Restriktionsendonukleasen eingesetzt, die die PCR-Produkte verdauen und sie entsprechend ihrer Genotypen zerschneiden. Dabei entstehen DNA-Fragmente ähnlicher Länge. Punktmutationen in der DNA können dazu führen, dass ursprüngliche Schnittstellen nicht mehr erkannt werden oder zusätzliche Schnittstellen entstehen. Das Vorliegen unterschiedlich langer DNA-Fragmente nach Verdau durch Restriktionsenzyme wird als Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus bezeichnet. Die vervielfältigte und geschnittene DNA kann im nächsten Schritt durch die Agarosegelelektrophorese untersucht werden. Hierbei wandern die Fragmente abhängig von ihrer Größe unterschiedlich schnell durch die netzähnlichen Polysaccharidstrukturen des Agarosegels und werden schließlich durch intercalierende Farbstoffe wie Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Dieses Verfahren dient der gezielten Suche bekannter Mutationen mithilfe spezifischer Enzyme, wie beispielsweise der dieser Arbeit zugrunde liegende CYP2B6-Polymorphismus.

2.2.5 Bestimmung des CYP2B6-Allels durch den PCR-RFLP-Test

Die Bestimmung der CYP2B6-Allele erfolgte mittels PCR-RFLP-Tests, wie sie von Lang et al. (2001) beschrieben worden sind. Zur Bestimmung des Cytochroms P450 2B6-Genotypes wird 0,5 µl genomischer DNA 20 µl des in der Tabelle 10 beschriebenen PCR-Mastermix zugesetzt. Im Thermocycler wird die DNA danach in 35 Zyklen amplifiziert. Die erfolgreiche Durchführung der PCR wird im nächsten Schritt kontrolliert, indem 10 µl PCR-Produkt auf 2% Agarosegel aufgetragen werden, woraufhin nach Elektrophorese in einer Protrans-Kammer für 40 min bei 120 Volt im Fall von CYP2B6 Exon 1 eine 258 bp-Bande, im Fall von CYP2B6 Exon 4 eine 354 bp-Bande entstehen sollte. Im Erfolgsfall werden 10 µl PCR-Produkt mit 10 µl Enzymmastermix versetzt und über Nacht bei 37° C schüttelnd inkubiert.

Zur Auswertung in der Elektrophorese wird die Probe auf 2% Agarosegel aufgetragen und für 40 min bei 120 Volt aufgetrennt. Die entstehenden Restriktionsmuster für die unterschiedlichen Genotypen können dann abgelesen werden.

Chemikalie	Hersteller
dNTP's	Fa. Radipozym
PCR-Primer	Fa. TIB MOLBIOL
DNA-Polymerase	Fa. Biotherm
10 x PCR-Puffer	Fa. Perkin Elmer
50mM MgCl ₂	Fa. Perkin Elmer
Restriktionsendonuklease Bsp 143 II, Bsr I, Bgl II	Fa. MBI Fermentas
Agarose ultrapure	Fa. Gibco BRL
DNA-Standard: 4,5 ml 100 bp-DNA-Leiter	Fa. MBI Fermentas
Bromphenolblaupuffer	Fa. Merck
Ethidiumbromid	Fa. Merck

Tabelle 8: Chemikalie für die PCR-RFLP-Tests

Gerät	Hersteller
Thermocycler GeneAmp PCRSystem 9600/9700	Fa. Perkin Elmer/Fa. Applied Biosystems
Videosystem Eagle Eye II	Fa. Stratgene
Zentrifugen	Fa. Eppendorf, Fa. Beckmann
Inkubationsschränke	Fa. Biometra
Halbautomatische Schüttler	Fa. Hoefler, Fa. Heidolph
Elektrophorese-Kammern und –schlitten	Fa. Protrans

Tabelle 9: Geräte für die PCR-RFLP-Tests

CYP2B6*1			
PCR-Mastermix	10 x Perkin Elmer Puffer 2 µl dNTPs 2 µl Primer E1-F02 0,5 µl Primer E1-R01 0,5 µl MgCl ₂ (50 mM) 0,5 µl Biotherm Polymerase 0,2 µl H ₂ O (steril, bidest) 14,3 µl		
Cycler	2 min 94°C – 35 x (40 s 94°C – 40 s 66°C – 2 min 72°C) – 7 min 72°C		
Restriktionsenzym	Bsp 143II		
Enzymmastermix	7,6 µl H ₂ O 2,0 µl Puffer Y Tango 0,4 µl Bsp 143II		
Codierung	0	1	2
Muster (bp)	-	258	258
	169	169	-
	89	89	-

Tabelle 10: Durchführung und Ergebnis von PCR-RFLP exemplarisch von CYP2B6*1

2.3 Bestimmung von Medikamentenkonzentrationen mittels HPLC-Analyse

2.3.1 Prinzip der Bestimmung von Medikamentenkonzentrationen mittels HPLC-Analyse

2.3.1.1 Extraktion

Zunächst muss vor der eigentlichen Konzentrationsbestimmung die Extraktion aus den Plasmaproben erfolgen. Dies erfolgt als Vorreinigung und Anreicherung, womit ihre Detektion in der folgenden Chromatographie vereinfacht wird. Der Probe wird ein Interner Standard (IS) zugesetzt. Es handelt sich hierbei um eine bekannte Menge einer Substanz, die dem zu untersuchenden Stoff chemisch verwandt ist und mit deren Hilfe die Vollständigkeit der Extraktion beurteilt werden kann.

2.3.1.2 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung ist stark abhängig von äußeren Einflüssen. Aus diesem Grund wird vorher eine Kalibrierkurve mithilfe von Kalibrierstandards erstellt. Hierzu werden bei jeder Messung die Konzentrationen, die den aufgrund der gängigen Literaturdaten zu erwartenden Konzentrationsbereich umfassen sollten, mithilfe einer ausreichenden Anzahl von Eichproben bestimmt. Unter Berücksichtigung eventueller Verluste bei der vorausgegangen Extraktion werden die Quotienten der Peakhöhen des Analyten und des Internen Standards gebildet (Analyt/IS). Die Berechnung der Kalibrierkurve erfolgt dann mittels linearer Regression der Peakflächenquotienten der Kalibrierstandards gegen die Konzentration.

2.3.1.3 Durchführung der HPLC

Zur Bestimmung der Plasmamedikamentenkonzentrationen wurde die Methode der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (High Performance Liquid Chromatography = HPLC) angewandt.

Dies ist eine Methode, Substanzen qualitativ und quantitativ zu bestimmen. Das ihr zugrunde liegende Prinzip ist die Verteilungschromatographie, bei der sich Stoffe aufgrund unterschiedlicher Affinität zu zwei nicht miteinander mischbaren flüssigen Phasen zwischen diesen verteilen. Eine der Phasen, die stationäre Phase, ist an einen festen Träger gebunden, an

dem die andere mobile Phase entlangfließt. Im Fall der so genannten RPLC (reversed Phase Liquid Chromatography) besteht die stationäre Phase aus Kieselgelteilchen, an die hydrophobe Substanzen kovalent gebunden sind, und die mobile Phase aus einer pufferhaltigen wässrigen Lösung, die mit einem hydrophilen organischen Lösungsmittel gemischt ist. Die Trennung eines Stoffgemischs durch die HPLC kommt dadurch zustande, dass die verschiedenen in der mobilen Phase gelösten Komponenten je nach ihrer Affinität zur stationären Phase langsamer als das Lösungsmittel durch die Säule wandern und sich somit abhängig von ihren hydrophoben Eigenschaften auftrennen.

Die einzelnen Stoffe werden abschließend mittels eines nach dem Prinzip der Absorptionsphotometrie messenden UV-Durchflussdetektors bestimmt. Hierbei wird die Intensitätsabschwächung (Extinktion) eines eine Probe durchlaufenden Lichtstrahls gemessen, woraus ihre molare Konzentration bestimmt werden kann. Aus den normierten Messwerten der zu bestimmenden Proben lassen sich nun anhand der erhaltenen Regressionsparameter die unbekannt Konzentrationen ermitteln.

2.3.1.4 Statistische Qualitätskontrolle der Analyseergebnisse

Mithilfe der statistischen Qualitätskontrolle kann bei quantitativen Bestimmungen die Präzision (Erfassung zufälliger Fehler) systematisch kontrolliert und überwacht werden. Künstliche Qualitätskontrollproben werden in eine Analysenserie eingefügt und unter den gleichen Bedingungen wie Patientenproben analysiert. Das Prinzip der statistischen Qualitätskontrolle besteht darin, dass vom Analyseergebnis der Kontrollproben auf die Zuverlässigkeit der Probandenwerte geschlossen werden kann.

Präzision. Sie ist ein Maß für die Reproduzierbarkeit der Analyseergebnisse bei wiederholter Durchführung einer analytischen Methode unter identischen Bedingungen. Man unterscheidet zwischen der **Intra-assay-Varianz** (serielle Varianz), die durch mehrfache ($n \geq 5$) Bestimmung der Qualitätskontrollproben *in einer Mess-Serie* berechnet wird, und der **Inter-assay-Varianz**. Für letztere, auch zeitabhängige Varianz genannt, werden die gemessenen Qualitätskontrollproben über einen Zeitraum von *mehreren Messtagen* ausgewertet.

Bestimmungsgrenze. Die Bestimmungsgrenze lässt sich beschreiben als die kleinste messbare Konzentration eines Analyten, die noch mit einer definierten Richtigkeit und Präzision bestimmt werden kann ($\pm 20\%$). Sie wird mithilfe von Kalibrierstandards festgelegt.

2.3.2 HPLC von Bupropion und 4-OH-Bupropion

Die Bestimmung der Medikamentenkonzentration von Bupropion und 4-OH-Bupropion führte Dr. Steffen Bauer vom Institut der Klinischen Pharmakologie der Charité in Berlin durch.

2.3.2.1 Vorbereitung der HPLC von Bupropion und 4-OH-Bupropion

Kalibrierstandards und Qualitätskontrollen. Zur Herstellung einer Eichkurve wurden im Fall von Bupropion fünf (inkl. Nullserum) Kalibrierstandards und für die statistische Qualitätskontrolle zwei Qualitätskontrollproben im unteren und oberen Bereich der Kalibrierkurve verwendet. Die Kalibrierstandards und Qualitätskontrollproben wurden bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Extraktion von Bupropion und 4-OH-Bupropion. Für die chromatographische Analyse mussten Bupropion und sein Metabolit 4-OH-Bupropion aus den Plasmaproben extrahiert werden. Alle Proben wurden nach dem Auftauen kurz zentrifugiert, um feste Bestandteile, wie z.B. Fibrinfasern oder Proteinkonglomerate zu entfernen. 2 ml des homogenen Überstandes wurden in einem Zentrifugenglas mit 15 μl (250 ng) der Stammlösung 2 des internen Standards (Didesmethyl-Imipramin) versetzt. Bei dem Internen Standard handelt es sich um eine dem zu untersuchenden Stoff chemisch verwandte Substanz, mit deren Hilfe die Vollständigkeit der Extraktion beurteilt werden kann. Die nun folgende Extraktion dient dazu, störende Substanzen zu entfernen und mithilfe der Chromatographie zu detektierende Substanzen anzureichern. Anschließend wurden der Probe 200 μl 1-molarer Natrium-Carbonatlösung zugesetzt und die Probe kurz gemischt. Daraufhin wurde die Probe mit einem Gemisch von 5 ml n-Hexan/Acetonitril (98:2) für 10 min in einem Überkopfschüttler extrahiert. Die Probe wurde anschließend 5 min bei 4000 U/min zentrifugiert und 4,5 ml der organischen Phase in ein sauberes, trockenes Zentrifugenglas mit spitzem Boden überführt. Die organische Phase wird anschließend in 200 μl Salzsäure (0,2N) 10 min reextrahiert und die obere, organische Phase bis auf den Rest von ca. 0,5 ml abgenommen. Die wässrige Phase wurde in ein weiteres Zentrifugenglas überführt. Danach wurde das wässrige Extrakt bei 40°C unter Stickstoff (N_2) vollständig zum Trocknen gebracht. Der Rückstand wurde in 150 μl Acetonitril/Wasser ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$) gelöst. Nach erneuter Zentrifugation konnte die Probe chromatographiert werden.

2.3.2.2 Durchführung der HPLC von Bupropion und 4-OH-Bupropion

Die Chromatographie erfolgte bei Raumtemperatur mit einer Flussrate von 1,5 ml/min auf einer LiChrospher™ reversed phase Trennsäule (125 x 4 mm, 5 µm Partikelgröße, Fa. Merck, Darmstadt) mit einem Fließmittelgradienten aus Phosphatpuffer und Acetonitril. Die Zusammensetzung des Fließmittels wurde durch eine programmgesteuerte Pumpe zeitabhängig verändert. Die Konzentration von Bupropion wurde schließlich mithilfe eines nach dem Prinzip der Absorptionsphotometrie messenden UV-Durchflussdetektors (LiChroGraph 7485, Fa. Merck, Darmstadt) bei einer Wellenlänge von 220 nm gemessen und der Quotient der Peakflächen des Analyten und des Internen Standards berechnet.

2.3.2.3 Kalibrierstandards und Statistische Qualitätskontrolle für Bupropion und 4-OH-Bupropion

Als Bestimmungsgrenze wurde für Bupropion und 4-OH-Bupropion 10 ng/ml festgelegt. Die analytische Präzision wurde kontrolliert, jeweils zwei Kontrollproben mit 20 ng/ml und 100 ng/ml für Bupropion und 50 ng/ml und 200 ng/ml für 4-OH-Bupropion. Der Variationskoeffizient für Bupropion lag bei 16,2% für die Probe mit 20 ng/ml (Mittelwert 21,0 ng/ml, n = 27) und 17,1% für die Probe mit 100 ng/ml (Mittelwert 1053,7 ng/ml, n = 25). Die Werte für 4-OH-Bupropion (Hydroxybupropion) lagen bei 13,8% für die Probe mit 50 ng/ml (Mittelwert 45,5 ng/ml, n = 17) und 10,5% für die Probe mit 200 ng/ml (Mittelwert 199,6 ng/ml, n = 21).

2.4 Analyse der Messdaten und Statistik

2.4.1 Pharmakokinetische Begriffe und Parameter

In dieser Arbeit wurden folgende pharmakokinetischen Parameter als Haupt- und Nebenzielgrößen verwendet. Ihre Bedeutung und Berechnung soll zum besseren Verständnis kurz erläutert werden.

AUC (*area under the curve* = Fläche unter der Kurve). Die AUC dient als Messgröße für das Ausmaß der Bioverfügbarkeit im zentralen Kompartiment. Trägt man nach Medikamentenapplikation gemessene Plasmakonzentration gegen die Zeit auf, so bezeichnet

man die Fläche unter der resultierenden Kurve als AUC. Die AUC stellt somit das Integral der Konzentration über der Zeit dar. Am besten wird die AUC näherungsweise nach der Trapezregel bestimmt, wobei vom letzten Messzeitpunkt die Restfläche im Regelfall gegen unendlich extrapoliert wird. Dies setzt voraus, dass die Plasmakonzentration ausreichend lang verfolgt wurde, so dass mit hinreichender Präzision extrapoliert werden kann. Während sich in der AUC ausschließlich der Umfang der Bioverfügbarkeit niederschlägt, werden zur Quantifizierung ihrer Geschwindigkeit zwei weitere Zielgrößen gemessen. Dies ist einmal die **Spitzenkonzentration** C_{\max} nach Einmalapplikation sowie der **Zeitpunkt** t_{\max} nach Erreichen der Spitzenkonzentration. Die C_{\max} ist von Bedeutung im Zusammenhang mit der erreichbaren therapeutischen Wirkung, wahrscheinlich aber auch mit der Häufigkeit unerwünschter Nebenwirkungen. Die t_{\max} ist eine Größe, die ausschließlich von der Resorptionsgeschwindigkeit abhängt.

Totale orale Clearance. Die totale orale Clearance ist ein Parameter zur Charakterisierung und Quantifizierung aller Eliminationsprozesse. Sie beschreibt die Möglichkeit des Körpers und seiner Eliminationsorgane, ein bestimmtes Volumen pro Zeiteinheit von einem Arzneistoff zu befreien, d.h. durch Metabolisierung und/oder Exkretion eine verabreichte Substanz aus dem Körper zu eliminieren. Sie berechnet sich folgendermaßen: $Cl_{i,v} = \text{Dosis}_{i,v} / \text{AUC}$. Bei oraler Gabe von Arzneistoffen kann nur die orale Clearance Cl_o berechnet werden. Dies schließt neben der systemischen Clearance auch mögliche präsystemische Clearanceanteile ein und hängt häufig von der Resorptionsquote ab. Die Clearance ist additiv, d.h. sie setzt sich aus den Clearanceanteilen der jeweils an der Elimination beteiligten Organe oder Enzyme zusammen.

2.4.2 Analyse der Messdaten und Statistik

Die Ergebnisse der Plasmakonzentrationsmessungen aus dieser Studie wurden durch nonparametrische pharmakokinetische Methoden analysiert. Dies erfolgte mittels des Programms WinNonlinTM Version 1.5, 1997 (Scientific Consulting Inc., NC, USA). Die AUCs wurden nach der Trapezregel mit Extrapolierung gegen unendlich bestimmt und die Cl_o nach oben beschriebener Formel aus der oralen Dosis und den AUCs berechnet. Die orale Clearance errechnet sich somit als der Quotient aus der Clearance und der Bioverfügbarkeit. Die Bedeutung der Cyp2B6-Polymorphismen wurde durch die Varianzanalyse der logarithmierten Werte der Clearance und Adjustierung hinsichtlich des multipeln Test nach Bonferroni (F-Test, $p < 0,05$) bearbeitet. Zur Überprüfung der Unterschiede hinsichtlich der pharmakokinetischen Daten

zwischen Trägern des Cyp2B6*4-Allels und Probanden, die nicht Träger des Cyp2B6*4-Allels waren, wurde der nonparametrische Mann-Whitney U-Test angewendet.

Statistische Berechnungen zur Feststellung signifikanter Unterschiede pharmakokinetischer Eigenschaften wurden mit der Software NONMEM, Version 5 (University of California San Francisco, San Francisco, CA, USA) durchgeführt. Zur Beschreibung der Verteilung und Elimination von Bupropion wurde ein Zwei-Kompartiment-Modell angewandt. Die Clearances der 12 Cyp2B6-Genotypen wurden zusammengezogen aus den Teil-Clearances der 5 Allele (CLA1, CLA2, CLA4, CLA5, CLA6 für die Allele Cyp2B6*1, *2, *4, *5, *6). Als Beispiel für Träger des Genotypes Cyp2B6*2/*4 CLA2 + CLA4. Zur formalen Testung hinsichtlich eines reduzierten und vollständigen pharmakokinetischen Modells wurde CLA1 als Clearance des Allels *1 definiert. CLA2, CLA4, CLA5 wurden definiert als CLA1 multipliziert mit speziellen Faktoren (Th6, Th7 und Th8), die die Beziehung dieser drei Clearances zu CLA1 beschreiben. Schließlich wurde CLA6 definiert durch einen speziellen Faktor (Th9), beschreibend die Beziehung von CLA6 zu CLA4, um die zwei Aminosäureaustauscheffekte in diesem speziellen Allel zu erfassen. So konnten die Clearances der 12 Allel-Kombinationen durch 5 Parameter beschrieben werden. Diese Parameter zeigten die spezifischen Allel-Effekte hinsichtlich der totalen Clearance (CL/F) auf.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse für Bupropion

121 nichtverwandte, gesunde, männliche Nichtraucher kaukasischer Abstammung wurden alle in anonymisierter Form erhoben und in diese Studie eingeschlossen. Jeder Proband erhielt eine individuelle Code Nummer. Diese Daten wurden computergestützt gespeichert. Die Studienmedikation wurde von allen Probanden gut vertragen. Das durchschnittliche Alter betrug 26 Jahre (Standardabweichung 5 Jahre) und das durchschnittliche Körpergewicht betrug 76 kg (Standardabweichung 11 kg). 5 Probanden (4,1%) waren zwischen 18 und 20 Jahren, 95 Probanden (78,5%) waren zwischen 20 und 30 Jahren, 18 Probanden (14,9%) zwischen 30 und 40 Jahren sowie 3 Probanden (2,5%) zwischen 40 und 45 Jahren. Die Abbildung 4 zeigt die Altersverteilung in dieser Studie.

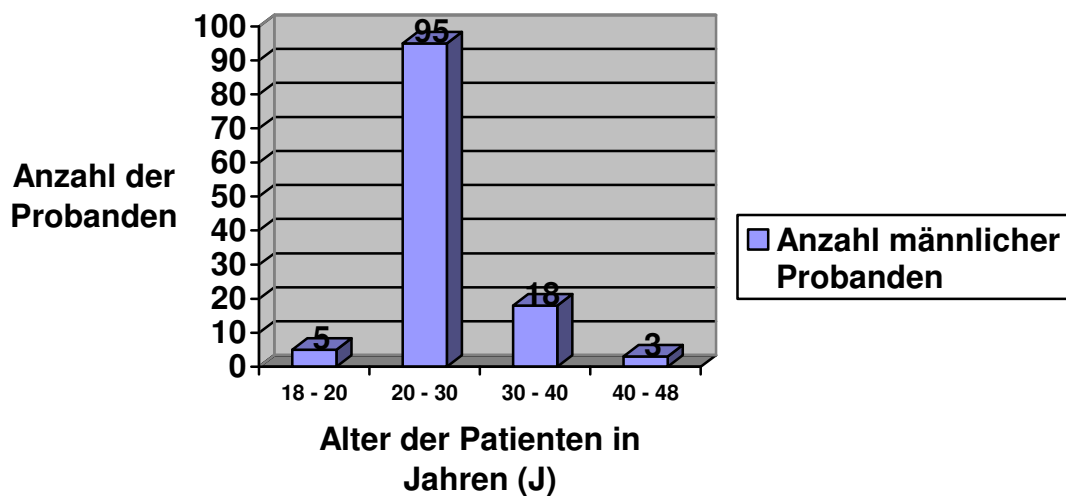


Abbildung 4: Altersverteilung der Probanden

3.1.1 Häufigkeit und Verteilung der Aminosäurepolymorphismen und der daraus resultierenden Allelfrequenzen

Bereits 2001 wurde von Lang et al. der kodierende Bereich des CYP2B6 Gens an DNA-Proben von 35 Probanden kaukasischen Ursprunges sequenziert und fünf Mutationen entdeckt, die zu

einem Aminosäureaustausch führen. Im Verlauf wurden mehrere Leberproben auf das Vorhandensein dieser Mutationen genotypisiert. Unter den analysierten Proben gab es einige Proben mit besonders erniedrigten CYP2B6-Apoproteinwerten und Enzymaktivitäten, die keine der von Lang et al. (2001) beschriebenen Mutationen trugen. Durch die Sequenzierung durch die Firma Epidaurus (München) wurden fünf weitere „missense“-Mutationen im CYP2B6-Gen gefunden (Lang et al., 2004).

In Abbildung 5 sind die Mutationen im kodierenden Bereich des CYP2B6-Gens mit den entsprechenden Aminosäureaustauschen nach Lang et al. (2001; 2004) dargestellt.

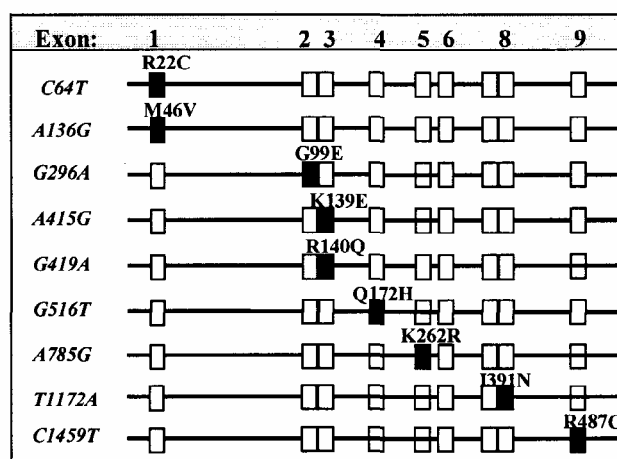


Abbildung 5: Mutationen im kodierenden Bereich des CYP2B6-Gens mit den entsprechenden Aminosäureaustauschen (Lang et al., 2001; 2004). Die Positionen entsprechen der cDNA nach Yamano et al. (1989)

Ausgehend von diesen Ergebnissen sind bisher insgesamt 37 verschiedene CYP2B6-Allele beschrieben worden, die Mutationen im kodierenden Bereich, in Intronregionen oder im Promoter des CYP2B6-Gens tragen. In dieser Arbeit wurde eine Genotypisierung der Allele CYP2B6*1-*7 durchgeführt. Das CYP2B6*1-Allel stellt hierbei das Wildtyp-Allel dar. Eine Zusammenfassung der Häufigkeit der Aminosäurepolymorphismen und den daraus resultierenden Allelfrequenzen in dieser gibt die Tabelle 11 wieder.

Allele	CYP2B6 Aminosäurevarianten					Allelfrequenz		
	22	172	259	262	487	n	%	(95% confidence interval)*
<i>CYP2B6*1</i>	R	Q	S	K	R	132	54.5	(48.0 – 60.9)
<i>CYP2B6*2</i>	C	Q	S	K	R	14	5.8	(3.3 – 9.7%)
<i>CYP2B6*3</i>	R	Q	R	K	R	0	0	(0 – 1.9%)
<i>CYP2B6*4</i>	R	Q	S	R	R	12	5.0	(2.7 – 8.7%)
<i>CYP2B6*5</i>	R	Q	S	K	C	23	9.5	(6.2 – 14%)
<i>CYP2B6*6</i>	R	H	S	R	R	61	25	(20 – 31%)
<i>CYP2B6*7</i>	R	H	S	R	C	0	0	(0 – 1.9%)

SNP Frequenz:					
n	14	61	0	73	23
%	5.8%	25%	0%	30%	9.5%
95% CI	(3.3 – 9.7%)	(20 – 31%)	(0 – 1.9%)	(25 – 36%)	(6.2 – 14%)

Tabelle 11: Frequenz von *CYP2B6* SNPs und den korrespondierenden Allelen

Die Genotypisierung für die *CYP2B6*-Aminosäurepolymorphismen in dieser Arbeit ergab eine Frequenz von 5,8% (für die Austauschvariante R22C), 25,2% (Q172H), 30,2% (K262R) und 9,5% (R487C). Die Variante S259R, welche für das *CYP2B6*3*-Allel verantwortlich ist wurde in dieser Studie nicht gefunden. Der R22C-Polymorphismus, charakteristisch für das *CYP2B6*2*-Allel trat mit einer Frequenz von 5,8% auf. Die Austauschvariante K262R, verantwortlich für das *CYP2B6*4* – Allel, wurde mit einer Frequenz von 5% und die Variante R487C (*CYP2B6*5*-Allel) mit einer Frequenz von 9,5% gefunden. Das am häufigsten vorkommende Allel war das *CYP2B6*6* (Q172H + K262R), welches in 25,2% aller Probanden gefunden wurde. Diese Allel-Frequenzen korrespondieren gut mit den gefundenen Frequenzen nach der Genotypisierung einer großen Datenbank von 573 gesunden freiwilligen Probanden kaukasischer Abstammung aus Berlin, die vorher ihr Einverständnis zur Genotypisierung gegeben hatten. Dort wurde eine Frequenz von 6% für R22C, 26% für Q172H, 0,2% für S259R, 26% für K262R und 12% für R487C gefunden.

3.1.2 Pharmakokinetische Parameter von Bupropion und 4-OH-Bupropion

3.1.2.1 Pharmakokinetische Parameter von Bupropion

Tabelle 12 zeigt die individuellen Daten für die pharmakokinetischen Parameter CL/F (Orale Clearance: Clearance/bioverfügbare Fraktion eines Medikamentes), C_{\max} (maximale Plasmakonzentration) und $t_{1/2}$ (Halbwertszeit) für Bupropion, die AUC (Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve vom Zeitpunkt der Medikamentenverabreichung bis zur letzten messbaren Konzentration) sowie die MRT (mittlere Verweildauer).

	MW (95% CI)	Grenzen (Range)
Bupropion		
C_{\max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.52 (0.23– 0.95)	0.13 – 1.01
AUC ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$)	3.64 (1.22 – 6.72)	0.89 – 8.14
CL/F $\cdot\text{kg}^{-1}$ ($\text{L}\cdot\text{h}\cdot\text{kg}^{-1}$)	2.33 (1.11 – 5.37)	1.06 – 6.61
$t_{1/2}$ (h)	9.4 (2.55 – 16.3)	2.0 – 24.2
MRT (h)	10.8 (3.37 – 21.0)	3.2 – 26.2

Tabelle 12: Pharmakokinetische Daten für Bupropion bei 121 männlichen Studienteilnehmer

Die Daten der AUC von Bupropion zeigte eine logarhythmisch-normale Verteilung mit Grenzen zwischen 0,89 und 8,14 $\mu\text{mol}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$ (95% CI 1,22-6,72 $\mu\text{mol}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$). Die Ergebnisse sind in der Abbildung 6 zusammengefasst.

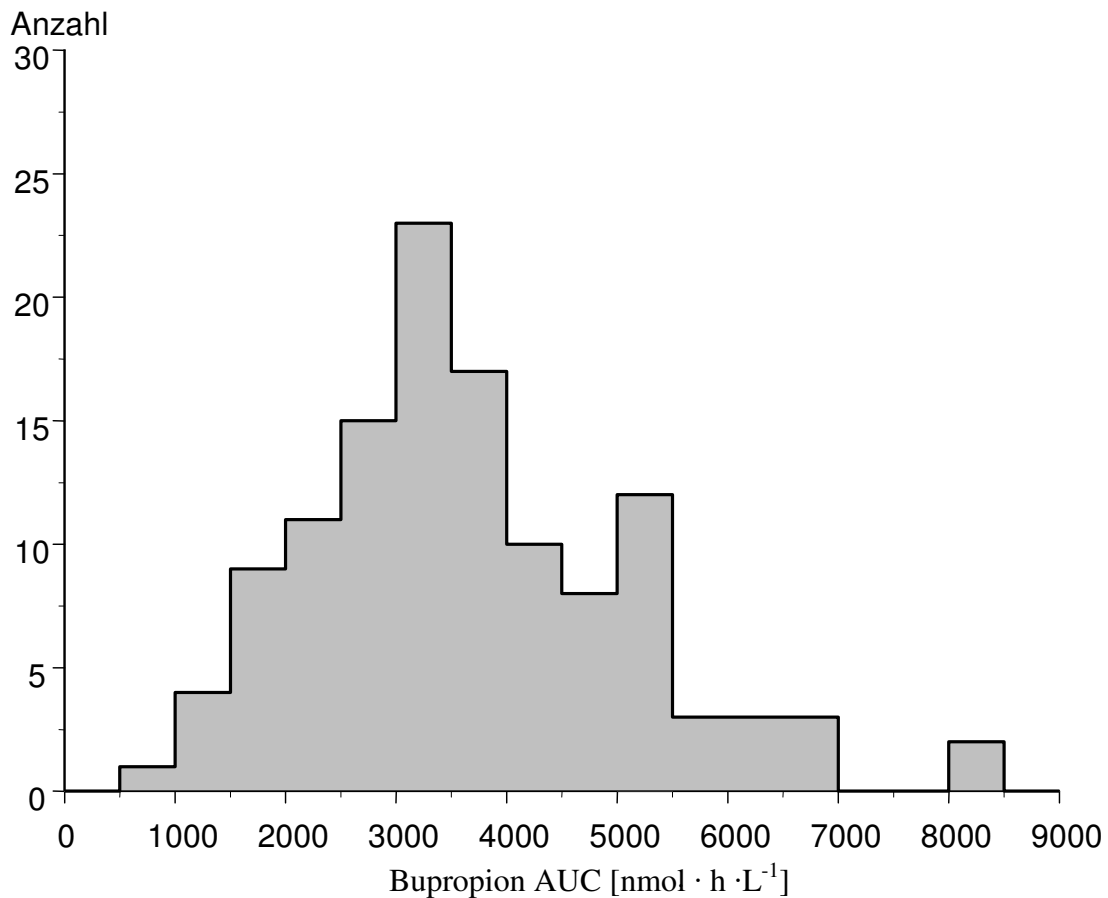


Abbildung 6: Verteilung der Plasmakonzentration von Bupropion, AUC

Die totale orale Clearance (CL/F), kalkuliert von den AUC-Daten, zeigte einen Durchschnittswert von 179 L/h und variierte zwischen 67 und 608 L/h. Diese Werte lagen in den meisten Fällen höher als der Leberblutfluss. Dies ist ein Hinweis entweder auf eine geringe Bioverfügbarkeit oder auf eine durchgemachte Biotransformation innerhalb der weißen Blutzellen. C_{\max} lag für Bupropion bei durchschnittlich $0,52 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (95% CI: $0,23$ - $0,95 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

Weiterhin wurde die Wirkung bzw. der Einfluss der CYP2B6-Aminosäurevarianten hinsichtlich der Pharmakokinetik von Bupropion analysiert. Die Pharmakokinetik von Bupropion wurde

durch das 2-Kompartiment-Model beschrieben. Die Clearance-Parameter CLA1, CLA2, CLA4, CLA5 und CLA6 wurden definiert als ein Teil der Clearance für ein Allel, d.h. für CYP2B6*1, *2, *4, *5 und *6.

Die Analyse zeigt, dass die totale Clearance von Bupropion für die Allele CYP2B6*1, *2 und *5 keinen Unterschied aufweist, hingegen die Clearance für die Allele CYP2B6*4 ungefähr 1,66 mal höher liegt als im Vergleich zum Allel CYP2B6*1.

Es ergaben sich eine mittlere Clearance für das Allel CYP2B6*4 von 104,3 l/h, für das CYP2B6*1 von 63,0 l/h. Die mittlere Clearance von dem Allel CYP2B6*6 (CL: 63,2 l/h), welche eine zusätzlichen Aminosäureaustausch im Vergleich zum CYP2B6*4 aufweist, war geringer als die mittlere Clearance von CYP2B6*4 und unterscheidet sich nicht vom Wildtyp-Allel CYP2B6*1 (CL: 63,0 l/h).

Eine Übersicht über die allel-spezifischen Clearance sowie aller möglichen 12 Genotypen, kalkuliert als Summe aller partiellen Clearances, die in dieser Studie untersucht wurden gibt die Tabelle 13 wieder.

	Einheit	ME	SE (Standard Error)		
Volume	l	91.2	17.9		
K23**	h ⁻¹	1.427	0.202		
K32**	h ⁻¹	0.102	0.009		
Absorptionsrate konstant	h ⁻¹	0.456	0.025		
Allel-spez. Clearance		Mittlere CL (l/h) SE			
CYP2B6*1 (CLA1)	l/h	63.0	20.8		
CYP2B6*2 (CLA2)	l/h	63.8	24.6		
CYP2B6*4 (CLA4)	l/h	104.3	36.5		
CYP2B6*5 (CLA5)	l/h	62.8	22.9		
CYP2B6*6 (CLA6)	l/h	63.2	23.4		
Genotypisch-spez. Clearance		Mittlere CL (l/h)	SE	t _{1/2} alpha (h)	t _{1/2} beta (h)
CYP2B6*1/1	l/h	126.0	29.4	0.242	14.1
CYP2B6*1/2	l/h	126.8	32.2	0.241	14.0
CYP2B6*1/4	l/h	167.3	42.0	0.209	12.3
CYP2B6*1/5	l/h	125.8	30.9	0.242	14.1
CYP2B6*1/6	l/h	126.2	37.6	0.242	14.1
CYP2B6*2/4	l/h	168.1	44.0	0.209	12.2
CYP2B6*2/5	l/h	126.7	33.6	0.241	14.1
CYP2B6*2/6	l/h	127.0	34.0	0.241	14.0
CYP2B6*4/5	l/h	167.1	43.1	0.210	12.3
CYP2B6*4/6	l/h	167.5	43.4	0.209	12.3
CYP2B6*5/6	l/h	126.0	32.8	0.242	14.1
CYP2B6*6/6	l/h	126.4	33.1	0.242	14.1

Tabelle 13: Pharmakokinetische Parameter für Bupropion bezogen auf die Genotypen

Einzelne Träger des CYP2B6*4-Allel (n=12; beinhaltet Probanden mit dem Genotypen *1/*4, *2/*4, *4/*5, *4/*6) wiesen eine mittlere Clearance von 203 l/h auf. Die Probanden, die das CYP2B6*4-Allel nicht aufwiesen (n=109), zeigten eine mittlere Clearance von 149 l/h. Die Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen sind statistisch signifikant (p=0,001). Die Abbildung 7 gibt diese Unterschiede wieder.

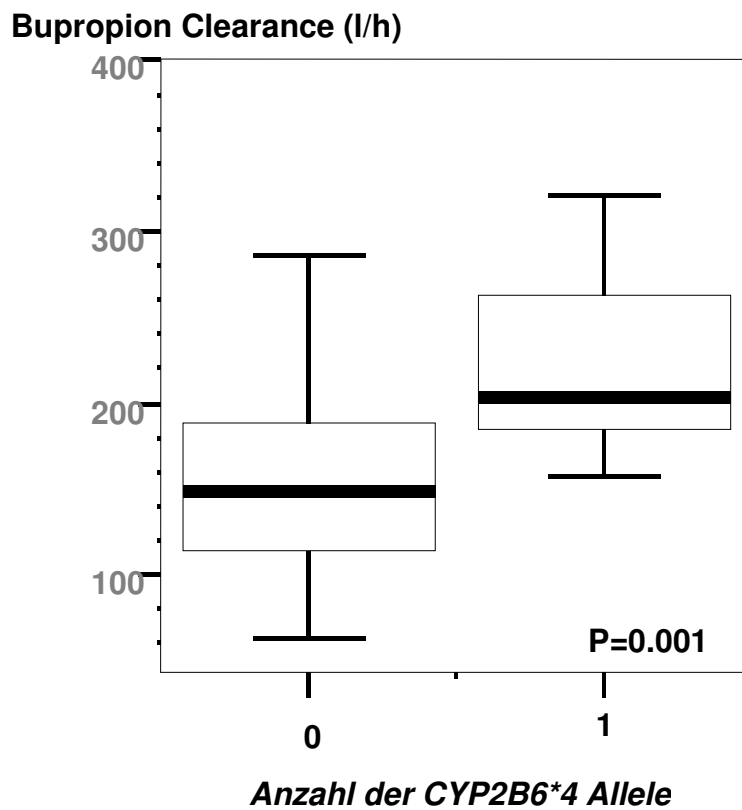


Abbildung 7: Bupropion Clearance (l/h) von Trägern des CYP2B6*4 Allels (n=12) im Vergleich mit den Probanden ohne einem CYP2B6*4 Allel (n=109)

Zusätzlich wurde eine Genotypisierung für weitere polymorphe Enzyme, die Arzneimittel metabolisieren, durchgeführt. In diesem Falle wurde das CYP2D6, CYP2C9 und das CYP2C19 untersucht. Es zeigten sich allerdings keine Unterschiede im Bezug auf die Clearance von Bupropion für die Enzyme CYP2D6, CYP2C9 und CYP2C19.

3.1.2.2 Pharmakokinetische Parameter von 4-OH-Bupropion (Hydroxybupropion)

Die AUC des pharmakologisch aktiven Metaboliten von Bupropion, in diesem Fall das Hydroxybupropion, war im Vergleich zu der Muttersubstanz deutlich erhöht. Sie lag im Durchschnitt bei $25,5 \mu\text{mol}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$ (95% CI: 8,22-61,4 $\mu\text{mol}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$). Auch die Halbwertszeit $t_{1/2}$ war deutlich länger. Im Durchschnitt betrug diese 20,0 h (95% CI: 11,9-37,8 h). Entsprechend war die mittlere Verweildauer des aktiven Metaboliten Hydroxybupropion beinahe 2fach länger mit 18,5 h im Vergleich zu 10,8 h für Bupropion.

Eine Auflistung der pharmakokinetischen Parameter gibt die Tabelle 14 wieder.

	Mittelwert (95% CI)	Grenzen (Range)
4-OH-Bupropion		
C_{\max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.83 (0.31 – 1.71)	0.24 – 2.38
AUC ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$)	25.5 (8.22 – 61.4)	6.72 – 75.31
$t_{1/2}$ (h)	20.0 (11.9 – 37.8)	10.4 – 50.0
MRT (h)	18.5 (3.08 – 39.5)	1.16 – 61.6

Tabelle14: Pharmakokinetische Parameter von 4-OH-Bupropion (n=121)

Hinsichtlich der AUC von 4-OH-Bupropion ergab sich im Wesentlichen eine normale Verteilung. Die logarithmische „Umsetzung“ zeigt die Abbildung 8.

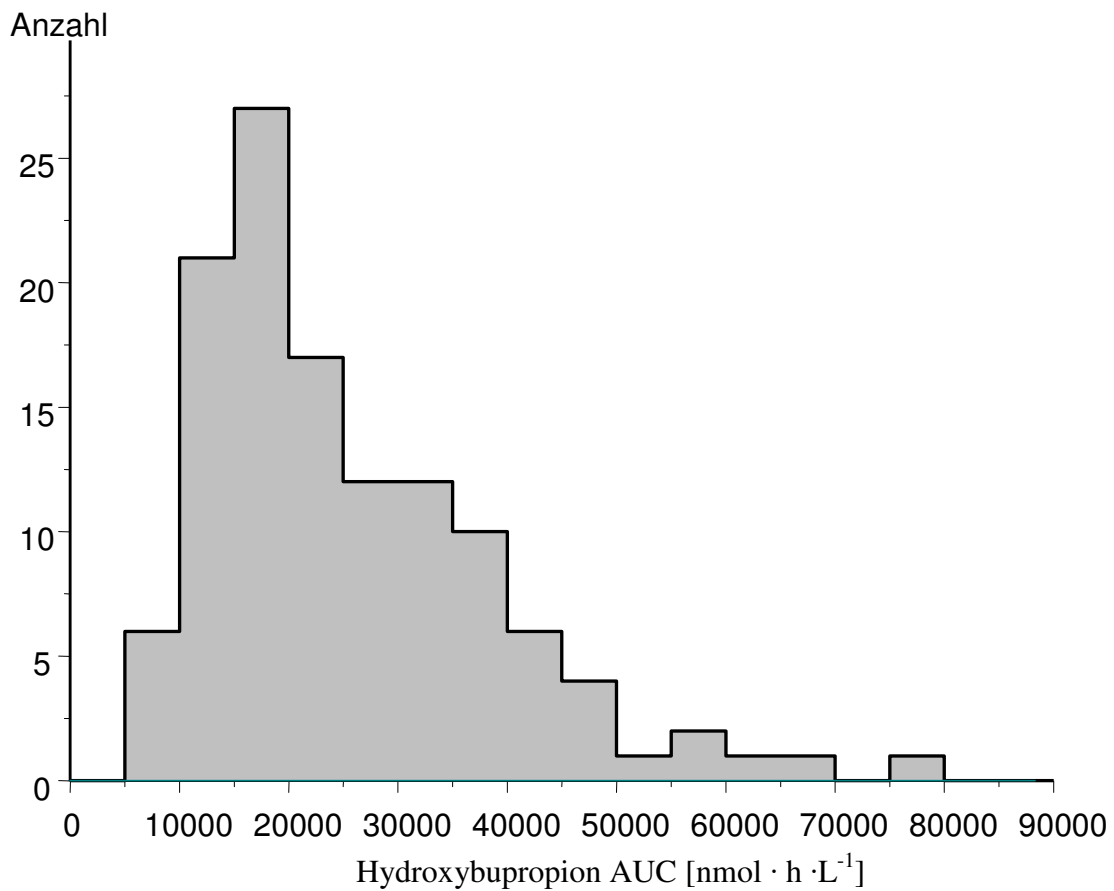


Abbildung 8: Verteilung der Plasmakonzentration von Hydroxybupropion, AUC

Die pharmakokinetischen Parameter von Hydroxybupropion wurden anhand der 12 definierten CYP2B6-Genotypen analysiert. Die Mittelwerte für C_{\max} und AUC zeigten deutliche Unterschiede bei Trägern des Genotypes CYP2B6*1/*4 im Vergleich zu Trägern des Genotypes *1/*1, *1/*5, *1/*6, *2/*5, *6/*6 (Tabelle 15).

CYP2B6-Genotyp	n	C _{max} (µg/l)	AUC (µg/h/l)	t _{1/2} (h)	Ratio OH-Bup/Bup
*1/*1	36	0,92 (0,79-1,05)	27,6 (22,6-32,7)	19,8 (17,8-21,9)	7,8 (6,4-9,2)
*1/*2	6	0,85 (0,65-1,04)	29,2 (17,1-41,2)	21,8 (13,6-29,9)	10,3 (6,1-14,6)
*1/*4	8	1,36 (0,97-1,76)	34,4 (24,5-44,4)	17,5 (15,6-19,3)	13,9 (11,1-16,7)
*1/*5	18	0,80 (0,65-0,95)	28,6 (21,7-35,4)	23,3 (19,5-27,1)	8,0 (6,6-9,3)
*1/*6	28	0,65 (0,57-0,74)	19,6 (16,5-22,7)	18,7 (17,0-20,4)	5,8 (4,6-7,1)
*2/*4	1	1,37	36,1	16,1	13,1
*2/*5	1	0,70	26,2	25,8	3,9
*2/*6	6	0,76 (0,52-1,01)	28,3 (6,1-50,5)	24,4 (10,7-38,2)	5,7 (3,0-8,5)
*4/*5	2	0,65 (0,42-0,87)	14,1 (0-33,2)	13,2 (0-31,7)	6,0 (-6,5-18,6)
*4/*6	1	1,71	41,6	15,3	17,0
*5/*6	2	0,97 (0,82-1,12)	32,1 (12,1-52,2)	21,2 (11,0-31,4)	14,4 (-76-105)
*6/*6	12	0,59 (0,46-0,73)	17,3 (13,0-21,6)	18,2 (15,1-21,3)	5,1 (2,6-7,6)
		P=0,03	P<0,001	NS	P<0,001

Tabelle 15: Funktionelle Wirkung von *CYP2B6* Genotypen auf pharmakokinetische Parameter von 4-OH-Bupropion nach Gabe von 150 mg Bupropion

So zeigte die C_{max} für Hydroxybupropion bei Trägern von *CYP2B6**1/*4 einen Wert von 1,36 µg/l (95% CI: 0,97-1,76 µg/l), die C_{max} von Trägern des Genotypes *CYP2B6**6/*6 einen Wert von 0,59 µg/l (95% CI: 0,46-0,73 µg/l). Auch die AUC von Hydroxybupropion war deutlich bei Trägern des Genotypes *CYP2B6**1/*4 mit 34,4 µg/h/l (95% CI: 24,5-44,4 µg/h/l) erhöht, im Vergleich z.B. bei Trägern des Genotypes *CYP2B6**1/*6. Dort lagen die Werte bei lediglich 19,6 µg/h/l (95% CI: 16,5-22,7 µg/h/l). Die höheren AUC-Daten für Hydroxybupropion bei

diesen Probanden sind vergleichbar mit der großen Clearance, die für Bupropion gefunden wurde.

Das „metabolische Verhältnis“ im Plasma als Marker für die Bupropion-Hydroxylierung wurde aus den AUC-Daten von Hydroxybupropion/Bupropion (OH-Bup/Bup) kalkuliert. Der OH-Bup/Bup-Wert lag dabei deutlich höher bei Trägern des CYP2B6*4-Allels. Der durchschnittliche Wert lag bei 14,0 im Vergleich zu den Probanden, die nicht Träger des CYP2B6*4-Allels sind. Hier lag der durchschnittliche Wert bei 6,3.

3.2 EKG - Veränderungen nach Einnahme von Bupropion

In dieser Arbeit wurden mögliche EKG-Veränderungen zum Zeitpunkt von t_{\max} , 2 Stunden nach Einnahme von Bupropion erfasst.

Es wurde die QT-Zeit untersucht, die Zeit, die die gesamte elektrische Kammeraktion beinhaltet, von der Erregungsausbreitung (QRS-Komplex) über die totale Kammererregung (ST-Strecke) bis hin zur Erregungsrückbildung (T-Welle). Die QT-Zeit ist pulsfrequenzabhängig und variiert physiologisch zwischen 260 und 440 Millisekunden.

In dieser Studie zeigten sich keine signifikanten EKG-Veränderungen. Die mittlere QT-Zeit vor Einnahme des Bupropion lag bei 390,6 ms (Schwankungsbreite zwischen 320 ms und 478 ms). 2 Stunden nach Einnahme von Bupropion zum Zeitpunkt t_{\max} zeigte sich eine mittlere QT-Zeit von 398,7 ms (Schwankungsbreite zwischen 338 ms und 502 ms).

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Ergebnisse von Bupropion

4.1.1 Bupropion als Testsubstanz für die Cytochrom P450 2B6 (CYP2B6) Aktivität

Voraussetzung für diese Arbeit war, zunächst das geeignete CYP2B6-Substrat auszuwählen, um die Enzymaktivität von CYP2B6 bestimmen zu können. Heyn et al. (1996) hatten S-Mephenytoin als erstes selektives Substrat beschrieben. In einer Arbeit von Ko et al. (1998) war die Selektivität unter Nachweis einer Beteiligung von CYP2C9 bezweifelt worden. Diese Studie wurde mit dem Medikament Bupropion als Testsubstanz für das Cytochrom P450 2B6 (CYP2B6) durchgeführt, nachdem Hesse et al. (2000) die Bupropion-Hydroxylierung als eine für CYP2B6 sehr spezifische Biotransformation empfohlen hatten. 95% der Ausgangssubstanz Bupropion wird im Menschen in metabolisierter Form ausgeschieden. Nach der Gabe von 150 mg Bupropion wurde eine maximale Plasmakonzentration C_{\max} des Hauptmetaboliten 4-OH-Bupropion (Hydroxybupropion) von 0,6 μM beschrieben (Hsyu et al., 1997). Bei dieser Konzentration würde CYP2B6 auch in vivo das Enzym sein, das den größten Anteil an der Metabolisierung von Bupropion ausmacht. In einer weiteren Übersichtsarbeit von Zanger et al. (2007) wurde Bupropion ebenfalls als geeignetes Substrat zur Bestimmung der CYP2B6-Enzymaktivität beschrieben.

4.1.2 Auswirkungen von CYP2B6-Genpolymorphismen auf den Bupropion-Metabolismus

Es wurde eine hohe interindividuelle Variabilität in Bezug auf die Pharmakokinetik von Bupropion und seinem wichtigsten aktiven Metaboliten 4-OH-Bupropion (Hydroxybupropion) in einer relativ homogenen Population gefunden. Alle Probanden waren Männer, Nichtraucher, im Alter zwischen 18 und 48 Jahren, kaukasischer Abstammung sowie Probanden ohne Leber-, Nieren-, und Herzerkrankungen. In den 121 getesteten Probanden zeigte sich eine bis zu zehnfache Schwankungsbreite im Bereich der meisten pharmakokinetischen Parameter. Es wurden allerdings keine offensichtlichen Ausreißer, d.h. keine Probanden, die ultraschnell bzw. unzureichend Bupropion metabolisieren, gefunden. Es zeigte sich keine bimodale oder trimodale Verteilung der Plasmakonzentration von Bupropion, sondern lediglich eine unimodale

Verteilung. Eine bimodale oder eine trimodale Verteilung wäre ein Anzeichen für eine große funktionelle Wirkung von spezifischen Polymorphismen gewesen.

Des Weiteren zeigte diese Studie, dass Probanden, die Träger der *4-Mutation waren, eine 1,66fach erhöhte Bupropionclearance im Vergleich zu den Trägern des Wildtyps aufwiesen.

4.1.3 Vergleich der gefundenen Daten mit anderen klinischen Untersuchungen

Der Umfang der in der Studie gefundenen Variabilität korrespondiert mit pharmakokinetischen Daten, die in früheren Studien mit Bupropion veröffentlicht wurden. Eine Meta-Analyse, die 6 pharmakokinetische Studien beinhaltete, beschrieb eine lineare Pharmakokinetik für eine Dosis von Bupropion im Bereich zwischen 50 mg und 250 mg und zeigte eine extensive präsystemische Elimination von Bupropion, welches auf eine geringe Bioverfügbarkeit des Medikamentes hindeutete (Lai & Schroeder, 1983).

Eine pharmakokinetische Studie bei Jugendlichen zeigte eine höhere Hydroxylierungsrate von Bupropion bei weiblichen Probanden als bei männlichen (Stewart et al., 2001). Hingegen zeigte sich bei Erwachsenen kein Unterschied zwischen Männern und Frauen in der Pharmakokinetik von Bupropion (Hsyu et al., 1997). Ein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Wirkung von Arzneimitteln wurde bei Ratten erstmals von Nicholas und Barron 1934 beschrieben.

Frauen und Männer unterscheiden sich in physiologischen Parametern wie Muskelmasse, Körpergewicht, Fettanteil. Dies kann zu unterschiedlichen Verteilungsvolumina und somit auch zu einer veränderten Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Arzneimitteln führen.

Es ist z.B. bekannt, dass Frauen für das Medikament Diazepam eine höhere Clearance als Männer haben (Greenblatt et al., 1980). In einer Arbeit von Hesse et al. (2004), in der die Expression von CYP2B6 und die Bupropionhydroxylaseaktivität in humanen Lebermicrosomen untersucht wurde, konnte kein Unterschied zwischen Männern und Frauen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu haben Lamba et al. (2003) eine 1,6fach erhöhte CYP2B6-Expression und eine 1,7fach erhöhte S-Mephenytoin-N-Demethylaseaktivität bei Frauen im Vergleich zu Männern gefunden.

Eine höhere Expression bei Leberproben hispanischen Ursprungs wurden von Parkinson et al. (2004) gefunden. Sie fanden eine zweifach erhöhte Expression von CYP2B6 bei dieser ethnischen Gruppe im Vergleich zu Proben kaukasischer und afroamerikanischer Probanden. In der vorliegenden Studie wurden nur Männer kaukasischer Abstammung eingeschlossen. Hinsichtlich geschlechtsspezifischer Unterschiede des Metabolismus von Bupropion zwischen

Männern und Frauen können aus dieser Arbeit keine Aussagen gemacht werden. Da am Metabolismus eines Arzneimittels auch mehrere Isoenzyme beteiligt sein können, kann nicht allgemeingültig von in-vitro-Experimenten auf in-vivo-Situation geschlossen werden. So ist es von Bedeutung, dass auch Frauen in frühen Phasen der klinischen Prüfung eingeschlossen werden.

Die gewichtsadaptierte durchschnittliche orale Clearance beträgt $2,0 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ bei Erwachsenen nach Einnahme einer einmaligen Dosis von 150 mg Bupropion. Dieses deckt sich gut mit der durchschnittliche orale Clearance von $2,3 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ bei Einnahme der gleichen Dosis, die in dieser Studie ermittelt wurde. Stewart et al. (2001) sowie Hsyu et al. (1997) beschrieben in ihren Studien keine Unterschiede für die AUC und die Clearance von Bupropion zwischen Erwachsenen und Jugendlichen, zeigten dafür aber eine höhere Menge von Hydroxybupropion bei Erwachsenen (durchschnittlich $57,6 \mu\text{mol} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$) als bei Jugendlichen (durchschnittlich $22,5 \mu\text{mol} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$).

In dieser Studie reichte die AUC von Hydroxybupropion von 8,22 bis $61,4 \mu\text{mol} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$ bei einer Population im Alter zwischen 18 und 48 Jahren. Die mittlere AUC für Hydroxybupropion lag in dieser Studie bei $25,5 \mu\text{mol} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$. Es zeigte sich keine Korrelation zwischen dem Alter der Probanden und der AUC von Hydroxybupropion.

Pharmakokinetische Parameter von Hydroxybupropion wurden in der Vergangenheit ermittelt seitdem bekannt wurde, dass die Hydroxylierung von Bupropion durch das Cytochrom P450 2B6 (CYP2B6) vermittelt wird (Hesse et al., 2000; Faucette et al., 2001). Die AUC und C_{max} von Bupropion sowie Hydroxybupropion könnte durch die Carbonyl-Reduktase bei der Umwandlung zu den alkoholischen Metaboliten beeinflusst werden. Dies könnte die Wirkung des CYP 2B6-Polymorphismus auf die Bupropion und/oder die Hydroxybupropionplasmakonzentration abschwächen.

4.2 Einfluss des CYP2B6-Genotypes auf die Expression und Funktion

In dieser Studie wurden eine non-parametrische pharmakokinetische Analyse und eine populationsbezogene pharmakokinetische Modellanalyse angewendet. Beide Analysen zeigten eine funktionelle Rolle des CYP2B6*4-Allels. Die populationsbezogene pharmakokinetische Modellanalyse erlaubt eine vollständige Beschreibung der Clearance für alle 12 Genotypen-Gruppen. Die Studie zeigt, dass Probanden, die Träger der CYP2B6*4-Mutation waren, eine 1,66fach erhöhte Bupropionclearance im Vergleich zu den Trägern des Wildtyps aufwiesen,

hinsichtlich der Pharmakokinetik von Bupropion und Hydroxybupropion in Abhängigkeit von genetischen Polymorphismen.

Die Ergebnisse für die Allele *4 und *6 korrelieren mit den bestehenden Daten von Lang et al., 2001. Das Protein, welches durch CYP2B6*4 kodiert wird, zeigt eine signifikant höhere 7-ethoxy-4-Trifluoromethylcoumarin-O-Deethylase-Aktivität, wenn es in COS-1-Zellen exprimiert wird im Vergleich zum Wild-Typ-Protein (Jinno et al., 2003). Diese Daten sind vergleichbar mit der signifikant höheren Bupropion-Clearance bei Trägern des CYP2B6*4 im Vergleich zu Trägern des Wildtyp-Allels CYP2B6*1. Dennoch, über einen substratabhängigen Unterschied im Bezug auf die Aktivität dieser CYP2B6 - Proteinvarianten lässt sich keine definitive Aussage machen.

Bei der Analyse des CYP2B6*6-Allels in Microsomen von menschlichen Leberproben zeigte sich in der Studie von Lang et al. (2001) ein Abfall der Proteinexpression (8,2 pmol und 17,1 pmol CYP 2B6/mg microsomales Protein für homozygote und heterozygote Träger im Vergleich zu 23,5 pmol für den Genotyp *1/*1).

Geringere Proteinexprimierung von CYP2B6*6 (bestehend aus dem Q172H und K262R Polymorphismus) bestätigte auch eine unabhängige in-vitro-Untersuchung über die Bioaktivierung von Cyclophosphamid (Xie et al., 2003). Auch Jinno et al. (2003) studierten die funktionellen Konsequenzen der CYP2B6 - Aminosäurevariationen in COS-1-Zellen. Auch sie beschrieben eine geringfügig schwächere Expression im Vergleich zum Wildtyp. Lediglich der K_m -Wert des CYP2B6*6 war deutlich ansteigend im Vergleich zum Wildtyp, was auf eine geringere Affinität hinweist. Eine Studie von Desta et al. (2007) zeigte das heterozygote und homozygote Träger von CYP2B6*6 eine vierfach geringere Proteinexprimierung aufwiesen im Vergleich zu homozygoten Trägern des CYP2B6*1. Ariyoshi et al. (2001) bestätigten zudem in einer Studie von rekombinierten Varianten, exprimiert in *E. coli.*, dass V_{max} von CYP2B6*6 ansteigt. Alle diese in-vitro-Daten über die funktionelle Rolle von CYP2B6*6 sind nicht überzeugend, aber die niedrigere Affinität ist vergleichbar mit den Daten in dieser Studie, die zeigen, dass CYP2B6*6 eine niedrigere Clearance im Vergleich zu CYP2B6*4 aufweist.

Unter Berücksichtigung des CYP2B6*5 zeigte sich durchschnittlich ein achtfach geringeres CYP2B6 - Level bei homozygoten Trägern des 487CC - Polymorphismus im Vergleich zum Wildtyp in der menschlichen Leber (Lang et al., 2001). Über 50% geringere Expression der 487C - Variante zeigte sich außerdem in untersuchten COS-Zellen (Jinno et al., 2003). Dies ließe eine geringere Clearance von Bupropion erwarten bei Trägern von CYP2B6*5. In dieser Studie fanden wir allerdings keinen Hinweis einer geringeren Clearance. Außerdem zeigte sich auch kein geringerer Wert für die Metaboliten in den 23 heterozygoten Trägern von CYP2B6*5.

Eine definitive Schlussfolgerung über einen in-vivo Effekt hinsichtlich dieser Mutation lässt sich daher nicht ziehen, da in dieser Studie keine 487CC homozygoten Träger nachgewiesen werden konnten. Eine Möglichkeit, diese Diskrepanz zu erklären, wäre, dass R487C die spezifische Aktivität des Enzyms ansteigen lässt, während es zu einer geringeren Proteinexpression kommt und damit der Effekt durch die Proteinexpression ausgeglichen wird.

Lang et al. (2001) zeigten, dass fünf von sechs 487CC - Leberproben nicht die *5/*5 - Variante, aber die *5/*7-Variante aufwiesen. Es ist also auch möglich, dass der Abfall im Bezug auf die Proteinexpression nicht auf den R487C-Polymorphismus zurückzuführen ist, sondern möglicherweise durch den Q172H und K262R-Polymorphismus begründet sein könnte. Da die Studie kein *7 aufwies, sind die Daten des Exon 9-Polymorphismus nicht vergleichbar.

Seit der durch Lang et al. (2001) erfolgten Erstbeschreibung der CYP2B6-Polymorphismen wurden diese auch von anderen Arbeitsgruppen im Hinblick auf Relevanz für die Biotransformation verschiedener klinisch relevanter Substrate untersucht.

So fanden Miksys et al. (2003) im Hirngewebe von Trägern der *5-Allels eine signifikant erniedrigte CYP2B6-Apoproteinexpression. Sie vermuteten, dass die CYP2B6-Mutationen mit einem stärkeren Nikotinmetabolismus im Gehirn im Zusammenhang stehen könnte. Lerman et al. (2002) konnten in ihrer Arbeit dann zeigen, dass Individuen, die Träger der *5-Mutation sind, ein stärkeres Verlangen nach Zigaretten hatten und somit eine geringere Abstinenzrate aufwiesen.

In der Arbeitsgruppe von Xie et al. (2003) wurden 67 Präparate humaner Lebermikrosomen in Anhängigkeit der *5 und *6-Mutation untersucht. Sie entdeckten eine erniedrigte Expression und eine spezifische Cyclophosphamidhydroxylaseaktivität bei Trägern der *6-Mutation. Diese spezifische Cyclophosphamidhydroxylase-Aktivität könnte allerdings auch die Folge eines höheren Anteils der Enzymaktivität von anderen Cytochrom P450-Enzymen sein, die auch an der Hydroxylierung von Cyclophosphamid beteiligt sind.

Tsuchiya et al. (2004) zeigten in einer Studie mit 35 HIV-Patienten, dass die homozygoten Träger der *6-Mutation signifikant erhöhte Plasmaspiegel des Reverse-Transkriptase-Hemmers Efavirenz aufwiesen, welcher durch CYP2B6 metabolisiert wird.

Hesse et al. (2004) untersuchten den Einfluss verschiedener Promotormutationen, die zusammen mit den in den Allelen *4, *5 und *6 im kodierenden Bereich vorliegenden Mutationen gekoppelt vorkommen, auf die CYP2B6-Expression und Funktion. Sie berücksichtigten dabei Faktoren wie Geschlecht, Nikotin- und Alkoholgenuss. Sie fanden einen signifikanten Einfluss des *6 Alleles bei Individuen mit hohem Alkoholgenuss.

In dieser Studie wurden nur die Allele CYP2B6*1 bis *7 untersucht. Neuere Studien, haben Allele bis *29 gefunden (Lang et al., 2004; Wang et al., 2006; Klein et al., 2005; Hiratsuka et al., 2004; Rotger et al., 2007; Gatanaga et al., 2007). Auch sie fanden hinsichtlich einer Enzymfunktionsänderung keine signifikanten Hinweise. Hinsichtlich der neuen Allele lassen sich aus dieser Arbeit keine Aussagen treffen.

Die Häufigkeitsverteilung der CYP2B6 Allele zeigt ethnische Unterschiede. So wurde in einer Studie mit 265 japanischen Probanden von Hiratsuka et al. (2002) das CYP2B6*3 und das CYP2B6*7 nicht gefunden. Das lässt darauf schließen, dass der CYP2B6*3-Genotyp bzw. der CYP2B6*7-Genotyp in der japanischen Bevölkerung fehlt oder sehr selten vorkommt. In dieser Studie wurden allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen Japanern und Kaukasiern mit der Allel-Frequenz für CYP2B6*2 und *3 gefunden. Hingegen zeigten sich hinsichtlich der Allel-Frequenz für CYP2B6*4, *5, *6 und *7 signifikante Unterschiede zwischen der japanischen und der kaukasischen Bevölkerung. Die Frequenz für das Allel *4 ist in der japanischen Bevölkerung höher als in der kaukasischen, während die Frequenz für die Allele *5, *6 und *7 niedriger ist. Das Allel *6 ist das am häufigsten vorkommende Allel sowohl bei Japanern als auch bei Kaukasiern.

Die Ergebnisse hinsichtlich der Ergebnisse für Kaukasier korrelieren gut mit den in dieser Studie gefundenen Häufigkeitsverteilungen für CYP2B6-Allele. So wiesen 54,5% der Studienteilnehmer das CYP2B6*1 Allel auf, 5,8% das CYP2B6*2, 5,0% das CYP2B6*4, 9,5% das CYP2B6*5 und 25% das CYP2B6*6 Allel auf. Das CYP2B6*3 und *7 Allel wurde nicht gefunden.

4.3 Klinischer Bezug der Ergebnisse

4.3.1 Individualisierung der Pharmakotherapie

Die Ursachen von unzureichenden Arzneimittelwirkungen oder von Arzneimittelnebenwirkungen können in einer individuell sehr schlechten Bioverfügbarkeit oder einer extrem schnellen oder langsamen Arzneimittel-Ausscheidung begründet sein. Eine besondere Bedeutung haben dabei die Enzyme, die an der Phase-I der Biotransformation von Arzneimitteln beteiligt sind. Das hier untersuchte Cytochrom P450 2B6 (CYP2B6) ist für einige wesentliche Arzneimittel wichtig. Dazu zählen die Zytostatika Cyclophosphamid und Ifosfamid (Chang et al., 1993; Roy et al., 1999), die HIV-Medikamente Efavirenz und Nevirapin (Rodriguez-Novoa et al., 2005) sowie das Antidepressivum Bupropion (Ekins et al., 1999). Ungenügende

Therapieresponse sowie nicht tolerierbare Nebenwirkungen in der antidepressiven Therapie wurden beschrieben (Coutts and Urichuk, 1999). Nur etwas 30–40% der Patienten erlangten eine vollständige Remission (Nelson, 2003). Zudem führen starke Nebenwirkungen zu einer häufig beobachteten Noncompliance der Patienten (Burke und Preskorn, 1999).

Eine bekannte Variabilität in der CYP2B6-Aktivität könnte Ursache für intra- und interindividuelle Unterschiede in der Wirkung von Zytostatika oder Bupropion sein. Dies könnte einerseits zu Therapieversagen, andererseits zu relativer Überdosierung bzw. Nebenwirkungen führen.

Es wäre wünschenswert, derartige Patienten vor der Gabe von Arzneimittel identifizieren zu können. Eine Einflussgröße, die in zunehmendem Maße eine wichtige Rolle in der klinischen Praxis spielt, ist die individuelle genetische Disposition arzneimittelmetabolisierender Enzyme eines Patienten (Coutts und Urichuk, 1999). Liegen genetische Varianten eines Cytochrom-Enzyms vor, kann dies zu unterschiedlichen pharmakokinetischen Eigenschaften im Vergleich zur durchschnittlichen Population führen. Bei einer Standard-Medikamentendosis wären z.B. Langsammetabolisierer durch Akkumulation des Wirkstoffes oder seiner Metaboliten gefährdet, häufiger und stärkere Nebenwirkungen bis hin zu toxischen Effekten zu erleiden, während bei Schnellmetabolisierern die Plasmakonzentration geringer sein könnte und zu einem ausbleibenden Therapieerfolg führen könnte. Somit sollte im Idealfall der individuellen Konstitution eines Patienten durch eine individualisierte Dosisanpassung Rechnung getragen werden, indem Langsammetabolisierer eine niedrigere Dosis und sehr schnelle Metabolisierer eine entsprechend höhere Dosis im Vergleich zum Populationsdurchschnitt erhalten (Brockmöller et al., 2000; Kirchheiner et al., 2001).

4.3.2 Genotypische Dosisanpassungen für Bupropion und weiter Substrate von CYP2B6

Eine individuelle Dosisanpassung anhand des CYP-Genotypes bedeutet einen hohen wissenschaftlichen und klinischen Aufwand, der nur bei geeigneten Medikamenten klinisch sinnvoll und finanziell vertretbar ist. Die pharmakologischen Eigenschaften von Bupropion, die in dieser Arbeit und in vorherigen Veröffentlichungen beschrieben wurden, rechtfertigen diesen Aufwand.

Auswahl des Medikamentes. Medikamente, die für Dosisanpassungen in Frage kommen, sollten hohe interindividuelle Plasmaspiegelschwankungen bei gleichzeitig geringer

therapeutischer Breite und spätem Wirkungseintritt aufweisen. Dies trifft für das atypische Antidepressivum Bupropion zu und wurde mehrfach beschrieben (u.a. Ekins et al, 1999). Weitere Medikamente, die über CYP2B6 abgebaut werden, z.B. Cyclophosphamid oder Ifosphamid, weisen zu viele Nebenwirkungen bis hin zu toxischen Effekten auf, um sie bei gesunden Individuen zu testen. Es ist zu vermuten, dass eine dosisadaptierte Therapie mit Bupropion die Sicherheit des Patienten klinisch relevant erhöht und sinnvoll ist. Dies ließe ggf. auch Rückschlüsse auf weitere Substrate, die über CYP2B6 metabolisiert werden, zu.

Beteiligung von Cytochromen-Enzymen. Mindestens ein polymorphes Enzym muss signifikant die Pharmakokinetik eines Medikamentes, in diesem Fall Bupropion, verändern. Dies ist eine Voraussetzung für eine Dosisanpassung in Abhängigkeit des CYP-Genotyps. Die vorliegende Studie bestätigte, dass CYP2B6 einen großen Einfluss auf den Metabolismus von Bupropion besitzt. Es wurden dabei die genetischen Varianten CYP*2, *3, *4, *5, *6 näher untersucht.

Lediglich die genetische Variante CYP2B6*4 hatte einen großen Einfluss auf die Pharmakokinetik von Bupropion. Träger der *4-Mutation wiesen eine 1,66fach erhöhte Bupropionclearance im Vergleich zu den Trägern des Wildtypallels (CYP2B6*1) auf. Langsammetabolisierer oder besonders schnelle Metabolisierer wurden nicht gefunden. Aufgrund des vergleichsweise geringen Einflusses auf den Metabolismus scheint in diesem Fall eine routinemäßige Dosisanpassung nicht gerechtfertigt. Es ist möglich, dass es sich beim CYP2B6 nicht um das klinisch relevante Cytochrom bei der Metabolisierung von Bupropion handelt. Diese Vermutung lässt sich anhand der vorliegenden Daten nicht ausschließen. Möglicherweise sind die Konzentrationen von Bupropion in der Leber signifikant höher als die in dieser Arbeit gemessenen Plasmakonzentrationen. In diesem Fall könnten auch andere Enzyme oder Isoenzyme von CYP2B, obwohl sie eigentlich eine geringere Affinität zu Bupropion haben, beteiligt sein. Weitere Studien müssen zeigen, ob weitere Cytochrome einen Einfluss auf den Metabolismus von Bupropion haben. Eine weitere Möglichkeit, dass sich keine signifikanten Auswirkungen von CYP2B6-Genpolymorphismen auf die Pharmakokinetik von Bupropion feststellen ließen, ist, dass substratspezifische unterschiedliche Auswirkungen dieser Polymorphismen bestehen.

Des Weiteren sind in dieser Arbeit lediglich die von Lang et al (2001) beschriebenen Genotypen analysiert worden. Neuere Studien haben Allele bis CYP2B6 *29 gefunden (Lang et al., 2004; Wang et al., 2006; Klein et al., 2005; Hiratsuka et al., 2004; Rotger et al., 2007; Gatanaga et al., 2007). Noch gibt es keine signifikanten Daten hinsichtlich einer veränderten Pharmakokinetik von Substraten, die vom CYP2B6 metabolisiert werden, und die neu gefundenen Genotypen mit

einschließen. Weitere Studien werden zeigen müssen, ob bei den neu gefundenen Genotypen Langsammetabolisierer oder besonders schnelle Metabolisierer von Bupropion bzw. Substraten, die über CYP2B6 abgebaut werden, gefunden werden können.

4.4 Zusammenfassung und Ausblick

Die genetischen Polymorphismen des Cytochrom-P450-Enzymsystems spielen für den Abbau vieler Medikamente eine entscheidende Rolle. Bei prädisponierten Patienten können sie leicht zu gravierenden Arzneimittelnebenwirkungen oder zu einem unzureichenden Ansprechen auf die jeweilige Therapie führen.

Zielsetzung dieser Arbeit war zu untersuchen, ob pharmakokinetische Veränderungen durch eine Auswahl genetischer Varianten des Enzyms CYP2B6 zu erklären sind. Dazu wurden die Auswirkungen ausgewählter genetischer Polymorphismen des CYP2B6 auf die Pharmakokinetik von Bupropion untersucht.

Dabei stellte sich heraus,

- dass in dieser Studie eine große interindividuelle Variabilität von Bupropion und seinem Metaboliten Hydroxybupropion in einer Population von 121 gesunden männlichen Probanden gefunden wurde,
- dass keines der untersuchten CYP 2B6-Allele *2, *3, *4, *5 und *6 in dieser Studie einen großen Einfluss auf die Pharmakokinetik von Bupropion und seiner Metaboliten zu haben scheint,
- dass lediglich das CYP2B6*4-Allel mit einem geringfügigen Anstieg der Clearance von Bupropion und einem höheren Level von Hydroxybupropion im Zusammenhang steht.

Inwieweit die Wirksamkeit und Nebenwirkungsrate von Bupropion bei Patienten tatsächlich vom CYP2B6-Polymorphismus abhängt, kann aus dieser Studie allein nicht sicher geschlossen werden. Dieses wird durch weiterführende molekulare und klinisch-pharmakologischen Untersuchungen geklärt werden müssen.

Eine Verbesserung der Pharmakotherapie mit Bupropion durch routinemäßige CYP2B6-Genotypisierung ist durch die vorliegenden Ergebnisse nicht zu erwarten.

Literaturverzeichnis

- Ahluwalia JS, Winter PD, Tucker VL. Summary of safety profile of bupropion HCl (Zyban). Society for Research on Nicotine and Tobacco, 1999 Nov: 25-26; London
- Ariyoshi N, Miyazaki M, Toide K, Sawamura Y, Kamataki T. A single nucleotide polymorphism of CYP2B6 found in Japanese enhances catalytic activity by autoactivation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 281: 1256 - 1260
- Ascher JA, Cole JO, Colin JN, Feighner JP, Ferris RM, Fibiger HC, Golden RN, Martin P, Potter WZ, Richelson E, et al. Bupropion: a review of its mechanism of antidepressant activity. *J Clin Psychiatry* 1995, 56 (9): 395 - 401
- Barry M, Feely J. Enzyme induction and inhibition. *Pharm. Ther.* 1990, 48: 71 - 94
- Briggs GG, Samson JH, Ambrose PJ et al. Excretion of Bupropion in breast milk. *Ann Pharmacother* 1993 Apr; 27: 431 - 433
- Brockmüller J. Cytochrom-P450-Enzyme 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4, Arzneimittelinteraktionen und individuell optimierte Arzneitherapie. In: Jäger H (ed) *AIDS – Neue Perspektiven. Therapeutische Erwartungen. Die Realität* 1997. ecomed, Landsberg/Lech 1997.
- Brockmüller J, Cascorbi I, Meisel C, Kaiser R, Stangl K, Garbe E, Roots I. Molekulare Medizin ist Realität. *Humboldt-Spektrum* 3/99, 1 - 8
- Brockmüller J, Kirchheiner J, Meisel C, Roots I. Pharmacogenetic diagnostics of cytochrome P450 polymorphism in clinical drug development and in drug treatment. *Pharmacogenomics* 2000, 1 (2): 125 - 151
- Burgis E. *Intensivkurs Allgemeine und Spezielle Pharmakologie*, 2. Auflage, Urban & Fischer Verlag 2001: 19 - 33
- Burke ML and Preskorn SH. Therapeutic drug monitoring of antidepressants. *Clin Pharmacokinet* 1999, 37(2): 147 - 165
- Clarke TA and Waskell LA. The metabolism of clopidogrel is catalyzed by human cytochrome P450 3A and is inhibited by atorvastatin. *Drug Metab Dispos* 2002, 31: 53 - 59
- Chang GWM, Kam PCA. The physiological and pharmacological roles of cytochrome P450 isoenzymes. *Anaesthesia* 1999, 54 (1): 42
- Chang TKH, Weber GF, Crespi CL, Waxman DJ. Differential activation of cyclophosphamide and ifosfamide by cytochrome P-450 2B and 3A in human liver microsomes. *Cancer Res* 1993, 53: 5629 – 5637
- Chapmann SC, Jamrozik K. Is bupropion (Zyban) causing deaths? *Med J Aust* 2002, 176: 134
- Code EL, Crespi CL, Penman BW, Gonzalez FJ, Chang TKH, Waxman DJ. Human cytochrome P-450 2B6: Interindividual hepatic expression, substrate specificity, and role in procarcinogen activation. *Drug Metab Dispos.* 1997, 25: 985 - 993

- Coller JK, Krebsfänger N, Klein K, Endrizzi K, Wolbold R, Lang T et al. The influence of CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 genotypes on the formation of the potent antioestrogen Z-4-hydroxy-tamoxifen in human liver. *Br J Clin Pharmacol* 2002, 54: 157 - 167
- Cooper BR, Wang CM, Cox RF, Norton R, Shea V, Ferris RM. Evidence that the acute behavioral electrophysiological effects of bupropion (Wellbutrin) are mediated by a noradrenergic mechanism. *Neuropsychopharmacology* 1994, 11 (2): 133 - 141
- Coukell AJ, Markham A. Clopidogrel. *Drugs* 1997, 54(5): 745 - 750
- Court MH, Duan SX, Hesse LM, Venkatakrisnan K, Greenblatt DJ. Cytochrome P-450 2B6 is responsible for interindividual variability of propofol by human liver microsomes. *Anesthesiology* 2001, 94: 110 - 119
- Coutts RT and Urichuk LJ. Polymorphic Cytochrome P450 and Drugs used in Psychiatry. *Cell Molr Neurobiol* 1999, 19 (3): 325 – 354
- Cupp MJ, Tracy TS. Cytochrome P450: new nomenclature and clinical implications. *American Family Physician* 1998, 1
- Destá Z, Saussele T, Ward BA et al. Impact of CYP2B6 polymorphism on hepatic efavirenz metabolism in vitro. *Pharmacogenomics* 2007, 8(6): 547 - 558
- De Vane CL. Differential pharmacology of newer antidepressants. *J Clin Psychiatry* 1998, 59: 85 - 93
- Edwards RJ, Adams DA, Watts PS, Davies DS, Boobis AR. Development of a comprehensive panel of antibodies against the major xenobiotic metabolizing forms of cytochrome P450 in humans. *Biochem Phamacol* 1998, 56: 377 – 387
- Engel G, Hofmann U, Heidemann H, Cosme J, Eichelbaum M. Antipyrine as a probe for human oxidative drug metabolism: identification of the cytochrome P450 enzymes catalyzing 4-hydroxyantipyrine, 3-hydroxymethylantipyrine, and norantipyrine formation. *Clin Pharmacol Ther* 1996, 59: 613 - 623
- Estler C.-J. *Pharmakologie und Toxikologie*, 5. Auflage, Schattauer 1999: 14 - 45
- Ekins S, Vandenbranden M, Ring BJ, Wrighton SA. Examination of purported probes of human CYP2B6. *Pharmacogenetics* 1997, 7: 165 - 179
- Ekins S, Vandenbranden M, Ring BJ, Gillespie JS, Yang TJ, Gelboin HV, Wrighton SA. Further characterization of the expression in liver and catalytic of Cyp 2B6. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 1998, 286 (3): 1253 - 1259
- Ekins S, Wrighton SA. The role of CYP 2B6 in human xenobiotic metabolism. *Drug Metabolism Reviews* 1999, 31 (3): 719 - 754
- Ekins S, Bravi G, Ring BJ, Gillespie TA, Gillespie JS, Vandenbranden M, Wrighton SA, Wikel JH. Three-dimensional quantitative structure activity relationship analyses of substrates for CYP 2B6. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 1999, 288: 21 -29
- Erickson DA, Mather G, Trager WF, Levy RH, Keirns JJ. Characterization of the in vitro biotransformation of the HIV-1 reverse transcriptase inhibitor nevirapine by human hepatic cytochromes P-450. *Drug Metab Dispos* 1999, 27: 1488 - 1495
- Farid P, Abate MA Buspirone use for smoking cessation. *Ann Pharmacother* 1998, 32(12): 1362 - 1364

- Faucette SR, Roy LH, Lecluyse EL, Shord SS, Yan B, Laethem RM, Lindley CM. Validation of bupropion hydroxylation as a selective marker of human cytochrome P450 2B6 catalytic activity. *Drug Metabolism and Disposition* 2000, 28 (10): 1222 - 1230
- Faucette SR, Roy LH, Stacy SS, Edward LL, Lindley CM. Evaluation of the contribution of Cytochrome P450 3A4 to human liver microsomal bupropion hydroxylation. *Drug Metab Dispos.* 2001, 29 (8): 1123 - 1129
- Ferris RM, Cooper BR, Maxwell RA. Studies of bupropion's mechanism of antidepressant activity. *J Clin Psychiatry* 1983, 44: 74 - 78.
- Ferry LH Non-nicotine pharmacotherapy for smoking cessation. *Prim Care* 1999, 26 (3): 653 - 669
- Findlay JWA, Van Wyck Fleet J, Smith PG et al. Pharmacokinetics of Bupropion, a novel antidepressant agent, following oral administration of healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 1981, 1981: 127 - 135
- Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 7. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg 1996: 40- 52
- Garfinkel D. Studies on pig liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 1958, 77: 493 - 509
- Gatanaga H, Hayashida T, Tsuchiya K, Yoshino M, Kuwahara T, Tsukada H, Fujimoto K, Sato I, Ueda M, Horiba M, Hamaguchi M, Yamamoto M, Takata N, Kimura A, Koike T, Gejyo F, Matsushita S, Shirasaka T, Kimura S, Oka S. Successful efavirenz dose reduction in HIV type 1-infected individuals with cytochrome P450 2B6*6 and *26. *Clin Infect Dis.* 2007, 45(9): 1230 - 1237
- Gerber JG, Rhodes RJ, Gal J. Stereoselective metabolism of methadone N-demethylation by cytochrome P4502B6 and 2C19. *Chirality* 2004, 16: 36 - 44
- Gervot L, Rochat B, Gautier JC, Bohnenstengel F, Kroemer H, de Berardinis V, Martin H, Beaune P, de Waziers I. Human CYP 2B6: Expression, inducibility and catalytic activities. *Pharmacogenetics* 1999, 9: 295 - 306
- Goodale E, Ascher J, Batey S. Cytochrome P450 metabolism of Bupropion [abstract]. *J Am Geriatr Soc* 1999 Sept, 47 (9): S88
- Gonzales FJ, Crespi CL, Czerwinski M, Gelboin HV. Analysis of human cytochrome P450 catalytic activities and expression. *Tohoku J Exp Med* 1992, 2: 67 - 72
- Gonzales FJ, Gelboin HV. Role of human cytochrome P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. *Drug Metab Rev.* 1994, 26: 165 - 183
- Granvil CP, Madan A, Sharkawi M, Parkinson A, Wainer IW. Role of CYP 2B6 and CYP 3A4 in the vitro N-dechloroethylation of (R)- and (S)- ifosfamide in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 1999, 4: 533 - 541
- Greenblatt DJ, Allen MD, Hartz JS, Shader RI: Diazepam disposition determinants. *Clin Pharmacol Ther* 1980, 27: 301 - 312
- Hanna IH, Reed JR, Guengerich P, Hollenberg PF. Expression of human cytochrome P450 2B6 in *Escherichia coli*: characterization of catalytic activity and expression levels in human liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2000, 376 (1): 206 - 216
- Hesse LM, Venkatakrishnan K, Court MH, von Moltke LL, Duan SX, Shader RI, Greenblatt DJ. CYP2B6 mediates the in vitro hydroxylation of Bupropion: potential drug interactions with other antidepressants. *Drug Metab Dispos* 2000, 28: 1176 - 1183

- Hesse LM, von Moltke LL, Shader RI, Greenblatt DJ. Ritonavir, Efavirent, and Nelfinavir Inhibit CYP2B6 Activity in Vitro: Potential Drug Interactions with Bupropion. *Drug Metabolism and Disposition* 2001, 29 (2): 100 - 102
- Hesse LM, He P, Krishnaswamy S, Hao Q, Hogan K, von Moltke LL, Greenblatt DJ, Court MH. Pharmacogenetic determinants of interindividual variability Bupropion hydroxylation by cytochrome P450 2B6 in human liver microsomes. *Pharmacogenetics* 2004, 14 (4): 225 - 338
- Heyn H, White RB, Stevens JC. Catalytic role of cytochrome P4502B6 in the N-demethylation of S-mephenytoin. *Drug Metab Dispos* 1996, 24: 948 - 954
- Hiratsuka M, Takekuma Y, Endo N, Narahara K, Hamdy SI, Kishikawa Y, Matsuura M, Agatsuma Y, Inoue T, Mizugaki M. Allele and genotype frequencies of CYP2B6 CYP3A5 in the Japanese population. *Eur J Clin Pharmacol* 2002, 58: 417 - 421
- Hiratsuka M, Hinai Y, Konno Y, Nozawa H, Konno S, Mizugaki M. Three novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the CYP2B6 gene in japanese individuals. *Drug Metab. Pharmacokin.* 2004, 19(2): 155 - 158
- Hirschfeld RM. Efficacy of SSRIs and newer antidepressants in severe depression: comparison with TCAs. *J Clin Psychiatry* 1999, 60 (5): 326 - 335
- Hoffmann SM, Fernandez-Salguero P, Gonzales FJ, Mohrenweiser HW. Organization and evolution of the cytochrome P450 CYP2A-2B-2F subfamily gene cluster on human chromosome 19. *Journal Mol. Evol.* 1995, 6: 894 - 900
- Holm KJ, Spencer CM. Bupropion – Eine Übersicht über seinen Einsatz im Rahmen der Raucherentwöhnung. *Drugs* 2000 Apr; 59 (4): 1007 - 1024
- Horst WD, Preskorn SH. Mechanism of action and clinical characteristics of three atypical antidepressants: venlafaxine, nefazodone, bupropion. *J Affect Disord* 1998, 51 (3): 237 - 254
- Hu KQ, Tiyyagura L, Kanel G, Redeker AG. Acute hepatitis induced by bupropion. *Dig Dis Sci.* 2000, 45(9): 1872 - 1873
- Hysu PH, Singh A, Giargiari TD, Dunn JA, Ascher JA, Johnston JA. Pharmacokinetics of Bupropion and its metabolites in cigarette smokers versus nonsmokers. *J Clin Pharmacol* 1997, 37: 737 - 743
- Huang Z, Roy P, Waxman DJ. Role of human liver microsomal CYP 3A4 and CYP 2B6 in catalyzing N-Dechloroethylation of cyclophosphamide and ifosfamide. *Biochemical Pharmacology* 2000, 59: 961 - 972
- Jacobson PA, Green K, Birnbaum A, Remmel RP. Cytochrome P450 isozymes 3A4 and 2B6 are involved in the in vitro human metabolism of thiotepa to TEPA. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2002, 49: 461 - 467
- Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Ohno A, Makino Y, Matsushima E, Hanioka N, Ando M. Functional characterization of cytochrome P450 2B6 allelic variants. *Drug Metab Dispos* 2003, 31: 398 - 403
- Jounaidi Y, Hecht JED, Waxman DJ. Retroviral transfer of human cytochrome P450 genes for oxazaphosphorine-based cancer gene therapy. *Cancer Res.* 1998, 58: 4391 – 4401
- Ketter TA, Jenkins JB, Schroeder DH, et al. Carbamazepine but not valproate induces bupropion metabolism. *J Clin Psychopharmacol* 1995 Oct, 15: 327 - 333

- Kirchheiner J, Brosen K, Dahl ML, Gram LF, Kasper S, Roots I, Sjoqvist F, Spina E, Brockmüller J. CYP2D6 and CYP2C19 genotype-based dose recommendations for antidepressants: a first step toward subpopulation-specific dosages. *Acta Psychiatr Scand* 2001, 104(3): 173 - 192
- Klein K, Lang T, Saussele T, Barbosa-Sicard E, Schunck WH, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM. Genetic variability of CYP 2B6 in populations of African and Asian origin: allele frequencies, novel functional variants, and possible implications for anti-HIV therapy with efavirenz. *Pharmacogenet Genomics* 2005 15(12): 861 - 873
- Klingenberg M. Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys.* 1958, 75: 376 - 386
- Ko JW, Desta Z, Flockhardt DA. Human N-demethylation of (S)-mephenytoin by cytochrome P450s 2C9 and 2B6. *Drug Metab Dispos* 1998, 26: 775 - 778
- Kobayashi K, Abe S, Nakajima M, Shimada N, Tani M, Chiba K, Yamamoto T. Role of human CYP 2B6 in S-mephobarbital N-demethylation. *Drug Metabolism and Disposition* 1999, 27 (12): 1429 - 1433
- Koyama E, Chiba K, Tani M, Ishizaki T. Identification of human cytochrome P450 isoforms involved in the stereoselective metabolism of mianserin enantiomers. *J Pharmacol Exp Ther* 1996, 278: 21 - 30
- Kreth K, Kovar K, Schwab M, Zanger UM. Identification of the human cytochromes P450 involved in the oxidative metabolism of 'Ecstasy'-related designer drug. *Biochem Pharmacol* 2000, 59: 1563 - 1571
- Lai AA, Schroeder DH. Clinical pharmacokinetics of bupropion: a review. *J Clin Psychiatry* 1983, 44: 82 - 84
- Lamba V, Lamba J, Yasuda K, Strom S, Davila J, Hancock ML, Fackenthal JD, Roan PK, Ring B, Wrighton SA, Schuetz EG. Hepatic CYP2B6 Expression: Gender and Ethnic Differences and Relationship to CYP2B6 Genotype and CAR (Constitutive Androstane Receptor) Expression. *Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics* 2003, 307: 906 - 922
- Lang T, Klein K, Fischer J, Nüssler A. K., Neuhaus P, Hofmann U, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM. Extensive genetic polymorphism in the human CYP 2B6 gene with impact on expression and function in human liver. *Pharmacogenetics* 2001, 11: 399 - 415
- Lang T, Klein K, Richter T, Zibat A, Kerb R, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM. Multiple Novel Nonsynonymous CYP2B6 Gene Polymorphisms in Caucasians: Demonstration of Phenotypic Null Alleles. *Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics* 2004, 311: 34 - 43
- Lerman C, Shields PG, Wileyto EP, Audrain J, Pinto A, Hawk L, Krishnan S, Niaura R, Epstein L. Pharmacogenetic investigation of smoking cessation treatment. *Pharmacogenetics* 2002, 12:627 - 634
- Lewis DFV, Watson E, Lake BG. Evolution of the cytochrome P450 superfamily: Sequence alignments and pharmacogenetics. *Mutat Res.* 1998, 410: 245 - 270
- Lindley C, Faucette S, LeCluyse E, Shifflet S, Yan B, Hawke R. Validation of Bupropion (B) hydroxylation as a CYP2B6 (2B6) catalytic marker. *Clin Pharmacol Ther* 2000, 67: 119
- Löffler G. *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie.* Springer Verlag. Berlin. Heidelberg. New York. Barcelona. Hongkong. London. Mailand. Paris. Singapur. Tokio. 2001.
- Loomis WF. *Four billion years: an essay on the evolution of genes and organisms.* Sinauer Associates 1988. Inc., Sunderland, Massachusetts, 286 pp

- May Manke A, Kroemer H, Hempel G, et al. Investigation of the major human hepatic cytochrome P450 involved in 4-hydroxylation and N-dechloroethylation of trofosamide. *Cancer Chemothe. Pharmacol.* 1999, 44: 327 - 334
- McCollom RA, Elbe DH, Ritchie AH. Bupropion-induced serum sickness-like reaction. *Ann Pharmacother.* 2000, 43 (4): 471 - 473
- Meyer UA, Zanger UM. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1997, 37: 269 - 296
- Miksys S, Lerman C, Shields P, Mash D, Tyndale R. The influence of smoking, alcoholism an genetics on CYP2B6 in human brain. *Clin Pharmacol Ther* 2003, 73: P59
- Miles JS, Spurr NK, Gough AC, Jowett T, McLaren AW, Brook JD, Wolf CR. A novel human cytochrome P450 gene (P450IIB): chromosomal localization and evidence for alternative splicing. *Nucleic Acids Res* 1988, 16: 5783 - 5795
- Miles JS, McLaren AW, Wolf CR. Alternative splicing in the human cytochrome P450IIB6 gene generates a high level of aberrant messages. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 8241 - 8255
- Mimura M, Baba T, Yamazaki H, Ohmori S, Inui Y, Gonzales FJ et al. Characterization of cytochrome P-450 2B6 in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 1993, 6: 1048 - 1056
- Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer H, Schäfer-Korting M. *Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, 8. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2001: 21 – 59
- Nebert DW, Gonzales FJ. P450 gene structure evolution and regulation. *Ann Rev Biochem* 1987, 56: 945 - 993
- Nebert DW. Polymorphisms in drug-metabolising enzymes: What is their clinical relevance and why do they exist?. *Am J Human Genet* 1997, 60: 265 - 271
- Nelson DR, Strobel HW. Evolution of cytochrome P450 proteins. *Mol Biol Evol.* 1987, 4: 572 - 593
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegemann JJ, Feyereisen R, Waxmann DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. P450 superfamily: update a new sequences, gen mapping, accession and nomenclature. *Pharmacogenetics* 1996, 6: 1 - 42
- Nelson JC. Managing treatment-resistant major depression. *J Clin Psychiatry* 2003, 64 Suppl. 1, 5 - 12
- Nicholas GS: *JPET* 1934, 43: 223 - 226
- Nielson K, Fiore MC. Cost-Benefit Analysis of Sustained-Release Bupropion, Nicotine Patch, or Both for Smoking Cessation. *Preventive Medicine* 2000, 30: 209 - 216
- Nomikos GG, Damsma G, Wenkstern D, Fibiger HC. Effects of chronic bupropion on interstitial concentrations of dopamine in rat nucleus accumbens and striatum. *Neuropsychopharmacology* 1992, 7: 7 - 14.
- Oda Y, Hamaoka N, Hiroi T, Imaoka S, Hase I, Tanaka K, et al. Involvement of human liver cytochrome P4502B6 in the metabolism of propofol. *Br J Clin Pharmacol* 2001, 51: 281 - 285
- Omura T, Sato R. A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem* 1962, 237: 1375 - 1376

- Ono S, Hatanaka T, Miyazawa S, Tsutsui M, Aoyama T, Gonzales FJ, Satoh T. Human liver microsomal diazepam metabolism using cDNA-expressed cytochrome P450s: role of CYP 2B6, 2C19 and the 3A subfamily. *Xenobiotica* 1996, 26: 1155 - 1166
- Parkinson A, Mudra DR, Johnson C, Dwyer A, Carroll KM. The effects of gender, age, ethnicity, and liver cirrhosis on cytochrome P450 enzyme activity in human liver microsomes and inducibility in cultured human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004, 199: 193 - 209
- Paris PA, Saucier JR. ECG conduction delays associated with massive bupropion overdose. *J Toxicol Clin. Toxicol.* 1998, 36 (6): 595 - 598
- Pierce JP, Gilpin EA. Impact of over-the-counter sales on effectiveness of pharmaceutical aids for smoking cessation. *JAMA* 2002, 288: 1260 - 1264.
- Pollock BG, Sweet RA, Kirshner M, Reynolds IC. Bupropion plasma levels and CYP 2D6 phenotype. *Therapeutic Drug Monitoring* 1996, 18: 581 - 585
- Popli AP, Tanquary J, Lamparella V, et al. Bupropion and anticonvulsant drug interactions. *Ann Clin Psychiatry* 1995 Jun, 7: 99 - 101
- Rae JM, Soukhova NV, Flockhardt DA, Desta Z. Triethylenethiophosphoramidate is a specific inhibitor of cytochrome P450 2B6: implications for cyclophosphamide metabolism. *Drug Metab Dispos* 2002, 30: 525 - 530
- Ramirez J, Innocenti F, Schuetz EG, Flockhart DA, Relling MV, Santucci R, Ratain MJ. CYP2B6, CYP3A4, and CYP2C19 are responsible for the in vitro N-demethylation of meperidine in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 2004, 32: 930 - 936
- Richelson E. Pharmacology of antidepressants--characteristics of the ideal drug. *Mayo Clin Proc* 1994, 69: 1069 - 1081.
- Richter T, Murdter TE, Heinkele G, Pleiss J, Tatzel S, Schwab M, Eichelbaum M, Zanger UM. Potent mechanism-based inhibition of human CYP2B6 by clopidogrel and ticlopidine. *J Pharmacol Exp Ther* 2004, 308: 189 - 197
- Rodriguez-Novoa S, Barreiro P, Jimenez-Nacher I, Rendon A, Soriano V. Pharmacogenetics in HIV therapy. *AIDS Rev.* 2005, 7(2): 103 - 112
- Roose SP, Dalack GW, Glassmann AH, Woodring S, Walsh BT, Giardina EG. Cardiovascular effects of bupropion in depressed patients with heart disease. *Am J Psychiatry* 1991, 148(4): 512 - 516
- Rosenstein DL, Nelson JC, Jacobs SC. Seizures associated with antidepressants: a review. *J Clin Psychiatry* 1993, 54: 289 - 299
- Rotger M, Tegude H, Colombo S, Cavassini M, Furrer H, Décosterd L, Bliedernicht J, Saussele T, Günthard HF, Schwab m, Eichelbaum M, Telenti A, Zanger UM. Predictive value of known and novel alleles of CYP2B6 for efavirenz plasma concentrations in HIV-infected individuals. *Clin Pharmacol Ther.* 2007, 81(4): 557 - 566
- Roy P, Yu LJ, Crespi CL, Waxman DJ. Development of a substrate-activity based approach to identify the major human liver P-450 catalysts of cyclophosphamide and ifosfamide activation based on cDNA-expressed activities and liver microsomal P-450 profiles. *Drug Metab. Dispos.* 1999, 27: 655 - 666
- Ryan D, Levin W. Purification and characterization of hepatic microsomal cytochrome P-450. *Pharmacol Ther* 1990, 45: 153 - 239

- Santisteban I, Povey S, Shephard EA, Phillips IR. The major phenobarbital-inducible cytochrome P-450 gene subfamily (P450IIB) mapped to the long arm of human chromosome 19. *Ann. Hum. Genet.* 1988, 52: 129 - 135
- Schroeder DH. Metabolism and kinetics of Bupropion. *J Clin Psychiatry* 1983, 44 (5): 79 - 81
- Settle EC, Jr. (1998): Bupropion sustained release: side effect profile. *J Clin Psychiatry* 59 Suppl 4: 32 - 36
- Shiffman S, Johnston JA, Khayrallah M, Elash CA, Gwaltney CJ, Paty JA, Gnys M, Evoniuk G, De Vaughn-Geiss J. The effect of bupropion on nicotine craving and withdrawal. *Psychopharmacology* 2000, 148: 33 - 40
- Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* 1994, 270: 414 - 423
- Shrier M, Diaz JE, Tsarouhas N. Cardiotoxicity Associated With Bupropion Overdose . *Journal of the American College of Emergency Physicians* 2000, 35 (1)
- Slemmer JE, Martin BR, Damaj MI. Bupropion is a Nicotinic Antagonist. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2000, 295: 321 - 327
- Stevens JC, White RB, Hsu SH, Martinet M. Human liver CYP2B6-catalyzed hydroxylation of RP 73401. *J Pharmacol Exp Ther* 1997, 3: 1389 - 1395
- Stewart JJ, Berkel HJ, Parish RC, Simar MR, Syed A, Bocchini JA Jr., Wilson JT, Manno JE. Single-dose pharmacokinetics of bupropion in adolescents: effects of smoking status and gender. *J Clin Pharmacol* 2001, 41: 770 - 778
- Svensson US and Ashton M. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the in vitro metabolism of artemisinin. *Br J Clin Pharmacol* 1999, 48: 528 - 533
- Tsuchiya K, Gatanaga H, Tachikawa N, Teruya K, Kikuchi Y, Yoshino M, Kuwahara T, Shirasaka T, Kimura S, Oka S. Homozygous CYP2B6 *6 (Q172H and K262R) correlates with high plasma efavirenz concentrations in HIV-1 patients treated with standard efavirenz-containing regimens. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 319: 1322 - 1326
- Wang Q, Halpert JR. Combined three-dimensional quantitative structure-activity relationship analysis of cytochrome P450 2B6 substrates and protein homology modeling. *Drug Metab Dispos.* 2002, 30 (1): 86 - 95
- Wang J, Sonnerberg A, Rane A, Josephson F, Lundgren S, Stahle L, Ingelmann-Sundberg M. Identification of a novel specific CYP2B6 allele in Africans causing impaired metabolism of the HIV drug efavirenz. *Pharmacogenet Genomics* 2006, 16(3): 191 - 198
- Ward BA, Gorski JC, Jones DR, Hall SD, Flockhardt DA, Desta Z. The cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) is the main catalyst of efavirenz primary and secondary metabolism: implication for HIV/AIDS therapy and utility of efavirenz as a substrate marker of CYP2B6 catalytic activity. *J Pharmacol Exp Ther* 2003, 306: 287 - 300
- Watkins PB. Noninvasive tests of CYP3A enzymes. *Pharmacogenetics* 1994, 4: 171- 184

- White IN, De Matteis F, Gibbs AH, Lim CK, Wolf CR, Henderson C, Smith LL. Species differences in the covalent binding of [¹⁴C]tamoxifen to liver microsomes and the forms of cytochrome P450 involved. *Biochem Pharmacol* 1995, 49: 1035 - 1042
- Wooltorton E. Bupropion (Zyban, Wellbutrin SR): reports of deaths, seizures, serum sickness. *Journal of the Canadian Medical Association* 2002, 166: 68
- Wurm RM, Dunn JA, Silver JS, Patel DK. In vitro metabolism of Bupropion by human liver microsomes and cDNA expressed human cytochrome P450s. *ISSX Proc* 1996, 10: 371
- Xie HJ, Yasar U, Lundgren S, Griskevicius L, Terelius Y, Hasan M, et al. Role of polymorphic human CYP2B6 in cyclophosphamide bioactivation. *Pharmacogenomics J* 2003, 3: 53 – 61
- Yamano S, Nhamburo PT, Aoyama T, Meyer UA, Inaba T, Kalow W, Gelboin HV, McBride OW, Gonzalez FJ. cDNA cloning and sequence and cDNA-directed expression of human P450 IIB1: identification of a normal and two variant cDNAs derived from the CYP2B locus on chromosome 19 and differential expression of the IIB mRNAs in human liver. *Biochemistry* 1989, 28: 7340 - 7348
- Yang TJ, Krausz KW, Shou M, Yang SK, Buters JT, Gonzalez FJ, Gelboin HV. Inhibitory monoclonal antibody to human cytochrome P450 2B6. *Biochem Pharmacol* 1998, 55: 1633 – 1640
- Zanger UM, Klein K, Saussele T, Blievernicht J, Hofmann MH, Schwab M. Polymorphic CYP2B6: molecular mechanisms and emerging clinical significance. *Pharmacogenomics* 2007, 8: 743 - 759

Webseiten

- <http://drnelson.utm.edu/CytochromeP450.html>. UT Memphis, Department Of Biochemistry 1993: Cytochrome P450 homepage
- <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2b6.htm>; Karolinska Institutet National Institut Of Environmental Medicine 1999: Human cytochrome P450 (CYP) allele nomenclature committee.
- <http://medicine.iupui.edu/flockhardt/>; UT Indiana, Department Of Medicine 2002: Cytochrome P450 drug int

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ivar Roots für die Überlassung des Dissertations-Themas und für die Möglichkeit, die Arbeit am Institut für Klinische Pharmakologie der Charité anzufertigen.

Besonders möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Julia Kirchheiner für die sehr engagierte und ausdauernde Unterstützung in der praktischen und theoretischen Einarbeitung in die Thematik sowie für zahlreiche Hilfestellungen bei der Durchführung der Arbeit bedanken.

Vom Institut der Klinischen Pharmakologie der Charité danke ich im Besonderen Dr. Steffen Bauer und Anja Alfandega für die überdurchschnittliche Zusammenarbeit und Hilfe bei der Bearbeitung der Proben und den molekulargenetischen Analysen.

Meiner Frau Nadine danke ich für die unendliche Geduld und Liebe während der Fertigstellung der Dissertation.

Für die Korrekturhilfe hinsichtlich der sprachlichen und grammatikalischen Gestaltung der Arbeit danke ich Dr. Armin Hofmaier.

Meinen Eltern danke ich für die Möglichkeit mein Medizinstudium zu beenden und für die ausdauernde Unterstützung und die kleinen Aufmunterungen zwischendurch.

Erklärung an Eides Statt

„Ich, Christian Klein, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Die Bedeutung genetischer Polymorphismen im Enzym Cytochrom P450 2B6 für Pharmakokinetik und Wirkung des Antidepressivums Bupropion“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Witten, den 21. Juli 2008

Christian Klein

Publikationsliste

Kirchheiner J, Klein C, Meineke I, Sasse J, Zanger UM, Mürdter TE, Roots I, Brockmüller J. Bupropion and 4-OH-bupropion pharmacokinetics in relation to genetic polymorphisms in CYP2B6. *Pharmacogenetics* 2003; 13(10): 619-626

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

Witten, 21. Juli 2008

Christian Klein