

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie

Direktor: Professor Dr. med. Dr. rer. nat. I. Cascorbi

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Bedeutung genetischer Polymorphismen des Enzyms CYP3A5 und
des Transportproteins ABCB1 für deren Expression und für die
Pharmakokinetik von Budesonid bei gesunden Probanden**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt

von

Lena Leschhorn

aus Hamburg

Kiel 2011

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. T. Herdegen

2. Berichterstatter: PD Dr. med. J. Culman

Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.2012

Zum Druck genehmigt

Kiel, den

gez.

INHALTSVERZEICHNIS.....	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Glukokortikoide	2
1.1.1 Pharmakodynamik von Budesonid.....	3
1.1.2 Pharmakokinetik von Budesonid	4
1.1.3 Indikation von Budesonid	5
1.1.3.1 Morbus Crohn	6
1.2 Das Cytochrom P450-Enzymsystem	7
1.2.1 Cytochrom P450 3A5 (CYP3A5).....	8
1.2.2 Genetische Polymorphismen von CYP3A5.....	9
1.3 P-Glykoprotein ABCB1.....	9
1.3.1 Genetische Polymorphismen des P-Glykoprotein ABCB1	11
1.4 Herleitung der Aufgabenstellung.....	13
2 MATERIAL UND METHODEN	14
2.1 Probandenrekrutierung und Studiendurchführung	14
2.1.1 Probandenrekrutierung	14
2.1.2 Kriterien der Probandenauswahl.....	15
2.1.3 Ausschlusskriterien	15
2.1.4 Studiendurchführung.....	16
2.1.4.1 Voruntersuchung der Probanden.....	16
2.1.4.2 Studiendurchführung.....	17
2.1.4.3 Nachuntersuchung der Probanden	17
2.1.4.4 Sigmoidoskopie am Probanden	18
2.1.4.5 Wahl und Dosis des verwendeten Arzneimittels.....	20
2.1.4.6 Diätetische Maßnahmen	20
2.1.5 Dokumentation der Studie.....	20
2.1.6 Datenschutz und Vertraulichkeit	20
2.2 Genotypisierung.....	21
2.2.1 DNA-Extraktion.....	21
2.2.2 PCR-RFLP	21
2.2.3 Kontrollsequenzierung	29

2.3	Bestimmung der Medikamentenkonzentration mittels HPLC- Analyse	29
2.4	Bestimmung der mRNA-Expression im Darmepithel mit real-time PCR ...	30
2.5	Analyse der Messdaten und Statistik	30
3	ERGEBNISSE	31
3.1	Häufigkeit der Genotypen	32
3.2	Pharmakokinetik von Budesonid in Abhängigkeit vom Genotyp	33
3.3	Expression der Enzyme in Abhängigkeit vom Genotyp	40
3.4	Korrelation der verschiedenen Enzymexpressionen	41
4	DISKUSSION	45
4.1	Häufigkeit und Verteilungsmuster der untersuchten Genotypen	45
4.2	Bedeutung des CYP3A5-Polymorphismus und seiner Expression für den Metabolismus von Budesonid	45
4.3	Bedeutung des ABCB1-Polymorphismus und seiner Expression für den Metabolismus von Budesonid	48
5	ZUSAMMENFASSUNG	52
6	QUELLENVERZEICHNIS	54
7	EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	65
8	DANKSAGUNG	66
9	LEBENS LAUF	67

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ABC	ATP-binding-cassette
AUC	Area under the Curve (Fläche unter der Konzentration/ Zeit-Kurve)
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C°	Grad Celsius
C _{max}	maximale Konzentration
Cl	renale Clearance
CYP450	Cytochrom P450-Enzyme
Denatur.	Denaturierung
DM	Diabetes mellitus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alteri
F	orale Bioverfügbarkeit
GREs	Glucocorticoid response elements
ges.	gesamt
GIT	Gastrointestinaltrakt
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
HIV	Human immunodeficiency virus
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Kontr.	Kontrolle
MDR	Multidrugresistance
MRP	Multidrug resistance associated protein
N	Anzahl
NNR	Nebennierenrinde
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
P	Signifikanzniveau

Pat.	Patienten
PCR	Polymerase Chain Reaction
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RT	Reverse Transkription
SNP	Single nucleotide polymorphism
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
t_{\max}	Zeit der maximalen Konzentration
Tab.	Tabelle
Taq	Thermophilus aquaticus
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UK-SH	Universitätsklinikum Schleswig Holstein
UV	Ultraviolett
V_d	Verteilungsvolumen

1 EINLEITUNG

Genetische Besonderheiten können dazu führen, dass Menschen verschieden auf Medikamente reagieren, beziehungsweise diese unterschiedlich schnell verstoffwechseln. Die Folgen reichen von ausbleibender Wirkung bis hin zu gravierenden Nebenwirkungen. Das Bundesamt für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) erfasst zwischen 15000 und 17000 unerwünschte Nebenwirkungen jährlich. Die Tendenz sei hierbei steigend. Davon verlaufen 1200 bis 1400 Komplikationen tödlich. Diese Zahlen repräsentieren lediglich die gemeldeten Zwischenfälle (Hagemann, 2009). In einer englischen Studie wird ein Anstieg der therapiebedürftigen unerwünschten Arzneimittelwirkungen von 1999 bis zu dem Jahr 2008 um 76.8% (von 43,453 auf 75,076 pro Jahr) beschrieben. Von insgesamt 6,830,067 Notaufnahmen waren 75,076 (1.1%) auf die Einnahme von Medikamente zurückzuführen (Wu et al, 2010).

Die genetischen Besonderheiten beruhen auf Varianten, sogenannten Polymorphismen arzneiverstoffwechselnder Enzyme, arzneitransportierender Proteine oder hierbei beteiligter Rezeptoren.

So kommt es unter der Gabe des Glukokortikoids Budesonid bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nicht selten zu ausbleibender oder unerwünschter Wirkung. Vermutet wird der Grund hierfür in einer veränderten Aktivität der am Metabolismus beteiligten Cytochrom P450-Enzyme CYP3A4 und CYP3A5 oder des ABCB1-Genprodukts P-Glykoprotein aufgrund einer verminderten oder verstärkten Expression dieser Isoenzyme im Gastrointestinaltrakt und in der Leber. So wurde ein Polymorphismus im ABCB1-Gen mit einer erniedrigten intestinalen Expression von P-Glykoprotein in Verbindung gebracht (Hoffmeyer et al., 2000), was zu einer erhöhten oralen Bioverfügbarkeit von Budesonid, einem nachgewiesenen Substrat von P-Glykoprotein (Dilger et al., 2006), führen könnte. Die 3435C>T Variante kommt mit einer Häufigkeit von 29% in der kaukasischen Bevölkerung vor (Cascorbi et al 2001), die orale Bioverfügbarkeit könnte somit bei einem beträchtlichen Teil erhöht sein und systemische Wirkungen provozieren. CYP3A-Isoenzyme vermitteln die Biotransformation fast jedes zweiten Medikaments, so auch die Umwandlung von Budesonid in seine inaktiven Metaboliten 16 α -OH-Prednisolon und 6 β -OH-Budesonid. Während

die Allelvarianten des CYP3A4 funktionell keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität haben, wird CYP3A5 in der Leber von 60-80% der kaukasischen Population nicht exprimiert. In vorangegangenen Studien wurde die klinische Relevanz der interindividuellen Unterschiede in der Expression und Aktivität von CYP3A5 untersucht. Sie zeigten deutlichen Einfluss auf die Pharmakokinetik und somit auf die therapeutische Wirkung beispielsweise der Immunsuppressiva Cyclosporin, Tacrolimus und Sirolimus (Hasselink et al., 2003; Renders et al., 2007).

1.1 Glukokortikoide

Glukokortikoide sind Steroid-Hormone aus der Nebennierenrinde. Die wichtigsten Vertreter sind Kortison, Kortisol und Kortikosteron. Alle Kortikoide sind Derivate des Progesterons (Δ^4 -Pregnen-3,20-dion). Die Glukokortikoide haben vielfältige physiologische Wirkungen. Sie nehmen Einfluss auf die Regelkreise des Stoffwechsels, des Wasser- und Elektrolythaushalts, des Herz-Kreislaufsystems und des Nervensystems. Sie wirken entzündungshemmend und immundepressiv. Ihr therapeutischer Einsatz ist somit sehr vielfältig. In hoher Konzentration, die nur durch synthetische Glukokortikoide wie Dexamethason erreicht werden kann, werden sie beispielsweise gegen Kreislaufchock bei Sepsis eingesetzt. Nach Langzeittherapie ist jedoch ein großes Spektrum an unerwünschten Wirkungen bekannt. Diese reichen von Umverteilung des Fettgewebes durch Hemmung der Eiweißsynthese (Cushing-Syndrom mit Vollmondgesicht, Stammfettsucht), verminderter Glukosetoleranz (Diabetes mellitus), Natriumretention (Ödembildung, arterieller Hypertonus), vermehrter Kaliumausscheidung, Inaktivität bzw. Atrophie der NNR mit Wachstumsverzögerung bei Kindern, Störung der Sexualhormonsekretion (Amenorrhoe, Hirsutismus, Impotenz), allergischem Exanthem und Depression bis hin zur Osteoporose (Gessi et al. 2010).

1.1.1 Pharmakodynamik von Budesonid

Glukokortikoide beeinflussen zum einen die Expression verschiedener pro- und antiinflammatorische Proteine und hemmen zum anderen die Synthese von proinflammatorischen Prostaglandinen und Leukotrienen. Durch eine hohe Lipophilie können Glukokortikoide die Zellmembran passieren und intrazellulär an spezielle Glukokortikoidrezeptoren binden. Der Komplex aus Glukokortikoid und Rezeptor gelangt in den Zellkern, bindet an spezielle DNA-Sequenzen, die sogenannten „Glucocorticoid response elements“ (GREs), und steigert so die Expression antiinflammatorischer Proteine wie z.B. I κ B- α und Lipocortin. Durch direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen kann der Glukokortikoid-Rezeptor-Komplex zudem die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wie NF κ -B beeinflussen. NF κ -B ist normalerweise an ein inhibitorisches Protein (I κ B- α) gebunden und liegt somit in inaktiver Form im Zytoplasma vor. Durch bestimmte Stimuli, wie z.B. Interleukin 1-Beta, kann NF κ -B aktiviert werden. Dabei wird das inhibitorische Protein phosphoryliert und dissoziiert vom Transkriptionsfaktor NF κ -B ab. NF κ -B kann somit in den Zellkern gelangen und dort die Transkription proinflammatorischer Proteine starten. Glukokortikoide greifen in diesen Prozess ein, indem sie im Zellkern an NF κ -B binden und somit die Bildung proinflammatorischer Proteine verhindern (Gessi et al. 2010).

Budesonid hemmt die Phospholipase A2 und damit die Freisetzung von Arachidonsäure, welche der Ausgangsstoff für die Synthese von Prostaglandinen und Leukotrienen ist. Neben der Synthese dieser Entzündungsmediatoren wird auch die Makrophagenaktivität blockiert. Antigen-Antikörper-Reaktionen und die Histaminfreisetzung werden bei diesem Wirkmechanismus nicht beeinflusst.

Ergebnisse aus kontrollierten klinischen Studien weisen deutlich daraufhin, dass Budesonid hauptsächlich über lokale Angriffspunkte in der Darmschleimhaut wirksam ist.

Erhältlich ist Budesonid je nach Indikation in Form von Nasentropfen (z.B. Pulmicort Topinasal®, empfohlene Tagesdosis 64 μ g), Inhalationssprays (z.B. Pulmicort®, empfohlene Tagesdosis 400 μ g/d), Hartkapseln mit magenresistenten Pellets (z.B. Budenofalk®, empfohlene Tagesdosis 3x3 mg) und Rektalschaum (Budenofalk®, Dosierung 2 mg/20 ml).

1.1.2 Pharmakokinetik von Budesonid

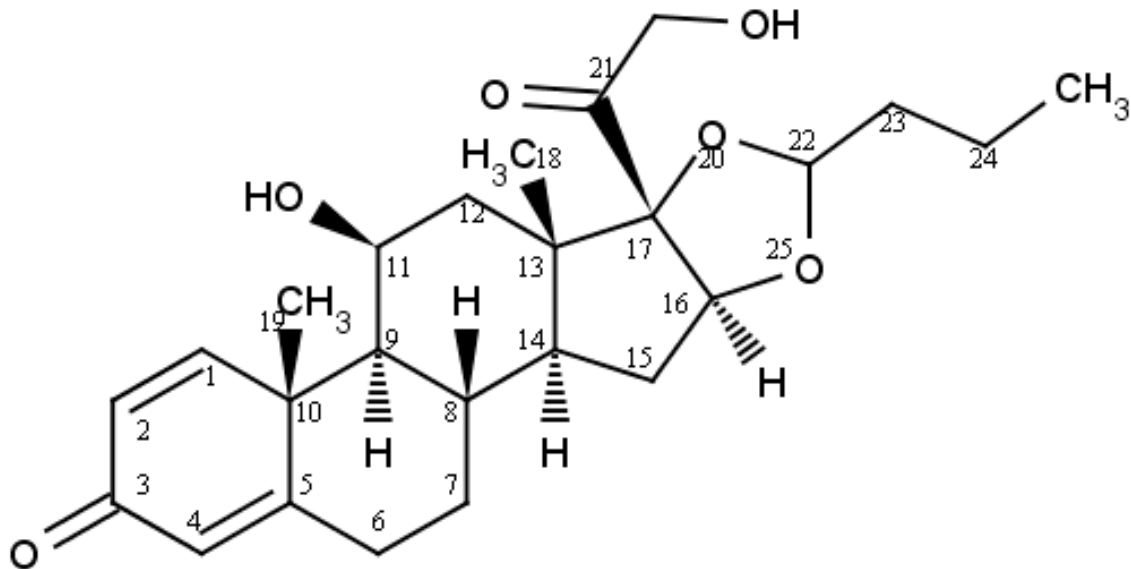


Abbildung 1: Budesonid: Summenformel C₂₅H₃₄O₆

Budesonid ist ein synthetisches, nicht-halogeniertes Glukokortikoid mit einem lipophilen Grundgerüst. Der Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient (log p_{OW}) für Budesonid beträgt 3,21. Somit ist Budesonid in Dichlormethan leicht, in Ethanol kaum und in Wasser praktisch gar nicht löslich.

Sein Molekulargewicht beträgt 450,5 g/mol. Die freien Metaboliten werden größtenteils renal und zu 15-30% über die Fäzes ausgeschieden. Budesonid weist durch seine hohe Rezeptoraffinität nach systemischer Gabe ein Verteilungsvolumen von 4,3 +/- 0,6 l/kg auf. Die Plasmaproteinbindung beträgt 85%. Budesonid wird überwiegend an Albumin und nicht an Transcortin gebunden. Seine Wirkung wird nach oraler Gabe nahezu ausschließlich im Gastrointestinaltrakt entfaltet. Dem liegt ein ausgeprägter first-pass-Metabolismus von Budesonid in der Leber zugrunde. Die orale Bioverfügbarkeit beträgt etwa 10-15% (Edsbacker & Andeson, 2004). Das Zeitintervall zwischen oraler Verabreichung und Beginn der Absorption beträgt bei Budesonid etwa 2 Stunden („Lag-time“) (Klotz & Schwab 2005). Dies ist zurückzuführen auf die besondere Galenik mit sogenanntem „extended release“, welches auch nach oraler Applikation die lokale Wirkung im Kolon ermöglicht. In einer *in-vitro* Studie mit huma-

nen Lebermikrosomen wurde nachgewiesen, dass die hepatische Biotransformation von Budesonid durch Cytochrom P450 (CYP) 3A-Isoenzyme katalysiert wird (Jonsson et al., 1995). Die durch Hydrolyse und Hydroxylierung entstehenden Metaboliten „16 α -Hydroxyprednisolon“ und „6 β -Hydroxybudesonid“ sind pharmakologisch inaktiv (insgesamt < 1% der Glukokortikoidaktivität von Budesonid), was das Risiko für steroidvermittelte Nebenwirkung bei normaler CYP3A-Aktivität gering hält. Die Plasmahalbwertszeit der Elimination beträgt etwa 2,8 Stunden.

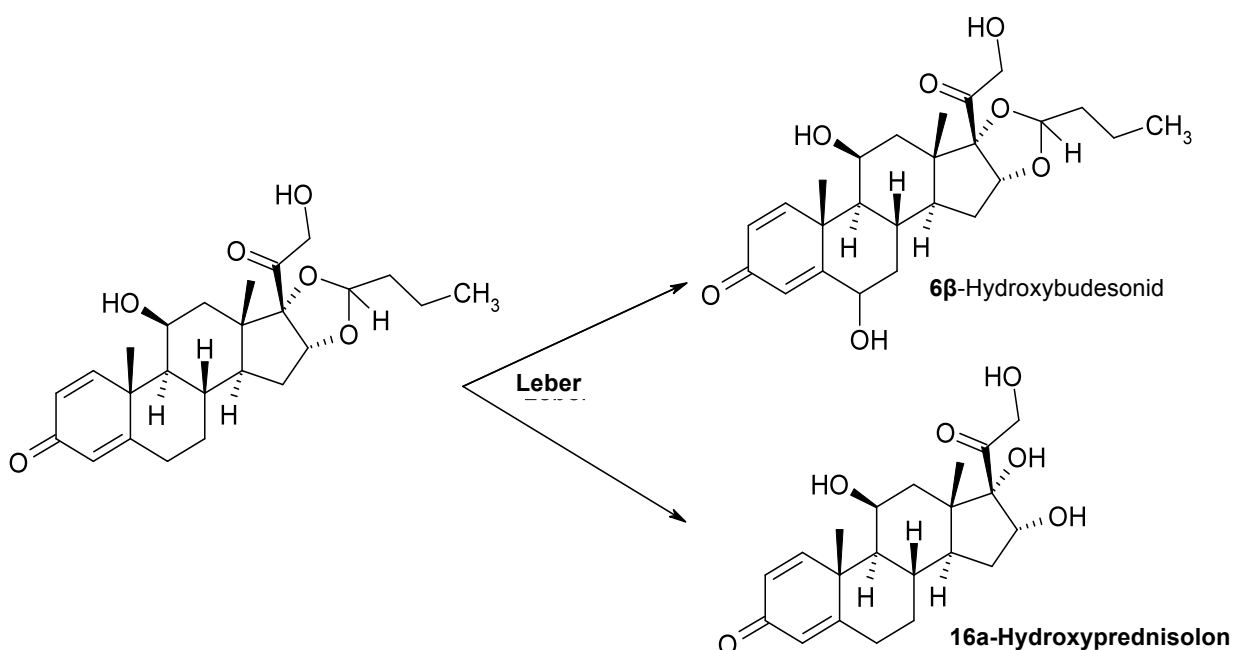


Abbildung 2: Hydrolyse (Acetalspaltung), Hydroxylierung

1.1.3 Indikation von Budesonid

Die ersten Untersuchungen mit nasal appliziertem Budesonid gehen auf das Jahr 1980 zurück, sieben Jahre nachdem die ersten Glukokortikoide dort ihre lokale Anwendung fanden. Als Nasenspray bewirkt das Arzneimittel ein Abschwellen der Nasenschleimhaut und vermindert die Sekretbildung in Nase und Nebenhöhlen bei allergischer Rhinitis und Asthma. Daneben kann die Nasenatmung bei vorhandenen Polypen durch Budesonid erheblich verbessert werden. Budesonid ist auch heute noch Mittel der Wahl bei allergischer Rhinitis und Asthma bronchiale, wobei es zur

Inhalation als Suspension, als Pulver oder als Aerosol zur Verfügung steht (Rote Liste 2010).

Etwa 70-80% der Inhalationsdosis befinden sich nach Schlucken des Speichels im GIT und nur 10-30% der Dosis erreichen die Lunge und werden dort resorbiert. Es findet keine Inaktivierung in der Mukosa des Respirationstrakts statt. Seit 1995 ist Budesonid auch zur Behandlung der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa zugelassen. Bei diesen Indikationen wird es weltweit in mehr als 40 Ländern eingesetzt (Spencer & McTavish, 1995).

1.1.3.1 Morbus Crohn

Die Inzidenz von Morbus Crohn beträgt in Deutschland derzeit 6 auf 100.000 Einwohner und hat in den letzten 70 Jahren stetig zugenommen (Deutsche Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa Vereinigung, www.dccv.de). Das Alter bei Diagnosestellung liegt zwischen dem 20. und 35. Lebensjahr. Frauen und Männer sind gleich häufig betroffen. Der Verlauf der Erkrankung ist individuell sehr unterschiedlich, weshalb es in der Therapie bisher keinen Goldstandard gibt. Bei leichtem bis mittelgradigem Krankheitsverlauf sind zunächst Aminosalicylate Mittel der Wahl. Bei schwergradigem Verlauf und Resistenz gegenüber NSAR kommen Glukokortikoide zum Einsatz. Budesonid spielt hierbei aufgrund seiner positiven kinetischen Eigenschaften, speziell seinem hohen First-Pass-Effekt, seiner potenten lokalen Wirkung und den daraus resultierenden verminderten Nebenwirkungen, eine wesentliche Rolle. Bei ihm wurde eine ebenso starke therapeutische Wirkung wie bei der des Prednisolon nachgewiesen, ohne die das Prednisolon begleitende Suppression des Plasmakortisols (Rutgeerts et al., 1994). Bei der Therapie von Morbus Crohn beträgt die Standarddosierung von Prednisolon 40-80 mg/die, die von Budesonid dagegen nur 9 mg/die (Kompetenznetz CED). Im Falle des Therapieversagens der Glukokortikoide stehen Immunsuppressiva wie Azathioprin, 6-Mercaptopirin, Methotrexat, Infliximab und Mycophenolatmofetil als wirksame Ausweichpräparate zur Verfügung (Krius, 2005). Budesonid ist nur im aktiven Schub der Erkrankung indiziert und wird lokal durch Rektalschaum und Klysmen oder systemisch durch Tabletten verabreicht. Die Wirksamkeit des Budesonid wurde auch in Placebo-kontrollierter Studie nachgewiesen (Feagan et al., 2005). Im Vergleich mit Mesalazin, bei dem es auch um die Wirksamkeit

während der aktiven Phasen der Erkrankung ging, schnitt Budesonid nahezu dreifach besser ab (Otley & Steinhart, 2005). Eine Vergleichsstudie mit Budesonid versus Beclomethasondipropionat, einem weiteren Glukokortikoid, welches bereits 1972 zur topischen Therapie der allergischen Rhinitis auf den Markt kam, jedoch nie in der Therapie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eingesetzt wurde, fiel im Wirkungsnachweis ebenfalls zugunsten von Budesonid aus (Tursi et al., 2006). Neueste Erkenntnisse zeigen, dass Budesonid bei der Therapie von Kindern dieselbe Wirksamkeit zeigt wie bei Erwachsenen, weshalb es nun gleichermaßen auch in der Pädiatrie Anwendung findet (Escher, 2004). Hier ist jedoch besondere Vorsicht geboten zur Verhütung einer Nebenniereninsuffizienz (Dilger et al., 2006). Auch muss beachtet werden, dass mehr als die Hälfte der an Morbus Crohn Erkrankten im Laufe der Therapie eine Resistenz oder Tachyphylaxie gegenüber Steroiden entwickeln. Bezüglich symptomfreier Intervalle der allergischen Darmerkrankung hat die Gabe von Budesonid in einem Beobachtungszeitraum von 24 Monaten keine reduzierende Wirkung auf das Auftreten von Rezidiven gezeigt (Steinhart et al., 2000). Weitere Indikationen für den Einsatz von Budesonid stellen die Primär Biliäre Zirrhose sowie aufgrund angeführter Beobachtung auch durch Chemotherapie ausgelöste Diarrhoen dar (Lenfers et al., 1999).

1.2 Das Cytochrom P450-Enzymsystem

Für die Phase I-Biotransformation, also für die Aktivierung und Deaktivierung von Fremdstoffen und endogenen Substanzen, trägt die Familie der Cytochrom P450-Enzyme (CYP) wesentlich bei (Guengerich et al., 1999). Diese Enzyme kommen im menschlichen Gewebe ubiquitär vor, sind jedoch am umfangreichsten in der Leber exprimiert (Bertilsson et al., 1997).

Es handelt sich um sogenannte Hämproteine, da sie Eisen-Protoporphyrin IX als prosthetische Gruppe enthalten. Die monomeren Proteine haben eine Molmasse zwischen 45 bis 55 kDa. Cytochrom P450 ist in der Phospholipidmatrix des endoplasmatischen Retikulums der Zelle lokalisiert. Da es bei der fraktionierten Zentrifugierung mit Bruchstücken der Zellmembran, den Mikrosomen, sedimentiert, wird es auch als „mikrosomales Enzym“ bezeichnet.

Das Cytochrom P450-Enzymsystem besteht neben dem P450 auch aus der NADPH-abhängigen Cytochrom P450-Reduktase. Diese ist ein Flavoprotein, welches pro Mol

Apoprotein je 1 Mol Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) und 1 Mol Flavin-Mononucleotid (FMN) gebunden hält. Die Molmasse des monomeren Enzymproteins beträgt 78 kDa. Das Enzym überträgt 2 Elektronen separat auf das Cytochrom-P450 mittels des Katalysemechanismus. Der Name Cytochrom P450 leitet sich her von der Lichtabsorption des Kohlenmonoxid-Komplexes des Cytochroms in seiner reduzierten Form (Fe^{2+}) bei $\lambda=450$ nm.

Derzeit sind im menschlichen Organismus 57 verschiedene Enzyme (Isoenzyme) der Superfamilie des Cytochrom P450-Enzyms bekannt (Guengerich, 2006). Alle Isoenzyme sind aufgrund der Ähnlichkeiten ihrer Aminosäuresequenzen in Genfamilien zusammengefasst. Darüber hinaus existieren weitere Subfamilien. Isoformen mit mehr als 40% Sequenzhomologie werden zu einer Familie, Isoformen mit mehr als 40-55 % Homologie (je nach CYP-Familie) zu einer Subfamilie gezählt (Nelson et al., 2004). Die P450-Überfamilie wird mit den Großbuchstaben CYP abgekürzt, die Familien werden unmittelbar als arabische Zahl angehängt (z.B. CYP2, CYP3). Ein weiterer Großbuchstabe charakterisiert die Isoform innerhalb einer Subfamilie (z.B. CYP3A4, CYP2C9). Die bisher 9 bei Menschen isolierten Familien bestehen aus 27 Subfamilien (Nelson et al, 2004).

Gene mit geringer Abweichung in ihrer DNA-Sequenz (Allele) werden als „polymorphe“ Gene bezeichnet. Für pharmakologische Überlegungen gilt ein polymorphes Gen als relevant, wenn es mit einer Frequenz von $>1\%$ in einer Population vertreten ist, und mindestens ein Polymorphismus die Aktivität des betroffenen Enzyms verändert. Zwischen unterschiedlichen ethnischen Populationen, wie etwa bei Kaukasiern und Asiaten, herrschen bezüglich der Allelfrequenz große Unterschiede (Shimada et al., 1994). Abhängig von der genetischen Variante wird die Wirkung von Medikamenten durch das Cytochrom P450-Enzym entweder verstärkt oder abgeschwächt (Herwig & Lehrach, 2006).

1.2.1 Cytochrom P450 3A5 (CYP3A5)

Beim Erwachsenen sind die Isoformen CYP3A4 und CYP3A5 von entscheidender Bedeutung für die Metabolisierung endogener und exogener Substanzen. Die CYP3A-Enzyme sind die quantitativ bedeutsamsten CYP-Enzyme der intestinalen Schleimhaut (Bergheim, Bode & Parlesak, 2005; Doherty & Charman 2002). 60% aller CYP-Enzyme im humanem Lebergewebe sind der CYP3A-Unterfamilie zuzu-

rechnen (Shimada et al., 1994). Diese vermittelt die Biotransformation etwa der Hälfte der im klinischen Gebrauch befindlichen Medikamente, wie z.B. der Makrolid-Antibiotika, Kalziumkanalblocker, Glukokortikoide, Immunsuppressiva, Chemotherapeutika und Benzodiazepine (Shimada et al., 1994; Thummel & Wilkinson, 1998).

1.2.2 Genetische Polymorphismen von CYP3A5

Während für CYP3A4 keine klinisch relevanten genetischen Polymorphismen nachgewiesen wurden, stellt CYP3A5 ein polymorph exprimiertes Enzym dar (Kuehl et al., 2001). Der dazugehörige Polymorphismus umfasst eine G→A Mutation in Position 6986 und hat eine falsche „splicing site“ zur Folge. Daher kommt es nur bei etwa 5-30% der kaukasischen Bevölkerung bei gleichzeitigem Vorliegen des *CYP3A5**1/*1-Genotyps zu einer gesteigerten Enzymexpression, wohingegen der *CYP3A5**3/*3-Genotyp mit einer fehlenden Expression von CYP3A5 einhergeht (Kuehl et al, 2001; Hustert et al., 2001). Die Frequenz der Varianten zeigt eine interethnische Differenz. Heterozygote Träger des Wildtyps *CYP3A5**1/*3 treten häufiger bei Afrikanern auf als bei Kaukasiern und Asiaten (Hustert et al., 2001; Daly 2006). Durch den signifikanten Funktionsverlust des CYP3A5 werden die Träger des *CYP3A5**3/*3 auch als „poor metabolizer“ (PM) bezeichnet.

1.3 P-Glykoprotein ABCB1

Das 170 kDa große P-Glykoprotein (P-gp) gehört zur Familie der membranständigen Efflux-Transportproteine, die auch als ABC-Transporter (*ATP-binding cassette*) bezeichnet werden. P-Glykoprotein ist ein Produkt des „multidrug-resistance-Gens“ (MDR1, ABCB1), wurde als erstes Mitglied der Transporterfamilie identifiziert und ist das wohl am besten untersuchte ABC-Transportprotein überhaupt. Es ist auf Chromosom 7q21 lokalisiert und umfasst 28 Exons. P-gp wird unter anderem in der apikalen Membran der Enterozyten des Dün- und Dickdarms exprimiert und kann aufgrund eines aktiven, lumenwärts gerichteten Transports zu einer verminderten Bioverfügbarkeit vieler Medikamente beitragen (Eichelbaum, Fromm & Schwab, 2004). Auch in den Zellmembranen der Leber, Niere, Blut-Hirn-Schranke und Plazenta ist P-Glykoprotein vorhanden (Mickley et al., 1989; Fojo, 1991; Thiebaut et al., 1987). Es transportiert dort unter Verbrauch von ATP hauptsächlich exogene Substrate aus der Zelle in die Exkretionsorgane. Möglicherweise fungiert es auch als funktionelle

Schranke gegen das Inkorporieren schädlicher Substanzen (Zhang & Benet, 2001). Seine Aufgabe liegt weniger im Transport endogener Stoffwechselprodukte (Marzolini et al., 2004; Ambudkar et al., 2003). P-Glykoprotein ist auch in Lymphozyten und in hohem Ausmaß in hämatopoetischen Stammzellen vertreten, wo es die Zelle vor Toxinen schützt (Chaudhary & Roninson, 1991; Chaudhary et al, 1992; Schinkel et al 1997). Die Hochregulation der ABCB1-Expression nach Einwirkung einer Vielzahl toxischer Stimuli, wie zu Beispiel Chemotherapeutika, UV-Strahlung und Hitze, unterstreicht die Bedeutung dieses Transporters bei der Fremdstoffabwehr und der Reaktion auf genotoxische Reize, verdeutlicht aber auch seinen Einfluss bei der sich nicht selten entwickelnden Chemotherapieresistenz vieler Krebsarten (Geier et al., 2003; Muller, 2000; Scotto, 2003).

Tabelle 1: Substrate des ABC-Transporters P-gp

Wirkstoffgruppe	Medikamente
Zytostatika	Doxetacel, Doxorubicin, Etoposid, Imatinib, Paclitaxel, Teniposid, Vinblastin, Vincristin
Steroide	Dexamethason, Methylprednisolon
Immunsuppressiva	Cyclosporin, Sirolimus, Tacrolimus
HIV-Protease-Inhibitoren	Amprenavir, Indinavir, Nelfinavir, Saquinavir, Ritonavir
Antibiotika	Erythromycin, Ofloxacin, Rifampicin
Betablocker	Bunitrolol, Carvedilol, Celiprolol, Tanilolol;
Calciumblocker	Diltiazem, Verapamil,
Kardiaka	Digoxin, Digitoxin, Chinidin
Statine	Atorvastatin, Lovastatin
H ₁ -Antihistaminika	Fexofenadin, Terfenadin
Antiemetika	Ondansetron
Diverse	Amitryptilin, Colchicin, Itraconazol, Lansoprazol, Loperamid, Losartan, Morphin, Phenytoin
Fluoreszenz Farbstoffe	Rhodamin 123

1.3.1 Genetische Polymorphismen des P-Glykoprotein ABCB1

In verschiedenen ethnischen Populationen wurde das ABCB1-Gen, vor allem in den kodierenden Bereichen, nach SNPs überprüft. Es wurden 19 exonische SNPs, von denen 11 zu einem Aminosäurenwechsel führen, identifiziert (Marzolini et al., 2004). Die bisher veröffentlichten SNPs können im Internet unter der Adresse:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=5243&chooseRS=al
aufgerufen werden.

Bislang sind zwei „single nucleotid“ -Polymorphismen (SNP) des ABCB1-Gens bekannt, welche mit einer reduzierten Aktivität des P-Glykoprotein einhergehen: exon 21:2677G>T/A und exon 26:3435C>T (Eichelbaum, Fromm & Schwab, 2004; Li et al., 2006). Im 2677G>T/A führt der SNP zu einem Aminosäureaustausch von Alanin zu Serin bzw. Threonin an Position 893 des Proteins. Der 3435C>T hingegen ist eine

stumme Variante, die keinen Aminosäureaustausch auf Proteinebene bewirkt. Beide SNPs sind genetisch gekoppelt und werden dadurch häufig gemeinsam vererbt, weshalb bestimmte Haplotypen innerhalb einer Population gehäuft anzutreffen sind (Furuno et al., 2002; Horinouchi et al., 2002; Illmer et al., 2002; Johne et al., 2002; Kurata et al., 2002; Moriya et al., 2002; Tanabe et al., 2001). Die Allelfrequenzen beider SNPs sind bei Kaukasiern etwa gleichmäßig verteilt: homozygote Wildtyp- bzw. Variant-Allelträger sind jeweils mit 25% und heterozygote Individuen mit 50% in der Population vertreten (Cascorbi et al., 2001; Hoffmeyer et al., 2000). In Afrika ist die Prävalenz jedoch mit 17-27% deutlich niedriger, wohingegen in der orientalischen Bevölkerung Werte zwischen von 41 bis 47% beschrieben sind. Dies ist eine wichtige Erkenntnis für die interindividuelle und interethnische Variabilität der Reaktion auf verabreichte Medikamente in unterschiedlichen Bevölkerungen (Schaeffler et al., 2001; Kim et al., 2001; Ameyaw et al., 2010; Lee et al., 2005).

1.4 Herleitung der Aufgabenstellung

Die vorliegende Studie verfolgte das Ziel, die Bedeutung des polymorphen metabolisierenden Enzyms CYP3A5 sowie des intestinalen Effluxtransporters ABCB1 auf die Pharmakokinetik von Budesonid an gesunden Probanden zu überprüfen.

Hier stellten sich folgende Fragen:

1. Ist die systemische Bioverfügbarkeit von 9 mg oral verabreichtem Budesonid und seiner Metaboliten 6- β -Hydroxybudesonid und 16- α -Hydroxyprednisolon bei Expressoren und Non-Expressoren von CYP3A5 unterschiedlich hoch?
2. Wird die systemische Bioverfügbarkeit von Budesonid und seiner Metaboliten 6- β -Hydroxybudesonid und 16- α -Hydroxyprednisolon durch Varianten von ABCB1 beeinflusst?
3. Unterscheidet sich die sigmoidale und rektale mRNA-Expression von CYP3A5 und ABCB1 in Abhängigkeit der genetischen Varianten?

Hieraus könnten sich Hinweise auf individuell-unterschiedliche lokale Konzentrationen bzw. systemische Belastungen ableiten, die ggf. Relevanz für den klinischen Einsatz dieses hochpotenten Glukokortikoids hätten.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Probandenrekrutierung und Studiendurchführung

In dieser Studie soll der Einfluss des CYP3A5- und ABCB1-Genotyps auf die Pharmakokinetik von Budesonid bei gesunden Probanden untersucht werden. Als primäres Zielkriterium wird die Fläche unter der Plasmakonzentration-Zeit-Kurve von Budesonid und seinen Metaboliten 16- α -Hydroprednisolon und 6- β -Hydroxybudesonid über einen Zeitraum von 24 Stunden bestimmt. Als sekundäres Zielkriterium dienen die Analyse der intestinalen P-Glykoprotein- und CYP3A5-Expression, die renale Clearance der Metaboliten sowie die Maximalkonzentration (C_{max}) von Budesonid und seinen Metaboliten zum Zeitpunkt (T_{max}) ihres Auftretens im Plasma. Die Zielkriterien wurden nach den Genotypen von CYP3A5 und ABCB1 stratifiziert.

2.1.1 Probandenrekrutierung

Um die geplante Studie mit gesunden Probanden beginnen zu können, benötigten wir zunächst eine Probandendatei, aus welcher zu einem späteren Zeitpunkt freiwillige Probanden mit für die Studie erforderlichem Genotyp ausgewählt werden konnten. Es sollten etwa 250 Probanden rekrutiert werden. An zwei Wochentagen boten wir je 4 Stunden Gelegenheit, die hierzu erforderlichen 9 ml Vollblut zu spenden und damit an der Studie mit der Bezeichnung „Populationsgenetische Untersuchungen zu Polymorphismen arzneistoffmetabolisierender Enzyme, Transportproteine und Rezeptoren als Basis für eine pharmakogenetische Arzneimittelprüfung“ teilzunehmen. An Patientendaten wurden Name, Alter, Geschlecht, ethnische Herkunft, Kontaktdaten auch zu Angehörigen sowie Gesundheits- und Raucherstatus tabellarisch erfasst. Die Probanden gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Untersuchung ihres Vollbluts auf arzneimetabolisch relevante Gene und Enzyme, sodass die Probandendatei neben dieser Studie auch weiteren vergleichbarer Art zur Verfügung steht. Voraussetzung zur Teilnahme an dieser Studie war die Altersbegrenzung zwischen 18 und 55 Jahre, sowie ein allgemein unauffälliger Gesundheitszustand. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der CAU befürwortet.

2.1.2 Kriterien der Probandenauswahl

Es wurden neun Frauen und neun Männer nach ihrem zuvor bestimmten CYP3A5- und ABCB1-Genotyp ausgewählt, und entsprechend ihres Genotyps einer der beiden Versuchsgruppen, *CYP3A5**1/*3 (6986G/A) „Expressoren“, bzw. *CYP3A5**3/*3 (6986G/G) „Nicht-Expressoren“ zugeordnet. In beiden Gruppen waren außerdem zwei homozygote Träger von *ABCB1* 3435C, fünf heterozygote Träger und zwei homozygote Träger der Variante *ABCB1* 3435T vertreten. Der *ABCB1* 2677G>T/A-Genotyp wurde ebenfalls erfasst, diente jedoch nicht als Auswahlkriterium. Berücksichtigt wurden neben Geschlecht und Genotyp auch das Alter. Jeder weiblichen Probandin sollte ein männliches Äquivalent zum Vergleich gegenüber stehen. Alle Probanden waren kaukasischer Abstammung. Das durchschnittliche Alter lag bei 26,3 Jahren (Schwankungsbreite 22-34 Jahre), das durchschnittliche Gewicht bei 72,3 kg (Schwankungsbreite 57-100 kg) und der durchschnittliche BMI bei 23,3 (Schwankungsbreite 18,3-30,9).

Die demographischen Daten der teilnehmenden Probanden sind in Tabelle 15 aufgeführt.

2.1.3 Ausschlusskriterien

Ausgeschlossen von der Studie waren alle Probanden mit metabolischen oder psychischen Erkrankungen sowie solche mit regelmäßigem Medikamentenkonsum. Besonders geachtet wurde auf vorausgegangene Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts, der Niere oder der Leber, da hierbei Einfluss auf die Pharmakokinetik der Medikamente zu erwarten wäre. Pathologische Veränderungen im EKG sowie in den Laboruntersuchungen, die vor der Studie durchgeführt wurden, führten ebenfalls zum Ausschluss wie selbstverständlich eine bekannte Unverträglichkeit gegenüber Glukokortikoiden. Darüber hinaus wurden keine Probanden in die Studie aufgenommen, die innerhalb der letzten sechs Monate vor Studienbeginn bereits an einer Arzneimittelstudie teilgenommen haben. Positive Testergebnisse bezüglich Schwangerschaft und Drogenkonsum sowie zu erwartende Compliance-Probleme führten ebenfalls zum Ausschluss von der Studie.

Tabelle 2: Ein- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
- Alter 18-55 Jahre	- Unverträglichkeit gegen Budesonid
- Laborwerte im Normbereich	- Positiver HIV- oder HbsAg-Test
- Unauffälliger Gesundheitsstatus	- Regelmäßige Medikamenteneinnahme
- Schriftliche Einwilligung	- Zu erwartende Complianceprobleme
- Negativer Schwangerschaftstest	- Positives Drogenscreening

2.1.4 Studiendurchführung

Zunächst wurden die ausgewählten Probanden aus der nach bereits geschilderten Kriterien erstellten Probandendatei des Instituts für Pharmakologie des UK-SH nochmals auf ihren Gesundheitszustand und ihre Eignung zur Teilnahme an der Studie untersucht. Diese Untersuchung sollte, um verwertbar zu bleiben, mindestens 2 Wochen, höchstens aber 4 Wochen vor Studienbeginn durchgeführt werden. An drei aufeinander folgenden Wochenenden wurden je sechs Probanden in das Institut für Pharmakologie eingeladen. Der Beobachtungszeitraum jedes Probanden betrug 24 Stunden (etwa 5 Halbwertszeiten) und errechnete sich aus der Plasmahalbwertszeit für Budesonid. Diese wird mit durchschnittlich 2-5 Stunden angegeben. Daneben umfasste die Beobachtung eine Nachuntersuchung im Abstand von mindestens 2 Wochen zum Tag des Studienbeginns. 16 Tage nach Verabreichung des Budesonid wurden endoskopisch Gewebeproben aus Rektum und Sigma entnommen. Für die Durchführung der Studie war ein Zeitrahmen von bis zu sechs Monaten eingeplant.

2.1.4.1 Voruntersuchung der Probanden

Die Voruntersuchung diente dem Nachweis, dass die Studienteilnehmer hinreichend gesund waren und für sie kein erhöhtes Risiko durch die Teilnahme an der Studie bestand.

Sie wurden zunächst über ihre Rauch- und Trinkgewohnheiten eingehend befragt. Die klinische Untersuchung beinhaltete die Blutdruck- und Pulsmessung, die Ableitung eines Ruhe-EKG sowie Blut- und Urintests zum Drogenscreening und Aus-

schluss einer HIV- und Hepatitisinfektion sowie bei den weiblichen Teilnehmerinnen auch einer Schwangerschaft.

2.1.4.2 Studiendurchführung

Die Messung der Pharmakokinetik erstreckte sich über 24 Stunden. Dazu wurden jeweils 6 Probanden in den Probandenstation des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie für 24 Stunden aufgenommen. Nach Ankunft der Probanden um 7.30 Uhr wurde erneut ein Status der Vitalparameter erhoben.

Eine Schwangerschaft wurde bei den weiblichen Probandinnen per Urintest nochmals ausgeschlossen. Unmittelbar vor Applikation des Budesonid wurde die erste von insgesamt 9 Blutentnahmen durchgeführt. Dabei wurde im Hinblick auf die folgenden Entnahmen ein Venenverweilkatheter angelegt. Außerdem war eine erste Urinprobe abzugeben. Mahlzeiten wurden gemeinsam jeweils 4, 7 und 10 Stunden nach Medikamentenverabreichung eingenommen unter Berücksichtigung diätetischer Maßnahmen. Blutentnahmen zur Messung der Plasmakonzentration von Budesonid und seiner Metaboliten fanden 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, und 24 Stunden nach Applikation statt. Die 9 ml EDTA-Monovetten wurden sofort zentrifugiert und zur späteren Weiterverarbeitung eingefroren. Der Urin wurde über 24 Stunden gesammelt, um später die metabolische Clearance bestimmen zu können. Zur Erfassung eventueller negativer gesundheitlicher Begleiterscheinungen wurden 2 Stunden nach Medikamentenapplikation erneut die Vitalparameter erhoben. Die Probanden wurden fortlaufend nach ihrem Befinden befragt, um Unverträglichkeiten frühzeitig erkennen zu können. Nach der 9. und letzten Blutentnahme, die 24 Stunden nach Medikamentenapplikation gewonnen wurde, entließen wir die Probanden aus der tagesstationären Beobachtung.

2.1.4.3 Nachuntersuchung der Probanden

Zwei Wochen nach Studiendurchführung haben wir unsere Probanden erstmals nachuntersucht. Sie wurden über ihr Befinden befragt. Kleines Blutbild, Gerinnung und Urinuntersuchung bestätigten uns einen allgemein unauffälligen Gesundheitsstatus. Keiner der Probanden berichtete über unerwünschte Nebenwirkungen.

2.1.4.4 Sigmoidoskopie am Probanden

Die Sigmoidoskopie wurde von einem erfahrenen ärztlichen Mitarbeiter der Klinik für Innere Medizin des UK-SH mittels eines flexiblen Endoskops durchgeführt. Die Biopsie aus Rektum und Sigma zur Beurteilung der Expression von CYP3A4, CYP3A5 und ABCB1 im Darmepithel erfolgte frühestens 16 Tage nach der Verabreichung von Budesonid. Die Biopsate wurden unmittelbar nach Entnahme bis zu ihrer histochemischen Auswertung in flüssigem Stickstoff bei minus 180° aufbewahrt.

Tabelle 3: Zeitlicher Ablauf und Koordination der Untersuchungen
Originalauszug aus den Case-Report-Forms (CRF)

EVALUATION SCHEDULE

Evaluation	Screening	Study day											Study end
		Hours after administration											
		Pre-dose	0	2	4	5	6	8	10	12	24	Day 14+	
Subjects Characteristics (Age, gender, body weight etc.)	X												
Past Medical History	X												
Prior/Concomitant Medication	X	X											
Physical Examination	X												
BP, PR	X	X		X									
Body Temperature		X		X									
12 lead ECG	X												
3 lead ECG		X											
Pulseoxymetry		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Hematology	X												X
Biochemistry, Coagulation	X												X
Serology (Hepatitis/HIV)	X												
Urine	X										X		
Drugs of abuse screening	X												
Pregnancy test	X												
Nicotine/Alcohol anamnesis	X	X											
Inclusion/Exclusion Criteria	X	X											
Medication budesonide			X										
Blood sampling	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Urine sampling	X	X	0 - 24 h										
Sigmoidbiopsy													X
Adverse Events			As required										
Therapy			As required										
Comments			As required										

2.1.4.5 Wahl und Dosis des verwendeten Arzneimittels

Bei dem in dieser Studie verabreichten Arzneimittel handelt es sich um das Präparat Budenofalk® der Dr. Falk Pharma GmbH, Freiburg, Germany. Jeder Proband erhielt um 8.00 Uhr am Morgen des 1. Studientages auf nüchternen Magen die orale Einzeldosis von insgesamt 9 mg Budesonid.

2.1.4.6 Diätetische Maßnahmen

Im Beobachtungszeitraum durften keine weiteren Medikamente mit Ausnahme von Kontrazeptiva eingenommen werden. Auch der Konsum von Drogen, Alkohol und Grapefruitsaft oder -früchten war eine Woche vor bis 24 Stunden nach Verabreichung des Glukokortikoids untersagt. Die Probanden erschienen am Studientag um 7.30 Uhr nüchtern und erhielten ihre erste Mahlzeit erst 4 Stunden nach Einnahme des Budesonids. Am Nachmittag bekam jeder Teilnehmer ein Stück Kuchen und zum Abendessen gab es Brot mit Aufschnitt. Die Mahlzeiten wurden von allen gemeinsam eingenommen. Das Trinken von Wasser oder Apfelsaft war nicht reglementiert.

2.1.5 Dokumentation der Studie

Die erhobenen Probandendaten wie Anamnese, Laborergebnisse und Vitalparameter sowie die Dokumentation über eventuell eingetretene unerwünschte Wirkungen durch Budesonid wurden lückenlos in Case Report Forms (CRFs) eingetragen.

2.1.6 Datenschutz und Vertraulichkeit

Jeder Teilnehmer der Studie erhielt eine Identifikationsnummer. Diese Nummer ist mit der Namenszuordnung auf einer vertraulichen Liste dokumentiert. Die Liste wird in einem Schließfach des Instituts für Pharmakologie des Universitätsklinikums Schleswig Holsteins archiviert. Zugriff auf diese Liste haben nur der Projektleiter und sein Stellvertreter. Mitarbeiter, die an der Genotypisierung beteiligt sind, erhalten ausschließlich anonymisiert gekennzeichnetes Probenmaterial. Auch bei Veröffentlichungen der Studienergebnisse und Einsichtnahme der Daten durch die staatlichen Gesundheitsbehörden zur Qualitätssicherung bleibt die Vertraulichkeit der persönli-

chen Daten gewahrt. Die gesetzlichen Auflagen nach dem Landesdatenschutzgesetz Schleswig Holstein sind in vollem Umfang gewährleistet.

2.2 Genotypisierung

2.2.1 DNA-Extraktion

Die DNA der Probanden wurde aus venösem Blut mittels des QIAmp®DNA Blood Mini Kits (Quiagen) isoliert und bei 4°C gelagert.

Aufbereitung: 400 µl Vollblut wurden mit 40µl Proteinkinase K und 400µl Lysepuffer (AL) versetzt und 10 min bei 56°C inkubiert. 400µl Ethanol (96%) wurden hinzugesetzt und mittels Vortex untergemischt. Dieses Lysat wurde auf eine Silica-Gel-Säule pipettiert und 1 min mit 6000 x g zentrifugiert. Die Säule wurde mit je 500µl Waschpuffer AW1 und AW2 gewaschen und jeweils 1 min mit 20000 x g zentrifugiert. Zur Elution der DNA wurden 200 µl Wasser für 5 min auf der Säule bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 1 min bei 6000 x g zentrifugiert.

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm mit einem Photometer (Biophotometer, Eppendorf) gemessen. Eine $OD_{260}=1$ entsprach einem Gehalt von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Zusätzlich wurde bei einer Wellenlänge von 280nm die Absorption gemessen, um aus dem Quotienten $OD_{260/280}$ den Kontaminationsgrad mit Proteinen zu ermitteln.

2.2.2 PCR-RFLP

Bei der PCR-RFLP wurde zunächst ein bestimmter DNA-Abschnitt mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und die gebildeten DNA-Fragmente anschließend einem Restriktionsendonuklease-Verdau unterworfen, bevor das Schnittmuster mittels Gel-Elektrophorese sichtbar gemacht wurde.

Tabelle 4: PCR-Reaktionsansatz zur Amplifikation der DNA-Fragmente des SNPs *CYP3A5* 6986A>G

Reagenzien	Volumen (μ l)	Endkonzentration
Taq-Puffer (10x)	2,5	1x
dNTP (2,5 mM)	2,5	1 mM
MgCl ₂ (50 mM)	0,6	2,0 mM
Primer <i>CYP3A5</i> -fnew #686941	0,5	200 nM
Primer <i>CYP3A5</i> -r #686942	0,5	200 nM
Taq-DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	0,15	0,02 U/ μ l
DNA (30-100 ng/ μ l)	1,0	-
Aqua bidest.	ad	-
Endvolumen	25,0	

Tabelle 5: PCR-Reaktionsansatz zur Amplifikation der DNA-Fragmente des SNPs *ABCB1* 3435C>T

Reagenzien	Volumen (μ l)	Endkonzentration
Taq-Puffer (10x)	2,5	1x
dNTP (2,5 mM)	2,5	1 mM
MgCl ₂ (50 mM)	1,0	2,0 mM
Primer MDR-11-f	0,5	200 nM
Primer MDR-12-r	0,5	200 nM
Taq-DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	0,15	0,02 U/ μ l
DNA (30-100 ng/ μ l)	1,0	-
Aqua bidest.	Ad	-
Endvolumen	25,0	

Tabelle 6: PCR-Reaktionsansatz zur Amplifikation der DNA-Fragmente des SNPs *ABCB1* 2677G>T/A

Reagenzien	Volumen (µl)	Endkonzentration
Taq-Puffer (10x)	2,5	1x
dNTP (2,5 mM)	2,5	1 mM
MgCl ₂ (50 mM)	1,0	2,0 mM
Primer MDR-9-f	0,5	200 nM
Primer MDR-10/10a-r	0,5	200 nM
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,15	0,02 U/µl
DNA (30-100 ng/µl)	1,0	-
Aqua bidest.	Ad	-
Endvolumen	25,0	

Tabelle 7: Verwendete Primer für die Amplifikation der DNA-Fragmente

SNP	Primernamen	Primersequenz
<i>CYP3A5</i> 6986A>G	#686941	5'-CTT GCA GCA TTT AGT CCT TG-3'
	#686942	5'-GGT CCA AAC GAA GAG GT-3'
<i>ABCB1</i> 3435C>T	MDR-11	5'-TGT TTT CAG CTG CTT GAT GG-3'
	MDR-12	5'-AAG GCA TGT ATG TTG GCC TC-3'
<i>ABCB1</i> 2677G>A	MDR-9	5'-TGC AGG CTA TAG GTT CCA GG-3'
	MDR-10	5'-GTT TGA CTC ACC TTC CCA G-3'
<i>ABCB1</i> 2677G>T	MDR-9	5'-TGC AGG CTA TAG GTT CCA GG-3'
	MDR-10a	5'-TTT AGT TTG ACT CAC CTT CCC G-3'

Angewendet wurde der Thermocycler Applied Biosystems 9700.

Tabelle 8: Thermocyclerbedingungen zur Amplifikation der DNA-Fragmente für die Detektion des SNPs *CYP3A5* 6986A>G

Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	terminale Elongation
2 min	60 sec.	60 sec.	60 sec.	7 min.
94 °C	94 °C	50 °C	72 °C	72 °C
35 Zyklen				

Tabelle 9: Thermocyclerbedingungen zur Amplifikation der DNA-Fragmente für die Detektion des SNPs *ABCB1* 3435C>T

Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	terminale Elongation
2 min	30 sec.	60 sec.	60 sec.	7 min.
94 °C	94 °C	60 °C	72 °C	72 °C
35 Zyklen				

Tabelle 10: Thermocyclerbedingungen zur Amplifikation der DNA-Fragmente für die Detektion des SNPs *ABCB1* 2677G>T/A

Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	terminale Elongation
3 min	30 sec.	60 sec.	60 sec.	7 min.
94 °C	94 °C	60 °C	72 °C	72 °C
35 Zyklen				

Zur Kontrolle des Erfolgs der Amplifikation wurden exemplarisch 8 PCR-Amplifikate in einem 2%igen Agarose-Gel elektrophoretisch getrennt. Dies vollzog sich unter einer Spannung von 120 V für die Dauer von 20-30 min und wurde mittels Imager (Kodak Imager Station 440F) photographiert und bestätigt.

Tabelle 11: Restriktionsansatz für die Restriktionsreaktionen zur Identifizierung des Genotyps von *CYP3A5* 6986A>G

Reagenzien	Volumen (μ l)	Endkonzentration
PCR-Produkt	12	-
NEB Puffer Nr. 1 (10x)	2,5	1x
<i>Rsa</i> I Enzym (10U/ μ l)	0,5	0,2U/ μ l
Aqua bidest.	10	-
Endvolumen	25,0	

Inkubation über Nacht bei 37°C

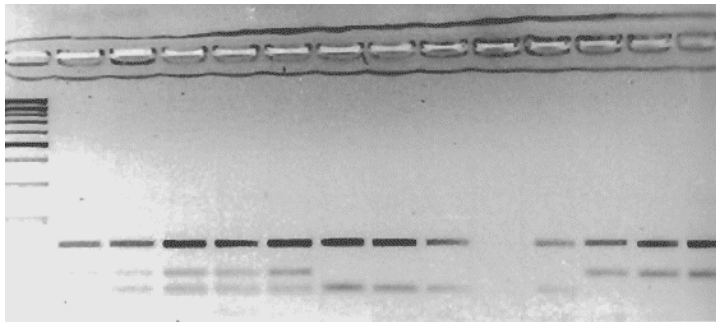


Abbildung 3: Restriktionsverdau zur Genotypisierung von *CYP3A5* 6986A>G mittels *Rsa* I

A/A	140bp,	94bp		
A/G	140bp,	94bp,	74bp,	20bp*
G/G	140bp,		74bp,	20bp*

*nicht sichtbar

Tabelle 12: Restriktionsansatz für die Restriktionsreaktionen zur Identifizierung des Genotyps von *ABCB1* 3435C>T

Reagenzien	Volumen (μ l)	Endkonzentration
PCR-Produkt	12,5	-
NEB Puffer Nr. 3 (10x)	2,5	1x
<i>Mbo</i> I Enzym (10U/ μ l)	0,5	0,2U/ μ l
Aqua bidest.	9,5	-
Endvolumen	25,0	

Inkubation über Nacht bei 37°C

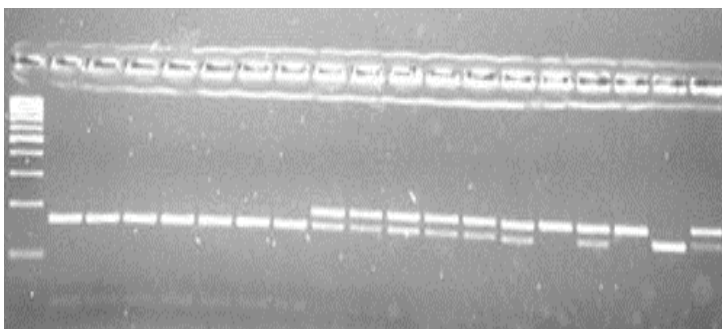


Abbildung 3: Restriktionsverdau zur Genotypisierung von *ABCB1* 3435C>T mittels *Mbo* I

C/C 158bp, 39bp*

C/T 197bp

T/T 197bp, 158bp, 39bp*

*nicht sichtbar

Tabelle 13: Restriktionsansatz für die Restriktionsreaktionen zur Identifizierung des Genotyps von *ABCB1* 2677G>A

Reagenzien	Volumen (μ l)	Endkonzentration
Präampl. DNA + Mastermix	12 + 13	-
NEB Puffer Nr. 3 (10x)	2,5	1x
<i>Bsr</i> I Enzym (10U/ μ l)	0,5	0,2U/ μ l
Aqua bidest.	10	-
Endvolumen	38,0	

Inkubation über Nacht bei 65°C

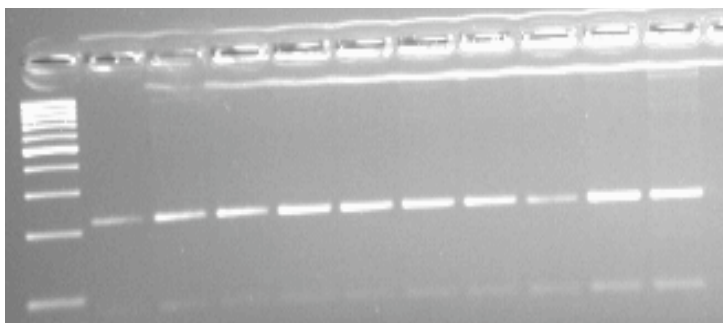


Abbildung 4: Restriktionsverdau zur Genotypisierung von *ABCB1* 2677G>A mittels *Ban* I

G/G 220bp,

G/A 220bp, 206bp, 14bp*

A/A 206bp, 14bp*

*nicht sichtbar

Tabelle 14: Restriktionsansatz für die Restriktionsreaktionen zur Identifizierung des Genotyps von *ABCB1* 2677G>T

Reagenzien	Volumen (μ l)	Endkonzentration
Präampl. DNA + Mastermix	12 + 13	-
NEB Puffer Nr. 1 (10x)	2,5	1x
<i>Ban I</i> Enzym (10U/ μ l)	0,5	0,2U/ μ l
Aqua bidest.	10	-
Endvolumen	38,0	

Inkubation über Nacht bei 37°C

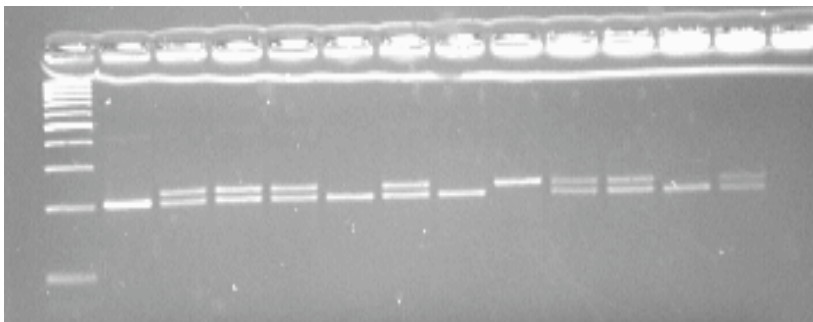


Abbildung 5: Restriktionsverdau zur Genotypisierung von *ABCB1* 2677G>T mittels *Ban I*

G/G 198bp, 26bp*

G/T 224bp, 198bp, 26bp*

T/T 224bp *

*nicht sichtbar

Zur Identifizierung des Genotyps der untersuchten Probe wurden die nach der Restriktion entstandenen Fragmente in einem 3%igen Agarose-Gel elektrophoretisch getrennt. Zu jedem „verdauten“ Restriktionsansatz (Verdau) wurden zunächst 4µl 10x BlueJuice Gel Loading Buffer (für *ABCB1* 2677G<T/A 10µl) hinzugemischt. Das gesamte Volumen wurde in eine Geltasche pipettiert. Nach Ablauf von 60-90 min unter einer Spannung von 100-120 V wurde das Gel mittels Imager (Kodak Image Station 440CF) photographiert. Daraufhin gelang die Auswertung nach der Größe der Fraktionen.

2.2.3 Kontrollsequenzierung

Zur Überprüfung der Richtigkeit der ermittelten Genotypen mittels PCR-RFLP wurden die 18 DNA-Proben der ausgewählten Probanden durch direkte Sequenzierung kontrolliert. Dies erfolgte über einen Kapillar-Sequenzier. Beide Methoden ergaben identische Ergebnisse der Genotypisierung.

2.3 Bestimmung der Medikamentenkonzentration mittels HPLC-Analyse

Bei der hierbei angewandten High Performace Liquid Chromatography handelt es sich um ein chromatographisches Trennverfahren, bei dem die zu untersuchende Substanz zur Analyse zusammen mit einem Elutionsmittel durch eine Trennsäule gepumpt wird, wobei die Trennung der Moleküle nach ihrer Lipophilie an der Reverse-Phase-Säule erfolgt.

Die EDTA- Monovetten mit Vollblut der Probanden wurden einem Labor in Freiburg zur Analyse zugestellt. Die Analyse der Budesonid- und Metabolitenkonzentration im Vollblut und Urin erfolgte durch die Fa. Dr. Falk Pharma mittels LC-MS/MS auf einem SCIEX API 3000 (Sciex, Thornhill, Ontario, Canada).

2.4 Bestimmung der mRNA-Expression im Darmepithel mit real-time PCR

Aus den Sigma- und Rektumbiopsaten wurde die zelluläre RNA mit Hilfe des RNeasy Kit (Quiagen) präpariert, woraus mittels Omniscript RT kit (Quiagen) die cDNA bestimmt wurde. Mit der real-time PCR wurden die mRNA-Expressionslevel für CYP3A4, CYP3A5 sowie für ABCB1 quantifiziert. Hierfür wurde das ABI Prism 7900 HT Fast PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA) angewendet. Vorgegebene Standardprotokolle wurden hierbei berücksichtigt. Durchgeführt wurde diese Untersuchung von Dr. Igor Mosyagin und Dr. Lise-Marie Daufresne am Institut für Pharmakologie des UK-SH.

2.5 Analyse der Messdaten und Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte am Institut für Pharmakologie des UKSH. Die Flächen unter der Plasmakonzentration-Zeit-Kurve (AUC) sowie C_{\max} und T_{\max} wurden als primäre bzw. sekundäre Zielkriterien über ein pharmakokinetisches Modell errechnet. Dafür wurde die Software WinNonLin Version 4.1 verwendet. Die primären und sekundären Zielkriterien wurden zwischen den einzelnen Gruppen verglichen. Hierzu wurden mit Hilfe des SPSS-Programms (SPSS 13.0, Chicago, USA) Varianzanalysen und Regressionsanalysen durchgeführt. Die Verteilung der Kinetik- und Expressionsdaten wurden nach dem Kolmogorov-Smirnov-Test berechnet. Der Vergleich der Gruppen mit unterschiedlichem Genotyp erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Test bzw. Kruskal-Wallis-Test. Als Signifikanzniveau wurde ein $p < 0,05$ festgelegt.

3 ERGEBNISSE

Tabelle 15: Genotyp und demographische Daten der Probanden

Probanden- Nr.	Alter (Jahre)	BMI Kg*m ²	Geschlecht	Genotyp <i>CYP3A5</i> 6986A>G	Genotyp <i>ABCB1</i> 3435C>T
1	23	22.35	m	GA	TT
2	23	29.29	m	GG	CT
3	23	21.38	m	GA	CT
4	23	26.36	f	GA	CC
5	27	24.22	f	GA	CT
6	32	21.60	m	GG	CT
7	26	22.86	f	GA	CT
8	27	20.97	f	GG	CT
9	25	21.47	m	GG	TT
10	31	21.19	f	GA	TT
11	25	25.38	m	GG	TT
12	34	30.96	m	GA	CT
13	27	23.71	f	GG	CT
14	24	23.53	f	GG	CC
15	22	21.55	f	GA	CT
16	27	20.20	m	GG	CC
17	25	24.28	m	GA	CC
18	26	18.31	f	GG	CT

3.1 Häufigkeit der Genotypen

Bei den 253 Probanden der populationsgenetischen Untersuchung, aus der die 18 teilnehmenden Probanden für diese Studie ausgewählt wurden, zeigte sich die Häufigkeitsverteilung der Genotypen wie in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Häufigkeitsverteilung der Genotypen und deren Allelfrequenzen

Gen	Genotyp	Genfrequenz n;[%]	Allel	Allelfrequenz n;[%]
<i>CYP3A5</i>	*1/*1	0 [0%]	*1	40 8%
	*1/*3	40 [16%]	*3	466 92%
	*3/*3	213 [84%]		
<i>ABCB1 3435</i>	C/C	56 [22%]	C	244 [48%]
	C/T	132 [52%]	T	264 [52%]
	T/T	66 [26%]		
<i>ABCB1 2677</i>	G/G	91 [36%]	G	311 [61%]
	G/T	124 [49%]	T	190 [38%]
	T/T	33 [13%]	A	5 [1%]
	G/A	5 [2%]		
	T/A	0 [0%]		
	A/A	0 [0%]		

3.2 Pharmakokinetik von Budesonid in Abhängigkeit vom Genotyp

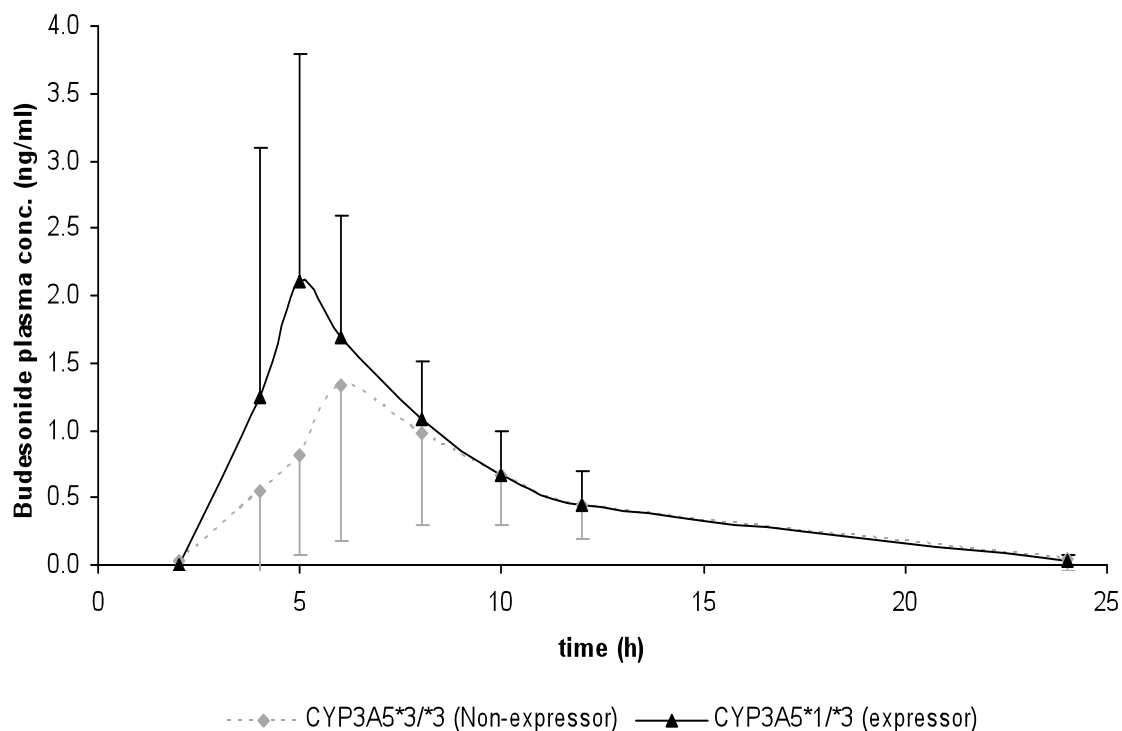


Abbildung 6: Plasmakonzentration-Zeit-Kurve von Budesonid für *CYP3A5* 6986GA (Expressoren) und *CYP3A5* 6986GG (Nicht-Expressoren) nach oraler Verabreichung von 9 mg Budesonid

Nach der oralen Verabreichung einer Einmaldosis von 9 mg Budesonid wurde eine maximale Plasmakonzentration von 2.16 ± 1.40 ng/ml (C_{\max}) in einer Zeit von 6.03 ± 2.15 h (t_{\max}) erreicht. Die durchschnittliche Halbwertszeit betrug 3.70 ± 1.70 h ($t_{1/2}$).

Der Metabolit 6- β -OH-Budesonid erreichte eine C_{\max} von 3.10 ± 1.26 ng/ml nach einer t_{\max} von 5.98 ± 1.71 h. Die Halbwertszeit $t_{1/2}$ war nach 5.70 ± 2.22 h erreicht.

Die C_{\max} von 26.9 ± 15.4 ng/ml war für 16- α -OH-Prednisolon bei einer t_{\max} von 5.97 ± 1.54 h nachgewiesen. Hier betrug die Halbwertszeit $t_{1/2}$ 3.32 ± 1.58 h.

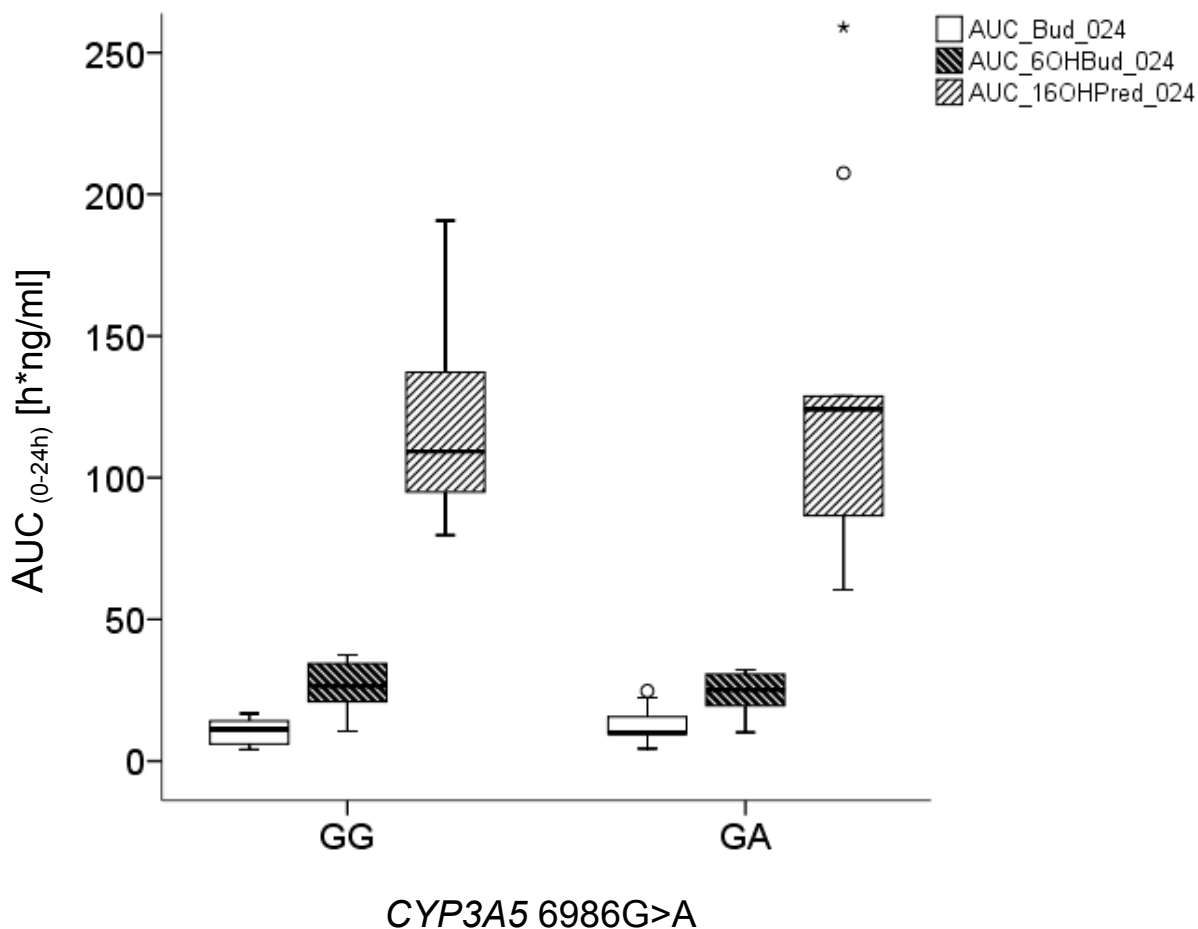


Abbildung 7: AUC(0-24) von Budesonid und seinen Hauptmetaboliten 6-OH-Budesonid und 16-OH-Prednisolon in Abhängigkeit vom CYP3A5 Genotyp

Bei diesen Messungen viel eine deutlich höhere Maximalkonzentration (C_{max}) von 16- α -OH-Prednisolon gegenüber den anderen Substraten auf, jedoch war kein signifikanter Unterschied in den pharmakokinetischen Daten wie der AUC oder der oralen Clearance bezüglich des Genotyps CYP3A5 oder ABCB1 nachweisbar. Auffallend war jedoch ein deutlich höheres Verteilungsvolumen (V_d) unter Berücksichtigung des Körpergewichts in der *CYP3A5**3/*3 Nicht-Expressoren Gruppe gegenüber der Gruppe der *CYP3A5**1/*3 Expressoren ($p=0.021$). Ebenfalls signifikant erhöht zeigte sich die metabolische Clearance von 6- β -OH-Budesonid bei den *CYP3A5**3/*3 Nicht-Expressoren ($p=0.015$).

Die niedrigsten Konzentrationen, die hier quantifiziert wurden, waren für Budesonid 0.1 ng/ml im Plasma und 0.5 ng/ml im Urin, für 16-0H-Prednisolon 0.5 ng/ml im Plasma und 2 ng/ml im Urin sowie für 6-0H-Budesonid 0.1 ng/ml im Plasma und 0.5 ng/ml im Urin.

Tabelle 17: Pharmakokinetische Parameter von Budesonid und seinen Metaboliten, beeinflusst durch den CYP3A5-Genotyp

CYP3A5	C_{max} (ng/ml)	t_{max} (h)	$t_{1/2}$ (h)	AUC_{0-24h} (h*ng/ml)	V_d/KG (l/kg)	Cl_{oral} (ml/min/kg)
Budesonid						
*1/*3	2.20 (0.38-5.75)	4.97 (3.95-11.9)	2.76 (1.82-5.87)	10.0 (4.39-58.8)	45.2 (14.9-58.8)	189 (74.8-599)
*3/*3	1.87 (0.69-4.16)	5.97 (4.00-9.95)	4.08 (2.02-6.97)	11.2 (4.05-16.8)	75.8 (24.5-168)*	252 (114-582)
6β-OH-Budesonid						
*1/*3	3.42 (1.06-4.96)	4.97 (3.95-8.05)	4.95 (2.77-7.67)	25.2 (10.1-32.2)	29.5 (24.2-123)	2.04 (1.29-6.37)
*3/*3	3.04 (1.30-5.18)	5.98 (4.00-9.94)	5.72 (3.77-12.7)	26.5 (10.6-37.5)	32.8 (25.0-60.0)	3.19 (2.34-7.06)*
16α-OH-Prednisolon						
*1/*3	25.5 (9.35-55.5)	5.02 (4.88-8.05)	2.11 (1.26-5.66)	124 (60.4-259)	2.97 (1.16-11.8)	19.9 (7.96-38.1)
*3/*3	16.4 (13.4-59.2)	5.97 (4.00-9.95)	3.61 (1.55-5.98)	109 (79.7-280)	5.83 (1.43-11.1)	26.8 (15.0-48.7)

Tabelle 18: Pharmakokinetische Parameter von Budesonid und seinen Metaboliten, beeinflusst durch den ABCB1-Genotyp

ABCB1	C _{max} (ng/ml)	t _{max} (h)	t _{1/2} (h)	AUC _{0-24h} (h*ng/ml)	V _d /KG (l/kg)	Cl _{total} (ml/min/kg)
Budesonid						
3435CC (n=4)	1.96 (0.69-3.19)	4.98 (4.92-4.98)	2.69 (2.48-3.70)	10.6 (4.05-22.4)	49.7 (32.3-131)	220 (101-582)
3435CT (n=10)	2.15 (0.71-4.16)	5.50 (3.97-9.95)	3.07 (1.82-5.87)	9.75 (5.35-16.8)	52.5 (24.5-168)	221 (89.8-459)
3435TT (n=4)	1.90 (0.38-5.76)	6.95 (3.95-11.9)	5.29 (2.30-6.97)	15.1 (4.39-24.7)	52.0 (14.9-75.1)	119 (74.8-599)
6β-OH-Budesonid						
3435CC (n=4)	3.41 (1.30-3.76)	4.98 (4.92-4.98)	5.47 (4.68-5.95)	25.2 (10.6-32.2)	32.5 (28.4-51.5)	2.89 (2.04-3.39)
3435CT (n=10)	3.40 (1.06-5.18)	6.00 (3.97-9.95)	4.93 (2.77-6.74)	25.0 (10.1-37.5)	30.8 (24.2-91.8)	2.34 (1.29-7.06)
3435TT (n=4)	2.99 (1.08-4.96)	6.95 (3.95-7.95)	7.29 (5.21-12.7)	30.3 (11.9-34.4)	41.6 (24.8-123)	2.91 (1.37-6.37)
16α-OH-Prednisolon						
3435CC (n=4)	24.3 (16.1-31.7)	4.98 (4.92-4.98)	3.58 (2.04-5.83)	117 (95.7-137)	5.18 (3.02-8.03)	21.6 (16.2-46.6)
3435CT (n=10)	25.5 (9.50-59.2)	5.50 (4.00-9.95)	2.68 (1.26-3.69)	127 (60.4-280)	2.60 (1.16-8.64)	24.6 (9.10-48.7)
3435TT (n=4)	13.8 (9.35-30.8)	6.95 (5.88-7.95)	5.22 (1.65-5.8)	90.8 (86.6-126)	8.69 (1.85-11.8)	15.7 (7.96-38.1)

Die Regressionsanalyse zeigte eine umgekehrte Korrelation zwischen der $AUC_{(0-24h)}$ von Budesonid und der intestinalen CYP3A4 mRNA-Expression ($r^2=0.18$; $P=0.040$) (Abb. 8). Dementsprechend zeigte sich auch ein Zusammenhang zwischen der CYP3A4 mRNA-Expression und den $AUCs_{(0-24)}$ der Metaboliten 16-OH-Prednisolon und 6-OH-Budesonid. Somit existiert auch eine signifikante Korrelation zwischen der metabolischen Clearance von 16-OH-Prednisolon ($r^2=0.30$; $P=0.01$) (Abb. 9) und der Clearance von 6-OH-Budesonid ($r^2=0.25$; $P=0.016$) (Abb. 10) mit der Enzymexpression von CYP3A4.

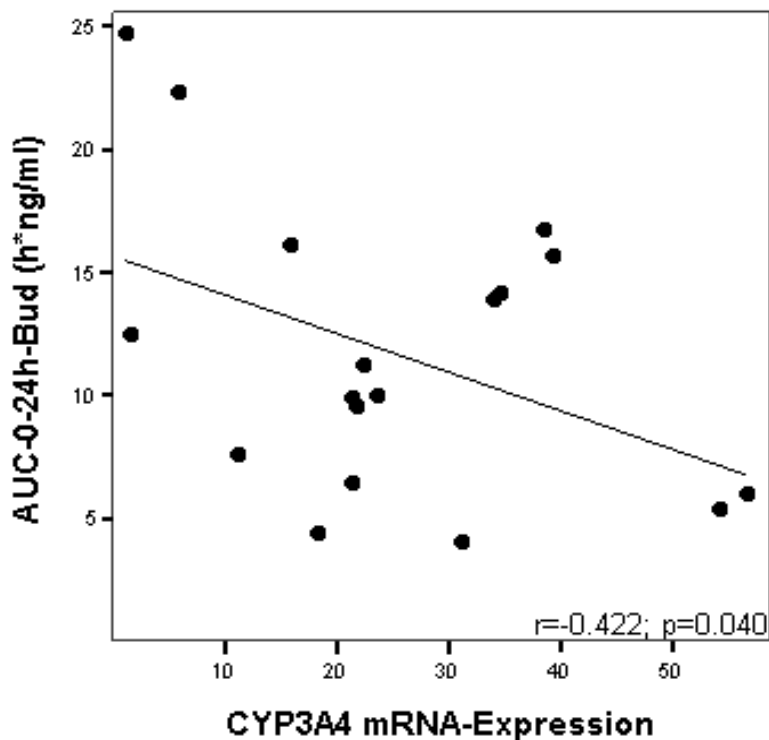


Abbildung 8: Korrelation der $AUC_{(0-24)}$ von Budesonid und CYP3A4 mRNA-Expression

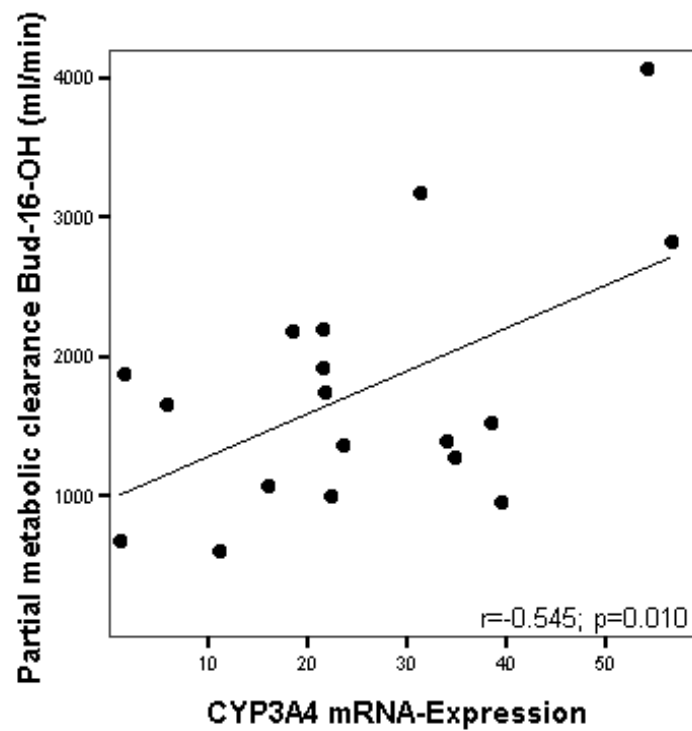


Abbildung 9: Korrelation der Metabolischen Clearance von 16-OH-Prednisolon und der CYP3A4 mRNA-Expression

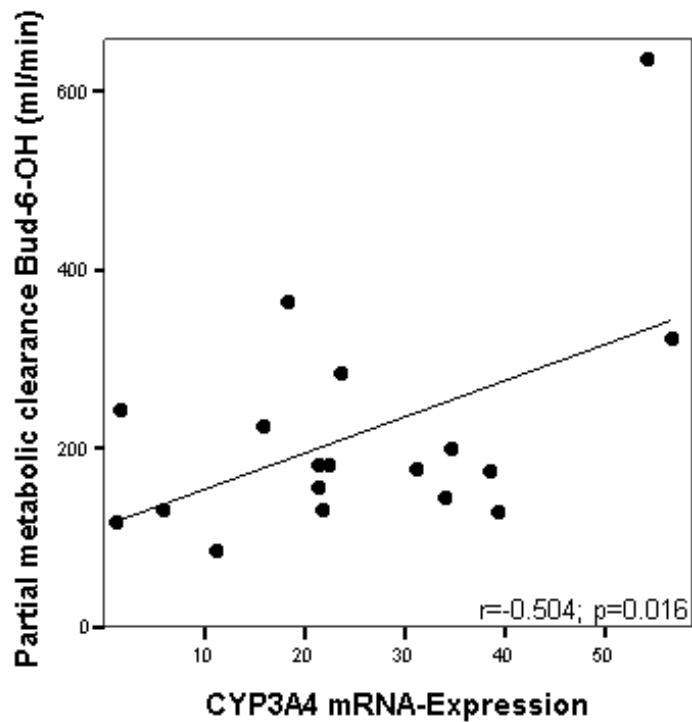


Abbildung 10: Korrelation der Metabolischen Clearance von 6-OH-Budesonid und der CYP3A4 mRNA-Expression

3.3 Expression der Enzyme in Abhängigkeit vom Genotyp

Die Enzymexpressionen von ABCB1, CYP3A4 und CYP3A5 wurden anhand von Sigma- und Rektumbiopsaten ermittelt. Diese wurden bei jedem Studienteilnehmer 16 Tage nach Einnahme von Budesonid entnommen. Die Enzymexpressionen von mRNA ABCB1, mRNA CYP3A5 und mRNA CYP3A4 in Sigma- und Rektumepithel wurden mit den Genotypen ABCB1 und CYP3A5 ins Verhältnis gesetzt. Bei dieser Berechnung zeigte sich erwartungsgemäß eine Korrelation zwischen der CYP3A5 mRNA-Expression in Sigma ($p < 0.0001$) und Rektum ($p = 0.001$) und dem CYP3A5-Genotyp. Im Gegensatz zu den CYP3A5 *1/*3-Expressoren war bei den CYP3A5*3/*3-Nichtexpressoren die CYP3A5 mRNA nahezu nicht nachweisbar.

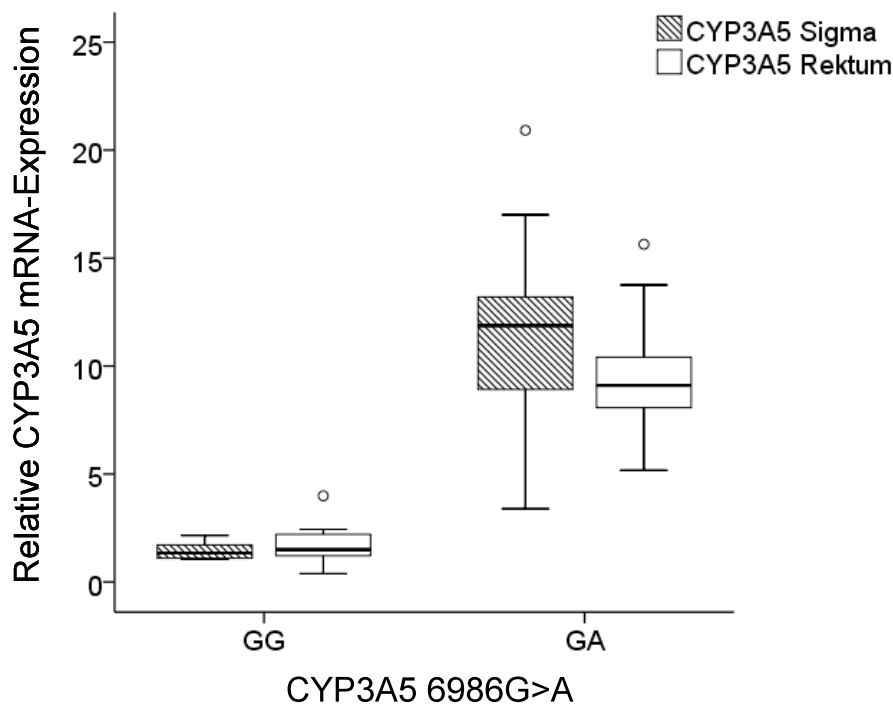


Abbildung 11: Relative CYP3A5 mRNA-Expression in Abhängigkeit vom CYP3A5-Genotyp in Sigma ($p < 0.0001$) und Rektum ($p = 0.001$)

Dagegen war die CYP3A4 mRNA-Expression in der Gruppe der Nichtexpressoren nahezu 50% höher als bei den Expressoren. Dies erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Der ABCB1-Genotyp zeigt keinen Einfluss auf die Expression der ABCB1 mRNA-Expression. Weitere Regelmäßigkeiten zwischen den untersuchten Expressionen und Genotypen ließen sich hier nicht erschließen.

3.4 Korrelation der verschiedenen Enzymexpressionen

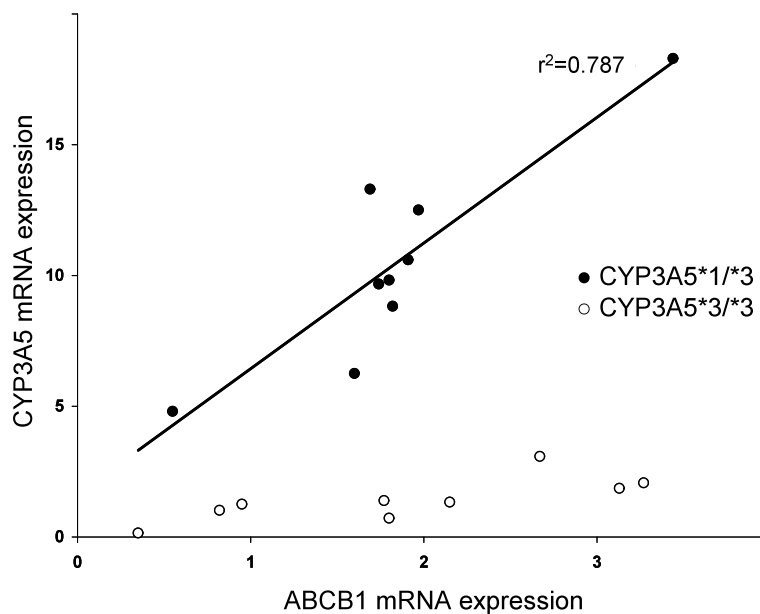


Abbildung 12: Korrelation der intestinalen mRNA-Expression von CYP3A5 und ABCB1

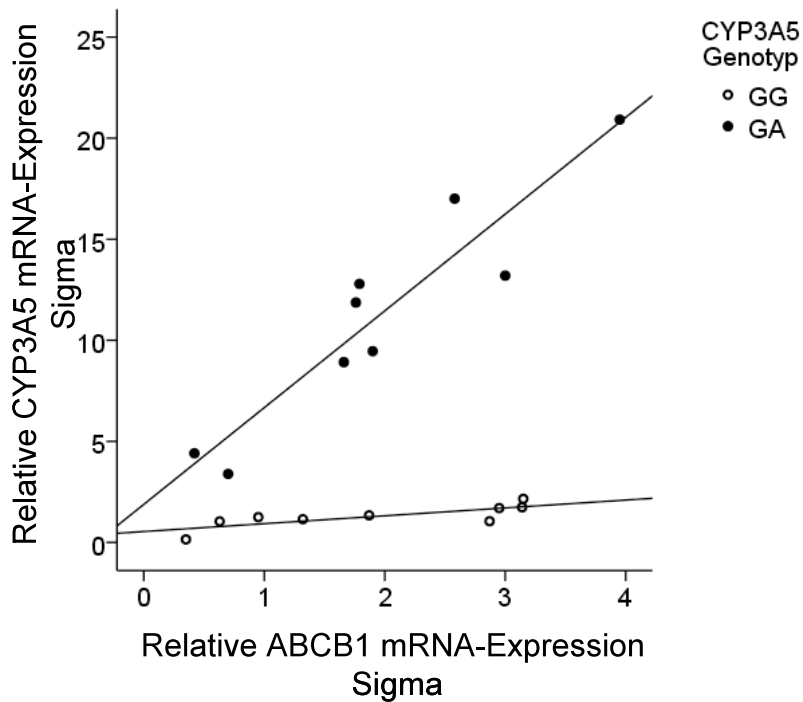


Abbildung 13: Korrelation der mRNA-Expression von CYP3A5 und ABCB1 im Sigma in Abhängigkeit von den Genotypen *CYP3A5**3/*3 ($p=0.013$; $r^2=0.612$) und *CYP3A5**1/*3 ($p<0.0001$; $r^2=0.873$)

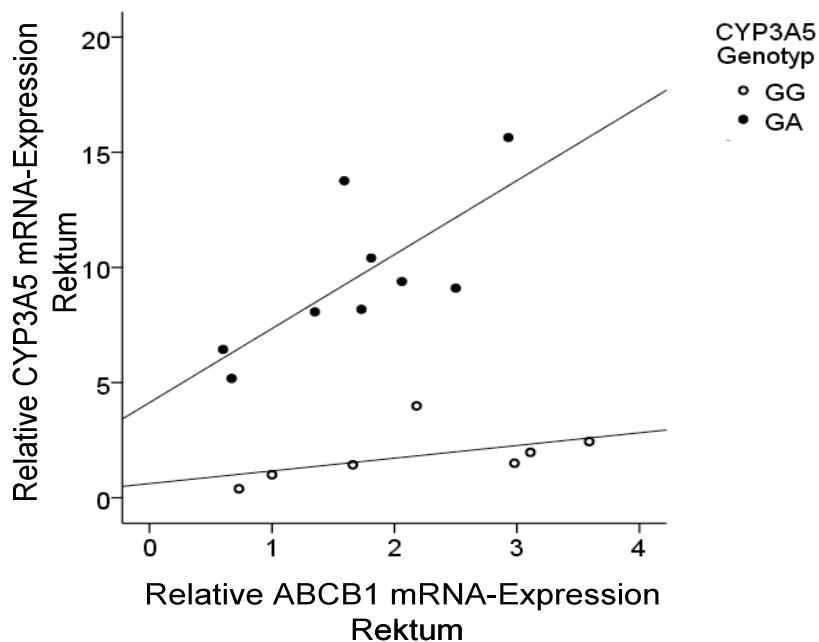


Abbildung 14: Korrelation der mRNA-Expression von CYP3A5 und ABCB1 im Rektum in Abhängigkeit von den Genotypen *CYP3A5**3/*3 ($p=0.229$; $r^2=0.273$) und *CYP3A5**1/*3 ($p=0.023$; $r^2=0.548$)

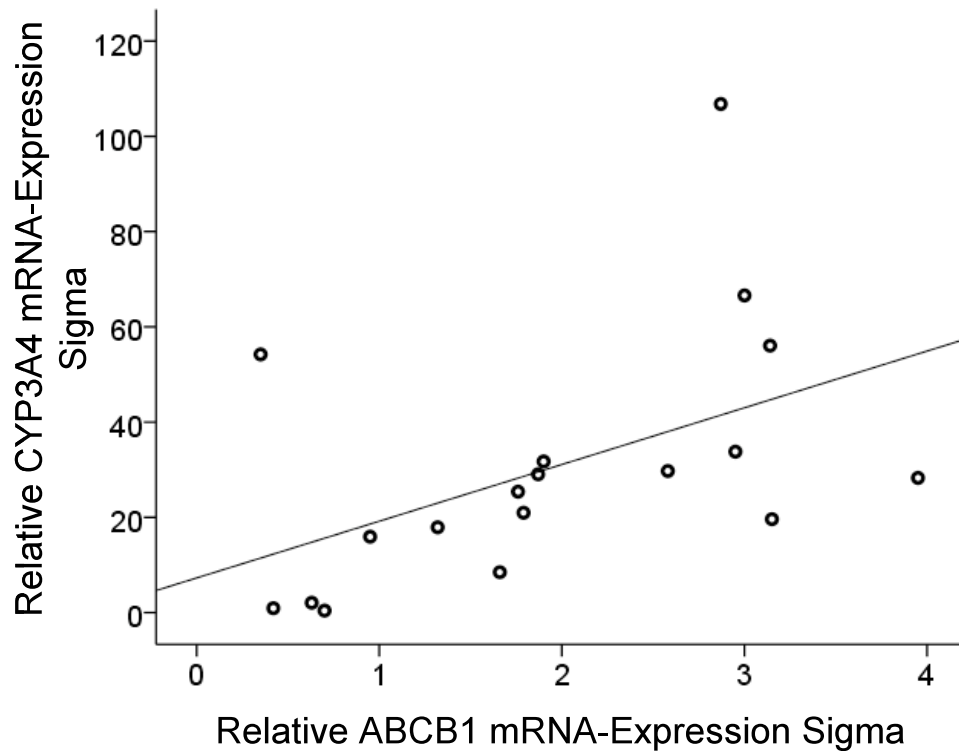


Abbildung 15: Korrelation der relativen mRNA-Expression von CYP3A4 und ABCB1 im Sigma ($p=0.041$; $r^2=0.235$)

Die Auswertungen zeigen einen gleichgerichteten Zusammenhang zwischen der sigmoidalen Expression von CYP3A4 und ABCB1 ($p=0.041$, $r^2=0.235$) (Abb. 15) sowie eine positive Korrelation zwischen der CYP3A5-Expression in Sigma und Rektum und der ABCB1-Expression in Sigma und Rektum ($p=0.001$, $r^2=0.787$) bei CYP3A5-Expressoren (Abb. 12).

Ein Vergleich der Enzymexpression von CYP3A4 mit der von *CYP3A5*3/*3* (Nicht-Expressoren) lässt zunächst eine negative Korrelation vermuten, die errechnete Irrtumswahrscheinlichkeit liegt jedoch gerade außerhalb der repräsentativen Ergebnisgrenze (Abb. 16).

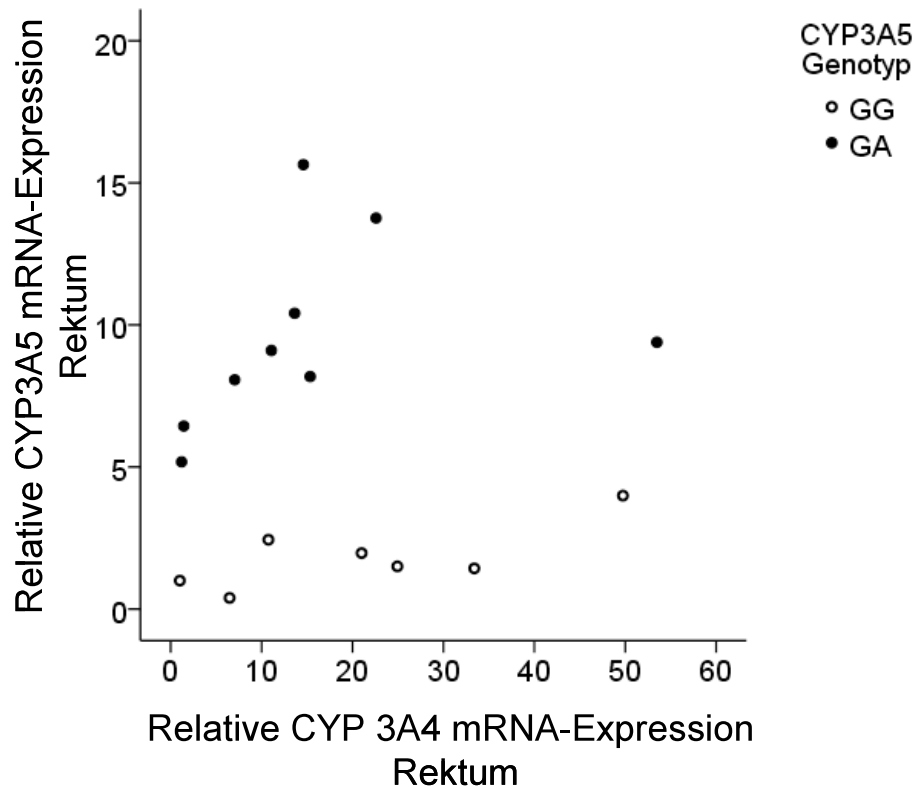


Abbildung 16: Korrelation der mRNA-Expression von CYP3A5 und CYP3A4 in Abhängigkeit von den Genotypen *CYP3A5*3/*3* ($p=0.057$; $r^2=0.548$) und *CYP3A5*1/*3* ($p=0.389$; $r^2=0.107$) im Rektum

4 DISKUSSION

4.1 Häufigkeit und Verteilungsmuster der untersuchten Genotypen

Die Verteilung der Genotypen war aufgrund vorangegangener populationsgenetischer Untersuchungen mit einer Häufigkeit von etwa 80% für *CYP3A5*3* und etwa 5-30% für *CYP3A5*1* zu erwarten (Van Schaik et al., 2002; Kuehl et al., 2001). Die Allelfrequenz des *ABCB1* 3435C>T mit jeweils etwa 25% homozygoten Wildtyp- bzw. Variantallelträgern und etwa 50% heterozygoten Trägern wurde ebenfalls bereits beschrieben (Cascorbi et al., 2001). Beide Häufigkeitsverteilungen ließen sich durch die hiesige Studie bestätigen. Auch die Verteilung von *ABCB1* 2677G>T/A zeigte sich weitestgehend kongruent mit anderen populationsgenetischen Untersuchungen (Cascorbi et al., 2001).

4.2 Bedeutung des CYP3A5-Polymorphismus und seiner Expression für den Metabolismus von Budesonid

Die Subfamilie der Cytochrom-P450-3A-Enzyme ist an der Verstoffwechslung von fast jedem zweiten heute eingesetzten Medikament beteiligt (Thummel & Wilkinson, 1998). Die CYP3A4- und CYP3A5-Isoformen sind hierbei die am besten untersuchten. Genetische Polymorphismen des Enzyms CYP3A5 zeigen eine signifikante klinische Relevanz für die Metabolisierung von Medikamenten, insbesondere bei Immunsuppressiva (Hesselink et al., 2003). *In-vitro* wurde nachgewiesen, dass auch Budesonid ein Substrat von CYP3A-Isoenzymen ist. Die Metabolisierung durch CYP3A-Isoenzyme führt hierbei zu inaktiven Metaboliten 16- α -Hydroxyprednisolon und 6- β -Hydroxybudesonid (Jonsson, Astrom & Andersson, 1995; Ryrfeldt et al., 1982). Das lokal wirkende Budesonid ist nicht frei von unerwünschten Wirkungen, insbesondere wenn es zu pharmakokinetischen Interaktionen durch CYP3A-Hemmer kommt (Sagir et al., 2002). Marc J Bolland beschrieb beispielsweise 2004 einen Fall, in dem ei-

ne 70 jährige Frau, die wegen einer asthmatischen Erkrankung unter einer Langzeittherapie mit Budesonid stand, nach 2-monatiger Gabe von Itraconazol ein Cushing-Syndrom entwickelte. Itraconazol wurde wegen einer Pilzerkrankung der Haut, hervorgerufen durch eine *Scedosporium apiospermum* Infektion, verordnet und ist hierbei ein bekannter CYP3A-Hemmer (Bolland et al., 2004).

Die Strukturähnlichkeit von CYP3A4 und CYP3A5 von ca 80 % geht mit einer hohen Übereinstimmung der Substratspezifität einher (Domanski et al., 2001). In früheren *in-vitro* Untersuchungen über die hepatische Verstoffwechslung von Budesonid (zwischen den Isoformen von CYP3A wurde dabei nicht unterschieden) zeigte sich eine deutliche Ähnlichkeit der Metaboliten 16-OH-Prednisolon und 6-OH-Budesonid mit Testosteron-6 β -Hydroxylase (Korrelat 0.98 und 0.95), einem nachgewiesenen Substrat für den CYP3A4-Phenotyp (Jonsson, Astrom & Anderson, 1995). Ebenso zeigt Ketoconazol, ein spezifischer CYP3A4-Hemmer, eine stark hemmende Wirkung auf die Entstehung der Metaboliten von Budesonid mit einer IC₅₀ von 0,1 μ mol/L (Jonsson, Astrom & Anderson, 1995). Im Widerspruch zu den Ergebnissen dieser *in-vitro* Studien fielen jedoch in einer früheren Studie zwei Probanden mit einem *CYP3A5*1*-Genotyp auf, die gegenüber den Probanden mit dem *CYP3A5*3*-Genotyp eine niedrigere AUC von Budesonid darboten. In der Studie aus dem Jahr 2006 erhielten die Probanden 3 mg Budesonid oral (Dilger et al, 2006). Die Vermutung, dass der *CYP3A5*-Genotyp eine Auswirkung auf die hepatische Verstoffwechslung von Budesonid hat, ließ sich in der hiesigen Studie jedoch nicht beweisend bestätigen. Doch nicht nur die hepatischen CYP3A-Isoformen, sondern auch deren intestinale Expression spielen bei der Wirksamkeit nach oraler Verabreichung von Budesonid nachgewiesen eine Rolle (Zhang & Benet, 2001). Die CYP3A4-Expression in Sigma und Rektum war bei allen Studienteilnehmern in erwarteter Konzentration vorhanden, während die Expression von CYP3A5 nur bei den Probanden mit dem Wildtyp *CYP3A5*1* nachgewiesen wurde. In vorangegangenen *in-vivo* und *in-vitro* Studien wurde festgestellt, dass Budesonid von intestinalem Gewebe aufgenommen und bereits verstoffwechselt wird (Cortijo et al, 2001). Es wurde berichtet, dass die Plasmakonzentration von Budesonid um das Doppelte höher war, nachdem Ketoconazol, ein spezifischer CYP3A4-Hemmer, lokal ins Jejunum und Duodenum appliziert wurde. Verglichen wurde die CYP3A4-Konzentration mit und ohne vorherige Gabe von Ketoconazol (Kul-

lak-Ublick & Becker, 2003). Auch CYP3A-Hemmung durch Grapefruitsaft erhöhte die orale Bioverfügbarkeit von Budesonid bei gesunden Probanden um das Zweifache. Hierbei zeigten sich die Clearance, das Verteilungsvolumen sowie die Eliminationshalbwertszeit im wesentlichen unverändert, was auf eine selektive Hemmung der präsystemischen Verstoffwechslung von Budesonid hinweist (Edsbacker & Andersson, 2004). Patienten mit mittelgradiger Leberzirrhose zeigten in einer Untersuchung eine etwa 3,5-fach erhöhte orale Bioverfügbarkeit von Budesonid gegenüber gesunden Probanden. Andere pharmakokinetische Parameter blieben durch die gestörte Leberfunktion weitgehend unbeeinflusst (Edsbacker & Andersson, 2004).

Nachgewiesenermaßen zeigt die intestinale CYP3A4-Expression einen deutlichen Einfluss auf die Pharmakokinetik von Budesonid und auf die Kinetik seiner inaktiven Hauptmetaboliten 16α -OH-Prednisolon und 6β -OH-Budesonid.

Zusammenfassend kann man davon ausgehen, dass die Ergebnisse der vorliegenden Studie über die Verstoffwechslung von Budesonid hauptsächlich durch die Metabolisierung über das CYP3A4-Enzym auf intestinaler Ebene begründet werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass auch die hepatische Expression von CYP3A4, sowie die Kombination aus hepatischer und intestinaler Expression hierbei noch eine Rolle spielen. Das CYP3A5-Enzym mit seinen Polymorphismen und seiner intestinalen Expression hat hingegen auf die orale Bioverfügbarkeit sowie auf weitere pharmakokinetische Parameter von Budesonid keinen nachgewiesenen Einfluss.

Dagegen konnte in der vorliegenden Studie kein signifikanter Einfluss der CYP3A5- oder ABCB1-Genotypen oder deren mRNA-Expression auf die Einmalgabe von 9 mg Budesonid bei gesunden Probanden nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch eine positive Korrelation zwischen der intestinalen CYP3A4-Expression und der metabolischen Clearance beider Metaboliten. Damit ging auch eine negative Korrelation mit der $AUC_{(0-24h)}$ von Budesonid und seinen Metaboliten einher. Dieses Ergebnis verdeutlicht einen erhöhten Stoffumsatz von Budesonid in seine Metaboliten mit erhöhter CYP3A4-Expression. In diesem Zusammenhang ist naheliegend, dass die erhöhte Clearance beider Metaboliten in der Gruppe der CYP3A5-Nicht-Expressoren durch eine erhöhte

CYP3A4-Expression begründet ist. Dies konnte in der vorliegenden Studie auch bestätigt werden.

4.3 Bedeutung des ABCB1-Polymorphismus und seiner Expression für den Metabolismus von Budesonid

Auch die Transportproteine können die orale Bioverfügbarkeit von Medikamenten nachweislich beeinträchtigen (Zhang & Benet, 2001). Budesonid ist bekannt als ein Substrat des gut untersuchten P-Glykoproteins, ein Produkt des polymorphen ABCB1-Gens (Dilger, Schwab & Fromm, 2004). Die zahlreichen publizierten Studien der letzten Jahre, in denen verschiedene ABCB1-Genotypen und deren Expression, auch in Bezug auf pharmakokinetische Parameter, verglichen wurden zeigten häufig widersprüchliche Ergebnisse.

In der hiesigen Studie wurde an gesunden Probanden ebenfalls untersucht, ob zwischen der mRNA-Expression von ABCB1 und den Genotypen *ABCB1* 2677G<AT und *ABCB1* 3435C>T ein Zusammenhang besteht. Ein sicherer Zusammenhang konnte in dieser vorliegenden Studie nicht gefunden werden.

Auch wenn die hier vorliegenden Ergebnisse im Einklang stehen mit vorherigen Studien die ebenfalls keine Korrelation zwischen der ABCB1 mRNA-Expression im gesunden Gewebe und den ABCB1-Genotypen nachweisen konnten (Siegmond et al., 2002), gilt es die diskrepanten Ergebnisse genauer zu betrachten.

In einer retrospektiven Untersuchung an 21 gesunden kaukasischen Probanden wurde erstmals eine Korrelation zwischen dem Polymorphismus 3435C>T und der duodenalen P-Glykoprotein-Expression beschrieben (Hoffmeyer et al., 2000). Probanden mit dem Genotyp 3435TT (n=5) hatten im Vergleich zu den Genotypen 3435CT (n=10) und 3435CC (n=6) eine erniedrigte P-Glykoprotein-Expression. Einen gegenteiligen Trend zur obigen Untersuchung wurde in einer Studie an 11 japanischen Probanden beobachtet (Nakamura et al., 2002). Die Gruppe des Genotyps 3435TT (n=4) zeigte die höchste duodenale MDR1-mRNA-Expression im Vergleich zu den Genotypen 3435CT (n=4) und 3435CC (n=5). In einer Untersuchung mit deutschen Probanden ergab sich für den SNP 3435C>T kein Effekt auf die duodenale mRNA-Expression (n=32, 3435CC=7,

CT=16, TT=9) oder die duodenale P-Glykoprotein-Expression (n=37, 3435CC=9, CT=18, TT=10) (Siegmond et al., 2002). In einer weiteren Studie, bei der 13 gesunden asiatischen Probanden Biopsien aus dem Duodenum entnommen wurden, war ebenfalls keine signifikante Korrelation zwischen der MDR1-mRNA-Expression und dem Polymorphismus 3435C>T vorhanden (Moriya et al., 2002). Die Betrachtung weiterer P-Glykoprotein exprimierender Gewebe lieferte bislang ebenfalls keine eindeutigen Resultate. Eine Untersuchung an 73 Plazenten kaukasischer Mütter zeigten keinen signifikanten Einfluss der MDR1-SNP 2677G>T, 3435C>T auf die plazentare MDR1-mRNA-Expression (Hitzl et al., 2004). Allerdings war die Expression von P-Glykoprotein verringert, wenn Mutter und Kind gemeinsam den Genotypen 3435TT hatten bzw. bei der Mutter allein der Genotyp 2677TT/3435TT vorlag. Eine Untersuchung an 89 Plazenten japanischer Mütter fand wiederum keine eindeutigen Unterschiede in der plazentaren P-Gp-Expression in Abhängigkeit vom mütterlichen SNP 3435C>T (Tanabe et al., 2001).

Eine Ursache für genotypenabhängige Unterschiede auf Protein-, nicht aber auf mRNA-Ebene, stellt die translationale Kinetik des ABCB1-Proteins dar. Bislang war bekannt, dass die *ABCB1* 3435C>T-Polymorphismen keinen Austausch der Aminosäuren verursachen. Durch einen „silent“ SNP 3435C>T, bei dem ein Nukleotidaustausch in einem Kodon existiert, kommt es zwar nicht zu einem Aminosäureaustausch auf mRNA-Ebene, trotzdem kann die Proteinfaltung durch diesen Genotyp verändert sein. Der genaue Mechanismus, durch den der „stille“ und somit nicht zum Aminosäureaustausch führende Polymorphismus die P-gp-Aktivität beeinflusst ist nicht bekannt. Möglicherweise befindet sich der 3435C>T-Polymorphismus in Verknüpfung mit einem oder mehreren Genvarianten oder Regionen auf dem ABCB1-Gen, welche eine wichtige Rolle bei Steuerungsprozessen einnehmen können, wie beispielsweise die Promoter-Region. Kimchi-Sarfaty entdeckte unter anderem, dass P-glycoprotein-Hemmer Cyclosporin-Alpha und Verapamil eine weniger hemmende Wirksamkeit gegenüber Proteinen zeigten, die aus Haplotypen stammen (1236CT-2677GT, 1236CT-3435CT, 2677GT-3435CT), was daraufhin deutet, dass deren Proteinprodukte eine veränderte Konformation besitzen (Kimchi-Sarfaty et al, 2007). Haplotypen beschreiben spezifische Allele, die durch die Abfolge mehrerer SNP-Loci entlang eines einzelnen Chromosoms definiert sind. Die in der hiesi-

gen Studie nicht berücksichtigten Haplotypen können ebenfalls eine Ursache für die vielen von einander abweichenden Studienergebnisse sein.

Resultierend gilt, dass der Einfluss des ABCB1-Genotyps und der Einfluss der intestinalen ABCB1-mRNA-Expression auf die Pharmakokinetik von Budesonid, einem nachgewiesenen Substrat von P-Glycoprotein (Dilger, Schwab & Fromm, 2004), nicht sicher zu vernachlässigen ist. Auch wenn es in dieser Studie nicht gelungen ist, einen gezielten Zusammenhang darzustellen.

Interessanterweise gelang in der hiesigen Studie der Nachweis eines signifikanten Zusammenhangs zwischen der CYP3A5-mRNA-Expression und der ABCB1-mRNA-Expression in Rektum und Sigma bei *CYP3A5*1*-Trägern, den sogenannten CYP3A5-Expressoren. Damit sind 79% der ABCB1-Expressionsvariabilitäten durch die CYP3A5-mRNA-Expressionslevel vorhersehbar. Diese bedeutsame Korrelation zwischen verstoffwechselndem Enzym und Transportprotein eines Medikaments ist höchstwahrscheinlich in der Koregulation der Expression von CYP3A5 und ABCB1 durch einen gemeinsamen Transkriptionsfaktor wie beispielsweise dem Pregnan X Rezeptor (PXR) begründet. Obwohl auch die CYP3A4-Expression durch den PXR modifiziert wird, ist seine hepatische Expression nicht eindeutig mit der von ABCB1 koreguliert. Trotzdem zeigt sich nachweislich eine gemeinsame Induzierbarkeit der beiden Enzyme in HepG2-Zellen durch Dexamethason (Seree et al., 1998). Die hiesige Studie dokumentiert auch eine Übereinstimmung zwischen der intestinalen mRNA-Expression von CYP3A4 und der von ABCB1, was bereits in einer früheren Studie über die P-Glykoprotein-Expression in der Leber beschrieben wurde (Schuetz et al., 1996).

Zur Bestimmung der intestinalen ABCB1-Expression wurden in der Vorliegenden Studie Darmmukosabiopsate aus Sigma und Rektum entnommen. In einer schwedischen Studie an 27 Probanden wurde unter Anderem die ABCB1-mRNA-Expression in unterschiedlichen Lokalisationen des Gastrointestinaltrakts bestimmt. Hierbei gelang die Erkenntnis, dass nicht nur der Genotyp, sondern auch die Lokalisation für die mRNA-Expression entscheidend ist. Eine kontinuierliche Steigerung der mRNA-Expression mit Punctum Maximum im aufsteigenden Kolon wurde hierbei beschrieben (Thörn et al., 2004). Es wurde die Vermutung aufgestellt, dass gerade im Ileum und Kolon eine vermehrte Permeabilität für Xenobiotika existiert. Dies scheint durch eine steigende Ex-

pression von P-Glycoprotein kompensiert werden zu können. Auffällig ist hierbei ein entgegengesetztes Verteilungsmuster zu der CYP3A-mRNA-Expression. Xenobiotika, die bis dahin nicht durch CYP3A –Enzyme verstoffwechselt wurden, können somit durch vermehrte P-Glycoproteinpräsenz ausgeschieden werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen mit dem Glukokortikoid Budesonid ruft nach klinischer Erfahrung nicht selten Therapieresistenz oder unerwünschte Nebenwirkungen hervor. Es wurde daher der Frage nachgegangen, ob genetische Varianten im wichtigsten intestinalen Effluxtransporter P-Glykoprotein (ABCB1) bzw. im Gen des Cytochrom P450 3A5 (CYP3A5) die Kinetik von Budesonid beeinflussen und so zu interindividuell unterschiedlichem Ansprechen führen könnte.

Es wurde eine klinische Studie an 18 gesunden Probanden, von denen neun genotypisch einen CYP3A5-Expressor und neun einen Non-Expressor-Status aufwiesen durchgeführt. Jeder Proband erhielt eine orale Einmaldosis von 9 mg Budesonid. Untersucht wurde der Zusammenhang zwischen den Genotypen ABCB1 und CYP3A5 und der Pharmakokinetik von Budesonid sowie zwei seiner Metaboliten. Des Weiteren wurden Biopsate aus Rektum und Sigma zur Expressions-Analyse der mRNA entnommen und in die Auswertung mit einbezogen.

Die erfassten pharmakokinetischen Parameter wie AUC, Eliminationshalbwertszeit oder Clearance wiesen weder im Bezug zu CYP3A5 noch zu ABCB1-Varianten statistisch signifikanten Unterschiede auf. Es zeigte sich aber eine signifikante Korrelation zwischen der intestinalen CYP3A4-mRNA-Expression und der Clearance von 16-OH-Prednisolon ($r^2=0.30$; $p=0.01$) sowie von 6-OH-Budesonid ($r^2=0.25$; $p=0.016$) ab. Die AUC_{0-24h} von Budesonid wies hingegen eine negative Korrelation zur Expression CYP3A4 ($r^2=0.18$; $p=0.040$) auf.

Die Auswertungen zeigten zudem einen gleichgerichteten Zusammenhang zwischen der sigmoidalen mRNA-Expression von CYP3A4 und ABCB1 ($p=0.041$, $r^2=0.235$). CYP3A5-Expressoren wiesen darüber hinaus eine hoch-signifikante Koregulation von CYP3A5 und ABCB1 in sämtlichen Proben auf ($r^2=0.79$; $p=0.001$).

Ausschlaggebend für die Pharmakokinetik von Budesonid scheinen somit weniger Varianten in CYP3A5 oder ABCB1, sondern vielmehr die große interindividuelle Variabilität der CYP3A4-Expression und seiner Aktivität zu sein. Dies

bedeutet für die Klinik, dass eine Co-Medikation von Budesonid und einem CYP3A4-Inhibitor zu einer Erhöhung der Bioverfügbarkeit mit einer entsprechend erhöhten systemischen Exposition führen könnte.

6 QUELLENVERZEICHNIS

Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE, Gottesman MM. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene*, 2003. 22(47): p. 7468-85.

Ameyaw MM, Regateiro F, Li T, Liu X, Tariq M, Mobarek A, Thornton N, Foyalayan GO, Githang'a J, Indalo A, Ofori-Adjei D, Price-Evans DA, McLeod HL. MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in Exon 26 is significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics*, 2001, 217-221.

Bergheim I, Bode C, Parlesak A. Distribution of cytochrome P450 2C, 2E1, 3A4, and 3A5 in human colon mucosa. *BMC Clin Pharmacol*, 2005. 5: p. 4. Bergheim, I., C. Bode, and A. Parlesak, Distribution of cytochrome P450 2C, 2E1, 3A4, and 3A5 in human colon mucosa. *BMC Clin Pharmacol*, 2005. 5: p. 4.

Bertilsson L, Tybring G, Wide J, Chang M, Tomson T. Carbamazepine treatment induces the CYP3A4 catalysed sulphoxidation of omeprazole, but has no or less effect on hydroxylation via CYP2C19. *Br J Clin Pharmacol*, 1997. 44(2): p. 186-9.

Bolland MJ, Bagg W, Thomas MG, Lucas JA, Ticehurst R, Black PN. Cushing's syndrome due to interaction between inhaled corticosteroids and itraconazole. *Ann Pharmacother*, 2004. 38(1): p. 46-9.

Cascorbi I, Gerloff T, Johne A, Meisel C, Hoffmeyer S, Schwab M, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Roots I. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther*, 2001. 69(3): p. 169-74.

Chan LM, Lowes S, Hirst BH. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci*, 2004. 21(1): p. 25-51.

- Chaudhary PM, Roninson IB. Expression and activity of P-Glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. (1991) *Cell* 66, 85-94.
- Chaudhary PM, Mechetner EB, Roninson IB. Expression and activity of the multidrug resistance P-Glycoprotein in peripheral blood lymphocytes. (1992). *Blood* 80, 2735-2739.
- Cortijo J, Urbieto E, Bort R, Castell JV, Ruiz- Bravo C. Biotransformation in vitro of the 22R and 22S epimers of budesonide by human liver, bronchus, colonic mucosa and skin. *Fundam Clin Pharmacol*, 2001. 15(1): p. 47-54.
- Daly AK. Significance of the minor cytochrome P450 3A isoforms. *Clin Pharmacokinet*, 2006. 45(1): p. 13-31.
- Dilger K, Cascorbi I, Grünhage F, Hohenester S, Sauerbruch T, Beuers U. Multidrug resistance 1 genotype and disposition of budesonide in early primary biliary cirrhosis. *Liver Int*, 2006. 26(3): p. 285-90.
- Dilger K, Denk A, Heeg MH, Beuers U. No relevant effect of ursodeoxycholic acid on cytochrome P450 3A metabolism in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*, 2005. 41(3): p. 595-602.
- Dilger K, Alberer M, Busch A, Enninger A, Behrens R, Koletzko S, Stern M, Beckmann C, Gleiter CH. Pharmacokinetics and pharmacodynamic action of budesonide in children with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 2006. 23(3): p. 387-96.
- Dilger K, Schwab M, Fromm MF. Identification of budesonide and prednisone as substrates of the intestinal drug efflux pump P-glycoprotein. *Inflamm Bowel Dis*, 2004. 10(5): p. 578-83.
- Doherty MM, Charman WN. The mucosa of the small intestine: how clinically relevant as an organ of drug metabolism? *Clin Pharmacokinet*, 2002. 41(4): p. 235-53. Doherty, M.M. and W.N. Charman, The mucosa of the small intestine: how clinically relevant as an organ of drug metabolism? *Clin Pharmacokinet*, 2002. 41(4): p. 235-53.

- Domanski TL, Finta C, Halpert JR, Zaphiropoulos PG. cDNA cloning and initial characterization of CYP3A43, a novel human cytochrome P450. *Mol Pharmacol*, 2001. 59(2): p. 386-92.
- Edsbacker S, Andersson T. Pharmacokinetics of budesonide (Entocort EC) capsules for Crohn's disease. *Clin Pharmacokinet*, 2004. 43(12): p. 803-21.
- Eichelbaum M, Fromm MF, Schwab M. Clinical aspects of the MDR1 (ABCB1) gene polymorphism. *Ther Drug Monit*, 2004. 26(2): p. 180-5.
- Escher JC. Budesonide versus prednisolone for the treatment of active Crohn's disease in children: a randomized, double-blind, controlled, multicentre trial. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2004. 16(1): p. 47-54.
- Farrell RJ, Menconi MJ, Keates AC, Kelly CP. P-glycoprotein-170 inhibition significantly reduces cortisol and ciclosporin efflux from human intestinal epithelial cells and T lymphocytes. *Aliment Pharmacol Ther*, 2002. 16(5): p. 1021-31.
- Feagan BG, Sandborn WJ, Baker JP, Cominelli F, Sutherland LR, Elson CO, Salzberg BA, Archambault A, Bernstein CN, Lichtenstein GR, Heath PK, Cameron S, Hanauer SB. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of CDP571, a humanized monoclonal antibody to tumour necrosis factor-alpha, in patients with corticosteroid-dependent Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 2005. 21(4): p. 373-84.
- Fojo AT. Multidrug resistance. *Adv Intern Med*, 1991. 36: p. 195-218.
- Furuno T, Landi MT, Ceroni M, Caporaso N, Bernucci I, Nappi G, Martignoni E, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM. Expression polymorphism of the blood-brain barrier component P-glycoprotein (MDR1) in relation to Parkinson's disease. *Pharmacogenetics*, 2002. 12(7): p. 529-34.
- Geier A, Mertens PR, Gerloff T, Dietrich CG, En-Nia A, Kullak-Ublick GA, Karpen SJ, Matern S, Gattung C. Constitutive rat multidrug-resistance protein 2 gene transcription is down-regulated by Y-box protein 1. *Biochem*

- Biophys Res Commun, 2003. 309(3): p. 612-8.
- Gessi S, Merighi S, Borea PA. Glucocorticoid's pharmacology: past, present and future. *Curr Pharm Des.* 2010;16(32):3540-53.
- Gonzales DH, Neupert W, Biogenesis of mitochondrial c-type cytochromes. *J Bioenerg Biomembr,* 1990. 22(6): p. 753-68.
- Guengerich FP. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS J.* 2006 Mar 10;8(1):E101-11.
- Guengerich FP, Parikh A, Turesky RJ, Josephy PD. Inter-individual differences in the metabolism of environmental toxicants: cytochrome P450 1A2 as a prototype. *Mutat Res,* 1999. 428(1-2): p. 115-24.
- Herwig R, Lehrach H. Expression profiling of drug response--from genes to pathways. *Dialogues Clin Neurosci,* 2006. 8(3): p. 283-93.
- Hesselink DA, van Schaik RH, van der Heiden IP, van der Werf M, Gregoor PJ, Lindemans J, Weimar W, van Gelder T. Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther,* 2003. 74(3): p. 245-54.
- Hitzl M, Schaeffeler E, Hocher B, Slowinski T, Halle H, Eichelbaum M, Kaufmann P, Fritz P, Fromm MF, Schwab M. Variable expression of P-glycoprotein in the human placenta and its association with mutations of the multidrug resistance 1 gene (MDR1, ABCB1). *Pharmacogenetics* 2004, 14:309 – 318
- Hoffmann U, Kroemer HK. The ABC transporters MDR1 and MRP2: multiple functions in disposition of xenobiotics and drug resistance. *Drug Metab Rev,* 2004. 36(3-4): p. 669-701.
- Hoffmeyer S, Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmüller J, John A, Cascorbil, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-

- glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(7): p. 3473-8.
- Horinouchi M, Sakaeda T, Nakamura T, Morita Y, Tamura T, Aoyama N, Kasuga M, Okumura K. Significant genetic linkage of MDR1 polymorphisms at positions 3435 and 2677: functional relevance to pharmacokinetics of digoxin. *Pharm Res*, 2002. 19(10): p. 1581-5.
- Hustert E, Haberl M, Burk O, Wolbold R, He YQ, Klein K, Nuessler AC, Neuhaus P, Klattig J, Eiselt R, Koch I, Zibat A, Brockmöller J, Halpert JR, Zanger UM, Wojnowski L. The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics*, 2001. 11(9): p. 773-9.
- Illmer T, Schuler US, Thiede C, Schwarz UI, Kim RB, Gotthard S, Freund D, Schäkel U, Ehninger G, Schaich M. MDR1 gene polymorphisms affect therapy outcome in acute myeloid leukemia patients. *Cancer Res*, 2002. 62(17): p. 4955-62.
- Johne A, Köpke K, Gerloff T, Mai I, Rietbrock S, Meisel C, Hoffmeyer S, Kerb R, Fromm MF, Brinkmann U, Eichelbaum M, Brockmöller J, Cascorbi I, Roots I. Modulation of steady-state kinetics of digoxin by haplotypes of the P-glycoprotein MDR1 gene. *Clin Pharmacol Ther*, 2002. 72(5): p. 584-94.
- Jonsson G, Astrom A, Andersson P. Budesonide is metabolized by cytochrome P450 3A (CYP3A) enzymes in human liver. *Drug Metab Dispos*, 1995. 23(1): p. 137-42.
- Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI, Taylor A, Xie HG, McKinsey J, Zhou S, Lan LB, Schuetz JD, Schuetz EG, Wilkinson GR. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther*, 2001. 70(2): p. 189-99.
- Kimchi-Sarfaty C, Oh J, Kim I, Sauna Z, Calcagno A, Ambudkar S, Gottesman M. A "Silent" Polymorphism in the MDR1 Gene Changes Substrate Specificity. *Science*, 2007: 525-528.

- Klotz U, Schwab M. Topical delivery of therapeutic agents in the treatment of inflammatory bowel disease. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005. 57(2): p. 267-79.
- Kruis W, Crohn's disease-standards of treatment. *Schweiz Rundsch Med Prax*, 2005. 94(41): p. 1595-8.
- Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, Watkins PB, Daly A, Wrighton SA, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K, Venkataramanan R, Strom S, Thummel K, Boguski MS, Schuetz E. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet*, 2001. 27(4): p. 383-91.
- Kullak-Ublick GA, Becker MB. Regulation of drug and bile salt transporters in liver and intestine. *Drug Metab Rev*, 2003. 35(4): p. 305-17.
- Kurata Y, Ieiri I, Kimura M, Morita T, Irie S, Urae A, Ohdo S, Ohtani H, Sawada Y, Higuchi S, Otsubo K. Role of human MDR1 gene polymorphism in bioavailability and interaction of digoxin, a substrate of P-glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther*, 2002. 72(2): p. 209-19.
- Lee SS, Kim SY, Kim WY, Thi-Le H, Yoon YR, Yea SS, Shin JG. MDR 1 genetic polymorphisms and comparison of MDR1 haplotype profiles in Korean and Vietnamese populations. *Ther Drug Monit*, 2005, Vol 27, 531-535.
- Lenfers BH, Loeffler TM, Droege CM, Hausamen TU. Substantial activity of budesonide in patients with irinotecan (CPT-11) and 5-fluorouracil induced diarrhea and failure of loperamide treatment. *Ann Oncol*, 1999. 10(10): p. 1251-3.
- Li YH, Wang YH, Li Y, Yang L. MDR1 gene polymorphisms and clinical relevance. *Yi Chuan Xue Bao*, 2006. 33(2): p. 93-104.
- Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther*, 2004. 75(1): p. 13-33.

- Mickley LA, Bates SE, Richert ND, Currier S, Tanaka S, Foss F, Rosen N, Fojo AT. Modulation of the expression of a multidrug resistance gene (mdr-1/P-glycoprotein) by differentiating agents. *J Biol Chem*, 1989. 264(30): p. 18031-40.
- Moriya Y, Nakamura T, Horinouchi M, Sakaeda T, Tamura T, Aoyama N, Shirakawa T, Gotoh A, Fujimoto S, Matsuo M, Kasuga M, Okumura K. Effects of polymorphisms of MDR1, MRP1, and MRP2 genes on their mRNA expression levels in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. *Biol Pharm Bull*, 2002. 25(10): p. 1356-9.
- Muller M. Transcriptional control of hepatocanalicular transporter gene expression. *Semin Liver Dis*, 2000. 20(3): p. 323-37.
- Nakamura T, Sakaeda T, Horinouchi M, Tamura T, Aoyama N, Shirakawa T, Matsuo M, Kasuga M, Okumura K. Effect of the mutation (C3435T) at exon 26 of the MDR1 gene on expression level of MDR1 messenger ribonucleic acid in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. *Clin Pharmacol Ther*, 2002, 71(4):p. 297–303.
- Nebert DW, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Kemper B, Levin W. The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA*, 1987. 6(1): p. 1-11.
- Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SM, Maltais LJ, Wain HM, Nebert DW. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics*. 2004 Jan;14(1):1-18.
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 1996. 6(1): p. 1-42.

- Otley A, Steinhart AH. Budesonide for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*, 2005(4): p. CD000296. Otley, A. and A.H. Steinhart, Budesonide for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*, 2005(4): p. CD000296.
- Payen L, Sparfel L, Courtois A, Vernhet L, Guillouzo A, Fardel O. The drug efflux pump MRP2: regulation of expression in physiopathological situations and by endogenous and exogenous compounds. *Cell Biol Toxicol*, 2002. 18(4): p. 221-33.
- Renders L., Frisman M, Ufer M, Mosyagin I, Haenisch S, Ott U, Caliebe A, Dechant M, Braun F, Kunzendorf U, Cascorbi I. CYP3A5 genotype markedly influences the pharmacokinetics of tacrolimus and sirolimus in kidney transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther*, 2007. 81(2): p. 228-34.
- Rutgeerts P, Löfberg R, Malchow H, Lamers C, Olaison G, Jewell D, Danielsson A, Goebell H, Thomsen OO, Lorenz-Meyer H. A comparison of budesonide with prednisolone for active Crohn's disease. *N Engl J Med*, 1994. 331(13): p. 842-5.
- Ryrfeldt A, Andersson P, Edsbäcker S, Tönnesson M, Davies D, Pauwels R. Pharmacokinetics and metabolism of budesonide, a selective glucocorticoid. *Eur J Respir Dis Suppl*, 1982. 122: p. 86-95.
- Sagir A, Wettstein M, Oette M, Erhardt A, Häussinger D. Budesonide-induced acute hepatitis in an HIV-positive patient with ritonavir as a co-medication. *Aids*, 2002. 16(8): p. 1191-2.
- Schaeffeler, E., Eichelbaum M, Brinkmann U, Penger A, Asante-Poku S, Zanger UM, Schwab M. Frequency of C3435T polymorphism of MDR1 gene in African people. *Lancet*, 2001. 358(9279): p. 383-4.
- Schinkel AH, Mayer U, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L, Smit JJ. Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug transporting) P-Glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 4028-4033.

- Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003. 55(1): p. 3-29.
- Schuetz EG, Furuya KN, Schuetz JD. Interindividual variation in expression of P-glycoprotein in normal human liver and secondary hepatic neoplasms. *J Pharmacol Exp Ther*, 1995. 275(2): p. 1011-8.
- Schuetz EG, Schinkel AH, Relling MV, Schuetz JD. P-glycoprotein: a major determinant of rifampicin-inducible expression of cytochrome P4503A in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 April 30; 93(9): 4001–4005.
- Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF. Genetic polymorphisms of the human *mdr1* drug transporter. *Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol*. 2003;43:285-307.
- Scotto KW. Transcriptional regulation of ABC drug transporters. *Oncogene*, 2003. 22(47): p. 7496-511.
- Seidegard J. Reduction of the inhibitory effect of ketoconazole on budesonide pharmacokinetics by separation of their time of administration. *Clin Pharmacol Ther*, 2000. 68(1): p. 13-7.
- Sérée E, Villard PH, Hevér A, Guigal N, Puyou F, Charvet B, Point-Somma H, Lechevalier E, Lacarelle B, Barra Y. Modulation of MDR1 and CYP3A expression by dexamethasone: evidence for an inverse regulation in adrenals. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. 252(2): p. 392-5.
- 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(1): p. 414-23.
- Siegmund W, Ludwig K, Giessmann T, Dazert P, Schroeder E, Sperker B, Warzok R, Kroemer HK, Cascorbi I. The effects of the human MDR1 genotype on the expression of duodenal P-glycoprotein and disposition of the

- probe drug talinlol. *Clin Pharmacol Ther*, 2002, 72(5):p. 572–583.
- Spencer CM, McTavish D. Budesonide. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in inflammatory bowel disease. *Drugs*, 1995. 50(5): p. 854-72.
- Steinhart AH, Ewe K, Griffiths AM, Modigliani R, Thomsen OO. Corticosteroids for maintaining remission of Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*, 2000(2): p. CD000301.
- Suzuki H, Sugiyama Y. Single nucleotide polymorphisms in multidrug resistance associated protein 2 (MRP2/ABCC2): its impact on drug disposition. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002. 54(10): p. 1311-31.
- Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, Inoue K, Ito S, Kanamori Y, Takahashi M, Kurata Y, Kigawa J, Higuchi S, Terakawa N, Otsubo K. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001. 297(3): p. 1137-43.
- Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. 84(21): p. 7735-8.
- Thörn M, Finnström N, Lundgren S, Rane A, Lööf L. Cytochromes P450 and *MDR1* mRNA expression along the human gastrointestinal tract. *Br J Clin Pharmacol*. 2005 July; 60(1): 54–60.
- Thummel KE, Wilkinson GR. In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1998. 38: p. 389-430.
- Tursi A, Giorgetti GM, Brandimarte G, Elisei W, Aiello F. Beclomethasone dipropionate for the treatment of mild-to-moderate Crohn's disease: an open-label, budesonide-controlled, randomized study. *Med Sci Monit*, 2006. 12(6): p. PI29-32.
- Ufer M, Häsler R, Jacobs G, Haenisch S, Lächelt S, Faltraco F, Sina C, Rosenstiel P, Nikolaus S, Schreiber S, Cascorbi I. Decreased sigmoidal ABCB1

(P-glycoprotein) expression in ulcerative colitis is associated with disease activity. *Pharmacogenomics*. 2009 Dec;10(12):1941-53.

Van Schaik RH, van der Heiden IP, van den Anker JN, Lindemans J. CYP3A5 variant allele frequencies in Dutch Caucasians. *Clin Chem*, 2002. 48(10): p. 1668-71.

Watkins PB. The barrier function of CYP3A4 and P-glycoprotein in the small bowel. *Adv Drug Deliv Rev*, 1997. 27(2-3): p. 161-170.

Wu TY, Jen MH, Bottle A, Molokhia M, Aylin P, Bell D, Majeed A. Ten-year trends in hospital admissions for adverse drug reactions in England 1999-2009. *J R Soc Med*. 2010 Jun; 103(6):239-50

Zhang Y, Benet LZ. The gut as a barrier to drug absorption: combined role of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein. *Clin Pharmacokinet*, 2001. 40(3): p. 159-68.

7 EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Lena Leschhorn, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Mittel und Quellen angefertigt zu haben.

Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen und dass die vorliegende Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form veröffentlicht oder in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt wurde.

Kiel, den

Lena Leschhorn

8 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi, der mir die vorliegende Arbeit mit dem Ziel der Promotion überhaupt erst ermöglichte und sie zu jeder Zeit mit Rat und Tat begleitet hat.

Danken möchte ich auch Herrn Privatdozent Dr. Dr. Mike Ufer für seine wissenschaftliche Betreuung und sein Engagement bei der Auswahl der Materialien und der Auswertung der Ergebnisse sowie allen Mitarbeitern des Instituts, allen voran Herrn Dr. Sierk Haenisch und Frau Dr. Cornelia Remmler, die mir bei der Bedienung der Präzisionsgeräte und der Herstellung des Manuskripts hilfreich zur Seite gestanden haben.

Nicht zuletzt danke ich aber auch meinen Eltern, meiner Schwester und Christian Stoffers, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit stets verständnisvoll unterstützten und, wenn erforderlich, liebevoll ermutigten.

9 LEBENS LAUF

Name: Lena Leschhorn

Geburtsdatum / -ort: 19.05.1983 in Hamburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulische Laufbahn:

1988 - 1993 Vor- und Grundschule Brödermannsweg in Hamburg

1993 - 1999 Heilwig Gymnasium in Hamburg

1999 - 2000 MacLachlan College (12 Monate) in Kanada

2000 - 2002 Helene Lange Gymnasium in Hamburg

Juni 2002 Abitur

Hochschulausbildung:

Oktober 2002 Beginn des Medizinstudiums, CAU zu Kiel

August 2004 Ärztliche Vorprüfung / Physikum, CAU zu Kiel

April 2009 Ärztliche Prüfung / Staatsexamen, CAU zu Kiel

Beruflicher Werdegang:

08/2009-03/2010 Assistenzärztin in der Weiterbildung für Orthopädie/
Chirurgie in der Praxisklinik Kronshagen bei Kiel
unter der Leitung von Dr. Müggenburg

Seit April 2010 Assistenzärztin in der Weiterbildung für Orthopädie/
Unfallchirurgie im Lubinus-Clinicum in Kiel
unter der Leitung von Dr. Laprell

Publikation:

Ufer M, Dilger K, Leschhorn L, Daufresne L, Mosyagin I, Rosenstiel P, Haesler R, Kuehbacher T, Nikolaus S, Schreiber S, Cascorbi I. Influence of CYP3A4, CYP3A5, and ABCB1 genotype and expression on budesonide pharmacokinetics: a possible role of intestinal CYP3A4 expression. Clin Pharmacol Ther. 2008;84:43-46.

Kiel, Juli 2011