

Aus der Universitätsklinik für Psychiatrie und Psychotherapie

Tübingen

Abteilung Allgemeine Psychiatrie und Psychotherapie mit Poliklinik

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. G. Buchkremer

**Auswirkungen des CYP2A6\*2-Polymorphismus auf die  
individuelle Nikotinkinetik bei Rauchern**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

des Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Eberhard Karls Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Anette Katrin Riexinger

aus Nürtingen

2006

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Batra

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. K. Mörike

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>3</b>
1.1	Nikotinmetabolismus.....	5
1.2	Cytochrom P450 2A6 (CYP2A6).....	7
1.2.1	CYP2A6-Polymorphismen .....	8
1.3	CYP2A6*2-Polymorphismus und Nikotinmetabolismus .....	10
1.4	CYP2A6-Polymorphismen und Rauchverhalten .....	14
1.5	Fragestellung dieser Arbeit .....	16
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>
2.1	Probanden .....	17
2.1.1	Auswahlkriterien.....	17
2.1.2	Rekrutierung .....	17
2.2	Studienablauf.....	18
2.2.1	FTND-Fragebogen.....	20
2.2.2	QSU-Fragebogen.....	20
2.2.3	Messzeitpunkte während der Studie .....	21
2.2.4	Verwendete Materialien für den klinischen Teil.....	21
2.3	Quantitative Bestimmung von Nikotin und Cotinin im Serum.....	22
2.3.1	Prinzip der HPLC .....	22
2.3.2	Verwendete Materialien und Geräte .....	24
2.3.3	Probenaufarbeitung .....	26
2.3.4	Chromatographische Bestimmung.....	26
2.4	Statistische Auswertung.....	27
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>28</b>
3.1	HPLC-Ergebnisse .....	28
3.2	Studienpopulation, soziodemographische und rauchanamnestische Daten .....	28
3.3	Nikotin- und Cotininausgangskonzentrationen.....	30
3.4	Nikotin- und Cotininkonzentrationskurven.....	32
3.5	Nikotin- und Cotininkinetik.....	36

3.6	Varianzanalysen zu CYP2A6-Genotyp und Nikotin- bzw. Cotininkonzentration .....	38
3.6.1	Nikotin.....	39
3.6.2	Cotinin.....	39
3.7	Craving und CYP2A6-Genotyp .....	40
3.7.1	QSU-Ausgangswerte .....	40
3.7.2	Varianzanalyse zu CYP2A6-Genotyp und Craving.....	41
3.7.3	Auswirkung des CYP2A6-Genotyps auf die Absicht zu rauchen/ Erwartung positiver Rauchwirkung (Faktor 1 des QSU-Fragebogens).....	43
3.7.4	Auswirkung des CYP2A6-Genotyps auf die Erwartung einer Entzugsreduktion/ überwältigender Drang zu rauchen (Faktor 2 des QSU-Fragebogens).....	44
3.8	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	46
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>47</b>
4.1	Einfluss des CYP2A6*2-Allels auf den Nikotinmetabolismus bei heterozygoten Merkmalsträgern .....	47
4.1.1	Mögliche Interpretationen der vorliegenden Ergebnisse.....	47
4.1.2	Nikotinmetabolismus bei heterozygoten CYP2A6*2-Allelträgern – Vergleich mit der vorhandenen Literatur .....	49
4.2	Diskussion der Methodik.....	50
4.3	CYP2A6*2 und Auswirkungen auf das Rauchverhalten.....	55
4.4	Klinische Bedeutung des CYP2A6*2-Polymorphismus und des CYP2A6-Gens .....	56
4.5	Craving und CYP2A6*2 .....	58
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>63</b>
6.1	Fagerström Test für Nikotinabhängigkeit (FTND) .....	63
6.2	Deutsche Fassung des „Questionnaire on Smoking Urges“ (QSU-G) .....	64
6.3	CYP2A6 Allelnomenklatur.....	66
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>77</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>86</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>87</b>

## 1 Einleitung

Zurzeit rauchen weltweit ein Drittel der Erwachsenen, was ungefähr 1,1 Milliarden Menschen entspricht (Weltbank 1999). Jedes Jahr versuchen ungefähr 30 Prozent der Raucher in Amerika das Rauchen aufzugeben (USDHHS 1990). Von denen, die spontan, ohne professionelle Hilfe aufhören wollen, sind nach sechs Monaten nur noch etwa drei bis fünf Prozent abstinent (Hughes et al. 1992; Davidson et al. 1998). Doch auch mit professioneller Hilfe und medikamentöser Unterstützung liegt die Langzeiterfolgsrate nur bei 20 bis 30 Prozent oder weniger (Fiore et al. 1994; Batra 2000).

Um Rauchern bessere und effektivere Therapien und Raucherentwöhnungsmethoden anbieten zu können, ist es von großer Bedeutung, ein umfassendes Wissen über die Ursachen der Tabakabhängigkeit zu erlangen. Auf der Suche nach diesen Ursachen zeigten zahlreiche Zwillingsstudien z. B. aus den USA, Schweden, Australien und Holland, dass neben psychosozialen Faktoren und Umgebungsfaktoren genetische Einflüsse eine wichtige Rolle in der Entstehung und Ausprägung der Tabakabhängigkeit spielen (Carmelli et al. 1992; True et al. 1997; Heath et al. 1999; Koopmans et al. 1999; Kendler et al. 2000). Würde man bei bestimmten Rauchern von einer genetischen Disposition, so wäre es denkbar, für diese speziellen Subgruppen spezifische Therapien zu entwickeln. In genetischen Studien gelang es bisher jedoch nicht, entsprechende Gene zu identifizieren.

Möglicherweise macht ein Teil der nachgewiesenen biologischen Disposition die genetisch determinierte Nikotinkinetik, die vor allem über das Cytochrom P450 2A6 (CYP2A6) erfolgt, aus. Da Nikotin in vielerlei Hinsicht vergleichbar mit anderen psychoaktiven Drogen wie Heroin oder Cocain ist und als wichtigste Einzelsubstanz im Tabakrauch gilt, die zur Tabakabhängigkeit führt und diese aufrechterhält (Henningfield et al. 1985; USDHHS 1988; Stolerman et al. 1995), scheint es vielversprechend, Variationen im CYP2A6, welches die Bioverfügbarkeit von Nikotin im Blut und damit im Gehirn beeinflusst, als mögliche genetisch bedingte Ursache für die Tabakabhängigkeit zu untersuchen.

Anfangs konnten in vielen Studien große interindividuelle und interethnische Unterschiede im Nikotin- bzw. Cumarinstoffwechsel und der CYP2A6-mRNA-Konzentration sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachgewiesen werden (Pelkonen et al. 1985; Miles et al. 1990; Yamano et al. 1990; Rautio et al. 1992; Iscan et al. 1994; Benowitz et al. 1995; Shimada et al. 1996). Obwohl schon frühe Untersuchungen Polymorphismen im Gen des CYP2A6 als Ursache für diese Variabilität vermuteten (Yamano et al. 1990), konnte erst ab Mitte der neunziger Jahre durch die Entwicklung zuverlässiger Genotypisierungsmethoden nachgewiesen werden, dass sich ein großer Teil dieser Variabilität auf Polymorphismen im CYP2A6-Gen zurückführen lässt (Fernandez-Salguero et al. 1995; Oscarson et al. 1998; Nakajima et al. 2000; Benowitz et al. 2001; Nakajima et al. 2001). Das CYP2A6\*2-Allel wurde als Erstes entdeckt und ist mit einer Allelfrequenz von ein bis drei Prozent in der kaukasischen Bevölkerung anzutreffen. Vermutlich ist dieser Polymorphismus mit einer reduzierten Enzymaktivität verbunden (Yamano et al. 1990; Fernandez-Salguero et al. 1995; Oscarson et al. 1998).

Studien an homozygoten CYP2A6\*2-Allelträgern bestätigten die Annahme von Yamano et al. (1990), dass das CYP2A6\*2-Enzym katalytisch weitgehend inaktiv ist (Benowitz et al. 1995; Hadidi et al. 1997; Oscarson et al. 1998; Benowitz et al. 2001). Nicht genau bekannt ist allerdings, wie groß der Einfluss des CYP2A6\*2-Allels auf den Nikotinstoffwechsel bei Heterozygoten Allelträgern ist, da nur wenige Studien mit sehr kleinen Fallzahlen durchgeführt wurden (Benowitz et al. 1995; Fernandez-Salguero et al. 1995; Oscarson et al. 1998). Dies ist jedoch von großer Bedeutung, da es Vermutungen gibt, wonach selbst *ein* polymorphes CYP2A6\*2-Allel Auswirkungen auf das Rauchverhalten haben könnte (Pianezza et al. 1998; Gu et al. 2000).

In der vorliegenden Studie wird der Nikotinmetabolismus an heterozygoten CYP2A6\*2-Allelträgern untersucht.

## **1.1 Nikotinmetabolismus**

Nikotin wird vor allem über CYP2A6, das beim Menschen hauptsächlich in der Leber, aber in geringeren Mengen auch in Lunge, Trachea und Nasenschleimhaut vorkommt, metabolisiert und zu zehn Prozent unverändert renal eliminiert (Benowitz et al. 1994; Nakajima et al. 1996b; Su et al. 1996; Messina et al. 1997; Crawford et al. 1998; Su et al. 2000; Raunio et al. 2001). Sechs Hauptmetaboliten des Nikotins sind bekannt (vgl. Abbildung 1): Cotinin (über Nikotin- $\Delta^{1(5)}$ -Iminium-Ion), Nornikotin, Nikotin-Glukuronid, Nikotin-Isomethonium-Ion, Nicotin-N'-Oxid und 2'-Hydroxynikotin, wobei Cotinin quantitativ mit etwa 70 bis 80 Prozent der wichtigste Metabolit ist (Benowitz et al. 1994; Hecht et al. 2000; Hukkanen et al. 2005). Die Transformation von Nikotin zu Cotinin beinhaltet zwei Schritte: zunächst wird Nikotin durch CYP2A6 zu Nikotin- $\Delta^{1(5)}$ -Iminium-Ion oxidiert (Murphy 1973), dieses Zwischenprodukt wird in einem zweiten Schritt durch eine zytoplasmatische Aldehydoxidase zu Cotinin umgewandelt (Gorrod et al. 1982). Der größte Anteil des Cotinins wird zu zahlreichen Metaboliten weiter verstoffwechselt, wobei das durch CYP2A6 produzierte Trans-3'-Hydroxycotinin der bedeutendste ist (Nakajima et al. 1996a; Murphy et al. 1999). Die Halbwertszeit von Nikotin beträgt ungefähr zwei Stunden (100 bis 150 Minuten). Der Hauptnikotinmetabolit Cotinin hat mit 13 bis 30 Stunden eine wesentlich längere HWZ (Benowitz et al. 1993; Zevin et al. 1997) und kann als lang nachweisbares Maß für den Nikotinkonsum genutzt werden (Hurt et al. 1995; Suter et al. 1995).

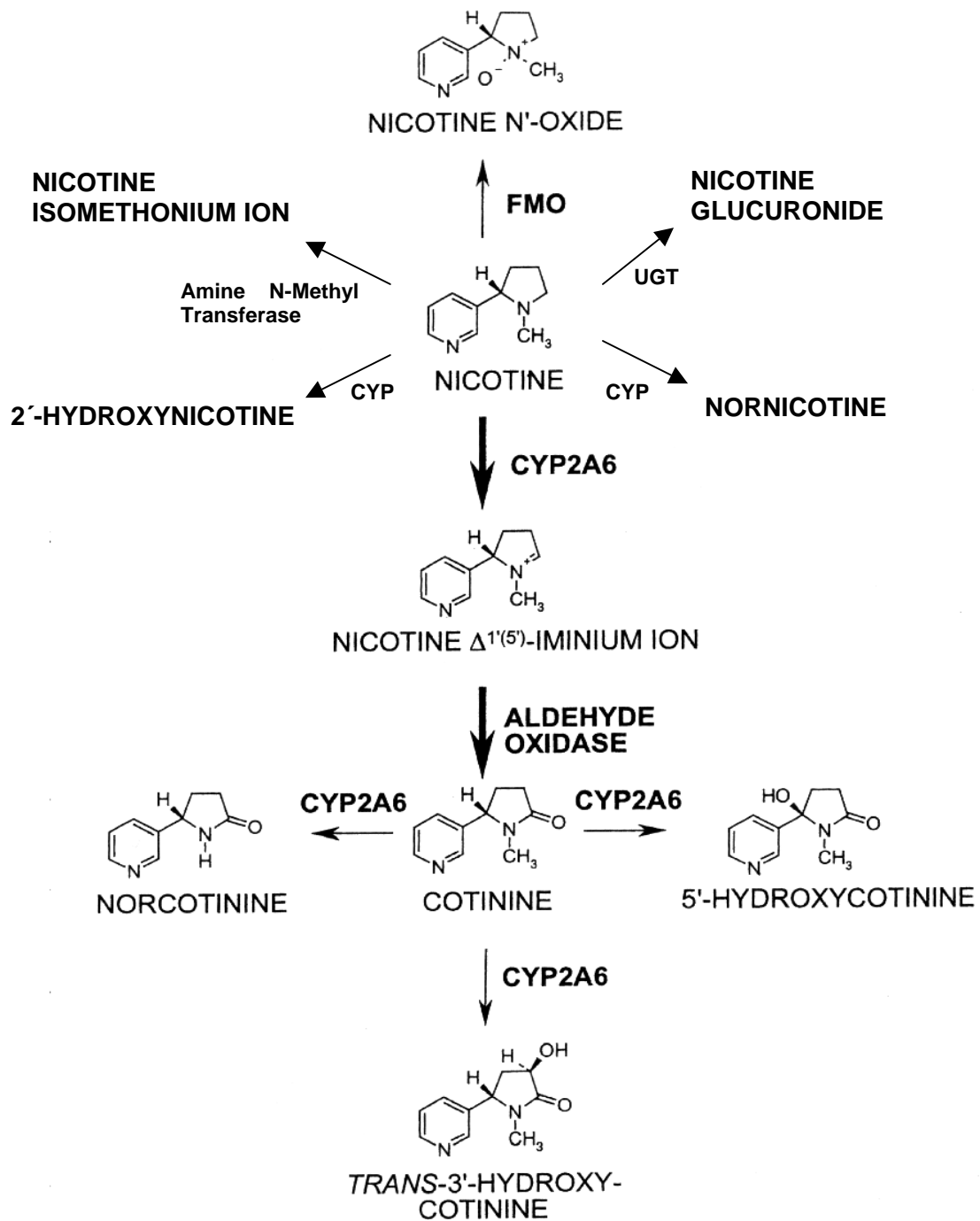


Abbildung 1: Nikotinmetabolismus, FMO = „Flavine-Containing Monooxygenase“, UGT = „Uridine Diphosphate-Glucuronosyltransferase“, Abbildung zusammengestellt aus: (Oscarson 2001; Hukkanen et al. 2005)



## **1.2 Cytochrom P450 2A6 (CYP2A6)**

Cytochrom-P450-Enzyme sind mischfunktionelle Monooxygenasen, die ubiquitär in Bakterien, Pflanzen und Tieren vorkommen. Bislang wurden über 50 verschiedene CYP-Gene beim Menschen identifiziert, die in 18 Familien, 43 Subfamilien und innerhalb der Subfamilien in die entsprechenden Isoformen eingeteilt wurden. CYP1 bis 3 stellen die relevanten Familien für den Arzneimittelstoffwechsel dar (Aktorics et al. 2005), von diesen ist die CYP2-Familie die größte und komplexeste (Hoffman et al. 2001; Nelson 2005). Die Gene der Subfamilien CYP2A, CYP2B und CYP2F befinden sich auf dem langen Arm von Chromosom 19 innerhalb eines 350 Kilobasen Genclusters. Die CYP2A-Subfamilie besteht aus den Genen der Isoformen CYP2A6, CYP2A7, CYP2A13 und einem Pseudogen (Hoffman et al. 2001).

CYP-Enzyme enthalten Hämgruppen, deren zentrales Eisenatom an der Elektronenübertragung beteiligt ist. Sie spielen eine wichtige Rolle im Metabolismus von endogenen und exogenen Substanzen. CYP2A6 ist am Metabolismus von Medikamenten (z. B. Halothan, Tegafur) (Spracklin et al. 1996; Daigo et al. 2002), Präkarzinogenen wie Nitrosaminen (z. B. N`-Nitrosornikotin [NNN]) (Patten et al. 1997) und Substanzen wie z. B. Nikotin, Cotinin und Cumarin beteiligt.

Neben Nikotin ist Cumarin als Probensubstanz zur Phänotypisierung von CYP2A6 und seinen Allelvarianten weit verbreitet. CYP2A6 wurde anfangs sogar Cumarin-7-Hydroxylase genannt, da Cumarin hauptsächlich über CYP2A6 zu 7-Hydroxycumarin abgebaut wird (Cashman et al. 1992; Rautio et al. 1992). Dass CYP2A6 eine Hauptrolle im Nikotinstoffwechsel einnimmt, wurde erst später entdeckt (Nakajima et al. 1996b; Messina et al. 1997).

### 1.2.1 CYP2A6-Polymorphismen

Von einem genetischen Polymorphismus spricht man, wenn die Häufigkeit einer bestimmten Allelvariante in einer Population mehr als ein Prozent beträgt (Aktories et al. 2005).

Zurzeit sind 22 verschiedene Varianten des polymorphen CYP2A6-Gens (CYP2A6\*1 bis 22) bekannt<sup>1</sup>; einige Polymorphismen werden zusätzlich in Untergruppen unterteilt (z. B. CYP2A6\*4A bis D), außerdem gibt es eine Vielzahl von „single nucleotide polymorphisms“ (SNPs) mit noch nicht definierten Haplotypen (vgl. Tabelle 13, Kapitel 6.3).

Ein großer Teil der gefundenen interindividuellen und interethnischen Variabilität der CYP2A6-Enzymaktivität und CYP2A6-mRNA-Konzentration kann durch Polymorphismen des CYP2A6-Gens erklärt werden (Fernandez-Salguero et al. 1995; Oscarson et al. 1998; Nakajima et al. 2000; Nakajima et al. 2001). Die derzeit bekannten Polymorphismen erklären jedoch nicht die ganze Variabilität, deshalb ist zu erwarten, dass noch weitere bislang unentdeckte Allelvarianten existieren (Rao et al. 2000; Swan et al. 2005).

Die Prävalenzen der einzelnen Polymorphismen variieren in verschiedenen ethnischen Populationen sehr stark. So ist das CYP2A6\*2-Allel mit einer Frequenz von 1 bis 3 Prozent in der kaukasischen Bevölkerung einer der häufigsten CYP2A6-Polymorphismen (Oscarson et al. 1998; Chen et al. 1999; Esser 2004), in der asiatischen Bevölkerung hingegen existiert der CYP2A6\*2-Polymorphismus nicht. Dort kommt z. B. der mit einer kompletten Gendeletion verbundene CYP2A6\*4-Polymorphismus mit 7 bis 20 Prozent relativ häufig vor (Nakajima et al. 2001; Tan et al. 2001; Yoshida et al. 2002). Einen Überblick über die Allelfrequenzen der wichtigsten CYP2A6-Polymorphismen in der kaukasischen Bevölkerung zeigt Tabelle 1. Einige der in jüngster Zeit

---

<sup>1</sup> Die in dieser Arbeit verwendete CYP2A6-Nomenklatur richtet sich nach der Homepage des „Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee“: <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/> (Zugriffsdatum: 27. 11. 2005); ist vom Enzym bzw. Protein eines bestimmten Allels die Rede, so wird dies in der vorliegenden Arbeit mit einem Bindestrich angehängt, z. B. CYP2A6\*2-Protein.

entdeckten Allele (z. B. CYP2A6\*9 und 12) wurden bis jetzt nur an sehr kleinen Populationen oder in einzelnen Studien untersucht (Oscarson et al. 2002; Yoshida et al. 2003; Schoedel et al. 2004).

In frühen Genotypisierungsstudien stellte sich das CYP2A6\*2-Allel als das bedeutendste defekte CYP2A6-Allel in der nordeuropäischen Bevölkerung dar (Fernandez-Salguero et al. 1995; Gullsten et al. 1997; Oscarson et al. 1998). Verbesserte Genotypisierungsmethoden konnten jedoch zeigen, dass die Allelfrequenz wesentlich niedriger liegt, als die ursprünglich angenommenen 15 bis 17 Prozent (Fernandez-Salguero et al. 1995; Oscarson et al. 1998). Obwohl der Einfluss des CYP2A6\*2-Allels auf den Nikotinstoffwechsel bei Heterozygoten bislang nur unzureichend untersucht wurde, gibt es eine Vielzahl an Studien, die den Zusammenhang zwischen CYP2A6\*2-Polymorphismus und Rauchverhalten untersuchten – bislang allerdings mit widersprüchlichen Ergebnissen (s. u.).

	Allelfrequenz	Enzymatische Aktivität
CYP2A6*1 (Wildtyp-Allel)	96–99%	normal
CYP2A6*1x2	0,7%	gesteigert
CYP2A6*2	1–3%	keine
CYP2A6*4	1%	keine
CYP2A6*9	7,1%	vermindert
CYP2A6*12	2,2%	vermindert

**Tabelle 1: Allelfrequenzen der häufigsten CYP2A6-Polymorphismen in der kaukasischen Bevölkerung, zusammengestellt aus: (Oscarson et al. 1998; Oscarson et al. 1999; Rao et al. 2000; Oscarson 2001; Oscarson et al. 2002; Schoedel et al. 2004)**

### **1.3 CYP2A6\*2-Polymorphismus und Nikotinmetabolismus**

Auf der Suche nach Erklärungen für die große interindividuelle Variabilität im Cumarinmetabolismus wurde zunächst in *in vitro* Studien ein Zusammenhang zwischen dem CYP2A6\*2-Polymorphismus und einer verminderten Enzymaktivität vermutet. Yamano et al. (1990) beschrieben erstmals eine Variante des CYP2A6-Proteins, die aus einem einzigen Aminosäuretausch von Leucin zu Histidin resultierte (= CYP2A6\*2, später umbenannt in CYP2A6\*2 (Daly et al. 1996)). *In vitro* konnte mittels eines rekombinanten Vaccinia-Virus-Expressions-Systems, das verwendet wurde, um die CYP2A6\*2-cDNA in Zellen einzuschleusen, die das entsprechende Enzym produzieren sollten, keine Cumarin-7-Hydroxylaseaktivität festgestellt werden. Obwohl die Autoren vermuteten, dass das CYP2A6\*2-Enzym keine Hämgruppe aufnehmen konnte und dadurch inaktiv war, diskutierten sie auch noch andere mögliche Ursachen für die fehlende katalytische Aktivität *in vitro*, wie z. B. einen Fehler im Vaccinia-Virus-Expressions-System, eine fehlerhafte Translation oder einen falschen Einbau des Enzyms in die Zellmembran. Jedoch konnte mit dieser Studie nicht eindeutig beantwortet werden, ob das CYP2A6\*2-Allel in intakten menschlichen Leberzellen überhaupt ein Enzym produzieren kann und wenn, ob dieses dann funktionsfähig ist. Bis heute gibt es keine Studie, die dies eindeutig geklärt hat. In einigen Studien wurde versucht, das Ergebnis von Yamano (1990) *in vivo* zu replizieren. Eine gute Möglichkeit zu verifizieren, ob das CYP2A6\*2-Enzym *in vivo* katalytische Aktivität besitzt oder nicht, besteht darin, homozygote CYP2A6\*2-Allelträger zu untersuchen. In Tabelle 2 sind die bekannten Phänotypisierungsstudien mit Cumarin oder Nikotin an homozygoten CYP2A6\*2-Allelträgern zusammengefasst.

	Fernandez-Salguero et al. 1995	Oscarson et al. 1998	Benowitz et al. 1995, 2001	Hadidi et al. 1997
Design	<i>in vivo</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vivo</i>
Substrat	Cumarin	Cumarin	Nikotin	Cumarin
Zahl der CYP2A6*2/*2-Träger	3 <sup>1</sup>	2	1	1
katalytische Aktivität	keine	keine	sehr gering	sehr gering

**Tabelle 2: Synopsis der bekannten Studien zum Metabolismus bei homozygoten CYP2A6\*2-Allelträgern (Benowitz et al. 1995; Fernandez-Salguero et al. 1995; Hadidi et al. 1997; Oscarson et al. 1998; Benowitz et al. 2001). <sup>1</sup> = in dieser Studie wurden noch drei weitere Homozygote gefunden, die allerdings eine gewisse katalytische Aktivität aufwiesen; mindestens einer davon wurde später aber als heterozygot klassifiziert (Oscarson et al. 1998)**

Trotz der sehr kleinen Fallzahlen von ein bis drei homozygoten Personen und der dadurch eingeschränkten Aussagekraft, findet sich übereinstimmend keine oder eine nur sehr geringe katalytische Aktivität. Dies lässt vermuten, dass das CYP2A6\*2-Allel ein inaktives Protein kodiert oder keine Proteinsynthese bewirkt. Auch für andere Polymorphismen wie z. B. das CYP2A6\*4-Allel, das in einer kompletten Gendeletion resultiert, wurde bei Homozygoten ein fehlender Nikotinmetabolismus beschrieben (Nakajima et al. 2000).

Da die Zahl der heterozygoten CYP2A6\*2-Merkmalsträger wesentlich größer ist als die der homozygoten, ist es von klinischer und praktischer Bedeutung, die Auswirkungen eines einzelnen polymorphen CYP2A6\*2-Allels auf den Nikotinstoffwechsel zu erforschen. Wenige Studien untersuchten jedoch bislang die Auswirkungen des CYP2A6\*2-Allels auf den Nikotin- bzw. Cumarinmetabolismus bei Heterozygoten und wenn, dann mit unterschiedlichen Resultaten (vgl. Tabelle 3).

	Fernandez-Salguero et al. 1995	Inoue et al. 2000	Oscarson et al. 1998
Design	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
Substrat	Cumarin	Cumarin, Nikotin	Cumarin
Zahl der CYP2A6*2/*1- Träger	nicht bekannt	2	3
katalytische Aktivität	50-60% reduziert im Vergleich zum Bevölkerungsdurchschnitt	reduziert	gering reduziert
Bemerkung	unklares Phänotypisierungs- design (siehe Text)	unklare statistische Signifikanz	unklare statistische Signifikanz

**Tabelle 3: Synopsis der vorhandenen Studien zum Cumarin- bzw. Nikotinmetabolismus bei heterozygoten CYP2A6\*2-Allelträgern (Fernandez-Salguero et al. 1995; Oscarson et al. 1998; Inoue et al. 2000)**

Oscarson et al. (1998) untersuchten den Cumarinmetabolismus von 14 Finnen. Drei heterozygote CYP2A6\*2 Träger zeigten im Mittel einen etwas niedrigeren Cumarin-Index (prozentuale Menge an im Urin ausgeschiedenem 7-OH-Cumarin in Bezug auf die zugeführte Cumarinmenge über einen Zeitraum von zwei Stunden) (54 im Gegensatz zu 68) als die neun Individuen mit Wildtyp. Betrachtet man die Cumarin-Index Werte der einzelnen Individuen, fällt eine sehr große interindividuelle Variabilität sowohl innerhalb der Wildtypträger (Range: 44 bis 84) als auch innerhalb der drei Heterozygoten (Range: 40 bis 73) auf. Beide Gruppen weisen eine ähnlich große Spannweite innerhalb vergleichbarer Grenzen auf. Aufgrund der geringen Fallzahl sind diese Ergebnisse statistisch wenig aussagekräftig.

Fernandez et al. (1995), die einen auf 50 bis 60 Prozent verminderten Cumarinmetabolismus bei Heterozygoten fanden, verwendeten in ihrer Studie eine ungenaue Genotypisierungsmethode. Der Primer R4 konnte durch eine in 30 bis 40 Prozent vorkommende Genkonversion in der 3'-Region des CYP2A6-

Gens nicht binden, was zu unberechtigt hohen CYP2A6\*2-Allelfrequenzen führte (Oscarson et al. 1998). Außerdem wird in dieser Publikation nichts über das Studiendesign der Phänotypisierung, die verabreichte Cumarindosis, das Untersuchungsmedium (Serum, Urin), die Dauer der Beobachtung, die Zahl der untersuchten Heterozygoten, Größe und Genotyp der Vergleichsgruppe mitgeteilt.

Diesen Publikationen gemeinsam ist eine niedrige Fallzahl der Heterozygoten, nämlich zwischen zwei und drei Individuen pro Studie (bei Fernandez-Salguero et al. (1995) wird die Zahl nicht mitgeteilt). Die daraus resultierende sehr geringe statistische Power begrenzt ihre Aussagekraft deutlich. Aus der vorhandenen Literatur lässt sich nicht eindeutig beweisen, ob oder wie stark der Cumarin- bzw. Nikotinmetabolismus bei heterozygoten CYP2A6\*2-Trägern eingeschränkt ist.

#### **1.4 CYP2A6-Polymorphismen und Rauchverhalten**

Nikotin spielt, wie schon erwähnt, eine Schlüsselrolle in der Tabakabhängigkeit und im Rauchverhalten. So können Raucher die Menge des aufgenommenen Nikotins durch die Anzahl der gerauchten Zigaretten und die Inhalationstiefe und -frequenz sehr gut regulieren (Herning et al. 1983; Benowitz 1988). In Studien wurde bei Rauchern eine Korrelation der Nikotinsерumkonzentration mit dem subjektiven Rauchverlangen (Craving) nachgewiesen (Jarvik et al. 2000). Auch konnte gezeigt werden, dass sich Craving durch Nikotingabe vermindern lässt (Lunell et al. 1995; Molander et al. 2000) und dass Raucher nach intravenöser Nikotinzufuhr die Nikotinaufnahme aus Zigaretten reduzierten (Benowitz et al. 1990). Es könnte nun vermutet werden, dass Raucher mit einem Nikotinabbauenzym, das eine reduzierte oder gar keine Aktivität aufweist möglicherweise weniger Zigaretten rauchen, da ihr Nikotinspiegel schneller und länger erhöht ist. Erste Vermutungen für eine solche Assoziation stellten Pianezza et al. (1998) an: Individuen mit mindestens einem Null-Allel (CYP2A6\*2 oder \*3) rauchten im Vergleich zu denjenigen mit Wildtyp weniger Zigaretten pro Woche (129 versus 159 Zigaretten). Außerdem fanden sich die polymorphen Allele seltener unter tabakabhängigen Rauchern (12,3%) als unter nicht tabakabhängigen Rauchern (19,6%). Allerdings wurde in dieser Untersuchung die ungenaue Genotypisierungsmethode nach Fernandez-Salguero et al. (1995) verwendet, wodurch zu hohe CYP2A6\*2-Prävalenzen aufgetreten waren (Rao et al. 2000). Dadurch müssen diese Ergebnisse mit Vorsicht interpretiert werden.

Weitere Studien berichteten über einen Zusammenhang zwischen verschiedenen Aspekten des Rauchverhaltens und bestimmten CYP2A6-Polymorphismen (Gu et al. 2000; Rao et al. 2000; Schoedel et al. 2004). Jedoch konnten diese Ergebnisse von anderen nicht verifiziert werden (London et al. 1999; Sabol et al. 1999; Tiihonen et al. 2000; Lorient et al. 2001; Zhang et al. 2001; Esser 2004). Auch in einer Metaanalyse, die elf Studien einschloss, konnte keine empirische Evidenz über einen Zusammenhang polymorpher CYP2A6-Allele (CYP\*2, \*3 oder \*4) mit dem Rauchstatus (N = 4.091) oder dem



Zigarettenkonsum (N = 1.537) nachgewiesen werden (Carter et al. 2004). Obwohl die genannten Studien davon ausgehen, dass selbst ein einzelnes polymorphes CYP2A6-Allel einen verminderten Nikotinstoffwechsel bewirkt, kann dies für das CYP2A6\*2-Allel aus der vorhandenen Literatur nicht eindeutig geklärt werden.

Es mangelt an größeren Phänotypisierungsstudien an heterozygoten CYP2A6\*2-Merkmalsträgern mit Nikotin als Substrat. Da die Inzidenz von Homozygoten in der kaukasischen Bevölkerung sehr gering ist, und viele Studien die Zusammenhänge zwischen Rauchverhalten und CYP2A6-Genotyp an Heterozygoten untersuchten, ist es von Bedeutung, den Nikotinmetabolismus heterozygoter Merkmalsträger in Studien mit größerer Fallzahl zu klären. Nur so können statistisch haltbare Aussagen zum Nikotinmetabolismus in dieser Population gemacht und eventuelle Zusammenhänge zwischen Rauchverhalten und CYP2A6-Polymorphismen untersucht werden.

In einer Vorgängerstudie wurde der Einfluss des CYP2A6\*2-Polymorphismus auf das Rauchverhalten untersucht (Esser 2004). Es konnten keine Unterschiede in der Stärke der Nikotinabhängigkeit und im Nikotinkonsum zwischen Personen mit Wildtyp (CYP2A6\*1/\*1, N = 308) und heterozygoten CYP2A6\*2-Allelträgern (N = 16) festgestellt werden. Unter der Vorstellung, dass die Nikotinverfügbarkeit eine Schlüsselrolle im Rauchverhalten und in der Abhängigkeit einnimmt, stellt sich die Frage, ob der Nikotinmetabolismus in der Population mit CYP2A6\*2-Genotyp überhaupt deutlich reduziert war.

Die vorliegende Studie vergleicht den Nikotinmetabolismus von sieben heterozygoten CYP2A6\*2-Allelträgern mit sieben Individuen mit Wildtyp aus eben dieser Population.

### **1.5 Fragestellung dieser Arbeit**

Diese Studie verfolgt das Ziel zu klären, ob heterozygote CYP2A6\*2-Allelträger einen verminderten Nikotinmetabolismus haben. Ausgehend von einem Mangel an Studien zum Nikotinmetabolismus bei diesen Individuen und den widersprüchlichen Ergebnissen in der Forschung über den Zusammenhang zwischen Rauchverhalten und bestimmten CYP2A6-Genotypen, soll geprüft werden, ob heterozygote CYP2A6\*2-Allelträger einen verminderten Nikotinmetabolismus gegenüber Personen mit Wildtyp (CYP2A6\*1/\*1) aufweisen. Auf mögliche Einflüsse von Alter, Geschlecht, Rauchintensität und Rauchdauer wurde durch das gewählte „matched-pair-design“ geachtet.

**Hypothese 1:** Heterozygote CYP2A6\*2-Allelträger weisen im Vergleich zu Wildtypträgern (CYP2A6\*1/\*1) einen verzögerten Nikotinabbau auf.

**Alternativhypothese 1:** Es besteht kein Unterschied im Nikotinmetabolismus zwischen heterozygoten CYP2A6\*2-Allelträgern und Individuen mit Wildtyp.

In einer Nebenfragestellung soll untersucht werden, ob das subjektive Rauchverlangen (Craving) gemessen mittels QSU-G (deutsche Fassung des „Questionnaire on Smoking Urges“ (Müller et al. 2001)) während einer kontrollierten Nikotinverabreichung bei heterozygoten CYP2A6\*2-Merkmalsträgern geringer ausgeprägt ist, als bei Individuen mit Wildtyp. Grundlage für diese Überlegung ist die Annahme, dass Craving durch die Höhe der Nikotinkonzentration beeinflusst wird (Lunell et al. 1995). Haben Individuen mit CYP2A6\*1/\*2-Genotyp einen langsameren Nikotinabbau, so könnte vermutet werden, dass diese Gruppe aufgrund höherer Nikotinspiegel weniger Craving bzw. erst später eine Zunahme des Cravings zeigt.

**Hypothese 2:** Heterozygote CYP2A6\*2-Allelträger haben ein geringeres subjektives Rauchverlangen nach kontrollierter Nikotingabe als Wildtypträger.

**Alternativhypothese 2:** Heterozygote CYP2A6\*2-Allelträger zeigen nach kontrollierter Nikotingabe keinen Unterschied im subjektiven Rauchverlangen im Vergleich zu Individuen mit CYP2A6\*1/\*1-Genotyp.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Probanden**

Alle Studienteilnehmer wurden telefonisch und schriftlich ausführlich über die Studie informiert. Sie hatten vor Beginn der Untersuchung ausreichend Gelegenheit, alle offenen Fragen zu klären und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät Tübingen genehmigt (Ethikantrag 130/2002).

#### **2.1.1 Auswahlkriterien**

Auf folgende Einschlusskriterien wurde bei der Rekrutierung der Probanden geachtet:

- Männer und Frauen im Alter von mindestens 18 Jahren
- Fähigkeit zur Zustimmung nach ausführlicher schriftlicher Aufklärung zur Datenerhebung und deren anonymisierten Auswertung
- Vorliegende schriftliche Zustimmung nach ausführlicher Aufklärung zur Datenerhebung und deren anonymisierten Auswertung
- Aktueller Zigarettenkonsum

Die Probanden sollten nicht schwanger sein und weder eine schizophrene Störung in der Anamnese aufweisen oder an einer aktuellen Major Depression erkrankt sein, da sich dies unter anderem auf das Rauchverhalten und die Stärke der Abhängigkeit auswirken kann (Breslau et al. 1991; Breslau 1995). Außerdem sollten die Teilnehmer keine neuroleptische oder antidepressive Medikation einnehmen.

#### **2.1.2 Rekrutierung**

Rekrutiert wurden Raucher, die sich größtenteils zuvor im Rahmen eines Raucherentwöhnungskurses zur Teilnahme einer genetischen Studie bereit erklärt und freiwillig der Bestimmung des Genstatus von CYP2A6 unterzogen hatten. Wenige Personen nahmen – unabhängig von einem Raucherentwöhnungskurs – an der genetischen Studie teil. Die Bestimmung des Genstatus

wurde in der Dissertation von Esser ausführlich beschrieben (Esser 2004). Von den 324 in der vorhergehenden Studie untersuchten Personen wiesen 16 Probanden die seltene Allelvariante CYP2A6\*2 auf, was einer Inzidenz der heterozygoten Merkmalsträger von 4,9% entsprach. Nach Berücksichtigung der Ein- und Ausschlusskriterien kamen davon für die aktuelle Studie 14 Raucher in Frage, wovon sich sieben nach telefonischer oder schriftlicher Einladung zur Teilnahme bereit erklärten. Ausgehend von dieser Teilpopulation wurden aus der Gruppe der 308 Probanden mit CYP2A6\*1/\*1-Genotyp weitere sieben ausgewählt, die sich hinsichtlich der Variablen Alter, Geschlecht, Rauchdauer, FTND sowie Zahl der täglich gerauchten Zigaretten nicht wesentlich von den anderen sieben Probanden unterschieden. Die Studienteilnehmer waren ausschließlich europäischer Abstammung.

Ein Proband aus der CYP2A6\*2-Gruppe konsumierte ausschließlich Nikotinkaugummis (12 Kaugummis á 4 mg und 6 Kaugummis á 2 mg pro Tag). Die in den Nikotinkaugummis enthaltenen 60 mg Nikotin ersetzen bei regelhafter Anwendung etwa 30 Zigaretten. Aus derselben Gruppe nahm eine Probandin regelmäßig das Antiepileptikum Carbamazepin und das Antidepressivum Venlafaxin ein, eine aktuelle Major Depression lag nicht vor. Es gibt keine Hinweise auf einen relevanten Einfluss von Venlafaxin auf CYP2A6 (Spina et al. 2003), möglicherweise wird CYP2A6 jedoch von Carbamazepin induziert (Sotaniemi et al. 1995). Dieselbe Probandin hatte morgens vor der Untersuchung eine Zigarette geraucht.

### **2.2 Studienablauf**

Zur Bestimmung der individuellen Nikotinkinetik wurden die Probanden morgens am Untersuchungstag nach mindestens achtstündiger Nikotinkarenz und ohne vorher Kaffee getrunken zu haben, in die Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie Tübingen gebeten. Zu Beginn wurde die Kohlenmonoxidkonzentration in der Ausatemluft anhand eines Kohlenmonoxid-Messgerätes bestimmt. Das Gerät misst mittels eines elektro-chemischen Sensors die CO-Konzentration in der Ausatemluft. Diese gemessene CO-Konzentration

entspricht weitgehend der alveolären CO-Konzentration, diese wiederum korreliert direkt mit dem CO-Gehalt im Blut. Die Probanden wurden angewiesen, tief einzuatmen, für 15 Sekunden die Luft anzuhalten und anschließend über ein auf das Messgerät aufgesetzte Mundstück vollständig auszuatmen.

Anschließend wurden die Studienteilnehmer gebeten, Angaben über Zigarettenzahl pro Tag, Alter und Medikamenteneinnahme zu machen (die Rauchdauer wurde der vorausgegangenen Studie entnommen) und zusätzlich zwei Fragebögen (FTND und QSU s. u.) auszufüllen.

Für die Blutentnahmen wurde den Probanden eine Venenverweilkanüle in eine periphere Armvene gelegt. Zur Bestimmung der Basiswerte von Nikotin und Cotinin im Serum wurden 8 ml Blut entnommen. Anschließend wurden die Teilnehmer angewiesen, zwei Nikotin-Sublingualtabletten (je 2 mg) unter der Zunge zergehen zu lassen. Es folgten weitere neun Blutentnahmen zur Bestimmung von Nikotin und Cotinin im Serum über einen Zeitraum von zwei Stunden (vgl. Tabelle 4).

Als Aufwandsentschädigung erhielt jeder Proband 50 € und ein Frühstück, das direkt nach Auflösen der Nikotintablette eingenommen werden durfte.

Die Proben wurden 30 bis 60 Minuten nach der Entnahme zentrifugiert und das Serum bei  $-70^{\circ}\text{C}$  bis zur Weiterverarbeitung tiefgefroren.

### 2.2.1 FTND-Fragebogen

Zur Erfassung der Stärke der Abhängigkeit wurde allen Teilnehmern zu Beginn der Studie die deutsche Fassung des „Fagerström Test for Nicotine Dependence“ (FTND (Heatherton et al. 1991), siehe Anhang) vorgelegt. Auf einer Selbstbeurteilungsskala mit sechs Punkten sollten die Raucher ihr Rauchverhalten einschätzen. In diesem Fragebogen werden unter anderem die Anzahl der gerauchten Zigaretten und der morgendliche Konsum berücksichtigt. Die Summe der erreichbaren Punktwerte reicht von 0 bis 10 Punkten, woraus die Stärke der Abhängigkeit wie folgt in fünf Kategorien eingeteilt werden kann (Kunze et al. 1998):

0-2	Punkte:	sehr geringe Nikotinabhängigkeit
3-4	Punkte:	geringe Abhängigkeit
5	Punkte:	mittlere Abhängigkeit
6-7	Punkte:	starke Abhängigkeit
8-10	Punkte:	sehr starke Abhängigkeit

In der vorliegenden Studie wurden die Originalzahlenwerte verwendet.

### 2.2.2 QSU-Fragebogen

Zusätzlich wurden die Probanden gebeten, eine deutsche Übersetzung des „Questionnaire on Smoking Urges“ (QSU-G (Müller et al. 2001), siehe Anhang) zu bearbeiten. Der Fragenbogen erfasst das subjektive Verlangen zu rauchen. Er besteht aus 32 Punkten, die auf einer Ratingskala von 1 (stimmt überhaupt nicht) bis 7 (stimmt völlig) zu beantworten sind. Nach einer Hauptfaktorenanalyse liegen dem QSU am ehesten zwei Faktoren zugrunde (Tiffany et al. 1991; Müller et al. 2001). Faktor 1 (bestehend aus elf Items) erfasst „den Wunsch und die Absicht zu rauchen sowie die Erwartung positiver Auswirkungen des Rauchens“. Faktor 2 (bestehend aus zehn Items) repräsentiert „die Erwartung einer Erleichterung von Nikotin-entzugserscheinungen bzw. negativen Affekten und einen überwältigenden Drang zu rauchen“ (Müller et al. 2001). Um den Verlauf des subjektiven Rauchverlangens (Cravings) über den Zeitraum der Studie zu beurteilen, wurde

der QSU den Teilnehmern nach Nikotineinnahme (im Durchschnitt 30 Minuten später) und zu Studienende nochmals vorgelegt.

### 2.2.3 Messzeitpunkte während der Studie

Messzeitpunkte (min)	T0, anschließend Nikotingabe (4 mg)	T0+ 10	T0+ 20	Nikotin-tablette aufgelöst	T0+ 30	T0+ 40	T0+ 50	T0+ 60	T0+ 80	T0+ 100	T0+ 120
FTND	X										
QSU	X			X							X
CO	X										
Nikotin	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
Cotinin	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X

**Tabelle 4: Messzeitpunkte der Blutentnahmen zur Nikotin- und Cotininbestimmung, CO-Konzentration in der Ausatemluft, QSU-Fragebogen und FTND-Fragebogen (T0 = Studienbeginn, T0 + 120 = Studienende nach 2 Stunden)**

### 2.2.4 Verwendete Materialien für den klinischen Teil

Sarstedt Monovette®	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht
Multi-Adapter	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht
Vasofix® Braunüle®	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Polypropylene-Tubes, 5 ml, 12 x 75 mm	Fa. Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen
Nicorette® Microtab	Sublingualtablette 2 mg, Pharmacia AG, Dübendorf, Schweiz
Vitalograph®	Breath CO, Irland
Zentrifuge	Universal 16R, Hettich, Tuttlingen
Gefrierschrank -70°C	Heraeus, Hanau

## **2.3 Quantitative Bestimmung von Nikotin und Cotinin im Serum**

Cotinin und Nikotin wurden mit der Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie und UV-Detektion quantitativ bestimmt (Farger 2004 (nicht veröffentlicht) modifiziert nach (Hariharan et al. 1988; Clark et al. 1994)).

### **2.3.1 Prinzip der HPLC**

Unter dem Begriff Chromatographie werden physikalische Methoden zusammengefasst, bei denen eine Stofftrennung durch Verteilung zwischen einer stationären und einer mobilen Phase erfolgt.

Die Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie („High Performance Liquid Chromatography“, HPLC) ist ein Verfahren, bei dem die Probe mittels einer mobilen Phase (Eluent) unter hohem Druck auf einer stationären Phase (Trennsäule) analysiert wird. Je nach Art der Wechselwirkung zwischen Probe, stationärer und mobiler Phase werden verschiedene Trennmechanismen unterschieden. In der vorliegenden Studie wurde die Umkehr-Phasen-Verteilungschromatographie („reversed phase chromatography“) angewandt. Hierbei ist die mobile Phase polarer als die stationäre Phase. Polare Stoffe werden so vor apolaren eluiert (z. B. Nikotin vor Cotinin). Nach Durchlaufen der Trennsäule erkennt der UV-Detektor die Substanzen, die UV-Licht absorbieren, und zeichnet diese Signale nacheinander in Form eines Chromatogramms auf. Anhand der Retentionszeiten (Zeit zwischen Injektion der Substanz und der Signalerkennung im Detektor) kann die Identifikation von Substanzen erfolgen. Die Retentionszeit für eine Substanz ist bei gleichen chromatographischen Bedingungen stets gleich groß. Die unbekannte Substanzmenge in der Probe ist der Fläche bzw. Höhe der Signale proportional. Über eine Kalibrationsfunktion ist die quantitative Bestimmung der einzelnen Substanzen möglich. Den schematischen Aufbau eines HPLC-Gerätes zeigt Abbildung 2.



### 2.3.1.1 Schema eines HPLC-Gerätes

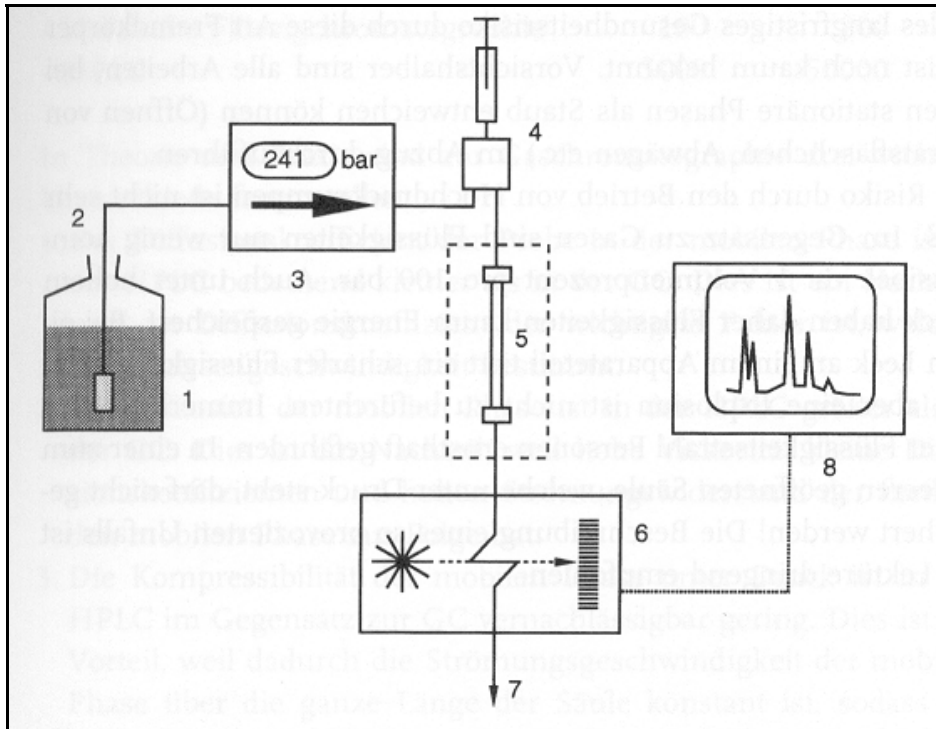


Abbildung 2: Schema eines HPLC- Gerätes, 1 = Lösungsmittelvorrat, 2 = Zuleitung mit Fritte, 3 = Pumpe (mit Digitalanzeige des Drucks), 4 = Probenaufnahme, 5 = Säule, evtl. thermostatisiert, 6 = Detektor, 7 = Abfall, 8 = Datenerfassung und -verarbeitung, Abbildung entnommen aus: (Meyer 2004)

## 2.3.2 Verwendete Materialien und Geräte

### 2.3.2.1 Chemikalien und Materialien

Trichloressigsäure p. a.	Merck, Darmstadt
Natriumdesoxycholat p. a.	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid p. a.	Merck, Darmstadt
Dichlormethan LiChrosolv	Merck, Darmstadt
Salzsäure p. a.	Merck, Darmstadt
Methanol LiChrosolv	Merck, Darmstadt
Acetonitril LiChrosolv	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat p.a.	Merck, Darmstadt
Phosphorsäure p. a.	Merck, Darmstadt
Triethylamin p. a.	Fluka, Buchs, Schweiz

### 2.3.2.2 Referenzsubstanzen

(-)Cotinin	Sigma, St. Louis, USA
(-)Nikotinhydrogentartrat	Sigma, St. Louis, USA
2-Phenylimidazol	Aldrich-Chemie, Steinheim

### 2.3.2.3 Säulenmaterial

Hypersil ODS, 5 µm	Thermo Electron, Hyde, GB
Microbore Vorsäule, 10 x 2 mm I. D.	A. Maisch, Ammerbuch
Microbore Trennsäule, 125 x 2 mm I. D.	A. Maisch, Ammerbuch

#### 2.3.2.4 Geräte

Heraeus Multifuge 3 L – R	Kendro, Osterode
Kühlzentrifuge Allegra 6 R	Beckman Coulter, München
Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Multitube Vortexer 4010	Corning Medical, Medfield, USA
Analysenwaage 770	Kern, Balingen
pH-Meter 535	WTW, Weilheim
Speed Vac Concentrator	Bachofer, Reutlingen
Eppendorff-Pipetten, variabel	Eppendorff, Hamburg
Finn-Pipette	Labsystems, Helsinki, Finnland

#### 2.3.2.5 HPLC-System

Pumpensystem HP 1090	Agilent Technologies, Waldbronn
Probengeber HP 1090	Agilent Technologies, Waldbronn
Säulenthermostat HP 1090	Agilent Technologies, Waldbronn
UV-Detektor HP 1100 VWD	Agilent Technologies, Waldbronn
HP Chem Station Plus Rev. A07.01.	Agilent Technologies, Waldbronn

### 2.3.3 Probenaufarbeitung

Die Probenaufarbeitung zur Extraktion von Nikotin und Cotinin erfolgte in mehreren Flüssig-Flüssig-Extraktionsschritten. Für die Enteiweißung wurden 1 ml Serum (mit 2-Phenylimidazol als internem Standard) mit 0,75 ml 10-prozentiger Trichloressigsäure versetzt, am Vortex 30 sec gut gemischt und anschließend 10 Minuten bei 14.000 x g zentrifugiert. Dieser Ansatz wurde ein zweites Mal durchgeführt, um das Probenvolumen zu erhöhen. In einem ersten Extraktionsschritt wurden beide Überstände zusammen mit 1 ml 0,5-prozentiger Na-Desoxycholat-Lösung und mit 500 µl 5 mol/l NaOH versetzt und erneut gemischt. Es folgte die Zugabe von 5 ml Dichlormethan mit nachfolgendem Mischen am Corning-Multivortex und eine 10-minütige Zentrifugation bei 3000 rpm und 18°C. Um aus der organischen Phase Nikotin und Cotinin in die saure Phase zu extrahieren, wurden 3 ml 0,5 mol/l HCL hinzugefügt und wie oben beschrieben gemischt und zentrifugiert. Die saure Phase wurde erneut mit 500 µl 5 mol /l NaOH versetzt und mit 5 ml Dichlormethan extrahiert. Nach Zugabe von 200 µl methanolischer HCl wurde die organische Phase am Speed Vac Concentrator unter Vakuum bis zur Trockene eingeengt, gefolgt von einer Spülung der Gefäßwände mit 200 µl Methanol, um Verluste des dort verbliebenen Nikotins und Cotinins zu vermeiden. Nach Abdampfen des Methanols wurde der aufkonzentrierte, trockene Rückstand in 100 µl mobiler Phase (pH 7,5) gelöst und mittels HPLC auf Nikotin und Cotinin analysiert.

### 2.3.4 Chromatographische Bestimmung

Zur chromatographischen Bestimmung wurde die mobile Phase, bestehend aus Acetonitril, Kaliumdihydrogenphosphat und Triethylamin mit Phosphorsäure auf pH 6,5 eingestellt. Von der aufgearbeiteten Probe wurden jeweils 60 µl auf die Trennsäule injiziert und bei 40°C mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,3 ml/min im System aufgetrennt. Nikotin und Cotinin wurden durch den UV- Detektor bei einer Wellenlänge von 262 nm analysiert und die Signale in Form eines Chromatogramms aufgezeichnet. Die Chromatographiezeit pro Messung betrug 12 Minuten.

Die Methode wurde für Nikotin im Konzentrationsbereich von 2,5 bis 20 ng/ml und für Cotinin von 100 bis 700 ng/ml kalibriert. Die Kalibrierfunktionen wurden mittels linearer Regression der Konzentrationen und der Peakhöhenverhältnisse von Substanz zu internem Standard ermittelt. Dabei lagen die Nachweisgrenzen jeweils bei 0,5 bis 1,0 ng/ml. Um die Richtigkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden jeweils Kontrollen mit definierter Nikotin- und Cotininkonzentration mitgeführt.

### **2.4 Statistische Auswertung**

Die Datenauswertung wurde mit dem Statistikprogramm SPSS Version 10 („SPSS statistical software system for Windows release 10.0.5.“ Chicago: SPSS Incorporated, 1999) durchgeführt. Die gegenwärtige Studie verwendet unter Berücksichtigung der Interaktion der Faktoren Gruppenzugehörigkeit und Zeit ein quasi-experimentelles, gemischtes Design mit Messwiederholungen.

Univariate Varianzanalysen mit Messwiederholungen (ANOVA) wurden für die Hauptergebnisanalysen gewählt, da sie die Fehlervarianz aufgrund von individuellen Unterschieden zwischen den Probanden vermindern. Univariate Varianzanalysen bieten außerdem den Vorteil, dass sie bei kleinen Stichproben eine größere statistische Power bieten als multivariate Varianzanalysen (Dallal 2001).

Für normalverteilte, intervallskalierte Daten wurde der T-Test, für nominale Daten der Chi-Quadrat-Test angewandt. Um Ordinalskalen bzw. nicht normalverteilte Daten zu vergleichen, wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Für bivariate Korrelationen wurde die Pearsons- $r$ -Statistik verwendet, um so die Assoziationsstärke zwischen Variablen festzustellen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 HPLC-Ergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse der HPLC erfolgt in Form von Chromatogrammen, welche die Konzentration (Höhe und Fläche der Peaks) der Substanzen in Abhängigkeit der Zeit darstellen (vgl. Abbildung 3).

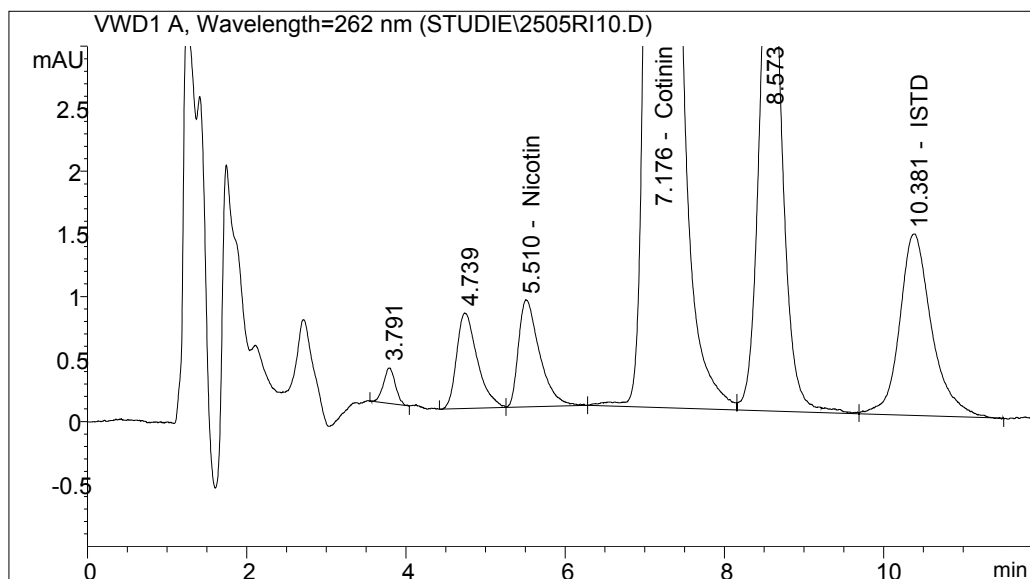


Abbildung 3: Beispiel eines Chromatogramms, mAU = „milli Absorption Units“, min = Minuten, errechnete Nikotinkonzentration: 6,3 ng/ml, Cotininkonzentration: 242 ng/ml

#### 3.2 Studienpopulation, soziodemographische und rauchanamnestische Daten

Insgesamt wurden 14 Studienteilnehmer zweier Populationen verglichen: Personen mit CYP2A6\*1/\*1-Genotyp (Wildtyp, Gruppe 1) und Studienteilnehmer mit CYP2A6\*1/\*2-Genotyp (Gruppe 2). In Tabelle 5 werden die soziodemographischen und rauchanamnestischen Ausgangsdaten aller Probanden dargestellt. Da die Teilnehmer hinsichtlich dieser Daten „gematched“ worden waren, ergaben sich zu Studienbeginn hierfür im Vergleich der beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede (vgl. Tabelle 5 und Tabelle 6). Die FTND-

## Ergebnisse

Ergebnisse zeigten eine mittlere bis starke Abhängigkeit für beide Gruppen (Gruppe 1: 4,86; Gruppe 2: 6,14;  $p=0,2$ ) mit einer Tendenz zu höheren Werten für Gruppe 2. Die CO-Werte lagen für beide Gruppen im Mittel bei 15 ppm.

Proband (Genotyp)	Ge- schlecht	Alter (Jahre)	Zig.- Zahl/ Tag	Rauch- dauer (Jahre)	FTND (Punkte)	CO- Wert (ppm)	Erkrankungen, Medikamente, Sonstiges
1 (*1/*1)	w	51	15	27	4	13	
2 (*1/*1)	w	45	25	22	4	13	Asthma, Theophyllin, Fenoterol, Montelukast, Salmeterol/ Fluticason
3 (*1/*1)	m	32	25	12	4	18	
4 (*1/*1)	m	52	35	32	6	20	KHK, Acetylsalicyl- säure 100 mg, Lovastatin, Bisoprolol 5 mg
5 (*1/*1)	w	45	20	22	4	13	Jodetten
6 (*1/*1)	w	55	20	32	5	09	
7 (*1/*1)	w	46	25	26	7	17	
8 (*1/*2)	m	23	20	10	4	15	
9 (*1/*2)	w	36	25	21	8	21	Z.n. Depression, Carbamazepin 400 mg (0-0-2), Venlafaxin 75 mg (1-0-0), morgens 1 Zig. geraucht
10 (*1/*2)	w	48	20	28	5	08	
11 (*1/*2)	w	36	20	18	4	12	
12 (*1/*2)	w	38	20	19	5	13	
13 (*1/*2)	w	39	40	27	8	22	L-Thyroxin 125µg
14 (*1/*2)	m	51	60 mg Nikotin (≈ 30 Zig.	32	9	02	tgl. 12 Nikotin- kaugummis á 4 mg und 6 á 2 mg

**Tabelle 5: Soziodemographische und rauchanamnestische Ausgangsdaten aller Probanden**

## Ergebnisse

Gruppenvergleich	Geschlecht	Alter (Jahre)	Zigarettenzahl pro Tag	Rauchdauer (Jahre)	FTND (Punkte)	CO-Wert (ppm)
CYP2A6*1/*1 (N=7) MW (SD)	71,4% Frauen	46,6 (7,5)	23,6 (6,3)	24,7 (7,0)	4,9 (1,2)	14,7 (3,8)
CYP2A6*1/*2 (N=7) <sup>1</sup> MW (SD)	71,4% Frauen	38,7 (9,1)	25,0 (7,6)	22,1 (7,4)	6,1 (2,1)	15,2 (5,4)
Teststatistik: $t/X^2$	0,00	1,76	-0,38	0,67	-1,39	-0,18
Signifikanzniveau: p	1,00	0,10	0,71	0,52	0,20	0,86
Freiheitsgrade: df	1 (N=14)	12	12	12	9,6 <sup>2</sup>	11

**Tabelle 6: Gruppenvergleich der soziodemographischen und rauchanamnestischen Daten, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, <sup>1</sup> = Proband Nr. 14 konsumierte Nikotinkaugummi. Da seine CO-Werte erwartungsgemäß vergleichbar mit Nichtrauchern waren, stellte er einen Extremausreißer dar (der Interquartilsabstand war mehr als drei mal so groß, wie der Abstand zwischen erstem und drittem Quartil) und wurde von den CO-Berechnungen ausgeschlossen. <sup>2</sup> = Zahl beruht auf einem Welch's Test – Deskriptive Statistik, T-Test/ $X^2$ -Test**

### **3.3 Nikotin- und Cotininausgangskonzentrationen**

Die Nikotin- und Cotininserumkonzentration zu Studienbeginn sowie die Resorptionszeiten der Nikotinsublingualtabletten aller Probanden sind in Tabelle 7 dargestellt. Ein T-Test zeigte für diese Ausgangsdaten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Studiengruppen. Ein männlicher Proband (kaugummikonsumierender Proband Nr. 14) stellte sich als einflussreicher Ausreißer für die Cotininwerte dar, er wurde deshalb für die folgenden Cotininanalysen ausgeschlossen, auch wenn die Messwerte nur knapp zwei Standardabweichungen (1,91) vom Mittelpunkt abwichen.



## Ergebnisse

Proband (Genotyp)	Nikotinausgangs-Konzentration (ng/ml)	Cotinausgangs-Konzentration (ng/ml)	Nikotinresorptions-Zeit (Minuten)
1 (*1/*1)	0,73	208	30
2 (*1/*1)	0,64	223	25
3 (*1/*1)	2,34	365	37
4 (*1/*1)	3,98	284	36
5 (*1/*1)	1,48	444	15
6 (*1/*1)	1,53	104	28
7 (*1/*1)	0,96	321	37
8 (*1/*2)	1,76	207	22
9 (*1/*2)	2,18	125	29
10 (*1/*2)	1,84	298	31
11 (*1/*2)	2,89	277	23
12 (*1/*2)	1,62	185	31
13 (*1/*2)	2,40	482	25
14 (*1/*2)	1,53	729	23
<b>Gruppenvergleich</b>			
CYP2A6*1/*1 (N=7) MW (SD)	1,7 (1,2)	278,4 (112,0)	29,7 (8,0)
CYP2A6*1/*2 (N=7 bzw. 6) MW (SD)	2,0 (0,5)	262,3 (124,6)	26,3 (4,0)
Teststatistik: <i>t</i>	-0,76	0,25	1,01
Signifikanzniveau: p	0,46	0,81	0,33
Freiheitsgrade: df	12	11	12

**Tabelle 7: Nikotin- und Cotinausgangskonzentrationen und Nikotinresorptionszeiten aller Probanden und im Gruppenvergleich, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung – Deskriptive Statistik, T-Test**

### **3.4 Nikotin- und Cotininkonzentrationskurven**

Die Nikotin- und Cotininkonzentrationsverläufe über den Zeitraum der zweistündigen Untersuchung aller einzelnen Probanden sind in Abbildung 4 und Abbildung 5 dargestellt. Auffällig ist eine große interindividuelle Variabilität der Kurvenverläufe sowohl in der Wildtypgruppe als auch bei CYP2A6\*2-Allelträgern. Abbildung 6 zeigt die Nikotin- und Cotininkonzentrationen im Gruppenvergleich (CYP2A6\*1/\*1 versus CYP2A6\*1/\*2, vgl. Kapitel 3.6.1 und 3.6.2)

# Ergebnisse

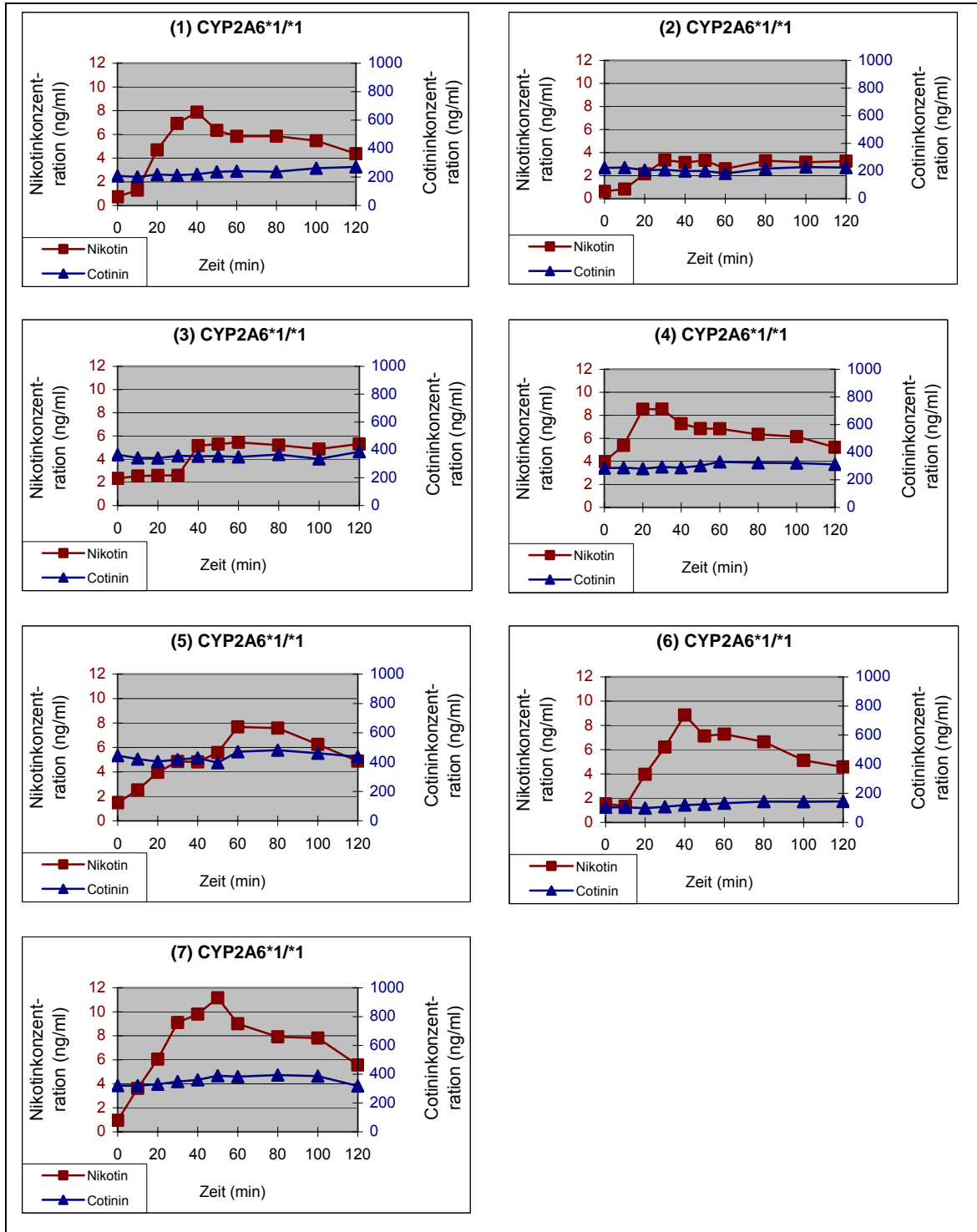


Abbildung 4: Diagramme der CYP2A6\*1/\*1-Probanden (1) bis (7), Nikotin- und Cotinkonzentrationen im Verlauf des zweistündigen Experiments

# Ergebnisse

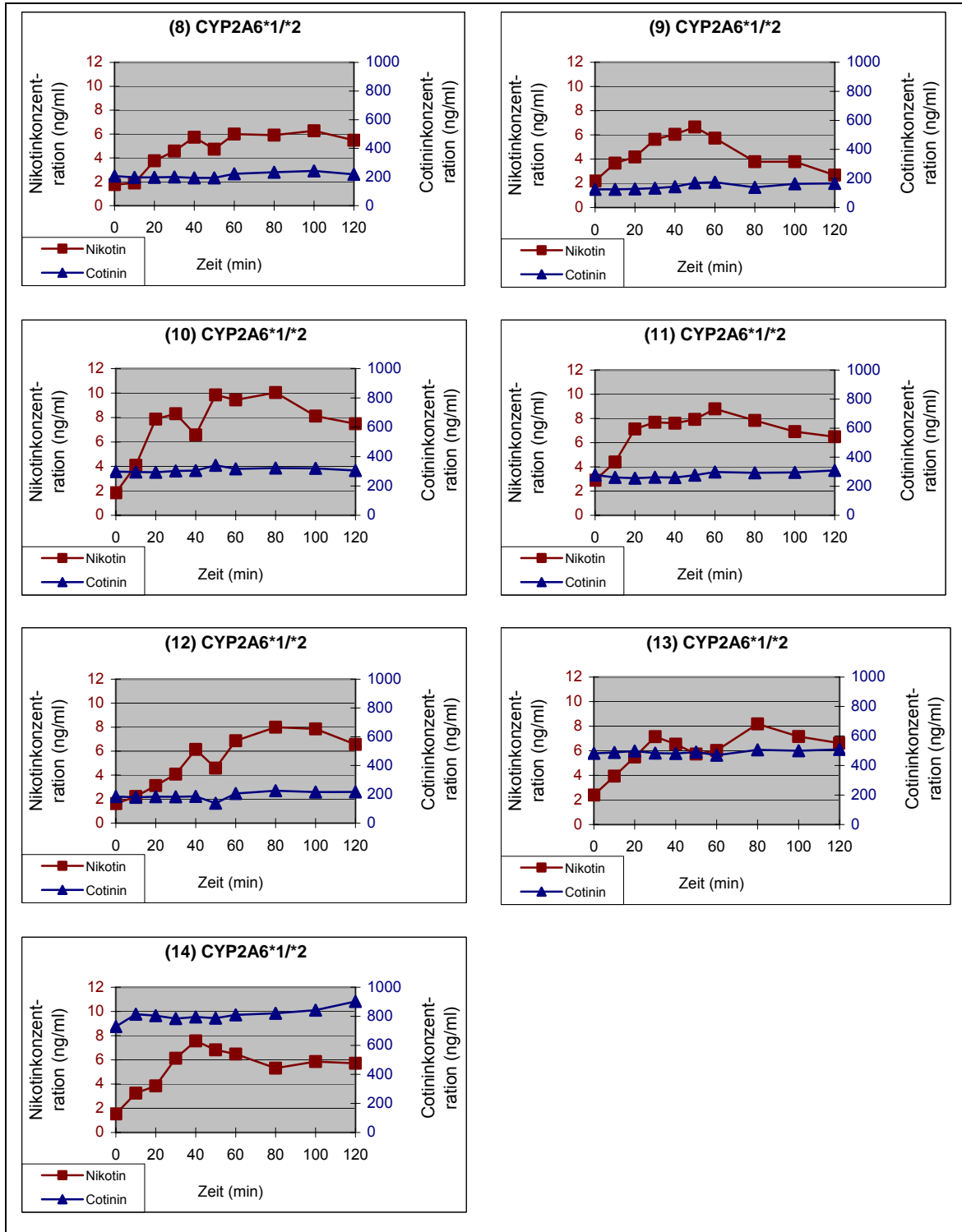


Abbildung 5: Diagramme der CYP2A6\*1/\*2-Probanden (8) bis (14), Nikotin- und Cotininkonzentrationen im Verlauf des zweistündigen Experiments

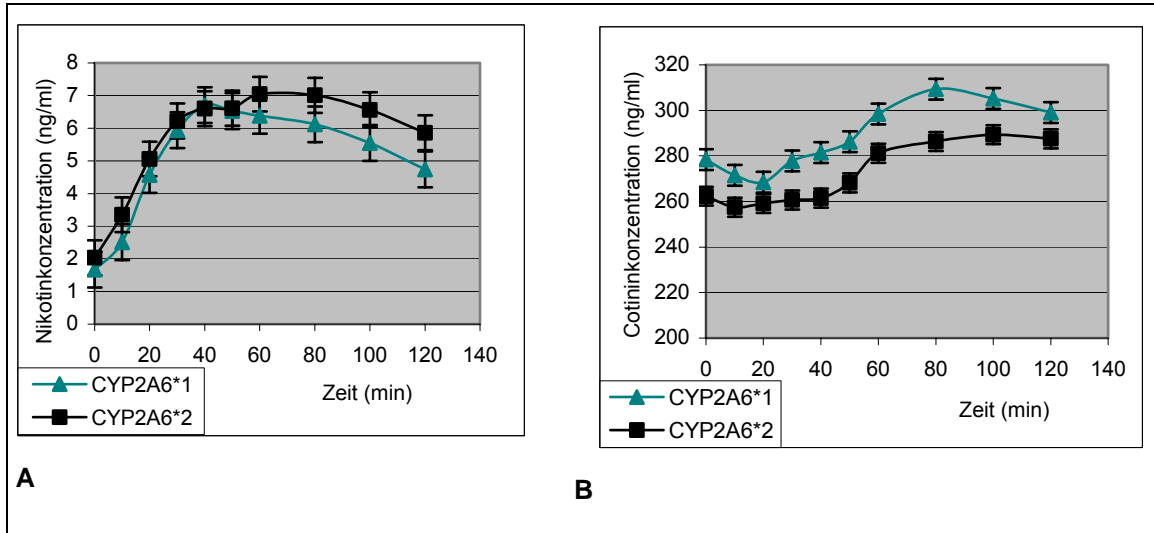


Abbildung 6A,B: Nikotin- und Cotininkonzentration in Abhängigkeit der Zeit im Gruppenvergleich CYP2A6\*1 (N=7) und CYP2A6\*2 (N=7 für Nikotin und N=6 für Cotinin); Balken zeigen die Standardabweichung an

### 3.5 Nikotin- und Cotininkinetik

Mit der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve („Area Under the Curve“, AUC) ist es möglich, die Menge von Medikamenten oder Substanzen, die den systemischen Kreislauf erreichen, zu bestimmen. Sie kann nach der Trapezregel berechnet werden, indem aus jeweils zwei Messzeitpunkten und den beiden dazugehörigen Konzentrationen die Fläche des entsprechenden Trapezes bestimmt wird. Mit folgender Formel lässt sich die AUC berechnen (Mutschler et al. 2001):

$$\text{AUC} = \sum \frac{1}{2}(t_{n+1}-t_n) \times (C_n + C_{n+1}) \quad t = \text{Zeit, } c = \text{Konzentration}$$

Parameter für die Resorptionsgeschwindigkeit von Stoffen sind die maximale Plasmakonzentration ( $C_{\max}$ ) und die Zeit zwischen Applikation und Erreichen der maximalen Plasmakonzentration ( $t_{\max}$ ) (Mutschler et al. 2001).

In Tabelle 8 sind für Nikotin die AUC-Werte sowie  $C_{\max}$  und  $t_{\max}$  aller Probanden dargestellt. Da beide Gruppen aufgrund der kurzen Abstinenz von acht Stunden hohe Cotininausgangskonzentrationen aufwiesen und die Abweichung von Cotinin- $C_{\max}$  zum Cotininausgangswert im Durchschnitt nur 18 Prozent betrug (SD = 12), wurde von einer AUC- und  $t_{\max}$ -Analyse für Cotinin abgesehen.

Im Mann-Whitney-U-Test ergaben sich für AUC-Nikotin keine signifikanten Gruppenunterschiede (vgl. Tabelle 8 und Abbildung 7). Auch die gemessene maximale Konzentration ( $C_{\max}$ ) für Nikotin zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Konzentration ( $t_{\max}$ ) zeigte einen signifikanten Gruppenunterschied: heterozygote CYP2A6\*2-Allelträger erreichten die maximale Nikotinkonzentration signifikant später als die Wildtypträger (vgl. Tabelle 8).

## Ergebnisse

Proband (Genotyp)	Nikotin C <sub>max</sub> (ng/ml)	Nikotin t <sub>max</sub> (min)	AUC Nikotin	Cotinin C <sub>max</sub> (ng/ml)
1 (*1/*1)	7,9	41	633	371
2 (*1/*1)	3,4	32	332	229
3 (*1/*1)	5,5	59	530	387
4 (*1/*1)	8,5	30	791	330
5 (*1/*1)	7,7	60	666	482
6 (*1/*1)	8,9	40	673	144
7 (*1/*1)	11,2	50	908	394
8 (*1/*2)	6,3	101	604	242
9 (*1/*2)	6,7	50	536	174
10 (*1/*2)	10,0	80	956	341
11 (*1/*2)	8,8	60	854	309
12 (*1/*2)	8,0	78	695	225
13 (*1/*2)	8,2	81	764	509
14 (*1/*2)	7,6	40	662	902
Gruppenvergleich				
CYP2A6*1/*1 (N=7)	7,6 (2,5)	44,6 (12,1)	647,4	319,0 (114,0)
MW (SD)			(183,7)	
CYP2A6*1/*2 (N=7) <sup>1</sup>	7,9 (1,3)	70,0 (21,0)	724,3	386,0 (252,0)
MW (SD)			(145,2)	
Mann-Whitney-U-Test	24,00	7,50	19,00	18,00
Signifikanzniveau: p	0,95	0,03	0,48	0,67

**Tabelle 8: Nikotin- und Cotininkinetik aller Probanden und im Gruppenvergleich, C<sub>max</sub> = maximale Nikotinserumkonzentration, t<sub>max</sub> = Zeit bis zum Erreichen der maximalen Nikotinkonzentration, AUC = „Area Under the Curve“, <sup>1</sup> = Proband Nr. 14 wurde von den Cotininberechnungen ausgeschlossen (vgl. Tabelle 7) – Deskriptive Statistik, Mann-Whitney-U-Test**

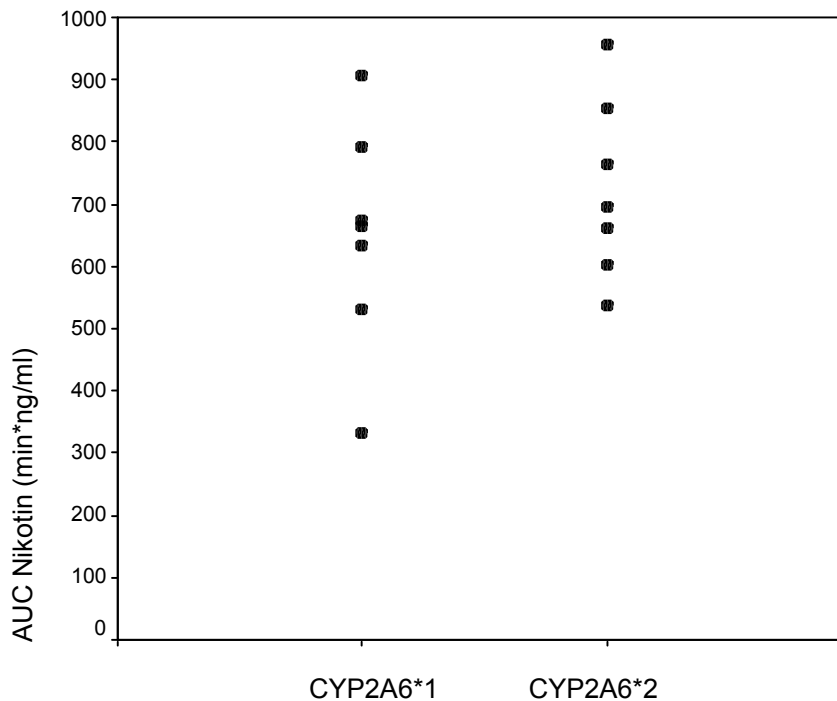


Abbildung 7: AUC-Werte von Nikotin für CYP2A6\*1/\*1 und \*1/\*2, N = 7

### 3.6 Varianzanalysen zu CYP2A6-Genotyp und Nikotin- bzw. Cotininkonzentration

Um zu prüfen, ob Unterschiede im Nikotinmetabolismus zwischen der Wildtyp- und CYP2A6\*2-Gruppe vorhanden sind, wurden zusätzlich zwei univariate Varianzanalysen durchgeführt. Die quasi-unabhängige, interindividuelle Variable stellte „Gruppe“ (CYP2A6\*1/\*1 oder \*1/\*2) dar, „Zeit“ (zehn Messzeitpunkte der Studie) stand für die unabhängige intraindividuelle Variable. Als abhängige Variablen dienten die Ausgangsserumkonzentrationen für Nikotin und Cotinin und die Konzentrationen an den neun darauffolgenden Messzeitpunkten.



### 3.6.1 Nikotin

Die erste Varianzanalyse wurde für die Nikotinkonzentration im Serum durchgeführt. Da der Mauchly-Test darauf hinwies, dass die Voraussetzung der Sphärizität nicht erfüllt war, wurde eine Greenhouse-Geisser-Korrektur durchgeführt. Die Interaktion zwischen Zeit und Gruppe war nicht signifikant ( $F(3,76;45,12)=0,45; p=0,76; \eta_p^2=0,04$ ), CYP2A6\*1- oder \*2-Allelträger wiesen also keine signifikanten Unterschiede in der Nikotinkonzentration über den Zeitraum des Experimentes auf. Gruppe 2 wies eine Tendenz zu einem etwas langsamerem Nikotinabbau auf (vgl. Abbildung 6A). Diese Tendenz wurde ein wenig deutlicher, wenn Person Nr. 9 von den Berechnungen ausgeschlossen wurde; sie hatte einen vergleichsweise schnellen Nikotinabbau.

Es wurde ein signifikanter Effekt der Zeit auf die Nikotinkonzentration nachgewiesen ( $F(3,76;45,12)=31,17; p<0,01; \eta_p^2=0,72$ ). Intraindividuelle Vergleiche zeigten für beide Gruppen eine signifikante Zunahme der Nikotinserumkonzentration von Studienbeginn bis zum Messzeitpunkt nach 40 Minuten ( $p<0,01$ ), sowie eine signifikante Abnahme zu Studienende zwischen 80 und 120 Minuten ( $p<0,05$ ).

### 3.6.2 Cotinin

Für die Cotininkonzentration im Serum wurde analog eine zweite ANOVA gerechnet. Auch hier war es nach einem Mauchly-Test erforderlich, eine Korrektur nach Greenhouse-Geisser durchzuführen. Proband Nr. 14 beeinflusste mit seinen hohen Cotininwerten die Korrelationen zwischen den Variablen stark, sodass er auch für diese Cotininanalysen ausgeschlossen wurde. Die Interaktion zwischen Zeit und Gruppe stellte sich als nicht signifikant dar ( $F(3,49;38,39)=0,18; p=0,93; \eta_p^2=0,02$ ), es ergaben sich also keine signifikanten Gruppenunterschiede in der Cotininkonzentration (Abbildung 6B). Auch hier war der Test für Zwischengruppeneffekte nicht signifikant ( $F(1;11)=0,06; p=0,80; \eta_p^2=0,01$ ).

### 3.7 Craving und CYP2A6-Genotyp

#### 3.7.1 QSU-Ausgangswerte

In einer Nebenfragestellung wurde mittels QSU-Fragebogen („Questionnaire on Smoking Urges“) untersucht, ob heterozygote CYP2A6\*2-Allelträger nach kontrollierter Nikotingabe ein geringeres subjektives Rauchverlangen aufwiesen als Wildtypträger (CYP2A6\*1/\*1).

Tabelle 9 zeigt für beide Gruppen die Ausgangswerte des QSU-Fragebogens zu Studienbeginn. Zwei auf den Fragebögen nicht ausgefüllte QSU-Werte wurden extrapoliert und durch die Mediane dieser Items aller Probanden ersetzt. Der multidimensionale Aufbau des Fragebogens spiegelt sich in den beiden Faktoren Absicht zu rauchen/ Erwartung positiver Rauchwirkung (Faktor 1) und Erwartung einer Entzugsreduktion/ überwältigender Drang zu rauchen (Faktor 2) wieder. Ein T-Test wies für die Ausgangswerte des Fragebogens keine signifikanten Unterschiede zwischen CYP2A6\*1/\*1 und \*1/\*2 auf, jedoch tendierte Gruppe 2 zu etwas höheren Werten.

	QSU-Faktor 1	QSU-Faktor 2
CYP2A6*1/*1 (N=7) MW (SD)	4,6 (1,7)	2,4 (1,2)
CYP2A6*1/*2 (N=7) MW (SD)	5,9 (1,1)	3,6 (1,7)
T-Test: <i>t</i>	-1,69	-1,49
Signifikanzniveau: <i>p</i>	0,12	0,16
Freiheitsgrade: <i>df</i>	12	12

**Tabelle 9: Gruppenvergleich der QSU-Daten zu Studienbeginn, Faktor 1: Absicht zu rauchen/ Erwartung positiver Rauchwirkung (elf Items), Faktor 2: Erwartung einer Entzugsreduktion/ überwältigender Drang zu rauchen (zehn Items) – T-Test**

### **3.7.2 Varianzanalyse zu CYP2A6-Genotyp und Craving**

Um zu prüfen, ob es Unterschiede in den QSU-Werten zwischen den Gruppen gibt, wurden zwei Kovarianzanalysen (ANCOVA) durchgeführt. Eine Voranalyse (bivariate Korrelationen) zeigte eine signifikante Korrelation der täglich gerauchten Zigarettenzahl mit Faktor 1 nach Nikotineinnahme (etwa 30 Minuten nach Studienbeginn). Ebenso korrelierten die FTND-Werte mit Faktor 2 zu Studienbeginn und Studienende nach 120 Minuten signifikant (vgl. Tabelle 10). Um den Effekt von Zigarettenzahl und FTND auf den Gruppeneffekt zu kontrollieren, dienten Zigarettenzahl und FTND als Kovarianten. Die Variable „Gruppe“ (CYP2A6\*1/\*1 oder \*1/\*2) repräsentierte die quasi-unabhängige Variable, „Zeit“ stand für die unabhängige intraindividuelle Variable. Als abhängige Variablen dienten die QSU-Werte von Faktor 1 und 2 zu Beginn der Untersuchung, sowie zu den Messzeitpunkten nach Tabletteneinnahme (etwa 30 Minuten) und zu Studienende (120 Minuten).

## Ergebnisse

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. Alter	-												
2. Zigarettenzahl	,07	-											
3. Rauchdauer	,92**	,33	-										
4. FTND	,20	,67*	,50	-									
5. CO-Wert	-,41	,42	,29	,07	-								
6. Nikotin- konzentration	,03	,54*	,25	,47	,28	-							
7. Cotinin- konzentration	,15	,49	,25	,48	-,31	,30	-						
8. Faktor 1, Studienbeginn	,31	,15	-,08	,48	,24	,30	,00	-					
9. Faktor 2, Studienbeginn	,03	,53	,25	,63*	,10	,55*	,33	,71*	-				
10. Faktor 1, nach 30 min	-,41	,57*	-,13	,40	,39	,19	,13	,53	,33	-			
11. Faktor 2, nach 30 min	-,08	,26	,07	,39	-,17	,29	,33	,51	,60*	,33	-		
12. Faktor 1, Studienende	-,18	,15	,05	,41	,08	,16	-,19	,47	,21	,54*	-,53	-	
13. Faktor 2, Studienende	,30	,23	,46	,58*	-,23	,41	,11	,62*	,80*	,13	,44	,45	-

**Tabelle 10: Korrelationstabelle für soziodemographische und rauchanamnestische Daten, Nikotin- und Cotininausgangskonzentrationen und QSU-Werte (Faktor 1 und Faktor 2) zu drei Messzeitpunkten (Studienbeginn, nach Tabletteneinnahme [etwa 30 Minuten], Studienende [120 Minuten]), \* = signifikante Korrelation mit  $p < 0,05$ , \*\* = signifikante Korrelation mit  $p < 0,01$**

### 3.7.3 Auswirkung des CYP2A6-Genotyps auf die Absicht zu rauchen/ Erwartung positiver Rauchwirkung (Faktor 1 des QSU-Fragebogens)

Bei der Kovarianzanalyse für Faktor 1 diente die Zigarettenzahl als Kovariante. Die Interaktion von Zeit und Gruppe stellte sich als nicht signifikant dar ( $F(2;20)=0,45; p=0,64; \eta_p^2=0,04$ ), die Kovariante Zigarettenzahl hatte keinen signifikanten Einfluss auf diese Berechnungen, ( $F(2;20)=0,67; p=0,52; \eta_p^2=0,06$ ). Es zeigte sich eine signifikante Änderung der QSU-Werte in beiden Gruppen über den zeitlichen Verlauf der Studie ( $F(2;20)=3,61; p<0,05; \eta_p^2=0,27$ ). Intraindividuelle Vergleiche wiesen für beide Gruppen eine signifikante Abnahme der Faktor 1-Werte zwischen Studienbeginn und nach Nikotinresorption (nach etwa 30 Minuten) ( $p=0,03$ ) sowie eine signifikante Zunahme zwischen 30 Minuten und Studienende ( $p<0,02$ ) auf (vgl. Abbildung 8, Tabelle 11).

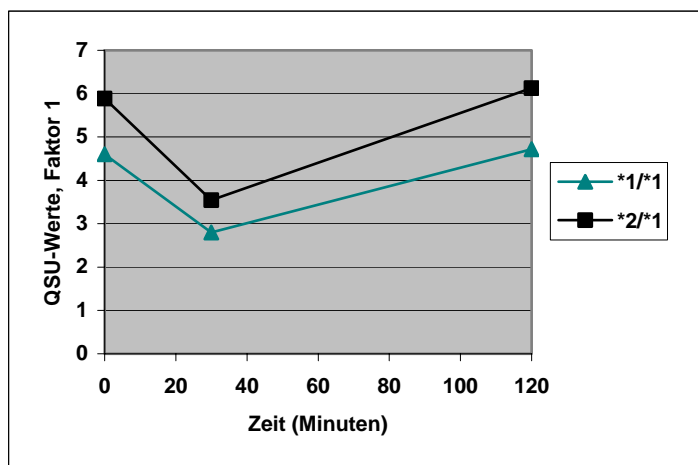


Abbildung 8: QSU-Werte für Faktor 1 in Abhängigkeit der Zeit für CYP2A6\*1/\*1 und \*2/\*1 (Messzeitpunkte: 0 min. = Studienbeginn, 30 min. = Nikotintablette resorbiert, 120 min. = Studienende nach zwei Stunden)

	Messzeitpunkte		
	Studienbeginn	post Nikotinresorption (nach etwa 30 min.)	Studienende (120 min.)
Variablen	MW (SD)	MW (SD)	MW (SD)
QSU-Faktor 1 CYP2A6*1/*1	4,6 (1,7)	2,8 (1,1)	4,7 (1,8)
QSU-Faktor 1 CYP2A6*1/*2	5,9 (1,1)	3,6 (1,1)	6,1 (0,7)

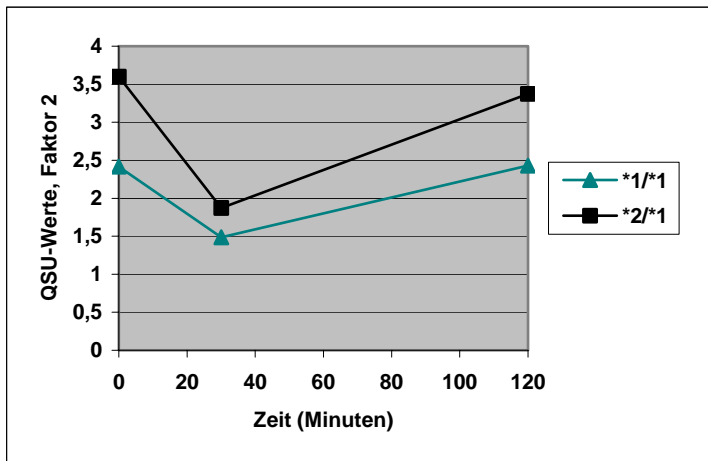
**Tabelle 11: Faktor 1-Werte zu den drei Messzeitpunkten (Studienbeginn, post Nikotinresorption, Studienende) für CYP2A6\*1/\*1 und \*1/\*2 – Deskriptive Statistik**

### **3.7.4 Auswirkung des CYP2A6-Genotyps auf die Erwartung einer Entzugsreduktion/ überwältigender Drang zu rauchen (Faktor 2 des QSU-Fragebogens)**

In der Kovarianzanalyse für Faktor 2 mit FTND als Kovariante war die Interaktion zwischen Zeit und Gruppe nicht signifikant ( $F(2;20)=2,99; p<,07; \eta_p^2=0,23$ ). Es zeigte sich jedoch eine Heterogenität der Varianz (Levene's Test zu Studienbeginn,  $F=11,82; p<0,01$ ) und eine mögliche Heterogenität der Regression (die Interaktion von Zeit – Gruppe – FTND zeigte eine Tendenz zur Signifikanz,  $F=2,91; p=0,08$ ). Diese Daten erfüllten daher die statistischen Voraussetzungen für eine Kovarianzanalyse nicht vollständig, weshalb die Ergebnisse dieser Analyse unter Umständen nicht eindeutig interpretiert werden können.

Um eine Interpretation der Interaktion von Zeit und Gruppe für Faktor 2 zu erleichtern und die vorangegangenen ANCOVA-Ergebnisse zu ergänzen, wurde eine zusätzliche univariate Varianzanalyse mit Messwiederholungen durchgeführt, die die Voraussetzung für Sphärität und Varianzhomogenität erfüllte. Die Interaktion von Zeit und Gruppe war auch hier nicht signifikant ( $F(2;24)=0,88; p=0,43; \eta_p^2=0,07$ ). Es zeigten sich im zeitlichen Verlauf der Studie für beide Gruppen signifikante Änderungen des Faktor 2 ( $F(2;24)=11,45; p<0,01; \eta_p^2=0,49$ ). Die intraindividuellen Vergleiche waren für

beide Gruppen signifikant, es zeigte sich eine Abnahme von Faktor 2 zwischen Studienbeginn und 30 Minuten ( $p < 0,002$ ), sowie eine signifikante Zunahme zwischen 30 Minuten und Studienende ( $p < 0,002$ ) (vgl. Abbildung 9 und Tabelle 12)



**Abbildung 9: QSU-Werte, Faktor 2 (Erwartung einer Entzugsreduktion/ Drang zu rauchen) in Abhängigkeit der Zeit für CYP2A6\*1/\*1 und \*2/\*1 (Messzeitpunkte: 0 min. = Studienbeginn, 30 min. = Nikotintablette resorbiert, 120 min. = Studienende nach zwei Stunden)**

Variablen	Messzeitpunkte		
	Studienbeginn	post Nikotinresorption (nach etwa 30 min.)	Studienende (120 min.)
QSU-Faktor 2 CYP2A6*1/*1	MW (SD) 2,4 (1,2)	MW (SD) 1,5 (0,5)	MW (SD) 2,4 (1,4)
QSU-Faktor 2 CYP2A6*1/*2	MW (SD) 3,6 (1,7)	MW (SD) 1,9 (0,7)	MW (SD) 3,4 (1,2)

**Tabelle 12: Faktor 2-Werte zu den drei Messzeitpunkten (Studienbeginn, post Nikotinresorption, Studienende) für CYP2A6\*1/\*1 und \*1/\*2 – Deskriptive Statistik**

### **3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse**

Heterozygote CYP2A6\*2-Merkmalsträger wiesen in den Varianzanalysen im Vergleich zu homozygoten Trägern des CYP2A6\*1-Allels bei sonst gleichen Ausgangsbedingungen (Alter, Geschlecht, Rauchintensität) keine signifikante Reduktion des Nikotinabbaus über den zweistündigen Zeitraum der Studie auf ( $p=0,76$ ). Auch die Nikotin-Konzentrations-Zeit-Kurven und die gemessene maximale Nikotinkonzentration ( $C_{max}$ ) zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen ( $p=0,48$  bzw.  $p=0,95$ ). Die Zeit zwischen Nikotinapplikation und Erreichen der maximalen Serumkonzentration ( $t_{max}$ ) war bei den CYP2A6\*2-Allelträgern signifikant länger als in der Wildtypgruppe (70 versus 45 Minuten,  $p=0,03$ ).

Erwartungsgemäß stieg die Nikotinkonzentration in beiden Gruppen nach Nikotingabe signifikant an und fiel zum Ende des Experimentes wieder etwas ab.

Während des zweistündigen Experimentes waren keine signifikanten Unterschiede im subjektiven Rauchverlangen (Craving) zwischen den CYP2A6\*1/\*1- und \*1/\*2-Genotypgruppen erkennbar.

Die Effekte der Nikotinzufuhr zeigten sich in beiden Gruppen in einer signifikanten Reduktion sowohl des Wunsches zu rauchen (Faktor 1 des QSU) als auch in der Erwartung einer Entzugsreduktion (Faktor 2) zwischen Studienbeginn und Nikotineinnahme. Zu Studienende war das subjektive Rauchverlangen trotz noch deutlich erhöhter Nikotinwerte wieder auf Ausgangsniveau angestiegen.



## 4 Diskussion

### **4.1 Einfluss des CYP2A6\*2-Allels auf den Nikotinmetabolismus bei heterozygoten Merkmalsträgern**

In der vorliegenden Studie wurde die Nikotinkinetik zweier Studienpopulationen (homozygot für CYP2A6\*1 (Wildtyp) und heterozygot für CYP2A6\*2) an je sieben Versuchspersonen (alle europäischer Abstammung) untersucht. Im Verlauf der zweistündigen Studie zeigten sich keine signifikanten Gruppenunterschiede in der Nikotin- und Cotininserumkonzentration.

#### **4.1.1 Mögliche Interpretationen der vorliegenden Ergebnisse**

Eine mögliche Erklärung für diese fehlenden Unterschiede im Nikotinabbau wäre, dass andere CYP-Enzyme wie z.B. CYP2A13 oder 2B6 einen Teil des Nikotins abbauen und so die verminderte Aktivität des CYP2A6\*2-Enzyms kompensieren können. Beide Enzyme sind in der Lage, Nikotin als Substrat zu metabolisieren (Yamazaki et al. 1999; Bao et al. 2005). Doch erscheint diese Vermutung eher unwahrscheinlich, da die genannten Enzyme bei homozygoten CYP2A6\*2-Allelträgern die verminderte Aktivität in ähnlichem Maße ausgleichen müssten. Der Nikotin- bzw. Cumarinmetabolismus von Homozygoten ist jedoch sehr stark eingeschränkt oder nicht vorhanden (Oscarson et al. 1998; Benowitz et al. 2001) und lässt bei diesen Individuen keine wesentliche Kompensation durch andere CYP-Enzyme erkennen.

Aus dem gleichen Grund ist es unwahrscheinlich, dass das CYP2A6\*2-Enzym doch eine gewisse katalytische Aktivität besitzt, was von anderen Autoren nicht ausgeschlossen wurde (Inoue et al. 2000) und dies den Grund für die fehlenden Unterschiede im Nikotinabbau darstellen könnte. Yamano et al. (1990), die in der Literatur häufig dahingehend zitiert wurden, dass das CYP2A6\*2-Allel ein inaktives Enzym kodiert, wiesen die Inaktivität des CYP2A6\*2-Enzyms nicht in intakten menschlichen Leberzellen nach, dadurch können aufgrund dieser Studie keine eindeutigen Aussagen über die Enzymaktivität *in vivo* gemacht

werden. Die bekannten Studien an Homozygoten sprechen jedoch insgesamt für ein weitgehend inaktives CYP2A6\*2-Enzym (Benowitz et al. 1995; Hadidi et al. 1997; Oscarson et al. 1998).

Möglicherweise kompensiert das intakte CYP2A6\*1-Allel die verminderte Enzymaktivität zu einem großen Teil. Der in der vorliegenden Studie gefundene tendenziell verminderte Nikotinmetabolismus bei heterozygoten CYP2A6\*2-Allelträgern könnte für eine nicht 100-prozentige Kompensation sprechen. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang auch, dass die Provokation mit 4 mg Nikotin nicht ausreichend war, um die Kapazität auch bei eingeschränktem CYP2A6\*2-Enzym zu erschöpfen. Möglicherweise wären die minimalen Gruppenunterschiede nach höheren Nikotingaben oder mit einem anderen Studiendesign, bei dem die Probanden bis zur Nikotingabe z. B. am Nachmittag wie gewohnt weiterrauchen dürften, ausgeprägter.

Zahlreiche Mechanismen der Enzymregulation sind beschrieben, wie z. B. die Regulation der Enzymmenge (Enzyminduktion) in der Zelle durch eine vermehrte Genexpression über regulierbare Transkriptionsfaktoren oder über eine Regulation der katalytischen Aktivität der Enzyme selbst (Löffler 1999). Viele Gendefekte, die für Krankheiten verantwortlich sind, werden erst im homozygoten Zustand d. h. wenn beide Gene mutiert sind, klinisch manifest (Löffler et al. 2003). Dies wäre mit der vorliegenden Studie vereinbar, in der heterozygote CYP2A6\*2-Allelträger keinen signifikant eingeschränkten Nikotinmetabolismus aufweisen; Homozygote, die in anderen Studien untersucht wurden, zeigten hingegen kaum eine Enzymaktivität (Hadidi et al. 1997; Oscarson et al. 1998).

Bei dem sehr gut untersuchten polymorphen CYP2D6-Gen, das am Stoffwechsel zahlreicher Medikamente beteiligt ist, weisen Individuen mit mindestens einem voll funktionsfähigen Allel, unabhängig davon, ob das zweite defekt ist oder nicht, eine normale Enzymaktivität auf („extensive metabolizer“), Personen, die zwei defekte Allele (Null-Allele) besitzen haben einen deutlich reduzierten Stoffwechsel („poor metabolizer“) und Individuen mit einem teilweise funktionierenden und einem Null-Allel werden als „intermediate

metabolizer“ bezeichnet (Zanger et al. 2004). Die vorliegende Studie spricht für eine ähnliche Situation wie beim CYP2D6-Gen, da heterozygote CYP2A6\*2-Allelträger mit nur einem voll funktionsfähigen Wildtyp-Allel weitgehend die gleiche Stoffwechselkapazität aufwiesen wie homozygote Wildtypträger.

Die Dauer bis zur vollständigen Auflösung der Nikotintabletten (CYP2A6\*1/\*1: 30 Minuten und CYP2A6\*1/\*2: 26 Minuten) stimmt mit den Zeiten in der Literatur überein (Molander et al. 2001b).

#### **4.1.2 Nikotinmetabolismus bei heterozygoten CYP2A6\*2-**

##### **Allelträgern – Vergleich mit der vorhandenen Literatur**

Wenige Studien untersuchten bislang den Nikotinmetabolismus bei heterozygoten CYP2A6\*2-Allelträgern (Fernandez-Salguero et al. 1995; Oscarson et al. 1998; Inoue et al. 2000). Methodische Unterschiede wie z. B. ein *in vivo* oder *in vitro* Design oder unterschiedliche Phänotypisierungsmethoden und Messparameter machen es schwierig, diese Studien direkt zu vergleichen: Inoue et al. (2000) untersuchten *in vitro* den Cumarinmetabolismus und das  $V_{\max}$  zu  $K_m$ -Verhältnis der Nikotin-C-Oxidation und Cumarin-7-Hydroxylierung an zwei heterozygoten CYP2A6\*2-Allelträgern, wohingegen Oscarson et al. (1998) *in vivo* an drei Heterozygoten den Cumarinindex bestimmten. Diesen Studien gemeinsam ist eine extrem kleine Fallzahl, wodurch die Aussagekraft deutlich gemindert wird.

Die vorliegenden Ergebnisse stehen im Widerspruch zur Studie von Fernandez-Salguero et al. (1995), dort wurde ein auf 50 bis 60 Prozent reduzierter Cumarinmetabolismus bei heterozygoten CYP2A6\*2-Allelträgern beschrieben. Sie können eher mit den Resultaten von Oscarson et al. (1998) verglichen werden, wo ebenfalls eine große interindividuelle Variabilität in beiden Gruppen gefunden wurde und die Enzymaktivität bei heterozygoten CYP2A6\*2-Allelträgern eher gering vermindert war.

Insgesamt deutet die aktuelle Studie unter den gegebenen Bedingungen auf einen geringen Einfluss des CYP2A6\*2-Allels auf den individuellen Nikotinmetabolismus bei heterozygoten Merkmalsträgern hin.

## **4.2 Diskussion der Methodik**

Mit sieben heterozygoten Personen ist die Fallzahl der vorliegenden Studie zwar deutlich größer als die der anderen Publikationen zu diesem Thema (Oscarson et al. 1998; Inoue et al. 2000), dennoch resultiert daraus eine geringe statistische Power, was die Aussagekraft mindert. Die vorhandenen statistischen Methoden sind bei dieser kleinen Fallzahl nur mit großer Vorsicht einzusetzen, da Einzelpersonen einen sehr starken Einfluss auf die Gesamtergebnisse hatten (z. B. Proband Nr. 14 mit überaus hoher Cotininkonzentration, vgl. Tabelle 7, Kapitel 3.3). Deutlich höhere Fallzahlen werden benötigt, um verlässliche Aussagen zum Nikotinmetabolismus bei heterozygoten CYP2A6\*2-Trägern machen zu können.

In der vorliegenden Studie wurden die Raucher angewiesen, vor dem Experiment eine achtstündige Nikotinkarenz einzuhalten. Die Abstinenz wurde durch die CO-Messung der Ausatemluft vor der Studie überprüft. Molander et al. (2000) hatten in ihrer Studie als Grenzwert 11 ppm für die Abstinenz über Nacht festgelegt, die Probanden waren dort allerdings mehr als zwölf Stunden abstinent. In der vorliegenden Studie lag die Kohlenmonoxidkonzentration nach einer achtstündigen Nikotinkarenz im Durchschnitt bei 15 ppm was nicht ausschließt, dass die Abstinenz nicht korrekt eingehalten worden war. Drei Probanden wiesen sogar Werte über 20 ppm auf, davon hatte eine Probandin morgens eine Zigarette geraucht. Die hohen Konzentrationen der beiden anderen lassen sich unter Umständen durch ihren sehr hohen Zigarettenkonsum erklären (vgl. Tabelle 5, Kapitel 3.2). Vermutungen wonach Kohlenmonoxid den Nikotin- und Cotininmetabolismus hemmt, konnten in einer Studie nicht bestätigt werden (Benowitz et al. 2000), sodass die hohen CO-Konzentrationen in der vorliegenden Studie vermutlich keine Auswirkung auf die Ergebnisse hatten.

Bei allen Teilnehmern waren zu Studienbeginn noch geringe Nikotinkonzentrationen im Serum nachweisbar. Nach Nikotingabe konnte

jedoch eine Konzentrationszunahme um mindestens das Doppelte des Ausgangswertes beobachtet werden.

Ein Problem für die Beurteilung des Hauptmetaboliten Cotinin stellten die hohen Cotininausgangskonzentrationen dar. Da Cotinin mit 13 bis 30 Stunden (Benowitz et al. 1993; Zevin et al. 1997) eine wesentlich längere Halbwertszeit als Nikotin aufweist, wirkte sich die achtstündige Nikotinkarenz kaum auf die Cotininserumwerte zu Beginn des Experiments aus. Gemessen an der Basiscotininkonzentration zeigte sich im Laufe des Experimentes nur ein Anstieg von durchschnittlich 18 Prozent, dadurch waren die Cotininwerte in dieser Studie wenig aussagekräftig. Aus diesem Grund wurde auf die Verhältnissbildung von AUC-Cotinin zu AUC-Nikotin verzichtet, welche ansonsten einen guten Parameter des Nikotinmetabolismus darstellen würde (Nakajima et al. 2000). Eine Abstinenz von vier bis fünf Halbwertszeiten wäre notwendig, um das Cotinin weitgehend aus dem Körper zu eliminieren (Aktories et al. 2005); dann könnte die Änderung der Cotininwerte durch Nikotingabe zuverlässiger beurteilt werden.

Der Untersuchungszeitraum der vorliegenden Studie war mit zwei Stunden eher kurz bemessen. Denkbar wäre, dass sich die tendenziellen Unterschiede im Nikotinabbau zwischen den beiden Gruppen über einen längeren Messzeitraum vergrößern könnten, zumal nach zwei Stunden erst ungefähr die Hälfte des zugeführten Nikotins abgebaut war. Andererseits wurde der Zweistundenwert von AUC-Cotinin zu AUC-Nikotin in einer Studie als guter Parameter für das Ausmaß des Nikotinmetabolismus genannt, der Vierstundenwert brachte hingegen keine Vorteile (Nakajima et al. 2000). In der genannten Studie waren die Probanden jedoch zehn Tage vorher abstinent, wodurch vermutlich zu Studienbeginn weder Nikotin noch Cotinin im Serum nachweisbar war.

Eine Probandin der CYP2A6\*2-Gruppe nahm das Antidepressivum Venlafaxin (Selektiver Serotonin Noradrenalin Wiederaufnahme Hemmer [SSNRI]) und Carbamazepin ein. Laut Studienprotokoll hätte sie wegen des Antidepressivums ausgeschlossen werden müssen. Da es in der Literatur jedoch keine Hinweise

auf eine relevante Inhibition oder Induktion von Trevilor auf CYP2A6 gibt (Spina et al. 2003), wurde sie nicht ausgeschlossen. Eine aktuelle Major Depression lag nicht vor.

Carbamazepin hingegen induziert vermutlich das CYP2A6-Gen, was in einem gesteigerten Metabolismus resultiert (Sotaniemi et al. 1995). Betrachtet man die Nikotinserkonzentrationen dieser Probandin (vgl. Abbildung 5, Kapitel 3.4) so fällt auf, dass nach zwei Stunden fast wieder Ausgangswerte erreicht waren, wohingegen die durchschnittliche Nikotinkonzentration von Gruppe 2 am Ende des Experiments noch deutlich über dem Ausgangsniveau lag. Dies deutet auf einen schnelleren Nikotinmetabolismus dieser Probandin hin; Carbamazepin könnte hierfür die Ursache sein. Schließt man diese Probandin von den Berechnungen aus, wird die Tendenz der CYP2A6\*2-Gruppe zu einem geringfügig langsameren Nikotinstoffwechsel etwas deutlicher, an der fehlenden Signifikanz ändert sich allerdings nichts.

Die signifikant längeren  $t_{\max}$ -Zeiten in der CYP2A6\*1/\*2-Gruppe könnten möglicherweise dadurch bedingt sein, dass der Nikotinabbau, bedingt durch den CYP2A6\*2-Polymorphismus, in dieser Gruppe erst etwas später in nennenswertem Umfang einsetzte und dadurch der Nikotinanstieg länger anhielt.

Des Weiteren wäre es denkbar, dass der pH-Wert im Mund einen Einfluss auf die  $t_{\max}$ -Zeiten hatte. In einer Studie von Molander et al. (2001b) war die Dauer bei saurem oralen pH-Wert im Vergleich zu alkalischem pH bis zum Erreichen der maximalen Nikotinkonzentration signifikant länger. In der vorliegenden Studie durften die Probanden nach dem Auflösen der Nikotintabletten ein Frühstück zu sich nehmen. Angeboten wurde Orangensaft, Wasser, Kaffee, Brötchen, Butter, Marmelade und Honig und süße Stückchen. Die meisten Probanden tranken Kaffee und Wasser. Einige, aber nicht alle nahmen Orangensaft zu sich. Leider wurde versäumt, zu dokumentieren, welche Versuchsperson was gefrühstückt hatte, dadurch kann ein stärkerer Einfluss auf eine der beiden Gruppen nicht ganz ausgeschlossen werden. Molander et al. (2001b) gaben den Probanden zwei Minuten vor und bis 30 Minuten nach

Nikotin-Tablettenadministration frisch gepressten Orangensaft, wodurch der Mund-pH von durchschnittlich 6,6 auf 5,9 gesenkt wurde. Um den Einfluss des oralen pH auf die Nikotinresorption zu minimieren, müsste man in folgenden Studien darauf achten, dass keine Getränke und Speisen angeboten werden, die einen starken Einfluss auf den oralen pH-Wert haben wie z. B. Orangensaft. Es wäre daher besser, bis zu einer halben Stunde nach dem Auflösen der Nikotintabletten weder Getränke noch Nahrung zu sich zu nehmen.

Die Interpretation der Gruppenunterschiede durch das quasi-experimentelle Design der vorliegenden Studie könnte möglicherweise limitierter sein, als wenn die Gruppen nach dem Zufallsprinzip ausgewählt worden wären. Angesichts der niedrigen Prävalenz des CYP2A6\*2-Polymorphismus in der deutschen Bevölkerung war eine solche Datenerhebung im Rahmen dieser Studie jedoch nicht machbar. Andererseits ermöglichte das verwendete „matched-pair“ Design einen Ausschluss möglicher Einflüsse durch Alter, Geschlecht und Stärke der Tabakabhängigkeit auf den Nikotinabbau. Studien vermuteten, dass mit zunehmendem Alter der Nikotinmetabolismus abnimmt (Molander et al. 2001a) und dass Frauen einen höheren Nikotinmetabolismus als Männer aufweisen (Iscan et al. 1994; Zeman et al. 2002). Vermutlich hat auch das Rauchen selbst Auswirkungen auf die Nikotin-Clearance, jedoch wurden unterschiedliche Resultate diskutiert: einerseits eine Reduktion der Nikotin-Clearance durch Rauchen, woraus eine längere Halbwertszeit resultiert (Benowitz et al. 1993; Benowitz et al. 2000), andererseits eine reduzierte Halbwertszeit des Nikotins bei Rauchern (Kyerematen et al. 1990). Durch das „matched-pair“ Design der vorliegenden Studie hatten beide Gruppen gleiche Ausgangswerte für die genannten Parameter, sodass dadurch kein größerer Einfluss zu erwarten war.

In der aktuellen Studie wurde als Probensubstanz Nikotin in Form von Sublingualtabletten verabreicht. Ein Vorteil davon ist, dass die Nikotinaufnahme geringere interindividuelle Schwankungen zeigt als beim Zigarettenrauchen. Des Weiteren ist Nikotin, im Gegensatz zu dem in der Literatur weit verbreiteten Cumarin (Hadidi et al. 1997; Oscarson et al. 1998; Inoue et al. 2000) als

Phänotypisierungssubstanz realistischer für die Beurteilung der CYP2A6\*2-Funktion im Nikotinmetabolismus. Zwar ist der Cumarinmetabolismus gut untersucht und weist eine hohe Korrelation zum Nikotinstoffwechsel auf (Nakajima et al. 1996b), dennoch wäre es denkbar, dass der Cumarinmetabolismus durch die Mutation im CYP2A6-Gen, z. B. durch ein geändertes Bindungsverhalten von Cumarin am Enzym, nicht mehr in gleichem Maße mit dem Nikotinstoffwechsel korreliert.

Schlussfolgernd kann man sagen, dass wesentlich größere Phänotypisierungsstudien mit Nikotin als Substrat benötigt werden, wobei die Probanden möglichst mehrere Tage vorher abstinent sein sollten, um nicht nur Aussagen zum Einfluss des CYP2A6\*2-Polymorphismus auf die Nikotinkonzentration machen zu können, sondern um zusätzlich das Nikotinhauptabbauprodukt Cotinin beurteilen zu können. Für nachfolgende Studien sollten zudem höhere Nikotinkonzentrationen verwendet werden, um sicher zu sein, dass die Kapazitätsgrenzen der Enzymfunktion bei heterozygoten CYP2A6\*2-Allelträgern erreicht werden. Um Veränderungen des oralen pH-Wertes zu vermeiden, wäre es sinnvoll bis 30 Minuten nach Auflösung der Nikotintabletten keine Nahrung und Getränke zu sich zu nehmen, vor allem aber keine säurehaltigen Getränke, wie z. B. Orangensaft.

Damit konnte die vorliegende Studie das bisherige Wissen über den möglichen Einfluss des CYP2A6\*2-Allels bei heterozygoten Merkmalsträgern erweitern und darüber hinaus nützliche weiterführende Informationen für zukünftige Studien über den Nikotinmetabolismus liefern.



### **4.3 CYP2A6\*2 und Auswirkungen auf das Rauchverhalten**

Die vorliegende Studie zeigt, dass bei heterozygoten CYP2A6\*2-Allelträgern nicht ohne weiteres von einem klinisch relevanten eingeschränkten Nikotinmetabolismus ausgegangen werden kann. Dies könnte unter Umständen Auswirkungen auf einige Untersuchungen über Zusammenhänge zwischen Rauchverhalten und CYP2A6-Polymorphismen haben. In mehreren Studien wurden Individuen zu einer „slow-inactivator-group“ zusammengefasst, die mindestens ein polymorphes Allel aufwiesen (z. B. CYP2A6\*2, \*3, \*4, \*9 oder \*12); diese Allele waren in vorausgegangenen Studien mit einem verminderten Nikotinmetabolismus in Verbindung gebracht worden (Rao et al. 2000; Lorient et al. 2001; Schoedel et al. 2004). Wenn aber bei heterozygoten CYP2A6\*2-Allelträgern der Nikotinmetabolismus möglicherweise nicht signifikant eingeschränkt ist, wie die vorliegende Studie andeutet, so gelten diese unter Umständen nicht als „slow metabolizer“, was eventuell einen Einfluss auf die Interpretation der oben genannten Studien haben könnte. Jedoch ist die Aussagekraft der vorliegenden Studie aufgrund der kleinen Fallzahlen eingeschränkt und muss mit Vorsicht interpretiert werden. Es werden größere Studien benötigt, um eine sichere Aussage zum Nikotinmetabolismus von heterozygoten CYP2A6\*2-Allelträgern machen zu können.

In der Literatur wird widersprüchlich diskutiert, ob bestimmte Polymorphismen des CYP2A6-Gens einen Einfluss auf verschiedene Aspekte des Rauchverhaltens haben (Sabol et al. 1999; Rao et al. 2000; Tiihonen et al. 2000; Schulz et al. 2001; Schoedel et al. 2004). Eine Metaanalyse, die elf Studien einschloss, zeigte keine empirische Evidenz über einen Zusammenhang polymorpher CYP2A6-Allele mit dem Rauchstatus (N = 4.091) oder dem Zigarettenkonsum (N = 1.537) (Carter et al. 2004).

Eine Vorgängerstudie untersuchte den Einfluss des CYP2A6\*2-Polymorphismus auf das Rauchverhalten (Esser 2004). Es konnten keine Unterschiede in der Stärke der Nikotinabhängigkeit und im Zigarettenkonsum zwischen CYP2A6\*1- und \*2-Allelträgern festgestellt werden. Die vorliegende Studie untersuchte Individuen aus eben dieser Population. Hierbei wurde kein

signifikant reduzierter Nikotinmetabolismus gefunden, dies unterstützt die Annahme, dass das CYP2A6\*2-Allel bei Heterozygoten keinen relevanten Einfluss auf das Rauchverhalten hat.

#### **4.4 Klinische Bedeutung des CYP2A6\*2-Polymorphismus und des CYP2A6-Gens**

Rauchverhalten und Tabakabhängigkeit resultieren aus einem komplexen Zusammenspiel von multiplen genetischen und nicht genetischen Faktoren. So muss insgesamt gesehen gefragt werden, wie groß der Einfluss einzelner Kandidatengene, z. B. der des CYP2A6-Gens, auf das Rauchverhalten sein kann. Es erscheint eher unrealistisch zu erwarten, dass ein einzelnes, für die Tabakabhängigkeit verantwortliches Gen gefunden wird; vermutlich beeinflussen zahlreiche Gene das Rauchverhalten zu jeweils kleinen Teilen, sodass das Gewicht einzelner Gene eher gering sein dürfte. Nicht nur bei der CYP2A6-Forschung wurden widersprüchliche Ergebnisse über den Einfluss auf das Rauchverhalten gefunden, auch für Untersuchungen anderer Kandidatengene wie z. B. den Dopaminrezeptoren (DRD2, DRD4, DRD5) und Dopamintransporter DAT gibt es ähnliche Resultate (Comings et al. 1996; Shields et al. 1998; Singleton et al. 1998; Lerman et al. 1999; Batra 2000; Batra et al. 2000; Sullivan et al. 2001; Vandenbergh et al. 2002; Luciano et al. 2004). Um dieses Problem anzugehen, werden sehr große genetische Studien benötigt, die den polygenetischen und multifaktoriellen Charakter des Rauchens berücksichtigen (Lerman et al. 2003).

Das Rauchen ist nach wie vor ein großes gesellschaftliches Problem, dem von verschiedenen Richtungen her begegnet werden muss – sowohl von sozialer und psychologischer als auch von genetischer Seite. Es ist kaum bestritten, dass eine erhebliche genetische Komponente das Rauchen beeinflusst. Die vorliegenden Ergebnisse lassen jedoch vermuten, dass der Einfluss des CYP2A6\*2-Polymorphismus auf den Nikotinmetabolismus und auf das Rauchverhalten in der kaukasischen Bevölkerung eher von untergeordneter

Bedeutung ist. In dieser Bevölkerung ist die Prävalenz des CYP2A6\*2-Allels mit ein bis drei Prozent wesentlich geringer als ursprünglich angenommen und die Zahl der Homozygoten, bei denen die Mutation einen starken Einfluss auf den Nikotinmetabolismus zu haben scheint, liegt weit unter einem Prozent. Im Rahmen einer Studie an einer deutschen Population zur Bestimmung der Allelfrequenzen von CYP2A6\*2 und \*3 vermuteten auch andere Autoren aufgrund der sehr niedrigen Prävalenzen eine geringe klinische Relevanz des CYP2A6\*2-Polymorphismus in der deutschen Bevölkerung (Bourian et al. 2000). Für einzelne homozygote Individuen könnte der CYP2A6\*2-Polymorphismus jedoch von klinischer Bedeutung sein: sowohl im Hinblick auf das Rauchverhalten, da der Einfluss auf den Nikotinmetabolismus in diesem Fall groß ist, als auch in der verminderten Aktivierung von Prokarzinogenen und der Biotransformation von Medikamenten wie z. B. dem Chemotherapeutikum Tegafur (Pyrimidinanalogum). Möglicherweise hängt hierbei die Konzentration des aktiven Metaboliten 5-Fluorouracil von der Aktivität des CYP2A6-Enzyms ab (Daigo et al. 2002). In der asiatischen Bevölkerung, wo das CYP2A6\*4-Allel, welches in einer kompletten Gendeletion resultiert, in bis zu 20 Prozent vorkommt und auch die Prävalenzen der Homozygoten weitaus größer sind, scheint das CYP2A6-Gen möglicherweise von größerer Bedeutung für die Tabakabhängigkeit und die Karzinomentstehung zu sein.

#### **4.5 Craving und CYP2A6\*2**

In einer Nebenfragestellung dieser Nikotinkinetikstudie wurde untersucht, ob sich das subjektive Rauchverlangen (Craving), gemessen mittels QSU („Questionnaire on Smoking Urges“), in den beiden Gruppen (CYP2A6\*1/\*1 und \*1/\*2) unterscheidet.

Erwartungsgemäß zeigte sich nach Nikotingabe, der eine achtstündige Nikotinkarenz vorausging, eine signifikante Reduktion des Cravings (Faktor 1 und 2 des QSU), jedoch konnten keine signifikanten Gruppenunterschiede im Verlauf des Experimentes festgestellt werden. Die ursprüngliche Erwartung eines verminderten Nikotinmetabolismus bei Individuen mit CYP2A6\*1/\*2-Genotyp konnte nicht bestätigt werden und stellt vermutlich die Ursache für die fehlenden Gruppenunterschiede dar.

Die in der vorliegenden Studie beobachtete Reduktion des Cravings nach Nikotingabe wurde auch von anderen Autoren berichtet: Molander et al. (2000) konnten eine 50-prozentige Reduktion des Cravings, gemessen mittels einer Analogskala („visual analog scale“ [VAS]), nach Gabe einer Sublingualtablette nachweisen. In einer anderen Studie fanden sich bei nikotindeprivierten Probanden deutlich höhere QSU-Werte als bei nicht deprivierten (Willner et al. 1995).

Heterozygote CYP2A6\*2-Allelträger hatten durchweg etwas höhere Werte für Faktor 1 und 2 als die Wildtypträger; das subjektive Rauchverlangen war also größer, was durch die etwas höheren (allerdings nicht signifikant erhöhten) FTND-Werte dieser Gruppe erklärt werden könnte.

Es zeigte sich eine signifikante Korrelation der FTND-Werte aller Probanden mit Faktor 2 (Verlangen zu rauchen/ Entzugsreduktion), die auch von anderen Autoren gefunden wurde (Müller et al. 2001). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass Personen, die gemessen an den FTND-Werten stark abhängig sind, mehr Entzugssymptome entwickeln und daher eine höhere Erwartung einer Entzugsreduktion durch das Rauchen bzw. die Nikotinaufnahme entwickeln als weniger stark abhängige Raucher.

Interessant ist die Beobachtung, dass das subjektive Rauchverlangen (Faktor 1 und 2) beider Gruppen gegen Ende des Experimentes auf Ausgangsniveau anstieg, obwohl die Nikotinsenkonzentration noch deutlich über den Ausgangswerten lag. Die Nikotindosis reduzierte offensichtlich das akute Craving, jedoch spielten vermutlich neben dem Verlangen nach Nikotin auch andere Faktoren wie z. B. die Gewohnheit, das Verlangen nach dem Ritual des Rauchens oder das Wissen bzw. die Erwartung auf die baldige Möglichkeit zu rauchen und möglicherweise die zerebrale Halbwertszeit von Nikotin eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Craving.

Unter Umständen wäre eine kurze zerebrale HWZ von Nikotin eine Erklärung für das Craving der Probanden trotz hoher Serumnikotinspiegel. Nikotin bindet im gesamten ZNS an nikotinerge Acetylcholinrezeptoren und entfaltet so u. a. über eine Dopaminausschüttung seine Wirkung. PET-Studien an Affen haben gezeigt, dass Nikotin im ZNS relativ schnell ausgewaschen wird (in ca. 30 Minuten Reduktion um 50% (Sihver et al. 1999)). Jedoch wurde in einer neueren Studie eine deutlich längere Aktivität der nikotinergen ACh-Rezeptoren mittels PET beobachtet, die möglicherweise durch Nikotinmetaboliten zustande kommt (Valette et al. 2003). Allerdings konnten die komplexen Interaktionen des Nikotins und seiner Metaboliten an zentralen ACh-Rezeptoren beim Menschen noch nicht abschließend geklärt werden.

Westman et al. (1996) stellten fest, dass entnikotinierte Zigaretten eine ähnliche Wirkung (Befriedigung durch Rauchen, schnelle Craving-Reduktion oder beruhigende Effekte) wie normale Zigaretten zeigten. Es wurde vermutet, dass bestimmte sensorische und motorische Effekte des Rauchens die Verstärkerwirkung des Nikotins steigern (Westman et al. 1996). Jarvis und Kollegen fanden in einer Studie, dass das Rauchverlangen von über Nacht abstinenten Rauchern, die morgens entweder eine NaCl-Infusion oder eine langsame Nikotininfusion bekommen hatten gleich groß war (persönliche Kommunikation, Oktober 2004). Nach erlaubtem Rauchen zeigten sich gleich hohe Nikotinkonzentrationen im Blut, unabhängig davon, ob zuvor Nikotin oder NaCl zugeführt worden war. Dies weist darauf hin, dass Raucher die Menge des aufgenommenen Nikotins beim Zigarettenrauchen sehr gut kontrollieren.

Darüber hinaus unterstützt diese Untersuchung die Vermutungen der vorliegenden Studie, wonach das Rauchverlangen neben dem Verlangen nach Nikotin auch andere Ursachen haben muss. Dies könnte auch eine Erklärung dafür sein, dass Nikotinersatzprodukte zwar die Erfolge bei der Raucherentwöhnung erhöhen, jedoch sehr viele Raucher trotz Nikotinersatztherapie wieder rückfällig werden. Auch die Darreichungsform von Nikotin hat einen Einfluss auf die Befriedigung. Die oben beschriebene langsame i. v.-Gabe beeinflusste das Rauchverlangen praktisch nicht. Ein sehr schnelles Anfluten von Nikotin im Gehirn wie z. B. beim Zigarettenrauchen ruft eine positive Verstärkerwirkung durch die Aktivierung des dopaminergen Belohnungssystems hervor, welche mitverantwortlich für das hohe Suchtpotenzial ist (Benowitz 1990; Benowitz 1996).

Zusammenfassend kann aus der vorliegenden Studie gefolgert werden, dass das CYP2A6\*2-Allel vermutlich keinen Einfluss auf die Stärke des subjektiven Rauchverlangens hat. Des Weiteren spielen bei der Entwicklung von Craving neben dem Verlangen nach Nikotin andere Faktoren ebenfalls eine wichtige Rolle.

## 5 Zusammenfassung

Ausgehend von einem Mangel an Studien zum Nikotinmetabolismus bei heterozygoten CYP2A6\*2-Allelträgern (CYP2A6\*1/\*2) und den widersprüchlichen Ergebnissen in der Forschung über den Zusammenhang zwischen Rauchverhalten und bestimmten CYP2A6-Genotypen, war das Ziel der vorliegende Studie zu klären, ob heterozygote CYP2A6\*2-Allelträger im Vergleich zu Wildtypträgern (CYP2A6\*1/\*1) einen verminderten Nikotinmetabolismus aufweisen. An je sieben kaukasischen Versuchspersonen wurde der Nikotinmetabolismus nach Gabe zweier Nikotinsublingualtabletten (je 2 mg) untersucht.

In einer Nebenfragestellung wurde geprüft, ob das mittels QSU gemessene subjektive Rauchverlangen über den Zeitraum der zweistündigen Nikotinkinetikstudie bei heterozygoten CYP2A6\*2-Merkmalsträgern geringer ausgeprägt ist oder sich langsamer entwickelt als bei Individuen mit Wildtyp (CYP2A6\*1/\*1).

Heterozygote CYP2A6\*2-Merkmalsträger wiesen im Vergleich zu homozygoten Trägern des CYP2A6\*1-Allels bei sonst gleichen Ausgangsbedingungen (Alter, Geschlecht, Zigarettenzahl) keine signifikante Reduktion des Nikotinmetabolismus auf ( $p=0,76$ ). Erwartungsgemäß stieg die Nikotinkonzentration in beiden Gruppen nach Nikotingabe signifikant an und fiel zum Ende des Experimentes wieder etwas ab. Individuen mit CYP2A6\*1/\*2-Genotyp zeigten signifikant längere  $t_{max}$ -Zeiten als die Wildtypträger.

Am ehesten ist der nicht signifikant verminderte Nikotinmetabolismus bei heterozygoten CYP2A6\*2-Allelträgern auf eine Kompensation des defekten Allels durch das Wildtypallel z. B. über Mechanismen der Genexpressionsregulation zu erklären. Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen diejenigen der Vorgängerstudie, bei der keine Unterschiede im Rauchverhalten zwischen den beiden Gruppen gefunden worden waren. Möglicherweise wird die Bedeutung des CYP2A6\*2-Polymorphismus in der kaukasischen Bevölkerung überschätzt,

da der Einfluss eines einzelnen CYP2A6\*2-Allels auf den Nikotinmetabolismus nach der vorliegenden Studie sehr gering zu sein scheint und die Prävalenz der Homozygoten, bei denen eine klinische Relevanz eher denkbar wäre, unter einem Prozent liegt.

Mit sieben Probanden je Gruppe war die Fallzahl dieser Studie sehr klein, was in einer geringen statistischen Power und verminderten Aussagekraft resultiert. Methodisch gute Studien mit großen Fallzahlen sind notwendig, um die Bedeutung des CYP2A6\*2-Allels im Nikotinmetabolismus bei heterozygoten Merkmalsträgern sicher beurteilen zu können. Hohe Basiscotininwerte erschwerten die Cotininauswertung der vorliegenden Studie, so dass für nachfolgende Studien eine längere Abstinenzzeit vor Studienbeginn empfohlen wird. Möglicherweise war die gegebene Menge an Nikotin zu gering, um die Kapazitätsgrenzen des CYP2A6\*2-Enzyms zu erreichen, deshalb sollte auf höhere Nikotingaben geachtet werden. Um den Einfluss eines sauren oder alkalischen Mund-pH-Wertes auf die Nikotinresorption zu minimieren, sollten bis 30 Minuten nach Auflösung der Nikotintabletten keine Speisen und Getränke zu sich genommen werden.

Über den Verlauf der Studie konnten keine signifikanten Gruppenunterschiede im subjektiven Rauchverlangen nachgewiesen werden. Jedoch reduzierte sich das Craving (Faktor 1 und 2 des QSU) nach Nikotingabe signifikant und erreichte am Ende der zweistündigen Untersuchung fast wieder Ausgangsniveau.

Die fehlenden Gruppenunterschiede im subjektiven Rauchverlangen sind vermutlich auf die vergleichbaren Nikotinserumkonzentrationen beider Gruppen zurückzuführen. Das starke Craving aller Versuchspersonen am Ende des Experiments bei noch hohen Nikotinspiegeln lässt neben dem Verlangen nach Nikotin auf zusätzliche Faktoren bei der Entwicklung des Rauchverlangens wie z. B. das Verlangen nach dem Ritual des Rauchens oder die Erwartung auf die baldige Möglichkeit zu rauchen schließen.



## 6 Anhang

### 6.1 Fagerström Test für Nikotinabhängigkeit (FTND)

1. Wann nach dem Aufwachen rauchen Sie Ihre erste Zigarette?

Innerhalb von 5 Minuten	3 Punkte
Innerhalb von 6-30 Minuten	2 Punkte
Innerhalb von 31-60 Minuten	1 Punkt
Nach 60 Minuten	0 Punkte
2. Finden Sie es schwierig, an Orten, wo das Rauchen verboten ist (z. B. Kino, Bücherei usw.), das Rauchen sein zu lassen?

Ja	1 Punkt
Nein	0 Punkte
3. Auf welche Zigarette würden Sie nicht verzichten wollen?

Die Erste am Morgen	1 Punkt
Andere	0 Punkte
4. Wie viele Zigaretten rauchen Sie im Allgemeinen pro Tag?

Bis 10	0 Punkte
11-20	1 Punkt
21-30	2 Punkte
Mehr als 30	3 Punkte
5. Rauchen Sie am Morgen im Allgemeinen mehr als am Rest des Tages?

Ja	1 Punkt
Nein	0 Punkte
6. Kommt es vor, dass Sie rauchen, wenn Sie krank sind und tagsüber im Bett bleiben müssen?

Ja	1 Punkt
Nein	0 Punkte

---

Summe: Punkte

Fragebogen 1: Deutsche Übersetzung des „Fagerström Test for Nicotine Dependence“ (FTND) (Heatherton et al. 1991)

## 6.2 Deutsche Fassung des „Questionnaire on Smoking Urges“ (QSU-G)

Bitte kennzeichnen Sie die für Sie zutreffende Einschätzung mit einem Kreis:  
stimmt überhaupt nicht 1—2—3—4—5—6—7 stimmt völlig

1. Rauchen würde mir jetzt dazu verhelfen, mich sehr gut 1 2 3 4 5 6 7  
zu fühlen.
2. Ich wäre weniger reizbar, wenn ich jetzt rauchen könnte. 1 2 3 4 5 6 7
3. Nichts wäre besser, als jetzt eine Zigarette zu rauchen. 1 2 3 4 5 6 7
4. Mir fehlt das Rauchen jetzt gerade *nicht*. 1 2 3 4 5 6 7
5. Ich werde rauchen, sobald ich wieder die Möglichkeit 1 2 3 4 5 6 7  
dazu bekomme.
6. Ich möchte jetzt *nicht* rauchen. 1 2 3 4 5 6 7
7. Rauchen würde meine schlechte Stimmung deutlich 1 2 3 4 5 6 7  
verbessern.
8. Rauchen würde mir jetzt *nicht* helfen, mich zu beruhigen. 1 2 3 4 5 6 7
9. Wenn ich jetzt eine Zigarette angeboten bekäme, würde 1 2 3 4 5 6 7  
ich sie sofort rauchen.
10. Ich könnte ab sofort für eine lange Zeit auf das Rauchen 1 2 3 4 5 6 7  
verzichten.
11. Jetzt eine Zigarette zu rauchen, wäre *nicht* angenehm. 1 2 3 4 5 6 7
12. Wenn ich jetzt im Moment rauchen würde, wäre ich 1 2 3 4 5 6 7  
weniger gelangweilt.
13. Das Einzige, was ich jetzt gerne hätte, wäre eine 1 2 3 4 5 6 7  
Zigarette.
14. Wenn ich jetzt eine Zigarette rauchen würde, würde ich 1 2 3 4 5 6 7  
mich weniger müde fühlen.
15. Jetzt zu rauchen, würde mich glücklicher machen. 1 2 3 4 5 6 7
16. Sogar, wenn es jetzt möglich wäre, würde ich 1 2 3 4 5 6 7  
wahrscheinlich *nicht* rauchen.
17. Ich habe jetzt gerade keinen Wunsch nach einer 1 2 3 4 5 6 7

Zigarette.

18. Mein Wunsch nach einer Zigarette scheint gerade so stark zu sein, dass er mich zu überwältigen droht. 1 2 3 4 5 6 7
19. Wenn ich jetzt rauchen würde, erschiene mir fast alles in Ordnung. 1 2 3 4 5 6 7
20. Ich sehne mich gerade nach einer Zigarette. 1 2 3 4 5 6 7
21. Ich würde eine Zigarette jetzt *nicht* genießen. 1 2 3 4 5 6 7
22. Eine Zigarette würde jetzt *nicht* gut schmecken. 1 2 3 4 5 6 7
23. Ich verspüre jetzt gerade den Drang nach einer Zigarette. 1 2 3 4 5 6 7
24. Ich hätte die Dinge gerade besser im Griff, wenn ich rauchen würde. 1 2 3 4 5 6 7
25. Ich werde rauchen, sobald ich die Möglichkeit dazu habe. 1 2 3 4 5 6 7
26. Ich würde mich körperlich *nicht* besser fühlen, wenn ich jetzt rauchen würde. 1 2 3 4 5 6 7
27. Eine Zigarette wäre jetzt *nicht* sehr befriedigend. 1 2 3 4 5 6 7
28. Wenn ich jetzt eine angezündete Zigarette in der Hand hätte, würde ich sie wahrscheinlich gar *nicht* rauchen. 1 2 3 4 5 6 7
29. Wenn ich jetzt rauchen würde, könnte ich klarer denken. 1 2 3 4 5 6 7
30. Ich würde fast alles tun, um jetzt eine Zigarette zu bekommen. 1 2 3 4 5 6 7
31. Ich muss jetzt rauchen. 1 2 3 4 5 6 7
32. Gerade jetzt habe ich *nicht* vor zu rauchen. 1 2 3 4 5 6 7

**Fragebogen 2: Deutsche Fassung des „Questionnaire on Smoking Urges“ (QSU-G) (Müller et al. 2001), Originalfassung: (Tiffany et al. 1991); Für die Auswertung umzupolende Items: 4, 6, 8, 10, 16, 17, 21, 22, 26, 27, 28, 32; Items zu Faktor 1: 4, 5, 6, 9, 17, 21, 22, 25, 27, 28, 32; Items zu Faktor 2: 2, 3, 7, 13, 18, 19, 24, 29, 30, 31**

### 6.3 CYP2A6 Allelnomenklatur

Allele	Protein	Nucleotide changes		Trivial name	Effect	Enzyme activity		
		<u>cDNA</u>	<u>gene</u>			<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	
CYP2A6*1A	CYP2A6.1	None	None			Normal	Normal	<u>Yamano et al., 1990</u>
CYP2A6*1B1 <i>(formerly CYP2A6*1B, has also been called CYP2A6*1E)</i>	CYP2A6.1	gene conversion in 3' flanking region				Incr.?		<u>Yamano et al., 1990</u> <u>Nakajima et al., 2001</u> <u>Pitarque et al., 2004</u>
CYP2A6*1B2 <i>(has also been called CYP2A6*1B)</i>	CYP2A6.1	gene conversion in the 3' flanking region	-1013A>G; gene conversion in the 3' flanking region					<u>Oscarson et al., 1999b</u> <u>Ariyoshi et al., 2000</u> <u>Pitarque et al., 2004</u>
CYP2A6*1B3 <i>(formerly CYP2A6*1C)</i>	CYP2A6.1	gene conversion in 3' flanking region	-395G>A; gene conversion in 3' flanking region					<u>Kiyotani et al., 2002</u>
CYP2A6*1B4	CYP2A6.1							To be released
CYP2A6*1B5 <i>Tentative allele</i>	CYP2A6.1	gene conversion in 3' flanking	-1680A>G; -1579T>C; -1301A>C; -1289G>A; -					<u>Haberl et al., 2005</u>

## Anhang

		region	1013A>G; 1620T>C; gene conversion in 3' flanking region					
<i>CYP2A6*1B6</i> <i>Predicted haplotype/ Tentative allele</i>	CYP2A6.1	gene conversion in 3' flanking region	-1680A>G; -1579T>C; - 1301A>C; - 1289G>A; - 1013A>G; 1620T>C; 6285A>G; 6293T>C; gene conversion in 3' flanking region					<u>Haberl et al., 2005</u>
<i>CYP2A6*1B7</i> <i>Predicted haplotype/ Tentative allele</i>	CYP2A6.1	gene conversion in 3' flanking region	-1680A>G; -1579T>C; - 1464A>T; - 1301A>C; - 1289G>A; 1620T>C; gene conversion in 3' flanking region					<u>Haberl et al., 2005</u>
<i>CYP2A6*1B8</i> <i>Tentative allele</i>	CYP2A6.1	gene conversion in 3' flanking region	-1680A>G; -1579T>C; - 1464A>T; - 1301A>C; - 1289G>A; - 1013A>G; 1620T>C; gene conversion in 3'					<u>Haberl et al., 2005</u>

## Anhang

			flanking region					
<i>CYP2A6*1B9</i> <i>Predicted haplotype/ Tentative allele</i>	CYP2A6.1	gene conversion in 3' flanking region	-1680A>G; -1579T>C; - 1464A>T; - 1301A>C; - 1289G>A; - 1013A>G; 1620T>C; 6390C>G; gene conversion in 3' flanking region					<u>Haberl et al., 2005</u>
<i>CYP2A6*1B10</i> <i>Predicted haplotype/ Tentative allele</i>	CYP2A6.1	gene conversion in 3' flanking region	-1680A>G; -1579T>C; - 1464A>T; - 1301A>C; - 1289G>A; - 1013A>G; 1620T>C; 6389C>G; gene conversion in 3' flanking region					<u>Haberl et al., 2005</u>
<i>CYP2A6*1B11</i> <i>Predicted haplotype/ Tentative allele</i>	CYP2A6.1	gene conversion in 3' flanking region	-1680A>G; -1579T>C; - 1464A>T; - 1301A>C; - 1289G>A; - 1013A>G; 1620T>C; 5628C>T; gene conversion in 3' flanking region					<u>Haberl et al., 2005</u>

## Anhang

CYP2A6*1B12 <i>Predicted haplotype/ Tentative allele</i>	CYP2A6.1	51G>A; gene conversion in 3' flanking region	51G>A; gene conversion in 3' flanking region					<u>Haberl et al., 2005</u>
CYP2A6*1C		See CYP2A6*1B3						
CYP2A6*1D <i>Predicted haplotype</i>	CYP2A6.1	-1013A>G						<u>Pitarque et al., 2004</u>
CYP2A6*1E		See CYP2A6*1B1						
CYP2A6*1F	CYP2A6.1	1224C>T	5717C>T					<u>Nakajima et al., 2004</u>
CYP2A6*1G	CYP2A6.1	1224C>T	5717C>T; 5825A>G					<u>Nakajima et al., 2004</u>
CYP2A6*1H <i>Predicted haplotype</i>	CYP2A6.1		-745A>G				Decr.?	<u>von Richter et al., 2004</u>
CYP2A6*1J <i>Predicted haplotype</i>	CYP2A6.1		-1013A>G; -745A>G					<u>von Richter et al., 2004</u>
CYP2A6*1X2	CYP2A6.1				CYP2A6 gene duplication			<u>Rao et al., 2000</u>
CYP2A6*2	CYP2A6.2	51G>A; <b>479T&gt;A</b>	51G>A; <b>1799T&gt;A</b>	v1	<b>L160H</b>	None	None	<u>Yamano et al., 1990</u> <u>Hadidi et al., 1997</u> <u>Oscarson et al., 1998</u>
CYP2A6*3	CYP2A6.3	CYP2A6/CYP2A7 hybrid		v2		?	?	<u>Fernandez- Salguero et al., 1995</u>
CYP2A6*4A		<b>CYP2A6 deleted</b>		CYP2A6 del, E-type	<b>CYP2A6 deleted</b>	None		<u>Oscarson et al., 1999a</u> <u>Nunoya et al., 1999a</u> <u>Nunoya et</u>

## Anhang

							<u>al., 1999b</u> <u>Ariyoshi et al., 2000</u>	
CYP2A6*4B		<b>CYP2A6 deleted</b>			<b>CYP2A6 deleted</b>	None	<u>Nunoya et al., 1998</u> <u>Ariyoshi et al., 2002</u> <u>Ariyoshi et al., 2004</u>	
CYP2A6*4C							Identical to the CYP2A6*4A allele (see above)	
CYP2A6*4D		<b>CYP2A6 deleted</b>			<b>CYP2A6 deleted</b>	None	<u>Oscarson et al., 1999b</u>	
CYP2A6*5	CYP2A6.5	<b>1436G&gt;T;</b> gene conversion in the 3' flanking region	<b>6582G&gt;T;</b> gene conversion in the 3' flanking region		<b>G479V</b>	None	None	<u>Oscarson et al., 1999b</u>
CYP2A6*6	CYP2A6.6	<b>383G&gt;A</b>	<b>1703G&gt;A</b>		<b>R128Q</b>		Decr	<u>Kitagawa et al., 2001</u>
CYP2A6*7	CYP2A6.7	<b>1412T&gt;C;</b> gene conversion in the 3' flanking region	<b>6558T&gt;C;</b> gene conversion in the 3' flanking region		<b>I471T</b>	(Decr)	Decr	<u>Ariyoshi et al., 2001</u> <u>Xu et al., 2002</u>
CYP2A6*8	CYP2A6.8	1454G>T; gene conversion in the 3' flanking region	6600G>T; gene conversion in the 3' flanking region		R485L		Normal	<u>Ariyoshi et al., 2001</u> <u>Xu et al., 2002</u>



## Anhang

CYP2A6*9A	CYP2A6.1		-1013A>G; - 48T>G		<b>TATA box</b>	Decr	Decr	<u>Pitarque et al., 2001</u> <u>Yoshida et al., 2003</u> <u>Kiyotani et al., 2003</u> <u>von Richter et al., 2004</u>
CYP2A6*9B	CYP2A6.1	1547C>G	-1680A>G; -1301A>C; -1289G>A; -1013A>G; <b>-48T&gt;G</b> ; 1620T>C; 1836G>T; 6354T>C; 6692C>G		<b>TATA box</b>			<u>Haberl et al., 2005</u>
CYP2A6*10	CYP2A6.10	<b>1412T&gt;C</b> ; <b>1454G&gt;T</b> ; gene conversion in the 3' flanking region	<b>6558T&gt;C</b> ; <b>6600G&gt;T</b> ; gene conversion in the 3' flanking region		<b>I471T</b> ; <b>R485L</b>	Decr		<u>Yoshida et al., 2002</u> <u>Xu et al., 2002</u>
CYP2A6*11	CYP2A6.11	<b>670T&gt;C</b>	<b>3391T&gt;C</b>		<b>S224P</b>	Decr	Decr	<u>Daigo et al., 2002</u>
CYP2A6*12A	CYP2A6.12	<b>exons 1-2 of CYP2A7 origin</b> ; exons 3-9 of CYP2A6 origin			<b>10 aa substitutions</b>	Decr	Decr	<u>Oscarson et al., 2002</u>
CYP2A6*12B	CYP2A6.12	exons 1-2 of CYP2A7 origin; exons 3-9 of CYP2A6 origin; 1547C>G	exons 1-2 of CYP2A7 origin; exons 3-9 of CYP2A6 origin; 1620T>C; 3396G>A; 4489C>T; 5163G>A; 5545G>C;					<u>Haberl et al., 2005</u>

## Anhang

			5717C>G; 6692C>G					
CYP2A6*12C	CYP2A6.12	exons 1-2 of CYP2A7 origin; exons 3-9 of CYP2A6 origin; 1547C>G	exons 1-2 of CYP2A7 origin; exons 3-9 of CYP2A6 origin; 1620T>C; 1630G>C; 3396G>A; 4489C>T; 5163G>A; 5545G>C; 5717C>G; 6692C>G					<u>Haberl et al., 2005</u>
CYP2A6*13	CYP2A6.13	13G>A	-48T>G; 13G>A		G5R			<u>Kiyotani et al., 2002</u>
CYP2A6*14	CYP2A6.14	51G>A; 86G>A	51G>A; 86G>A		S29N			<u>Kiyotani et al., 2002</u>
CYP2A6*15	CYP2A6.15	580A>G	-48T>G; 2134A>G		K194E			<u>Kiyotani et al., 2002</u>
CYP2A6*16	CYP2A6.16	607C>A	2161C>A		R203S			<u>Kiyotani et al., 2002</u>
CYP2A6*17	CYP2A6.17	459G>A; <b>1093G&gt;A</b> ; 1224C>T	209C>T; 1779G>A; 4489C>T; <b>5065G&gt;A</b> ; 5163G>A; 5717C>T; 5825A>G		<b>V365M</b>	Decr	Decr	<u>Fukami et al., 2004</u>
CYP2A6*18A	CYP2A6.18	<b><u>1175A&gt;T</u></b>	<b><u>5668A&gt;T</u></b>		<b><u>Y392F</u></b>		Decr	<u>Fukami et al., 2005a</u>
CYP2A6*18B	CYP2A6.18	51G>A; <b><u>1175A&gt;T</u></b> ; 1191T>C; 1209T>C	51G>A; <b><u>5668A&gt;T</u></b> ; 5684T>C; 5702T>C		<b><u>Y392F</u></b>		Decr	<u>Fukami et al., 2005a</u>

## Anhang

CYP2A6*18C <i>Predicted haplotype</i>	CYP2A6.18	<b>1175A&gt;T;</b> 1546C>G	-1680A>G; -1579T>C; - 1464A>T; - 1301A>C; - 1289G>A; - 1013A>G; 1620T>C; <b>5668A&gt;T;</b> 6692C>G		<b>Y392F</b>			<u>Haberl et al., 2005</u>
CYP2A6*19	CYP2A6.19	<b>1175A&gt;T;</b> <b>1412T&gt;C;</b> gene conversion in the 3' flanking region	<b>5668A&gt;T;</b> 6354T>C; <b>6558T&gt;C;</b> gene conversion in the 3' flanking region		<b>Y392F;</b> <b>I471T</b>		Decr	<u>Fukami et al., 2005a</u>
CYP2A6*20	CYP2A6.20	51G>A; <b>587-</b> <b>588delAA;</b> 1191T>C; 1546C>G	51G>A; <b>2141-</b> <b>2142delAA;</b> 2296C>T; 5684T>C; 6692C>G		<b>Frame- shift</b>		None	<u>Fukami et al., 2005b</u>
CYP2A6*21 <i>Predicted haplotype</i>	CYP2A6.21	51G>A; <u>1427A&gt;G</u>	51G>A; <u>6573A&gt;G</u>		<u>K476R</u>			<u>Haberl et al., 2005</u>
CYP2A6*22 <i>Predicted haplotype</i>	CYP2A6.22	51G>A; 474C>G; 478C>A	51G>A; 1794C>G; 1798C>A		D158E; L160I			<u>Haberl et al., 2005</u>
<b>Additional SNPs, present in characterized haplotypes</b>								
			-1890C>T; - 1643C>T; - 1569T>C; - 1162G>A; - 745A>G; 144G>A; 3492C>T; 3570C>G; 4932C>T;					<u>Haberl et al., 2005</u>

## Anhang

---

			5684T>C; 5738C>T; 5823C>T; 5843G>C				
<b>Additional SNPs, where the haplotype has not yet been determined</b>							
			1620T>C; 1836G>T; 1874G>T; 1890G>C; 2026C>T; 3396G>A; 3570C>G; 4489C>T; 4932C>A; 5336G>A; 6282A>G; 6354T>C; 6692C>G; 6782C>G; 6832A>G; 6835C>A				<u>Kiyotani et al., 2002</u>
			144G>A; 209C>T				<u>Saito et al., 2003</u>
			237G>A; 388C>G; 413T>G; 618delG; 1779G>A; 3332G>A; 4350G>A; 4636A>C; 5142C>T; 5437C>T; 5521A>T; 5525G>C; 5545G>C; 5573A>C; 5684T>C; 5717C>T;				<u>Solus et al., 2004</u>

## Anhang

---

			6361C>A; 6389C>G; 6681A>G; 6685C>T; 6688A>G; 6690A>G; 6696C>T; 6698T>C; 6699insC; 6703delG; 6706G>A; 6710C>G; 6712A>G; 6713G>T; 6714C>A; 6720C>A; 6726C>G; 6729G>A; 6734G>C; 6735C>G				
			1672T>C		F118L		<u>Solus et al., 2004</u>
			2162- 2163GC>A		Frame- shift		<u>Solus et al., 2004</u>
			5745A>G		N418D		<u>Solus et al., 2004</u>
			16A>C		M6L		<u>Haberl et al., 2005</u>
			567C>T		R101X		<u>Haberl et al., 2005</u>
			594G>C		V110L		<u>Haberl et al., 2005</u>
			1703G>T		R128L		<u>Haberl et al., 2005</u>
			1711T>G		S131A		<u>Haberl et al., 2005</u>
			2061T>G		D169E		<u>Haberl et al., 2005</u>

## Anhang

			3515G>A		R265Q		<u>Haberl et al., 2005</u>
			5661G>A		E390K		<u>Haberl et al., 2005</u>
			-1126C>A; 467C>T; 557G>A; 578A>G; 1710C>T; 2035G>T; 2039T>C; 2158T>C; 2274G>C; 3315C>T; 4193G>C; 4561G>A; 5162C>T; 5636A>C; 5660C>T; 5732C>T; 6586T>C				<u>Haberl et al., 2005</u>
			<u>1777G&gt;T/C</u>		<u>A153S/P</u>		<u>NCBI dbSNP</u>
			<u>4372G&gt;A</u>		<u>V292M</u>		<u>NCBI dbSNP</u>

**Tabelle 13: CYP2A6 Allelnomenklatur; die fettgedruckten Nukleotidvarianten sind die SNPs („single nucleotide polymorphisms“) bzw. Veränderungen, die verantwortlich für den Phänotyp des jeweiligen Allels sind. Tabelle übernommen von der Homepage des „Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committees“: <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/> (Zugriffsdatum: 27. 11. 2005)**

## 7 Literaturverzeichnis

- Aktories, K., U. Förstermann, F. Hofmann und K. Starke (2005). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban & Fischer. München, Jena. S. 50, S. 61, S. 72.
- Bao, Z., X. Y. He, X. Ding, S. Prabhu und J. Y. Hong (2005). Metabolism of nicotine and cotinine by human cytochrome P450 2A13. *Drug Metab Dispos.* 33(2): 258-61.
- Batra, A. (2000). Tabakabhängigkeit - Biologische und psychosoziale Entstehungsbedingungen und Therapiemöglichkeiten. Steinkopff. Darmstadt. S. 78ff, S. 151ff.
- Batra, A., G. Gelfort, M. Bartels, H. Smolczyk, G. Buchkremer, O. Ries und L. Schöls (2000). The dopamine D2 receptor (DRD2) gene - a genetic risk factor in heavy smoking? *Addiction Biology.* 5: 431-438.
- Benowitz, N. L. (1988). Drug therapy. Pharmacologic aspects of cigarette smoking and nicotine addiction. *N Engl J Med.* 319(20): 1318-30.
- Benowitz, N. L. (1990). Clinical pharmacology of inhaled drugs of abuse: implications in understanding nicotine dependence. *NIDA Res Monogr.* 99: 12-29.
- Benowitz, N. L. (1996). Pharmacology of nicotine: addiction and therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 36: 597-613.
- Benowitz, N. L., C. Griffin und R. Tyndale (2001). Deficient C-oxidation of nicotine continued. *Clin Pharmacol Ther.* 70(6): 567.
- Benowitz, N. L. und P. Jacob, 3rd (1990). Intravenous nicotine replacement suppresses nicotine intake from cigarette smoking. *J Pharmacol Exp Ther.* 254(3): 1000-5.
- Benowitz, N. L. und P. Jacob, 3rd (1993). Nicotine and cotinine elimination pharmacokinetics in smokers and nonsmokers. *Clin Pharmacol Ther.* 53(3): 316-23.
- Benowitz, N. L. und P. Jacob, 3rd (2000). Effects of cigarette smoking and carbon monoxide on nicotine and cotinine metabolism. *Clin Pharmacol Ther.* 67(6): 653-9.
- Benowitz, N. L., P. Jacob, 3rd, I. Fong und S. Gupta (1994). Nicotine metabolic profile in man: comparison of cigarette smoking and transdermal nicotine. *J Pharmacol Exp Ther.* 268(1): 296-303.
- Benowitz, N. L., P. Jacob, 3rd und D. P. Sachs (1995). Deficient C-oxidation of nicotine. *Clin Pharmacol Ther.* 57(5): 590-4.
- Bourian, M., H. Gullsten und W. Legrum (2000). Genetic polymorphism of CYP2A6 in the German population. *Toxicology.* 144(1-3): 129-37.
- Breslau, N. (1995). Psychiatric comorbidity of smoking and nicotine dependence. *Behav Genet.* 25(2): 95-101.
- Breslau, N., M. Kilbey und P. Andreski (1991). Nicotine dependence, major depression, and anxiety in young adults. *Arch Gen Psychiatry.* 48(12): 1069-74.
- Carmelli, D., G. E. Swan, D. Robinette und R. Fabsitz (1992). Genetic influence on smoking--a study of male twins. *N Engl J Med.* 327(12): 829-33.

- Carter, B., T. Long und P. Cinciripini (2004). A meta-analytic review of the CYP2A6 genotype and smoking behavior. *Nicotine Tob Res.* 6(2): 221-7.
- Cashman, J. R., S. B. Park, Z. C. Yang, S. A. Wrighton, P. Jacob, 3rd und N. L. Benowitz (1992). Metabolism of nicotine by human liver microsomes: stereoselective formation of trans-nicotine N'-oxide. *Chem Res Toxicol.* 5(5): 639-46.
- Chen, G. F., Y. M. Tang, B. Green, D. X. Lin, F. P. Guengerich, A. K. Daly, N. E. Caporaso und F. F. Kadlubar (1999). Low frequency of CYP2A6 gene polymorphism as revealed by a one-step polymerase chain reaction method. *Pharmacogenetics.* 9(3): 327-32.
- Clark, S. J., J. O. Warner und T. P. Dean (1994). Passive smoking amongst asthmatic children. Questionnaire or objective assessment? *Clin Exp Allergy.* 24(3): 276-80.
- Comings, D. E., L. Ferry, S. Bradshaw-Robinson, R. Burchette, C. Chiu und D. Muhleman (1996). The dopamine D2 receptor (DRD2) gene: a genetic risk factor in smoking. *Pharmacogenetics.* 6(1): 73-9.
- Crawford, E. L., D. A. Weaver, J. P. DeMuth, C. M. Jackson, S. A. Khuder, M. W. Frampton, M. J. Utell, W. G. Thilly und J. C. Willey (1998). Measurement of cytochrome P450 2A6 and 2E1 gene expression in primary human bronchial epithelial cells. *Carcinogenesis.* 19(10): 1867-71.
- Daigo, S., Y. Takahashi, M. Fujieda, N. Ariyoshi, H. Yamazaki, W. Koizumi, S. Tanabe, K. Saigenji, S. Nagayama, K. Ikeda, Y. Nishioka und T. Kamataki (2002). A novel mutant allele of the CYP2A6 gene (CYP2A6\*11) found in a cancer patient who showed poor metabolic phenotype towards tegafur. *Pharmacogenetics.* 12(4): 299-306.
- Dallal, G. E. (2001). The little handbook of statistical practice. *From the Tufts University website.* 07.07.2004. <http://www.tufts.edu/~gdallal/LHSP.HTM>.
- Daly, A. K., J. Brockmoller, F. Broly, M. Eichelbaum, W. E. Evans, F. J. Gonzalez, J. D. Huang, J. R. Idle, M. Ingelman-Sundberg, T. Ishizaki, E. Jacqz-Aigrain, U. A. Meyer, D. W. Nebert, V. M. Steen, C. R. Wolf und U. M. Zanger (1996). Nomenclature for human CYP2D6 alleles. *Pharmacogenetics.* 6(3): 193-201.
- Davidson, M., M. Epstein, R. Burt, C. Schaefer, G. Whitworth und A. McDonald (1998). Efficacy and safety of an over-the-counter transdermal nicotine patch as an aid for smoking cessation. *Arch Fam Med.* 7(6): 569-74.
- Esser, D. (2004). Genetische Bedingungen der Tabakabhängigkeit - der Einfluss eines Polymorphismus im Genort des CYP2A6 auf das Rauchverhalten. Inaugural-Dissertation. Universität Tübingen.
- Fernandez-Salguero, P., S. M. Hoffman, S. Cholerton, H. Mohrenweiser, H. Raunio, A. Rautio, O. Pelkonen, J. D. Huang, W. E. Evans, J. R. Idle und et al. (1995). A genetic polymorphism in coumarin 7-hydroxylation: sequence of the human CYP2A genes and identification of variant CYP2A6 alleles. *Am J Hum Genet.* 57(3): 651-60.
- Fiore, M. C., S. S. Smith, D. E. Jorenby und T. B. Baker (1994). The effectiveness of the nicotine patch for smoking cessation. A meta-analysis. *Jama.* 271(24): 1940-7.



- Gorrod, J. W. und A. R. Hibberd (1982). The metabolism of nicotine-delta 1'(5')-iminium ion, in vivo and in vitro. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 7(4): 293-8.
- Gu, D. F., L. J. Hinks, N. E. Morton und I. N. Day (2000). The use of long PCR to confirm three common alleles at the CYP2A6 locus and the relationship between genotype and smoking habit. *Ann Hum Genet.* 64(Pt 5): 383-90.
- Gullsten, H., J. A. Agundez, J. Benitez, E. Laara, J. M. Ladero, M. Diaz-Rubio, P. Fernandez-Salguero, F. Gonzalez, A. Rautio, O. Pelkonen und H. Raunio (1997). CYP2A6 gene polymorphism and risk of liver cancer and cirrhosis. *Pharmacogenetics.* 7(3): 247-50.
- Hadidi, H., K. Zahlsen, J. R. Idle und S. Cholerton (1997). A single amino acid substitution (Leu160His) in cytochrome P450 CYP2A6 causes switching from 7-hydroxylation to 3-hydroxylation of coumarin. *Food Chem Toxicol.* 35(9): 903-7.
- Hariharan, M., T. VanNoord und J. F. Greden (1988). A high-performance liquid-chromatographic method for routine simultaneous determination of nicotine and cotinine in plasma. *Clin Chem.* 34(4): 724-9.
- Heath, A. C., K. M. Kirk, J. M. Meyer und N. G. Martin (1999). Genetic and social determinants of initiation and age at onset of smoking in Australian twins. *Behav Genet.* 29(6): 395-407.
- Heatherston, T. F., L. T. Kozlowski, R. C. Frecker und K. O. Fagerstrom (1991). The Fagerstrom Test for Nicotine Dependence: a revision of the Fagerstrom Tolerance Questionnaire. *Br J Addict.* 86(9): 1119-27.
- Hecht, S. S., J. B. Hochalter, P. W. Villalta und S. E. Murphy (2000). 2'-Hydroxylation of nicotine by cytochrome P450 2A6 and human liver microsomes: formation of a lung carcinogen precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(23): 12493-7.
- Henningfield, J. E., K. Miyasato und D. R. Jasinski (1985). Abuse liability and pharmacodynamic characteristics of intravenous and inhaled nicotine. *J Pharmacol Exp Ther.* 234(1): 1-12.
- Herning, R. I., R. T. Jones, N. L. Benowitz und A. H. Mines (1983). How a cigarette is smoked determines blood nicotine levels. *Clin Pharmacol Ther.* 33(1): 84-90.
- Hoffman, S. M., D. R. Nelson und D. S. Keeney (2001). Organization, structure and evolution of the CYP2 gene cluster on human chromosome 19. *Pharmacogenetics.* 11(8): 687-98.
- Hughes, J. R., S. B. Gulliver, J. W. Fenwick, W. A. Valliere, K. Cruser, S. Pepper, P. Shea, L. J. Solomon und B. S. Flynn (1992). Smoking cessation among self-quitters. *Health Psychol.* 11(5): 331-4.
- Hukkanen, J., P. Jacob, 3rd und N. L. Benowitz (2005). Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev.* 57(1): 79-115.
- Hurt, R. D., L. C. Dale, K. P. Offord, I. T. Croghan, J. T. Hays und L. Gomez-Dahl (1995). Nicotine patch therapy for smoking cessation in recovering alcoholics. *Addiction.* 90(11): 1541-6.
- Inoue, K., H. Yamazaki und T. Shimada (2000). CYP2A6 genetic polymorphisms and liver microsomal coumarin and nicotine oxidation activities in Japanese and Caucasians. *Arch Toxicol.* 73(10-11): 532-9.

- Iskan, M., H. Rostami, T. Guray, O. Pelkonen und A. Rautio (1994). Interindividual variability of coumarin 7-hydroxylation in a Turkish population. *Eur J Clin Pharmacol.* 47(4): 315-8.
- Jarvik, M. E., D. C. Madsen, R. E. Olmstead, P. N. Iwamoto-Schaap, J. L. Elins und N. L. Benowitz (2000). Nicotine blood levels and subjective craving for cigarettes. *Pharmacol Biochem Behav.* 66(3): 553-8.
- Kendler, K. S., L. M. Thornton und N. L. Pedersen (2000). Tobacco consumption in Swedish twins reared apart and reared together. *Arch Gen Psychiatry.* 57(9): 886-92.
- Koopmans, J. R., W. S. Slutske, A. C. Heath, M. C. Neale und D. I. Boomsma (1999). The genetics of smoking initiation and quantity smoked in Dutch adolescent and young adult twins. *Behav Genet.* 29(6): 383-93.
- Kunze, U., A. Schmeiser-Rieder und R. Schoberberger (1998). European Medical Association Smoking or Health (EMASH)--consensus on smoking cessation: guidelines for physicians. *Soz Präventivmed.* 43(3): 167-72.
- Kyerematen, G. A., M. Morgan, G. Warner, L. F. Martin und E. S. Vesell (1990). Metabolism of nicotine by hepatocytes. *Biochem Pharmacol.* 40(8): 1747-56.
- Lerman, C. und W. Berrettini (2003). Elucidating the role of genetic factors in smoking behavior and nicotine dependence. *Am J Med Genet.* 118B(1): 48-54.
- Lerman, C., N. E. Caporaso, J. Audrain, D. Main, E. D. Bowman, B. Lockshin, N. R. Boyd und P. G. Shields (1999). Evidence suggesting the role of specific genetic factors in cigarette smoking. *Health Psychol.* 18(1): 14-20.
- Löffler, G. (1999). Basiswissen Biochemie, mit Pathobiochemie. Springer. Berlin, Heidelberg. S. 77ff, S. 386ff.
- Löffler, G. und P. E. Petrides (2003). Biochemie & Pathobiochemie. Springer. Berlin, Heidelberg. S. 340.
- London, S. J., J. R. Idle, A. K. Daly und G. A. Coetzee (1999). Genetic variation of CYP2A6, smoking, and risk of cancer. *Lancet.* 353(9156): 898-9.
- Loriot, M. A., S. Rebuissou, M. Oscarson, S. Cenee, M. Miyamoto, N. Ariyoshi, T. Kamataki, D. Hemon, P. Beaune und I. Stucker (2001). Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2A6 in a case-control study on lung cancer in a French population. *Pharmacogenetics.* 11(1): 39-44.
- Luciano, M., G. Zhu, K. M. Kirk, J. B. Whitfield, R. Butler, A. C. Heath, P. A. Madden und N. G. Martin (2004). Effects of dopamine receptor D4 variation on alcohol and tobacco use and on novelty seeking: multivariate linkage and association analysis. *Am J Med Genet.* 124B(1): 113-23.
- Lunell, E., L. Molander, S. J. Leischow und K. O. Fagerstrom (1995). Effect of nicotine vapour inhalation on the relief of tobacco withdrawal symptoms. *Eur J Clin Pharmacol.* 48(3-4): 235-40.
- Messina, E. S., R. F. Tyndale und E. M. Sellers (1997). A major role for CYP2A6 in nicotine C-oxidation by human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther.* 282(3): 1608-14.
- Meyer, V. R. (2004). Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie. Wiley-VCH. Weinheim. S. 9.

- Miles, J. S., A. W. McLaren, L. M. Forrester, M. J. Glancey, M. A. Lang und C. R. Wolf (1990). Identification of the human liver cytochrome P-450 responsible for coumarin 7-hydroxylase activity. *Biochem J.* 267(2): 365-71.
- Molander, L., A. Hansson und E. Lunell (2001a). Pharmacokinetics of nicotine in healthy elderly people. *Clin Pharmacol Ther.* 69(1): 57-65.
- Molander, L. und E. Lunell (2001b). Pharmacokinetic investigation of a nicotine sublingual tablet. *Eur J Clin Pharmacol.* 56(11): 813-9.
- Molander, L., E. Lunell und K. O. Fagerstrom (2000). Reduction of tobacco withdrawal symptoms with a sublingual nicotine tablet: a placebo controlled study. *Nicotine Tob Res.* 2(2): 187-91.
- Müller, V., R. F. Mucha, K. Ackermann und P. Pauli (2001). Die Erfassung des Cravings bei Rauchern mit einer deutschen Version des "Questionnaire on Smoking Urges" (QSU-G). *Zeitschrift für Klinische Psychologie.* 30(3): 164-171.
- Murphy, P. J. (1973). Enzymatic oxidation of nicotine to nicotine 1'(5') iminium ion. A newly discovered intermediate in the metabolism of nicotine. *J Biol Chem.* 248(8): 2796-800.
- Murphy, S. E., L. M. Johnson und D. A. Pullo (1999). Characterization of multiple products of cytochrome P450 2A6-catalyzed cotinine metabolism. *Chem Res Toxicol.* 12(7): 639-45.
- Mutschler, E., G. Geisslinger, H. K. Kroemer und M. Schäfer-Korting (2001). Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. WVG, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH. Stuttgart. S. 41f.
- Nakajima, M., J. T. Kwon, N. Tanaka, T. Zenta, Y. Yamamoto, H. Yamamoto, H. Yamazaki, T. Yamamoto, Y. Kuroiwa und T. Yokoi (2001). Relationship between interindividual differences in nicotine metabolism and CYP2A6 genetic polymorphism in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 69(1): 72-8.
- Nakajima, M., S. Yamagishi, H. Yamamoto, T. Yamamoto, Y. Kuroiwa und T. Yokoi (2000). Deficient cotinine formation from nicotine is attributed to the whole deletion of the CYP2A6 gene in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 67(1): 57-69.
- Nakajima, M., T. Yamamoto, K. Nunoya, T. Yokoi, K. Nagashima, K. Inoue, Y. Funae, N. Shimada, T. Kamataki und Y. Kuroiwa (1996a). Characterization of CYP2A6 involved in 3'-hydroxylation of cotinine in human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther.* 277(2): 1010-5.
- Nakajima, M., T. Yamamoto, K. Nunoya, T. Yokoi, K. Nagashima, K. Inoue, Y. Funae, N. Shimada, T. Kamataki und Y. Kuroiwa (1996b). Role of human cytochrome P4502A6 in C-oxidation of nicotine. *Drug Metab Dispos.* 24(11): 1212-7.
- Nelson, D. (2005). Cytochrome P450 Homepage. 26.08.2005.  
<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>
- Oscarson, M. (2001). Genetic polymorphisms in the cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) gene: implications for interindividual differences in nicotine metabolism. *Drug Metab Dispos.* 29(2): 91-5.
- Oscarson, M., H. Gullsten, A. Rautio, M. L. Bernal, B. Sinues, M. L. Dahl, J. H. Stengard, O. Pelkonen, H. Raunio und M. Ingelman-Sundberg (1998).

- Genotyping of human cytochrome P450 2A6 (CYP2A6), a nicotine C-oxidase. *FEBS Lett.* 438(3): 201-5.
- Oscarson, M., R. A. McLellan, V. Asp, M. Ledesma, M. L. Ruiz, B. Sinues, A. Rautio und M. Ingelman-Sundberg (2002). Characterization of a novel CYP2A7/CYP2A6 hybrid allele (CYP2A6\*12) that causes reduced CYP2A6 activity. *Hum Mutat.* 20(4): 275-83.
- Oscarson, M., R. A. McLellan, H. Gullsten, Q. Y. Yue, M. A. Lang, M. L. Bernal, B. Sinues, A. Hirvonen, H. Raunio, O. Pelkonen und M. Ingelman-Sundberg (1999). Characterisation and PCR-based detection of a CYP2A6 gene deletion found at a high frequency in a Chinese population. *FEBS Lett.* 448(1): 105-10.
- Patten, C. J., T. J. Smith, M. J. Friesen, R. E. Tynes, C. S. Yang und S. E. Murphy (1997). Evidence for cytochrome P450 2A6 and 3A4 as major catalysts for N'-nitrosonornicotine alpha-hydroxylation by human liver microsomes. *Carcinogenesis.* 18(8): 1623-30.
- Pelkonen, O., E. A. Sotaniemi und J. T. Ahokas (1985). Coumarin 7-hydroxylase activity in human liver microsomes. Properties of the enzyme and interspecies comparisons. *Br J Clin Pharmacol.* 19(1): 59-66.
- Pianezza, M. L., E. M. Sellers und R. F. Tyndale (1998). Nicotine metabolism defect reduces smoking. *Nature.* 393(6687): 750.
- Rao, Y., E. Hoffmann, M. Zia, L. Bodin, M. Zeman, E. M. Sellers und R. F. Tyndale (2000). Duplications and defects in the CYP2A6 gene: identification, genotyping, and in vivo effects on smoking. *Mol Pharmacol.* 58(4): 747-55.
- Raunio, H., A. Rautio, H. Gullsten und O. Pelkonen (2001). Polymorphisms of CYP2A6 and its practical consequences. *Br J Clin Pharmacol.* 52(4): 357-63.
- Rautio, A., H. Kraul, A. Kojo, E. Salmela und O. Pelkonen (1992). Interindividual variability of coumarin 7-hydroxylation in healthy volunteers. *Pharmacogenetics.* 2(5): 227-33.
- Sabol, S. Z., M. L. Nelson, C. Fisher, L. Gunzerath, C. L. Brody, S. Hu, L. A. Sirota, S. E. Marcus, B. D. Greenberg, F. R. t. Lucas, J. Benjamin, D. L. Murphy und D. H. Hamer (1999). A genetic association for cigarette smoking behavior. *Health Psychol.* 18(1): 7-13.
- Schoedel, K. A., E. B. Hoffmann, Y. Rao, E. M. Sellers und R. F. Tyndale (2004). Ethnic variation in CYP2A6 and association of genetically slow nicotine metabolism and smoking in adult Caucasians. *Pharmacogenetics.* 14(9): 615-26.
- Schulz, T. G., P. Ruhnau und E. Hallier (2001). Lack of correlation between CYP2A6 genotype and smoking habits. *Adv Exp Med Biol.* 500: 213-5.
- Shields, P. G., C. Lerman, J. Audrain, E. D. Bowman, D. Main, N. R. Boyd und N. E. Caporaso (1998). Dopamine D4 receptors and the risk of cigarette smoking in African-Americans and Caucasians. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 7(6): 453-8.
- Shimada, T., H. Yamazaki und F. P. Guengerich (1996). Ethnic-related differences in coumarin 7-hydroxylation activities catalyzed by

- cytochrome P4502A6 in liver microsomes of Japanese and Caucasian populations. *Xenobiotica*. 26(4): 395-403.
- Sihver, W., K. J. Fasth, M. Ogren, H. Lundqvist, M. Bergstrom, Y. Watanabe, B. Langstrom und A. Nordberg (1999). In vivo positron emission tomography studies on the novel nicotinic receptor agonist [<sup>11</sup>C]MPA compared with [<sup>11</sup>C]ABT-418 and (S)(-)[<sup>11</sup>C]nicotine in rhesus monkeys. *Nucl Med Biol*. 26(6): 633-40.
- Singleton, A. B., J. H. Thomson, C. M. Morris, J. A. Court, S. Lloyd und S. Cholerton (1998). Lack of association between the dopamine D2 receptor gene allele DRD2\*A1 and cigarette smoking in a United Kingdom population. *Pharmacogenetics*. 8(2): 125-8.
- Sotaniemi, E. A., A. Rautio, M. Backstrom, P. Arvela und O. Pelkonen (1995). CYP3A4 and CYP2A6 activities marked by the metabolism of lignocaine and coumarin in patients with liver and kidney diseases and epileptic patients. *Br J Clin Pharmacol*. 39(1): 71-6.
- Spina, E., M. G. Scordo und C. D'Arrigo (2003). Metabolic drug interactions with new psychotropic agents. *Fundam Clin Pharmacol*. 17(5): 517-38.
- Spracklin, D. K., K. E. Thummel und E. D. Kharasch (1996). Human reductive halothane metabolism in vitro is catalyzed by cytochrome P450 2A6 and 3A4. *Drug Metab Dispos*. 24(9): 976-83.
- Stolerman, I. P. und M. J. Jarvis (1995). The scientific case that nicotine is addictive. *Psychopharmacology (Berl)*. 117(1): 2-10; discussion 14-20.
- Su, T., Z. Bao, Q. Y. Zhang, T. J. Smith, J. Y. Hong und X. Ding (2000). Human cytochrome P450 CYP2A13: predominant expression in the respiratory tract and its high efficiency metabolic activation of a tobacco-specific carcinogen, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Res*. 60(18): 5074-9.
- Su, T., J. J. Sheng, T. W. Lipinskas und X. Ding (1996). Expression of CYP2A genes in rodent and human nasal mucosa. *Drug Metab Dispos*. 24(8): 884-90.
- Sullivan, P. F., M. C. Neale, M. A. Silverman, C. Harris-Kerr, M. V. Myakishev, B. Wormley, B. T. Webb, Y. Ma, K. S. Kendler und R. E. Straub (2001). An association study of DRD5 with smoking initiation and progression to nicotine dependence. *Am J Med Genet*. 105(3): 259-65.
- Suter, P. M., A. Spitzbarth, K. Gautschi, L. Erdmenger, D. J. Vonderschmitt und W. Vetter (1995). Cotinine - a useful biomarker for tobacco use? *Schweiz Rundsch Med Prax*. 84(29-30): 821-5.
- Swan, G. E., N. L. Benowitz, C. N. Lessov, P. Jacob, 3rd, R. F. Tyndale und K. Wilhelmsen (2005). Nicotine metabolism: the impact of CYP2A6 on estimates of additive genetic influence. *Pharmacogenet Genomics*. 15(2): 115-25.
- Tan, W., G. F. Chen, D. Y. Xing, C. Y. Song, F. F. Kadlubar und D. X. Lin (2001). Frequency of CYP2A6 gene deletion and its relation to risk of lung and esophageal cancer in the Chinese population. *Int J Cancer*. 95(2): 96-101.
- Tiffany, S. T. und D. J. Drobes (1991). The development and initial validation of a questionnaire on smoking urges. *Br J Addict*. 86(11): 1467-76.

- Tiihonen, J., U. Pesonen, J. Kauhanen, M. Koulu, T. Hallikainen, L. Leskinen und J. T. Salonen (2000). CYP2A6 genotype and smoking. *Mol Psychiatry*. 5(4): 347-8.
- True, W. R., A. C. Heath, J. F. Scherrer, B. Waterman, J. Goldberg, N. Lin, S. A. Eisen, M. J. Lyons und M. T. Tsuang (1997). Genetic and environmental contributions to smoking. *Addiction*. 92(10): 1277-87.
- USDHHS, (U.S. Department of Health and Human Services) (1988). The health consequences of smoking: Nicotine addiction. A Report of the Surgeon General. Rockville, MD. Public Health Service. Center for Disease Control. DHHS Publication No. (CDC) 88-8406.
- USDHHS, (US Department of Health and Human Services) (1990). The health benefits of smoking cessation. Public Health Service, Centers for Disease Control, Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health. DHHS Publication No. (CDC) 90-8416.
- Valette, H., M. Bottlaender, F. Dolle, C. Coulon, M. Ottaviani und A. Syrota (2003). Long-lasting occupancy of central nicotinic acetylcholine receptors after smoking: a PET study in monkeys. *J Neurochem*. 84(1): 105-11.
- Vandenbergh, D. J., C. J. Bennett, M. D. Grant, A. A. Strasser, R. O'Connor, R. L. Stauffer, G. P. Vogler und L. T. Kozlowski (2002). Smoking status and the human dopamine transporter variable number of tandem repeats (VNTR) polymorphism: failure to replicate and finding that never-smokers may be different. *Nicotine Tob Res*. 4(3): 333-40.
- Weltbank, The International Bank for Reconstruction and Development/THE WORLD BANK (1999). Curbing the Epidemic: Governments and the Economics of Tobacco Control. Washington, D.C.
- Westman, E. C., F. M. Behm und J. E. Rose (1996). Dissociating the nicotine and airway sensory effects of smoking. *Pharmacol Biochem Behav*. 53(2): 309-15.
- Willner, P., S. Hardman und G. Eaton (1995). Subjective and behavioural evaluation of cigarette cravings. *Psychopharmacology (Berl)*. 118(2): 171-7.
- Yamano, S., J. Tatsuno und F. J. Gonzalez (1990). The CYP2A3 gene product catalyzes coumarin 7-hydroxylation in human liver microsomes. *Biochemistry*. 29(5): 1322-9.
- Yamazaki, H., K. Inoue, M. Hashimoto und T. Shimada (1999). Roles of CYP2A6 and CYP2B6 in nicotine C-oxidation by human liver microsomes. *Arch Toxicol*. 73(2): 65-70.
- Yoshida, R., M. Nakajima, K. Nishimura, S. Tokudome, J. T. Kwon und T. Yokoi (2003). Effects of polymorphism in promoter region of human CYP2A6 gene (CYP2A6\*9) on expression level of messenger ribonucleic acid and enzymatic activity in vivo and in vitro. *Clin Pharmacol Ther*. 74(1): 69-76.
- Yoshida, R., M. Nakajima, Y. Watanabe, J. T. Kwon und T. Yokoi (2002). Genetic polymorphisms in human CYP2A6 gene causing impaired nicotine metabolism. *Br J Clin Pharmacol*. 54(5): 511-7.

- Zanger, U. M., S. Raimundo und M. Eichelbaum (2004). Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 369(1): 23-37.
- Zeman, M. V., L. Hiraki und E. M. Sellers (2002). Gender differences in tobacco smoking: higher relative exposure to smoke than nicotine in women. *J Womens Health Gend Based Med.* 11(2): 147-53.
- Zevin, S., P. Jacob, 3rd und N. Benowitz (1997). Cotinine effects on nicotine metabolism. *Clin Pharmacol Ther.* 61(6): 649-54.
- Zhang, X., K. Amemo, S. Ameno, K. Iwahashi, H. Kinoshita, T. Kubota, J. Mostofa und I. Ijiri (2001). Lack of association between smoking and CYP2A6 gene polymorphisms in A Japanese population. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi.* 36(5): 486-90.

## 8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen herzlich danken, die mir hilfreich und ermutigend zur Seite gestanden haben:

Herrn Prof. Dr. Anil Batra für die Überlassung des Themas, für die freundliche und gute Betreuung, die konstruktiven Anregungen und die unglaublich schnellen Antworten auf alle Fragen.

Marina Kaiser, die Station A3 der Psychiatrischen Klinik, die Mitarbeiter des AKR (Dr. Patrick Kaspar, Martina Schröter und Iris Torchalla), die mir bei der Probandenrekrutierung und Durchführung der Studie mit Rat und Tat zur Seite standen.

Dr. Dorothea Esser für gute Tipps und die ganze Vorarbeit.

Herrn Dr. Farger, Frau Stransky und allen im Labor, die an der Analyse der Proben beteiligt waren.

Susan Collins, Ph.D., die in unermüdlicher Geduld die statistische Auswertung betreut hat und mir beim Fertigstellen dieser Arbeit mit ihrer freundlichen und kompetenten Art immer mit guten Ratschlägen und Ermutigungen weitergeholfen hat.

Herrn PD Dr. Klaus Mörike für die gute Beratung in pharmakokinetischen und statistischen Fragen.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich herzlich für die Unterstützung und ihren Beitrag am Gelingen dieser Arbeit danken.



## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Anette Katrin Riexinger  
Geburtsdatum: 31. 08. 1977  
Geburtsort: Nürtingen  
Familienstand: Ledig

### Schulischer Werdegang

1984 – 1988 Grundschule in Dettingen  
1988 – 1997 Graf Eberhard Gymnasium Bad Urach  
1997 – 1998 Au Pair in den USA

### Hochschulbildung

1998 – 2001 Studium der Humanmedizin, Ernst Moritz Arndt  
Universität Greifswald  
2001 – 2005 Studium der Humanmedizin, Eberhard Karls  
Universität Tübingen

### Praktisches Jahr

1. Tertial Innere, Diakonie Klinikum Stuttgart  
2. Tertial Anästhesie, Diakonie Klinikum Stuttgart  
3. Tertial Chirurgie, Regionalspital Wattwil, Schweiz

### Prüfungen

14. 09. 2000 Ärztliche Vorprüfung  
28. 08. 2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
01. 04. 2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
31. 05. 2005 Ärztliche Prüfung

### Dissertation

2003 – 2005 Dissertation mit dem Titel: „*Auswirkungen des CYP2A6\*2-Polymorphismus auf die individuelle Nikotinkinetik bei Rauchern*“ bei Prof. Dr. A. Batra, Universitätsklinik für Psychiatrie und Psychotherapie Tübingen

### Ärztliche Tätigkeit

seit 01. 10. 2005 Assistenzärztin, Klinik für Anästhesiologie und  
Transfusionsmedizin, Universität Tübingen