

# *In vitro* Untersuchungen zur Wechselwirkung von Methadon mit psychotropen Substanzen

Gisela Skopp, Stephanie Bomsien

## Abstract

*Aim:* The aim of the present study was to assess the drug interaction potential of some psychoactive drugs on methadone N-demethylation using cDNA-expressed cytochrome P450 (CYP) enzymes.

*Design:* Methadone was incubated with various drugs (n=10) and cDNA-expressed CYP3A4, CYP2D6, CYP2B6, CYP2C19 and CYP1A2 enzymes to screen for their inhibition potency. The nature of inhibition mechanism was further investigated for potent inhibitors. To test for a mechanism-based component in inhibition, all substances were tested with preincubation and without. Methadone, EDDP and EMDP concentrations were determined by liquid chromatography/tandem mass spectrometry following liquid/liquid extraction (pH 8.5).

*Findings:* Amitriptyline, buprenorphine, MDMA and zolpidem preferentially inhibited N-demethylation of methadone. Amitriptyline showed a possible, and methylenedioxymethamphetamine (MDMA) a severe interaction potential via CYP2D6 as reversible inhibitors in further investigations. Zolpidem revealed a mechanism-based inhibition of CYP2D6.

*Conclusions:* Amitriptyline, MDMA and zolpidem showed a distinct inhibitory potency towards EDDP formation via CYP3A4 and CYP2D6, implicating a decreased conversion and an increased AUC of methadone. Further investigations, e.g. approaches involving relative activity factors, are planned to refine and extend the present results. Nevertheless, a consideration of the *in vitro* evidence of drug-methadone interaction should help to improve both patient care during maintenance treatment as well as the interpretation of toxicological findings.

## 1. Einleitung

Methadon ist weltweit das am häufigsten eingesetzte Substitutionsmittel zur medikamentösen Behandlung Opiatabhängiger und besitzt eine breite Akzeptanz [2, 18]. Der Wirkstoff hat nach Bekanntwerden zahlreicher Methadon-assoziierter Todesfälle etwas von seiner Attraktivität eingebüßt [1, 3-5, 15, 20]. Diese Todesfälle traten in der Einstellungsphase oder im Zusammenhang mit sog. take-home Vergaben, überwiegend jedoch in Kombination mit illegalen Drogen oder weiteren Medikamenten, auf [9, 18, 19]. Obwohl Interaktionen bei Opiatabhängigen und polytoxikomanen Personen häufiger beobachtet werden, sind die Inzidenz und das Ausmaß der klinischen oder toxikologischen Bedeutung unklar. Wechselwirkungen auf pharmakokinetischer Ebene verändern die Konzentration des Interaktionspartners im Blut, wobei relevante Interaktionen oft an den Cytochrom P450 Enzymen (CYP) stattfinden [12].

Es ist bereits länger bekannt, dass Methadon vorrangig in der Leber über CYP3A4 demethyliert wird, und anschließend spontan durch intramolekulare Kondensation zum EDDP zyklisiert, das den wesentlichen, allerdings pharmakologisch inaktiven Metaboliten des Methadons darstellt [2,7,10,16,17,22]. Erst vor kurzem wurde erkannt, dass auch CYP2B6 und CYP2C19 diese Umsetzung maßgeblich katalysieren, und erste Hinweise deuten auf eine Beteiligung von CYP1A2 hin [8]. Die Datenlage zu CYP2D6 ist kontrovers. Es wurden sowohl ein Abbau als auch eine Inhibition des Substratumsatzes bzw. keine Beteiligung des Enzyms an der Biotransformation aufgezeigt [2,23].

Ziel der Untersuchungen war a) zu klären, welche CYPs an der N-De-methylierung von Methadon beteiligt sind und b) erste orientierende Experimente zur Hemmung der Biotransformation von Methadon durch Drogen und Arzneimittel durchzuführen.

## **2. Material und Methoden**

### *2.1 Supersomes und Chemikalien*

Für die Untersuchungen wurden die folgenden cDNA-klonierten CYPs verwendet: CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 und CYP3A4, einschließlich Kontrollmikrosomen sowie NADPH-regenerating solution A und B (Natutec, Frankfurt). Methadonhydrochlorid, Amitriptylin, Atomoxetin, Buprenorphin, Citalopram, Clobazam, Clozapin, Methylenedioxyamphetamin (MDMA), Nikotin, Zolpidem und Zopiclon wurden von Sigma/Aldrich (Steinheim) bezogen. Die Bezugsquelle für Standardlösungen von deuteriertem und undeuteriertem Methadon und EDDP sowie von EMDP war LGC Promochem (Wesel); Methanol (HPLC-Qualität), Essigsäure, Ethylacetat, Acetonitril (HPLC-Qualität) und Ammoniumacetat waren von Roth (Karlsruhe).

### *2.2 Versuchsdesign*

Zunächst wurde untersucht, welche Enzyme am Stoffwechsel des Methadons beteiligt sind und die kinetischen Kerndaten ( $K_m$ : Michaelis-Menten Konstante,  $V_{max}$ : maximale Reaktionsgeschwindigkeit) ermittelt (Sigma Plot 9.0, Systat Software, Point Richmond, CA, USA). Anschließend wurden bisher nicht untersuchte, potenzielle Interaktionspartner anhand von Urinauswertungen (Immunoassay auf gängige Betäubungsmittel, Hochdruckflüssigkeitschromatographische Übersichtsanalyse) und Auskünften von Patienten einer großen, regionalen Methadon-Schwerpunktpraxis ausgewählt. Nach Wahl der potenziellen Inhibitoren Amitriptylin, Atomoxetin, Buprenorphin, Citalopram, Clobazam, Clozapin, MDMA, Nikotin, Zolpidem und Zopiclon wurde das Ausmaß ihrer Hemmung bestimmt. Um auf eine metabolisch aktivierte Inhibition zu prüfen, wurden Versuchsreihen ohne bzw. mit einem Präinkubationsschritt durchgeführt. Lag eine wesentliche Hemmung des Methadonabbaus vor, wurde der Inhibitor weiter durch Bestimmung von  $IC_{50}$  (Inhibitorkonzentration bei 50% der Kontrollaktivität),  $K_i$

(Inhibitionskonstante),  $K_I$  (Inhibitorkonzentration bei halbmaximaler Inaktivierungsrate der metabolisch-aktivierten Enzymhemmung) und  $k_{inact}$  (Inaktivierungskonstante der metabolisch-aktivierten Enzymhemmung) charakterisiert. Schließlich wurde versucht, anhand der Daten eine Abschätzung des Risikos im Sinne einer Erhöhung der area under the curve (AUC) bei kombinierter Einnahme vorzunehmen.

### 2.3 Probenaufarbeitung und Bestimmung von Methadon und seinen Metaboliten

Alle Kalibrationsstandards und Inkubationsansätze wurden nach Zugabe der internen Standardsubstanzen und Boratpuffer pH 8,5 mit Ethylacetat extrahiert. Der Extrakttrockenrückstand wurde in 50  $\mu$ L Fließmittel aufgenommen, davon wurden 5  $\mu$ L in ein LC-MS/MS System injiziert (Ionenquelle: TurboIon Spray, Tandem-Massenspektrometer: API 356, Applied Biosystems, Toronto, Kanada; Perkin Elmers series 200 Probengeber und Pumpe, Perkin Elmer, Überlingen). Die Trennung erfolgte an einer Luna C18 Säule (innerer Durchmesser: 2 mm, Länge 15 cm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) mit Ammoniumacetatpuffer pH 3,2/Methanol/Acetonitril (25:15:60 Vol%) als Fließmittel bei einer Flussgeschwindigkeit von 280  $\mu$ L/min. Das Eluat wurde im positive mode ionisiert, und die Analyte wurden im multiple reaction monitoring mode detektiert (Tab. 1). Die Methode war unter Berücksichtigung möglicher Matrixeffekte validiert worden [2, 13].

Tab. 1: Massenübergänge zur Quantifizierung von Methadon, EDDP und EMDP

| Analyt                  | Pseudomolekularion [M + H <sup>+</sup> ] | Fragmention |
|-------------------------|--|-------------|
| Methadon                | 310,3                                    | 265,1       |
| Methadon-d <sub>9</sub> | 319,3                                    | 268,1       |
| EDDP                    | 278,1                                    | 234,2       |
| EDDP-d <sub>3</sub>     | 281,3                                    | 234,2       |
| EMDP                    | 264,1                                    | 219,9       |

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Neben CYP3A4 katalysierten auch CYP2B6, CYP2C19 und CYP2D6 die Bildung von EDDP aus Methadon (Tab. 2), während EMDP nicht oder nur im Bereich der Nachweisgrenze (0,3 ng/mL) in den Inkubationsansätzen nachgewiesen werden konnte.

Für jeden potenziellen Inhibitor wurden zunächst Versuchsreihen mit Inhibitorkonzentrationen von  $\frac{1}{2}$ , 1 und 2  $K_m$ , entsprechend dem  $K_m$ -Wert des jeweiligen Enzyms, angesetzt. In Tabelle 3 sind die Substanzen (Inhibitorkonzentration 2  $K_m$ ) dargestellt, die die N-Demethylierung von Methadon deutlich hemmten.

Tab. 2: Michaelis-Menten-Konstante  $k_m$ , maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $V_{max}$  und Enzymkinetik der Abbau von Methadon beteiligten CYPs

| Enzym   | $K_m$ [ $\mu\text{M}$ ] | $V_{max}$ [ $\mu\text{mol}/\text{min}/10 \text{ pmol Enzym}$ ] | Kinetik          |
|---------|-------------------------|--|------------------|
| CYP2B6  | 69,6                    | $6,66 \cdot 10^{-1}$   | Michaelis-Menten |
| CYP2C19 | 72,7                    | $1,92 \cdot 10^{-1}$   | Substrathemmung  |
| CYP2D6  | 2,98, 704,3             | $2,30 \cdot 10^{-3}$ , $4,80 \cdot 10^{-3}$                    | biphasisch       |
| CYP3A4  | 13,3, 383,3             | $1,36 \cdot 10^{-2}$ , $5,28 \cdot 10^{-2}$                    | biphasisch       |

Buprenorphin und Amitriptylin hemmten die Umsetzung durch CYP3A4 stark, und bei Zolpidem war sogar eine sog. mechanism based Inhibition zu vermuten. Die metabolisch-aktivierte Hemmung, der meist die feste Bindung eines Inhibitorproduktes an das Enzym zugrunde liegt, führt zu bedeutenden, schwerwiegenden Arzneimittelinteraktionen [2, 21]. Amitriptylin hemmte den Methadonumsatz auch über CYP2D6, ebenso wie MDMA. Bei CYP2B6 zeigte sich ein deutlicher Effekt für Atomoxetin, ebenso bei CYP2C19, bei dem Amitriptylin erneut eine Hemmwirkung zeigte.

Tab. 3: Reaktionsgeschwindigkeit (EDDP-Bildung) relativ zur Geschwindigkeit ohne Inhibitor [%] bei  $2 \cdot K_m$ ; fett: potenzielle Inhibitoren, kursiv: potenzieller metabolisch-aktivierter Inhibitor

| CYP  | Inhibitor           | ohne Präinkubation | mit Präinkubation |
|------|---------------------|--------------------|-------------------|
|      |                     | $2 \cdot K_m$      | $2 \cdot K_m$     |
| 3A4  | <b>Buprenorphin</b> | <b>8,5</b>         | <b>12,6</b>       |
|      | <i>Zolpidem</i>     | <i>15,5</i>        | <i>9,2</i>        |
|      | <b>Amitriptylin</b> | <b>9,8</b>         | <b>8,1</b>        |
| 2B6  | Atomoxetin          | 36,7               | 10,9              |
| 2C19 | <b>Amitriptylin</b> | <b>21,6</b>        | <b>8,7</b>        |
|      | Atomoxetin          | 11,6               | 4,1               |
| 2D6  | Citalopram          | 41,9               | 32,3              |
|      | Clozapin            | 43,0               | 31,0              |
|      | Amitriptylin        | 23,6               | 38,0              |
|      | <b>MDMA</b>         | <b>14,2</b>        | <b>13,8</b>       |

Zur genaueren Charakterisierung der Interaktionen wurden für die 4 potenziellen Interaktionspartner Amitriptylin, Buprenorphin, MDMA und Zolpidem weitere kinetische Konstanten ermittelt.

Der  $IC_{50}$ -Wert kann einen ersten Anhaltspunkt für Interaktionen liefern, und ist bei metabolisch-aktivierter Hemmung nach Präinkubation kleiner als ohne Präinkubation [21]. Von den gewählten Kombinationen war dies für Zolpidem bezüglich CYP3A4 der Fall. Daher erfolgte eine weitere Bestimmung von  $K_i$  und  $k_{inact}$  über den Kitz-Wilson plot (Tab. 4) [2, 11, 14]. Für die anderen Substanzen ergaben sich keine Hinweise auf eine metabolisch-aktivierte Enzymhemmung. Um die Hemmung näher zu charakterisieren, wurde die Inhibitionskonstante  $K_i$

bestimmt, ein Maß für die Stärke der Bindung des Inhibitors an das Enzym. Je kleiner  $K_i$ , umso stärker ist die Bindung und damit auch die Hemmung [6, 21]. Danach ist MDMA ein starker, potenzieller Inhibitor gegenüber CYP2D6; und Amitriptylin hemmt den Methadonabbau über CYP2D6 stärker als über CYP3A4 (Tab. 4).

Tab. 4:  $IC_{50}$ - und  $K_i$ -Werte für Amitriptylin, Buprenorphin und MDMA sowie zusätzlich  $K_i$ - und  $k_{inact}$ -Werte für Zolpidem, MW: arithmetischer Mittelwert, SD: Standardabweichung

| Inhibitor           | CYP                | $IC_{50}$ [ $\mu$ M],<br>n=2 | $K_i$ [ $\mu$ M], n=4,<br>MW $\pm$ SD | $K_i$ [ $\mu$ M]; $k_{inact}$ [ $min^{-1}$ ],<br>n=4 |
|---------------------|--------------------|------------------------------|---------------------------------------|--|
| <b>Amitriptylin</b> | 3A4                | 32,4                         | 12,9 $\pm$ 1,5                        |  |
|                     | 2D6                | 9,5                          | 3,5 $\pm$ 0,4                         |  |
| <b>Buprenorphin</b> | 3A4                | 3,3                          | 2,5 $\pm$ 0,1                         |  |
| <b>MDMA</b>         | 2D6                | 1,5                          | 0,2 $\pm$ 0,1                         |  |
| <b>Zolpidem</b>     | 3A4                |                              |                                       |  |
|                     | ohne Präinkubation | 34,9                         | 61,1 $\pm$ 3,3                        |  |
| mit Präinkubation   |                    | 9,2                          |                                       | $K_i$ : 11,1, $k_{inact}$ : 0,0292                   |

Es gibt 2 Möglichkeiten zur weitergehenden Interpretation der Daten in Tabelle 4. Einerseits können bereits bekannte Konstanten von Arzneistoffkombinationen und Auswirkungen auf den Menschen zum Vergleich herangezogen werden. Andererseits kann eine erhöhte Belastung durch Methadon in Gegenwart des Inhibitors mathematisch abgeschätzt werden [6, 21]. Wendet man z.B. die in Abbildung 1 aufgeführten Gleichung an, so ergeben sich für Buprenorphin und Amitriptylin in therapeutischen Konzentrationen keine wesentlichen Änderungen der AUC von Methadon, während sie in Kombination mit MDMA bei Plasmakonzentrationen von 100-350 ng/mL bereits um das 3,3-8,9 fache ansteigen kann.

$$\frac{AUC_I}{AUC} = \frac{CL}{CL_I} = \frac{\frac{V_{max}}{[S] + K_m}}{\frac{V_{max}}{[S] + K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}} = 1 + \frac{[I]}{K_i}$$

Abb. 1: Veränderung der AUC eines Substrats durch einen reversiblen Inhibitor; AUC: area under the curve,  $AUC_I$ : area under the curve in Anwesenheit eines Inhibitors, CL: Clearance,  $CL_I$ : Clearance in Anwesenheit eines Inhibitors, [S]: Substratkonzentration, [I]: Inhibitor-Konzentration,  $V_{max}$ : maximale Reaktionsgeschwindigkeit,  $K_m$ : Michaelis-Menten-Konstante,  $K_i$ : Inhibitionskonstante

Durch metabolisch-aktivierte Hemmstoffe wird das natürliche Gleichgewicht zwischen Enzymneubildung und -abbau in Richtung einer negativen Enzyimbilanz verschoben, so dass dann die *in vivo* Abbauraten  $k_{degrad}$  des Enzyms berücksichtigt werden muss [14, 21]. Wendet man die in Abbildung 2 gezeigte Gleichung

chung an, so können z.B. bereits Plasmakonzentrationen an Zolpidem von 80-200 ng/mL die AUC für Methadon um das 2-3fache erhöhen.

$$\frac{AUC_I}{AUC} = \frac{CL}{CL_I} = \frac{k_{\text{degrad}} + \left( \frac{[I] \cdot k_{\text{inact}}}{[I] + K_I} \right)}{k_{\text{degrad}}}$$

Abb. 2: Veränderung der AUC eines Substrats durch einen metabolisch-aktivierten Inhibitor; AUC: area under the curve, AUC<sub>I</sub>: area under the curve in Anwesenheit eines Inhibitors, CL: Clearance, CL<sub>I</sub>: Clearance in Anwesenheit eines Inhibitors, [I]: Inhibitorkonzentration, k<sub>degrad</sub>: in vivo Abbaurrate des Enzyms, k<sub>inact</sub>: Inaktivierungskonstante der metabolisch-aktivierten Hemmung, K<sub>I</sub>: Inhibitorkonzentration bei halbmaximaler Inaktivierungsrate der metabolisch-aktivierten Hemmung

#### 4. Abschließende Bemerkungen

Nach den vorliegenden Ergebnissen sind Amitriptylin, Buprenorphin, MDMA und Zolpidem in der Substitutionspraxis mit Methadon als problematische Kombinationspartner einzuschätzen. Interaktionen sind bereits bei therapeutischen Dosen oder einer Konsumeinheit zu erwarten. Besondere Bedeutung kommt der metabolisch-aktivierten Hemmung durch Zolpidem zu. Untersuchungen, um die Ergebnisse in einen Zusammenhang zur gesamten Biotransformation in der Leber zu stellen sowie zur weiteren Charakterisierung der Hemmung des Methadonabbaus durch die anfänglich ebenfalls getesteten Substanzen Atomoxetin, Clobazam, Clozapin und Citalopram werden aktuell durchgeführt. Diese Wirkstoffe stellen wichtige, therapeutische Optionen zur Behandlung von Begleiterkrankungen bei Substitutionspatienten dar.

Die vorgestellten und weiterführenden Versuchsansätze bieten die Möglichkeit, potenzielle Interaktionen durch Arznei- oder Betäubungsmittel bei Substitutionspatienten im Vorfeld abzuklären, ohne risikoreiche und ethisch bedenkliche Probandenversuche durchführen bzw. auf selten ausreichend belegte Kasuistiken zurückgreifen zu müssen. Solche Untersuchungen können dazu beitragen, im forensischen Bereich die Beurteilungsgrundlage bei Kombinationsintoxikationen zu verbessern, und, im klinischen Bereich, potenziell gefährliche Kombinationen zu vermeiden.

#### Literatur

- [1] Ballesteros MF, Budnitz DS, Sanford CP, Gilchrist J, Agyekum GA, Butts J (2003) Increase in deaths due to methadone in North Carolina. JAMA 290: 40
- [2] Bomsien S (2006) In vitro Untersuchungen zur Wechselwirkung psychotroper Substanzen mit Methadon und Buprenorphin. Dissertation, Universität Heidelberg

- [3] Brugal MT, Domingo-Salvany R, Barrio G, Garcia de Olalla P, de la Fuente L (2005) Evaluating the impact of methadone maintenance programmes on mortality due to overdose and aids in a cohort of heroin users in Spain. *Addiction* 100: 981-989
- [4] Buster MC, van Brussel GH, van den Brink W (2002) An increase in overdose mortality during the first 2 weeks after entering or re-entering methadone treatment in Amsterdam. *Addiction* 97: 993-1001
- [5] Cairns A, Roberts IS, Benbow EW (1996) Characteristics of fatal methadone overdose in Manchester, 1985-1994. *BMJ* 313: 264-265
- [6] Dixon M (1953) The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J* 55: 170-171
- [7] Foster DJR, Somogyi AA, Coccia CP (1999) Methadone N-demethylation in human liver microsomes: lack of stereoselectivity and involvement of CYP3A4. *Br J Clin Pharmacol* 47: 403-412
- [8] Gerber JG, Rhodes RJ, Gal J (2004) Stereoselective metabolism of methadone N-demethylation by cytochrome P450 2B6 and 2C19. *Chirality* 16: 36-44
- [9] Gölz J (2000) Nebenkonsum und Beendigung der Substitution, Behandlungsabbruch und Konsequenzen. In: Jellinek C, Westermann B, Bellmann GU (Hrsg.) *Beigebrauch*. Deutscher Studien Verlag, Weinheim, S. 43-49
- [10] Iribarne C, Berthou F, Baird S, Dreano Y, Picart D, Bail JP, Beaune P, Menez JF (1996) Involvement of cytochrome P450 3A4 enzyme in the N-demethylation of methadone in human liver microsomes. *Chem Res Toxicol* 9: 365-373
- [11] Kitz R, Wilson IB (1962) Esters of methanesulfonic acid as irreversible inhibitors of acetylcholinesterase. *J Biol Chem* 237: 3245-3246
- [12] König F (2000) Einführung: Bedeutung der Interaktionen während der Psychopharmakotherapie. In: König F, Kaschka WP (Hrsg.) *Interaktionen und Wirkmechanismen ausgewählter Psychopharmaka*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 1f
- [13] Matuzewski BK, Constanzer LM, Chavez-Eng CM (2003) Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem* 75: 1031-1037
- [14] Mayhew BS, Jones DR, Hall SD (2000) An in vitro model for predicting in vivo inhibition of cytochrome P450 3A4 by metabolic intermediate complex formation. *Drug Metab Dispos* 28: 1031-1037
- [15] Milroy CM, Forrest AR (2000) Methadone deaths: a toxicological analysis. *J Clin Pathol* 53: 277-281
- [16] Moody DE, Alburges ME, Parker RJ, Collins JM, Strong JM (1997) The involvement of cytochrome P450 3A4 in the N-demethylation of L-alpha-acetylmethadol (LAAM), nor-LAAM, and methadone. *Drug Metab Dispos* 25: 1347-1353
- [17] Oda Y, Kharasch ED (2001) Metabolism of methadone and levo-alpha-acetylmethadol (LAAM) by human intestinal cytochrome P450 3A4 (CYP3A4): potential contribution of intestinal metabolism to presystemic clearance and bioactivation. *J Pharmacol Exp Ther* 298: 1021-1032
- [18] Pallenbach E (2002) Segen oder Sorgenkind? Die Substitutionstherapie bei opiatabhängigen Patienten. *Pharm Unserer Zeit* 31: 90-95
- [19] Pirnay S, Borron SW, Giudicelli CP, Tournéau J, Baud FJ, Ricordel I (2004) A critical review of the causes of death among post-mortem toxicological investigations: analysis of 34 buprenorphine-associated and 35 methadone-associated deaths. *Addiction* 99: 978-988

- [20] Shah N, Lathrop SL, Landen MG (2005) Unintentional methadone-related overdose death in New Mexico (USA) and implications for surveillance, 1998-2002. *Addiction* 100: 176-188
- [21] Venkatakrishnan K, von Moltke LL, Obach RS, Greenblatt DJ (2003) Drug metabolism and drug interactions: applications and clinical value of in vitro models. *Curr Drug Metab* 4: 423-459
- [22] Wang JS, De Vane CL (2003) Involvement of CYP3A4, CYP2C8, and CYP2D6 in the metabolism of (R)- and (S)-methadone in vitro. *Drug Metab Dispos* 31: 742-747
- [23] Wu D, Otton SV, Sproule BA, Busto U, Inaba T, Kalow W, Sellers EM (1993) Inhibition of human cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) by methadone. *Br J Clin Pharmacol* 35: 30-34

Prof. Dr. Gisela Skopp  
Dr. Stephanie Bomsien  
Institut für Rechtsmedizin und Verkehrsmedizin,  
Ruprecht-Karls Universität Heidelberg  
Voßstr. 2, D-69115 Heidelberg  
E-Mail: gisela\_skopp@med.uni-heidelberg.de