

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

## Dissertation

Einfluss von Haplotypen des  
MDR1-Gens (Multidrug Resistance Gene) auf  
die Pharmakokinetik von Fexofenadin und  
Digoxin bei gesunden Probanden

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Stefan Wudel  
aus Bonn

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. I. Roots  
2. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. I. Cascorbi  
3. Priv.-Doz. Dr. med. Th. Gerloff

Datum der Promotion: 23.09.2007

# **Widmung**

Für meine Mutter.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Transportproteine . . . . .	1
1.2	P-Glykoprotein, der ABC-Transporter . . . . .	2
1.3	Modellsubstrate für P-Glykoprotein . . . . .	3
1.4	MDR1-Polymorphismen . . . . .	4
1.4.1	Pharmakokinetische Effekte . . . . .	5
1.5	Zielsetzung . . . . .	6
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>7</b>
2.1	Studienteilnehmer . . . . .	7
2.1.1	Einschlusskriterien . . . . .	7
2.1.2	Ausschlusskriterien . . . . .	7
2.1.3	Laborparameter und körperliche Voruntersuchung . . . . .	9
2.2	Studienablauf . . . . .	9
2.2.1	Pharmakokinetik Fexofenadin, Einzeldosis . . . . .	10
2.2.2	Pharmakokinetik Digoxin, Einzeldosis . . . . .	11
2.2.3	Pharmakokinetik Digoxin, Mehrfachdosis . . . . .	11
2.3	Genotypisierung der MDR1-Allele . . . . .	11
2.3.1	DNA-Extraktion . . . . .	12
2.3.2	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) . . . . .	12
2.3.3	Agarose Gel-Elektrophorese . . . . .	17
2.3.4	Real-Time-PCR auf dem LightCycler® System . . . . .	19
2.4	Analytik Fexofenadin/Digoxin . . . . .	21
2.5	Statistische Berechnungen . . . . .	21
2.6	Berechnung der Haplotypen/Genotypen . . . . .	22
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>23</b>
3.1	Genotyp-Verteilung bei 1005 gesunden Probanden . . . . .	23
3.2	Demografische Daten der Probanden . . . . .	25
3.3	Pharmakokinetik von Fexofenadin nach Einmalgabe . . . . .	25
3.4	Pharmakokinetik nach einmaliger Digoxingabe . . . . .	27

3.5	Pharmakokinetik von Digoxin nach Mehrfachgabe . . . . .	29
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>31</b>
4.1	Häufigkeiten und Allelverteilung der SNP 2677G>T und 3435C>T . . . . .	31
4.1.1	Ethnische Unterschiede . . . . .	32
4.2	Funktionalität der SNP 2677G>T und 3435C>T . . . . .	33
4.2.1	MDR1-mRNA-Expression . . . . .	33
4.2.2	MDR1-mRNA-Stabilität . . . . .	34
4.2.3	Transportfunktion des P-Glykoprotein . . . . .	34
4.3	Funktionalität der untersuchten MDR1-Haplotypen . . . . .	35
4.4	Fexofenadin-Kinetik-Vergleich mit anderen Studien . . . . .	36
4.5	Digoxin-Kinetik-Vergleich mit anderen Studien . . . . .	38
4.6	Interpretation der eigenen Pharmakokinetiken . . . . .	39
4.6.1	Einflussfaktoren und Störfaktoren . . . . .	40
4.7	Schlussfolgerungen . . . . .	41
4.8	Zusammenfassung . . . . .	42

# Abbildungsverzeichnis

1.1	P-Glykoprotein . . . . .	2
2.1	Restriktionsverdau Exon 21 . . . . .	15
2.2	Restriktionsverdau Exon 26 . . . . .	16
2.3	Schmelzkurve . . . . .	20
3.1	Pharmakokinetik Fexofenadin, Einfachgabe . . . . .	26
3.2	Pharmakokinetik Digoxin, Einfachgabe . . . . .	28
3.3	$t_{\max}$ -Werte nach Digoxin Einfachgabe . . . . .	29
3.4	Pharmakokinetik Digoxin, Mehrfachgabe . . . . .	30

# Tabellenverzeichnis

2.1	Studienablauf . . . . .	10
2.2	Verwendete Primersequenzen . . . . .	13
2.3	PCR-Ansätze der SNP 2677G>T/A und 3435C>T . . . . .	14
2.4	Temperaturverlauf der PCR . . . . .	14
2.5	RFLP Ansätze . . . . .	14
2.6	Ansatz des Tris-Borat-EDTA-Puffers (10xTBE) . . . . .	18
2.7	Ansatz des Markers für PCR-Produkte . . . . .	18
2.8	Restriktionsmuster der RFLP und Laufzeiten der Gelelektrophorese . . . . .	18
2.9	Basensequenzen der Hybridisierungssonden . . . . .	19
2.10	PCR-Ansatz SNP 3435C>T beim LightCycler . . . . .	20
2.11	Temperaturprofil der LightCycler-Amplifikation . . . . .	21
2.12	Temperaturprofil der Schmelzkurve . . . . .	21
3.1	Häufigkeit von Allelen und SNP 2677G>T/A, 3435C>T . . . . .	23
3.2	Häufigkeit der verschiedenen Haplotypen . . . . .	24
3.3	Häufigkeit der kombinierten MDR1-Genotypen . . . . .	24
3.4	Demografische Daten der Probanden . . . . .	25
3.5	Pharmakokinetik Fexofenadin, Einfachgabe . . . . .	26
3.6	Pharmakokinetik Digoxin, Einfachgabe . . . . .	28
3.7	Pharmakokinetik von Digoxin im Fließgleichgewicht . . . . .	30
4.1	Häufigkeiten der MDR1-Polymorphismen 2677G>T/A und 3435C>T . . . . .	32
4.2	Übersicht Studienergebnisse MDR1-mRNA- bzw. P-Gp-Expression. . . . .	34
4.3	Übersicht Studienergebnisse Fexofenadin . . . . .	37
4.4	Übersicht Studienergebnisse Digoxin . . . . .	39

# Abkürzungen

ABC	Adenosine Binding Cassette
ALAT	Alanin-Amino-Transferase
AP	Alkalische Phosphatase
ASAT	Aspartat-Amino-Transferase
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area Under Curve
BMI	Body Mass Index
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
$C_{\max}$	Maximalkonzentration
Calcein-AM	Calcein-Azetoxymethyl-Ester
CI	Confidence Interval
CK	Kreatinin Kinase
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
HBsAg	Hepatitis-B-Virus-Oberflächenantigen
HCV	Hepatitis-C-Virus
HIV	Human Immunodeficiency Virus
kDa	Kilodalton

MCHC	Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration
MCV	Mean Corpuscular Volume
MDR1	Multidrug Resistance Gen 1
n.b.	nicht bestimmt
n.s.	nicht signifikant
OATP	Organische-Anionen-Transport-Polypeptid
P-gp	P-Glykoprotein
PCR	Polymerase Chain Reaction
PTT	Partial Thromboplastin Time
RFLP	Restriktionsfragmentlangenpolymorphismus
SLCO	Solute Carrier Organic Anion Transporter
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
$t_{\max}$	Zeitpunkt der Maximalkonzentration
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Transportproteine

Die Wirksamkeit eines Medikamentes ergibt sich aus seiner Pharmakokinetik (Absorption, Verteilung, Metabolisierung, Elimination) und Pharmakodynamik (Effekt am gewünschten Zielorgan bzw. Gewebe). Neben den physikochemischen Eigenschaften eines Wirkstoffs wie beispielsweise Fettlöslichkeit, Partikelgröße oder pK-Wert, spielen Transportproteine in den verschiedenen Geweben wie z. B. Intestinum, Leber und Niere bei diesen Prozessen eine wichtige Rolle.

Transportproteine sind häufig multifunktional und transportieren ein breites Spektrum an endogenen und exogenen Substanzen [Ho and Kim, 2005]. Sie können in zwei Kategorien entsprechend ihrer Transportrichtung aufgeteilt werden. Influx-Transporter erleichtern die Aufnahme von Substanzen in das Zellinnere. In der Leber transportiert OATP1B1 (Organische-Anionen-Transport-Polypeptid) sowohl endogene Substanzen wie Gallensäuren, Bilirubin und konjugierte Hormone als auch exogene Substanzen wie Pravastatin, Methotrexat und Rifampin ins Zellinnere [Ho und Kim, 2005]. Efflux-Transporter befördern ihre Substrate aus dem Zellinneren in den Extrazellulärraum. Dieser gerichtete Transport findet häufig gegen einen hohen Konzentrationsgradienten unter dem Verbrauch von ATP statt. Zu den bekanntesten Efflux-Transportern gehört das P-Glykoprotein. Es gehört zur Familie der ABC-Transporter (Adenosine Binding Casette, Subfamilie B), die anhand von Sequenz-Homologien in sieben Klassen bzw. Subfamilien (A–G) unterteilt werden. Im menschlichen Genom sind 48 verschiedene ABC-Transporter beschrieben.

Häufig entscheidet die Anordnung verschiedener Transporter mit unterschiedlicher Transportrichtung und überlappenden Substratspezifitäten innerhalb eines Gewebes oder Organs wie z. B. der Blut-Hirn-Schranke, der Leber oder der Niere über das Ausmaß und die Richtung des Transportes einer Substanz [Ho and Kim, 2005].

## 1.2 P-Glykoprotein, der ABC-Transporter

P-Glykoprotein gehört zur Klasse ABCB1. Es besteht aus zwei miteinander verbundenen homologen Hälften, welche jeweils sechs transmembranäre Domänen und eine ATP-Bindungsstelle einschliessen. Es handelt sich um ein symmetrisch aufgebautes, phosphoryliertes und glykosyliertes Molekül mit einem Molekulargewicht von 170 kDa, bestehend aus 1280 Aminosäuren [Ambudkar et al., 2003] (s. Abb. 1.1). Kodiert wird P-Glykoprotein durch das auf dem langen Arm des Chromosoms 7 liegende MDR1-Gen (Multidrug Resistance Gen1).

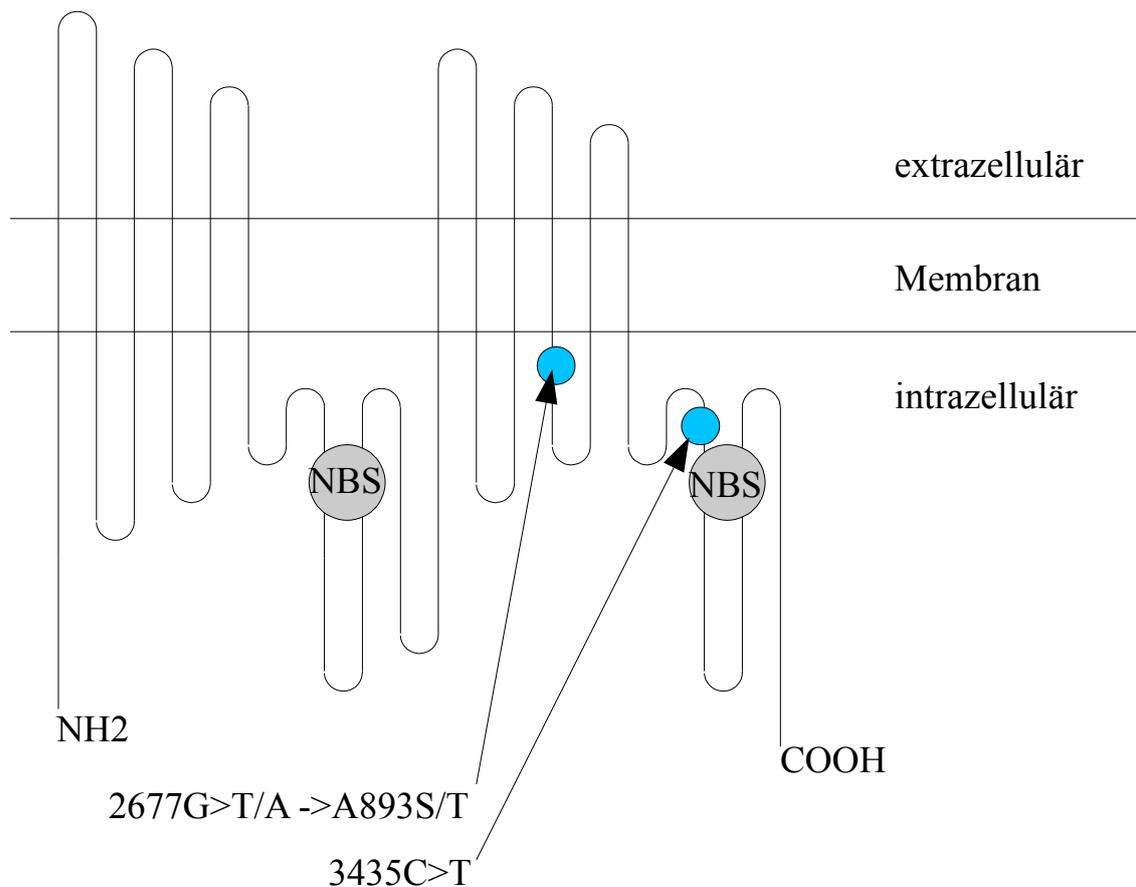


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des P-Glykoproteins mit den Lokalisationen der SNP 2677G>T/A und 3435C>T. Modifiziert nach [Verschaagen et al., 1999].

NBS: *nucleotide binding site*, ATP-Bindungsstelle.

P-Glykoprotein transportiert bevorzugt amphiphile, kationische Verbindungen mit einem Molekulargewicht zwischen 250 und 1900 Da. Der Transport ist von intracellulär nach extracellulär gerichtet. Spezielle Anordnungen von Elektronen-Donor-Gruppen bilden wahrscheinlich die Voraussetzung, dass ein Substrat über die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen von P-Glykoprotein gebunden und transportiert werden kann [Seelig, 1998].

P-Glykoprotein transportiert ein weites Spektrum verschiedener Substrate. Hierzu gehören u.a.

Chemotherapeutika, Antihypertensiva, Antiallergika, Antibiotika, Immunsuppressiva, Neuroleptika, nichtsteroidale antientzündliche Substanzen und Glukokortikoide. Einige Substrate inhibieren oder induzieren P-Glykoprotein, wodurch es zu pharmakologischen Wechselwirkungen bei Gabe mehrerer Substanzen kommen kann. Viele von P-Glykoprotein transportierte Substanzen sind auch Substrate des Cytochrom-P450-Systems, insbesondere der CYP3A-Familie [Kim et al., 1999].

P-Glykoprotein wird in den Organen Leber, Niere, Nebenniere, Kolon, Jejunum, Magen, Lunge, zerebraler Kortex, Zerebellum, Rückenmark, Speicheldrüsen, Ovarien, Uterus, Milz, Haut und der Plazenta exprimiert [Thiebaut et al., 1987]. Es wurde ausserdem in Endothelzellen zerebraler und testikulärer KapillargefäÙe nachgewiesen [Cordon-Cardo et al., 1989]. Die Expression von intestinalem P-Glykoprotein scheint im Duodenum und oberen Jejunum geringer ausgeprägt zu sein als im Ileum und Kolon [Fojo et al., 1987]. P-Glykoprotein findet sich häufig auf der apikalen Zellmembran der Epithelien.

Die Gewebeverteilung von P-Glykoprotein innerhalb des Organismus ermöglicht Rückschlüsse auf seine funktionelle Bedeutung. Im Darmepithel befindet es sich in dem Teil der Zellmembran, der dem Lumen zugewandt ist. Es transportiert seine Substrate aus dem Intrazellularraum in das angrenzende Lumen. Dadurch hat es eine protektive Funktion, indem es im Dünndarm die Resorption toxischer Substanzen verringert [Sparreboom et al., 1997]. In der Niere unterstützt P-Glykoprotein im Bürstensaum des proximalen Tubulussystems die Elimination von Substanzen durch deren Sekretion in den Primärurin. In der Leber werden Substanzen über P-Glykoprotein in die Gallenkanälchen transportiert. Eine wichtige Barrierefunktion übt P-Glykoprotein in der Blut-Hirn-Schranke aus. P-Glykoprotein wird in der Plazenta auf der maternalen Seite der Synzyotrophoblasten exprimiert und behindert den Übertritt von Wirkstoffen in den fetalen Kreislauf.

P-Glykoprotein beeinflusst als Transporter und durch seine Verteilung in den verschiedenen Geweben die orale Bioverfügbarkeit, die Absorption, die Verteilung und die Elimination seiner Substrate. Da es in vielen Gewebe- und Organschranken sowie in Zellen mit Ausscheidungsfunktion exprimiert wird, kommt ihm eine wichtige Funktion in der Abwehr von Schadstoffen zu.

### 1.3 Modellsubstrate für P-Glykoprotein

In der vorliegenden Studie wurden Fexofenadin und Digoxin als Testsubstanzen für eine Kinetik nach Einfachgabe verwendet. Digoxin diente auch als Testsubstanz für eine Kinetik nach Mehrfachgabe. Beide Substanzen können in Tablettenform (oral) eingenommen werden. Sie werden nur gering metabolisiert und zum größten Teil unverändert ausgeschieden.

Fexofenadin ist ein nicht sedierendes Antihistaminikum aus der Gruppe der spezifischen  $H_1$ -Rezeptoren-Antagonisten. Fexofenadin wird schnell resorbiert. Die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Plasmakonzentration ( $t_{max}$ ) beträgt ungefähr eine Stunde [Russell et al., 1998]. Die orale Bioverfügbarkeit liegt bei ca. 30 %. Der Wirkstoff passiert nicht die Blut-Hirn-Schranke. Fexofenadin wird biexponentiell mit einer terminalen Halbwertszeit von 11 bis 14 Stunden eliminiert [Russell et al., 1998]. Die Kinetik nach Einmal- und Mehrfachapplikation verläuft bei oralen

Tagesdosen bis zu 120 mg dosislinear. Eine Dosis von 240 mg erzeugt einen leicht überproportionalen Anstieg der Fläche unter der Kurve [Robbins et al., 1998]. Fexofenadin wird in unveränderter Form über Faeces (80 %) und Urin (12 %) ausgeschieden. Der hepatische Metabolismus der Substanz liegt unter 5 %. Fexofenadin wurde vielfach als Modells substrat von P-Glykoprotein eingesetzt [Drescher et al., 2002, Yi et al., 2004]. Der Transport von Fexofenadin erfolgt jedoch nicht ausschließlich über diesen Transporter, sondern auch über OATP-C [Cvetkovic et al., 1999].

Herzglykoside wirken primär über die Bindung an die  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ . Die Inhibition der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  führt indirekt zu einer Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^+$ -Konzentration und damit zu einem positiv inotropen Effekt auf die Herzmuskelzelle. Weiterhin wirken Herzglykoside in zentralen Vagus kernen und steigern die Empfindlichkeit von Barorezeptoren [Krum et al., 1995].

Nach [Mooradian, 1988] beträgt die orale Bioverfügbarkeit von Digoxin in Tablettenform 60 % bis 80 %. Die Verteilung von Digoxin erfolgt im wesentlichen in die Arbeits- und Herzmuskulatur und nicht in das Fettgewebe [Mooradian, 1988]. Die Verteilungsphase von Digoxin in die Gewebe dauert vier bis acht Stunden. Die Eliminationshalbwertszeit beträgt ca. 36 Stunden. Digoxin wird durch passive glomeruläre Filtration und aktive tubuläre Sekretion zu etwa 60 % bis 80 % unverändert renal ausgeschieden. Es unterliegt keinem hepatischen Metabolismus [Mooradian, 1988]. Es wird über das MDR1-Produkt P-Glykoprotein und OATP-8 transportiert [de Lannoy and Silverman, 1992]. Zahlreiche pharmakokinetische Interaktionen von Digoxin mit Chinidin, Verapamil, Propofanon, Amiodaron, Rifampicin und Johanniskraut werden über eine Beeinflussung insbesondere des intestinalen P-Glykoproteins erklärt [Johne et al., 1999, Fromm, 2000].

## 1.4 MDR1-Polymorphismen

Neben Umweltfaktoren beeinflussen auch genetische Polymorphismen des MDR-Gens die P-Glykoprotein-Funktion. Polymorphismen einzelner DNA-Nukleotide (SNP, single nucleotide polymorphisms) bilden die häufigsten DNA-Sequenz-Variationen im menschlichen Genom. So führen beispielsweise Polymorphismen im Exon eines Gens zum Austausch von Aminosäuren in der Aminosäuresequenz des exprimierten Proteins. Dies kann zur Änderung der Sekundärstruktur und der Funktion des Proteins führen. Polymorphismen im Promotorabschnitt können die Transkription des Gens beeinflussen.

In einer Untersuchung aller 28 Exons des MDR1-Gens einschliesslich der Promotor-Region und einiger Intron-Exon-Abschnitte wurden zunächst 15 SNP bestimmt, von denen sechs in Exons lagen [Hoffmeyer et al., 2000]. Nachfolgend wurden weitere SNP in einer Gruppe von 461 Probanden deutscher Herkunft beschrieben [Cascorbi et al., 2001]. Die Polymorphismen der Positionen 1236C>T (Exon12), 2777 G>T/A (Exon21) und 3435C>T (Exon26) traten mit jeweils ca. 50 % am häufigsten auf. Das A-Allel der Position 2677 wurde mit ca. 2 % jedoch nur selten nachgewiesen [Cascorbi et al., 2001]. Von den genannten drei Polymorphismen bewirkt lediglich der in der zweiten transmembranen Domäne gelegene Polymorphismus 2677G>T/A den

Austausch einer Aminosäure (Ala893Ser/Thr) im P-Glykoprotein (s. Abb. 1.1). Zwischen den SNP 1236C>T, 2677G>T/A und 3435C>T besteht zudem ein hohes Kopplungsungleichgewicht [Kim et al., 2001, Johne et al., 2002]. Die Häufigkeiten der verschiedenen genetischen Varianten weisen zum Teil erhebliche interethnische Unterschiede auf.

### 1.4.1 Pharmakokinetische Effekte

Die funktionelle Bedeutung des MDR1-Genotyps für die Bioverfügbarkeit von Arzneimitteln ist nicht im gleichen Maße geklärt, wie es zum Beispiel für die Cytochrom-P450-Enzyme der Fall ist, da die Ergebnisse einzelner Studien teilweise widersprüchlich ausfallen.

In einer retrospektiven Studie wurde eine Korrelation des SNP 3435C>T mit der duodenalen P-Glykoprotein-Expression und pharmakokinetischen Parametern gezeigt [Hoffmeyer et al., 2000]. Homozygote Träger des 3435T-Allels zeigten nur die Hälfte der duodenalen P-Glykoprotein-Expression im Vergleich zu den homozygoten Trägern des Wildtyps (3435CC), während die heterozygoten Träger intermediäre Werte aufwiesen. Diese Ergebnisse stehen denen einer japanischen Untersuchung mit 13 gesunden Probanden gegenüber, in welcher ein entgegengesetzter Trend in der duodenalen MDR1-mRNA-Expression festgestellt wurde. Probanden mit dem Genotyp 3435TT hatten hier die höchste duodenale MDR1-mRNA-Expression [Nakamura et al., 2002]. In anderen Fällen wurde wiederum kein Einfluss von MDR1-SNP auf die Expression von MDR1-mRNA oder P-Glykoprotein festgestellt [Siegmond et al., 2002].

Retrospektiv konnten für Träger des Genotyps 3435TT nach Digoxin-Einfachgabe im Vergleich zum Wildtyp (Genotyp 3435CC) größere Flächen unter den Kurven (AUC) festgestellt werden [Hoffmeyer et al., 2000]. Es ließen sich auch höhere Maximalkonzentrationen  $C_{\max}$  von Digoxin nach Digoxin-Mehrfachgabe finden. In einer prospektiven klinischen Studie mit Mehrfachgabe von Digoxin konnten die größten  $AUC_{0-4}$ ,  $AUC_{0-24}$  und  $C_{\max}$ -Werte ebenfalls beim Genotyp 3435TT bestimmt werden [Johne et al., 2002].

In einer klinischen Untersuchung an 50 gesunden kaukasischen Probanden wurde nach einer Einfachgabe von 1 mg Digoxin jedoch kein Einfluss des SNP3435C>T oder anderer MDR1-Polymorphismen auf die Pharmakokinetik von Digoxin festgestellt [Gerloff et al., 2002]. Andere Autoren fanden auch geringere Flächen unter der Kurve ( $AUC_{0-4}$ ) für den Genotyp 3435TT und höhere Werte für den Genotyp 3435CC nach einer Digoxin-Einfachgabe [Sakaeda et al., 2001].

Aus den geschilderten Studien läßt sich nicht ableiten, welchen Einfluss der SNP 3435C>T auf die Funktion von P-Glykoprotein hat. Möglicherweise werden seine Auswirkungen auf die Transporterfunktion von anderen Polymorphismen modifiziert. Eine Analyse der aus den Positionen 2677 (Exon21) und 3435 (Exon26) gebildeten Haplotypen ergab erhöhte  $AUC_{0-4}$ -Werte für die Träger der Variante 2677G/3435T. Träger des Haplotypen 2677G/3435C zeigten im Schnitt erniedrigte  $AUC_{0-4}$  Werte [Johne et al., 2002]. Mittels einer solchen Haplotypenanalyse konnten mehrere SNP in die Betrachtung der Ergebnisse eingeschlossen werden, wodurch sich widersprüchliche Resultate aus unterschiedlichen Studien auflösen ließen. So wurde für den Haplo-

typen 2677G/3435T eine höhere AUC im Vergleich zum Haplotypen 2677T/3435T festgestellt [Johne et al., 2002].

## 1.5 Zielsetzung

Die funktionelle Bedeutung einzelner Polymorphismen des MDR1-Gens ist bisher unklar. Für den derzeit am besten untersuchten Polymorphismus, 3435C>T, liegen widersprüchliche Ergebnisse vor. Möglicherweise modifizieren andere genetische Varianten, wie z. B. 2677G>T/A, die funktionelle Bedeutung dieses Polymorphismus. [Johne et al., 2002] haben zwischen den Haplotypen 2677G/3435T, 2677G/3435C und 2677T/3435T statistisch signifikante Unterschiede in der Digoxin-Kinetik festgestellt. Es ist zu vermuten, dass sich diese Unterschiede am besten darstellen lassen, wenn diese Haplotypen homozygot vorliegen.

Ziel dieser Arbeit war es, den Befund von [Johne et al., 2002] mit Hilfe von homozygoten Merkmalsträgern zu verifizieren, und zwar mit den Modellsubstraten Fexofenadin und Digoxin.

# Kapitel 2

## Material und Methoden

### 2.1 Studienteilnehmer

In einer offenen, parallelen, nichtrandomisierten klinischen Studie erhielten gesunde männlichen Probanden Fexofenadin als Einmaldosis, Digoxin als Einmaldosis sowie Digoxin als Mehrfachdosis. Die Probanden hatten die Genotypen 2677GG/3435CC, 2677GG/3435TT und 2677TT/3435TT. In der Untersuchung sollte festgestellt werden, ob die Pharmakokinetiken von Fexofenadin als Einzelgabe oder Digoxin als Einfach- oder Mehrfachgabe durch unterschiedliche MDR1-Genotypen beeinflusst werden. Die Studie erhielt ein positives Votum der Ethikkommission der Charité.

Zur Bestimmung der acht Probanden der Genotypen 2677GG/3435CC, 2677GG/3435TT und 2677TT/3435TT wurde ein Kollektiv von 1005 gesunden Probanden für die SNP 2677G>T/A und 3435C>T genotypisiert. Aus den gewonnenen Daten wurden die Häufigkeiten der beiden SNP, die Allel-Häufigkeiten, die Haplotyp-Häufigkeiten sowie die Häufigkeiten der kombinierten MDR1-Genotypen bestimmt.

#### 2.1.1 Einschlusskriterien

Voraussetzung für eine Aufnahme in die klinische Studie war das Vorliegen einer schriftlichen Einverständniserklärung des Probanden vor Studienbeginn. Es wurden lediglich gesunde männliche Probanden im Alter zwischen 18 und 50 Jahren und einem BMI zwischen 18 und 30 kg/m<sup>2</sup> in die Studie aufgenommen, um eine mögliche erhöhte Varianz in den Pharmakokinetiken von Fexofenadin und Digoxin aufgrund geschlechtsabhängiger Einflüsse zu vermeiden.

#### 2.1.2 Ausschlusskriterien

Als Ausschlusskriterien für die Studie galten:

- Störungen der Leber-, Nieren- oder kardiovaskulären Funktion;

- Herzrhythmusstörungen (AV-Block II. oder III. Grades), Karotissinussyndrom, Kammertachykardie, Sick-Sinus-Syndrom, Wolf-Parkinson-White-Syndrom, verlängertes QTc-Intervall (> 450 ms);
- Gastrointestinale Erkrankungen (z. B. Morbus Crohn, Colitis ulcerosa), die zu einer Absorptionsstörung der Studienmedikation führen können;
- Erkrankungen, die zu einer Veränderung metabolischer Stoffwechselfvorgänge führen können (endokrinologische Erkrankungen, akutes Fieber, schwere Infektionen);
- Elektrolytstörungen (Hyperkalzämie oder Hypokaliämie);
- Zustand nach Operation des Magen-Darmtraktes, ausser Appendektomie;
- Teilnahme an einer anderen Studie in den letzten zwei Monaten oder Blutspende innerhalb der letzten 30 Tage;
- regelmässige Medikamenteneinnahme sowie Medikamenteneinnahme innerhalb von vier Wochen vor Beginn der Studie;
- Drogenmissbrauch;
- maligne Erkrankung;
- Erkrankungen des Zentralnervensystems;
- anamnestisch bekannte Arzneimittelallergien;
- Infektion mit Hepatitis B, Hepatitis C und HIV.

Die Probanden wurden gegebenenfalls auch nach Beginn der Studie noch von der Teilnahme ausgeschlossen, wenn

- nicht tolerierbare, unerwünschte Arzneimittelwirkungen auftraten;
- eine Erkrankung auftrat, die eine zusätzliche Medikation erforderlich machte;
- nachträglich festgestellt wurde, dass die Einschluss- oder Ausschlusskriterien nicht erfüllt wurden;
- mangelnde Compliance seitens des Probanden vorlag, wie z. B. keine oder keine regelmässige Einnahme der Studienmedikation oder wiederholtes Fernbleiben von Blutabnahmen oder klinischen Untersuchungen;
- eine Situation eintrat, in der nach Meinung des Prüfarztes eine Fortsetzung der Studie den gesundheitlichen Interessen des Studienteilnehmers zuwiderlief;
- ein Studienteilnehmer aus persönlichen Gründen zurücktrat.

### 2.1.3 Laborparameter und körperliche Voruntersuchung

Die Voruntersuchung potenzieller Probanden fand innerhalb von sieben Tagen vor dem Studienbeginn statt. Nach der mündlichen und schriftlichen Aufklärung des Probanden über die Studieninhalte und der Unterzeichnung der Einverständniserklärung erfolgte eine ausführliche Anamneseerhebung, eine Blutabnahme für klinisch-chemische und hämatologische Untersuchungen sowie eine körperliche Untersuchung einschliesslich eines 12-Kanal-EKG's. Als Laborparameter wurden Glukose, Cholesterin, Triglyceride, Elektrolyte, Gesamt-Bilirubin, ASAT, ALAT,  $\gamma$ -GT, Creatin-Kinase, alkalische Phosphatase, Kreatinin, Harnstoff und Proteine bestimmt. Serologische Tests zum Nachweis von HIV-Ak, HCV-Ak und HBsAg dienten dem Ausschluss einer HIV- bzw. Hepatitisinfektion. Die Parameter zur Bestimmung des Blutbildes umfassten Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozytenzahl, Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl, MCV, MCHC, Neutrophile, Lymphocyten, Eosinophile, Basophile, Monocyten PTT, und Quick-Wert. Für eine Kontrollgenotypisierung wurden zwei EDTA-Röhrchen à 9,6 ml abgenommen. Zusätzlich wurde der Urin des Probanden auf Glukose, Protein, Bilirubin, Ketonkörper, Erythrozyten, Hämoglobin, Leukozyten, Bakterien sowie auf den pH-Wert untersucht. Ergaben sich in den Voruntersuchungen keine Einwände gegen eine Teilnahme, wurden die Probanden in die Studie eingeschlossen.

Trat ein Studienteilnehmer zurück oder fiel er aus, wurde ein anderer Proband mit dem gleichen Genotyp gemäss den oben aufgeführten Ein- und Ausschlusskriterien in die Studie aufgenommen.

## 2.2 Studienablauf

Die Studie erstreckte sich für den Probanden über 14 Tage und hatte zwei Abschnitte, wobei sich der zweite Abschnitt noch einmal in zwei Teile gliederte. Ziel des ersten Abschnittes war die Bestimmung der Pharmakokinetik von Fexofenadin (Telfast®). Im zweiten Abschnitt ging es um die Bestimmung der Pharmakokinetik des Digoxin, wobei im ersten Teil nur eine Einzeldosis gegeben wurde und im zweiten Teil durch mehrmalige Einnahmen an aufeinanderfolgenden Tagen eine Aufsättigung erzielt wurde (siehe Tabelle 2.1).

Vor der ersten Gabe der jeweiligen Studienmedikation erfolgte eine Messung von Puls und Blutdruck. Am darauf folgenden Tag wurde die Messung von Puls und Blutdruck vor den morgendlichen Blutentnahmen wiederholt; zusätzlich erfolgte noch eine EKG-Messung (siehe Tabelle 2.1). Bei Mehrfachgaben von Digoxin – entsprechend des dritten Studienabschnittes – erfolgte vor dem Beginn eine Überprüfung der Laborparameter  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Cl}^-$ . 48 h nach Beginn des dritten Abschnittes wurde der Talspiegel der Blutdigoxinkonzentration bestimmt und eine EKG- sowie eine Blutdruck- und Pulskontrolle durchgeführt (siehe Tabelle 2.1).

Das Rauchen sollte eine Woche vor Beginn und während des gesamten Zeitraums der Studie unterlassen werden. Ab dem vierten Tag vor Studienbeginn war der Konsum von Alkohol und vom Vortag der Untersuchung an der Verzehr xanthinhaltiger Speisen (Schokolade, Bananen) und Getränke (Kaffee, Tee, Cola) untersagt. Grapefruitsaft, Orangensaft und Apfelsaft sowie die

Tabelle 2.1: Studienablauf. Die Blutabnahme 48 h post am Studientag 8 erfolgte vor der Digoxineinnahme.

Studientag	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Medikation	t					d		D	D	d	d	d		
Kinetiktag	X	X				X	X	X				X	X	X
Vitalparameter	R	E				R	E			E		R		
Labor								el		ts		U	U	

t: 180 mg Fexofenadinhydrochlorid, morgens

d: 0,25 mg Digoxin, morgens

D: 0,25 mg Digoxin morgens und abends

R: Blutdruck vor Medikamenteneinnahme

E: EKG und Blutdruck vor Medikamenteneinnahme

U: Sammelurin 0-24 h post

el: Elektrolyte  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Cl}^-$

ts: Talspiegelkontrolle Digoxin

XX: Kinetik Fexofenadin: 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 28 h post

XXX: Kinetik Digoxin : 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48 h post

entsprechenden Früchte durften vom Vortag der Untersuchung an ebenfalls nicht mehr verzehrt werden. An den Kinetiktagen wurden vom Vorabend, 22.00 Uhr, bis 4 Stunden nach Einnahme der Prüfmedikation eine Nahrungskarenz eingehalten.

Zwischen den Kinetikmessungen wurden die Studienteilnehmer vor der Einnahme der jeweiligen Testsubstanz nach aktuellem Gesundheitszustand, Medikamenteneinnahmen und Drogen-, Alkohol- oder Nikotinkonsum gefragt. Die weitere Studienteilnahme konnte bei entsprechenden Risiken oder schlechter Compliance auch ganz untersagt werden. Bereits in den Voruntersuchungen waren die Probanden darauf hingewiesen worden, dass bei Verdacht auf Alkohol-, Drogen- oder Nikotinkonsum kurzfristig Blut- und Urinkontrollen angesetzt werden, die bei einem positiven Ausfall einen sofortigen Studienausschluss zur Folge gehabt hätten.

## 2.2.1 Pharmakokinetik einer Einzeldosis Fexofenadin

### Teil 1 (Studientag 1-2)

Die Messung erstreckte sich über zwei aufeinander folgende Tage. Am Tag 1 der Studie erhielten die Probanden im nüchternen Zustand eine Tablette Telfast® (Aventis Pharma, Bad Soden), entsprechend 180 mg Fexofenadinhydrochlorid, mit 200 ml Wasser ohne Kohlensäure. Vor der Einnahme wurde eine Messung von Puls und Blutdruck vorgenommen. Blutabnahmen zur Bestimmung der Plasmakonzentration des Fexofenadins erfolgten über eine intravenöse Verweilkanüle und fanden vor der Gabe sowie 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 28 Stunden nach der Gabe des Fexofenadins statt. Am zweiten Tag wurde eine EKG-Messung durchgeführt und nochmals Blutdruck und Puls bestimmt. Nun erfolgte eine dreitägige Pause, um zu verhindern, dass nicht ausgeschiedenes Fexofenadin die Messungen der folgenden Studienabschnitte beeinflusste.

## **2.2.2 Pharmakokinetik einer Einzeldosis von Digoxin**

### **Teil 2 (Studientag 6-8)**

Am Tag 6 erhielten die Probanden im nüchternen Zustand eine Tablette Dilanacin® (Arzneimittelwerke Dresden GmbH, Deutschland), entsprechend 0,25 mg Digoxin, mit 200 ml Wasser ohne Kohlensäure. Blutabnahmen über eine intravenöse Verweilkanüle oder via venöser Punktion zur Bestimmung der Plasmakonzentration des Digoxin fanden vor der Gabe sowie 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48 Stunden nach Gabe des Digoxins statt. Vor der Gabe von Digoxin am Tag 6 wurden Blutdruck und Puls gemessen. Am folgenden Tag wurde die Messung von Blutdruck und Puls vor der morgendlichen Blutentnahme (24 h) wiederholt und zusätzlich eine EKG-Messung durchgeführt.

## **2.2.3 Pharmakokinetik bei Mehrfachgabe von Digoxin**

### **Teil 3 (Studientag 8-14)**

Am Tag 8 nahmen die Probanden nach erfolgter Blutabnahme zur Überprüfung der Laborparameter  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{CL}^-$  und der Bestimmung des 48 h-Wertes für den zweiten Studienteil eine Tablette Dilanacin®, entsprechend 0,25 mg Digoxin, mit 200 ml Wasser ohne Kohlensäure ein. Anschließend erhielten sie die Studienmedikation für die Tage 8 und 9 ausgehändigt. Die Probanden nahmen eigenständig am Tag 8 um 20:00 h sowie am Tag 9 um 8:00 h und um 20:00 h eine Tablette Dilanacin® ein. Sie bestätigten mit ihrer Unterschrift die Einnahme der Tabletten auf einer gesonderten Medikationsliste. Am Tag 10 erfolgte morgendlich eine Talspiegelkontrolle des Digoxins sowie eine Blutdruck-, Puls- und EKG-Messung. Anschließend nahmen die Probanden wiederum eine Tablette Dilanacin® zu sich und bekamen eine weitere Tablette ausgehändigt zur selbstständigen Einnahme am Tag 11 um 8:00 h. Am Tag 12 wurden Puls und Blutdruck gemessen. Danach nahmen die Probanden im nüchternen Zustand eine Tablette Dilanacin®, entsprechend 0,25 mg Digoxin, mit 200 ml Wasser ohne Kohlensäure ein. Blutabnahmen zur Bestimmung der Plasmakonzentration des Digoxin fanden vor Gabe sowie 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 6, 8, 12, 24 und 48 Stunden nach der Einnahme statt. Urin wurde in den Perioden 0-12 und 12-24 Stunden gesammelt.

## **2.3 Genotypisierung der MDR1-Allele**

Nach der DNA-Extraktion aus dem Vollblut der Probanden erfolgte die Genotypisierung der MDR1-Allele mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und anschliessendem Verdau mit spezifischen Endonukleasen (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus, RFLP).

### 2.3.1 DNA-Extraktion

Das *Magna Pure LC DNA Isolation Kit 1* der Firma Roche, Mannheim, wurde zusammen mit dem *Magna Pure LC Instrument* (Roche, Mannheim) eingesetzt zur automatischen Isolation genomischer DNA aus den Blutproben der Probanden. Mittels Guanidiniumsalzen in hoher Konzentration und Proteinase K wurden die Zellen aufgebrochen. Die freigesetzten Nukleinsäuren wurden an magnetische Silicapartikel gebunden. Beim Pipettieren dieser Lösung schob sich ein Magnet zu den Pipettenspitzen vor, wodurch die Partikel mit den gebundenen Nukleinsäuren in den Spitzen zurückgehalten wurden. Auf diesem Wege wurden die Partikel in die Waschlösungen transportiert und die an den Partikeln anhaftenden Verunreinigungen gewaschen. Anschließend wurden die Partikel bei hoher Temperatur in einem Medium mit niedriger Ionenstärke inkubiert, wobei sich die Nukleinsäuren von den Partikeln ablösten. Mit Hilfe des Magneten wurden die Partikel entfernt, sodass man eine Lösung von gereinigten Nukleinsäuren erhielt, welche anschließend bei einer Temperatur von 4 °C gelagert werden konnten. Die Nukleinsäuren wurden mittels PCR amplifiziert und auf das Vorliegen der SNP 2677G>T und 3435C>T untersucht.

### 2.3.2 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die spezifische Basensequenzen einer DNA-Doppelhelix erkennen und schneiden, wodurch Restriktionsfragmente unterschiedlicher Länge entstehen. Genetische Polymorphismen können zu veränderten Schnittmustern von Restriktionsendonukleasen führen. Basensubstitutionen, Deletionen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotide führen zum Auftreten oder Verlust von Schnittstellen der verwendeten Endonukleasen. Die veränderten Schnittstellen der Endonukleasen führen zu veränderten Restriktionsfragmenten. Dieses Phänomen, Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) genannt, lässt sich zum Nachweis genetischer Polymorphismen einsetzen.

#### Durchführung

Es wurden die folgenden Geräte zur Durchführung der PCR und nachfolgendem RFLP-Verdau verwendet:

- Programmierbarer PCR-Heizblock, Gene Amp® PCR-System 9700, der Firma PE Applied Biosystems, USA;
- Brutschrank OV3 der Firma Biometra, Göttingen;
- Eppendorf Zentrifuge, Modell 5402 der Firma Eppendorf, Hamburg;
- Zentrifuge CF-6R Centrifuge der Firma Beckmann.

Die verwendeten Endonukleasen Bse NI, Bsh NI, Bsp 1431 und Puffer (B+, 0+, 1431+) wurden von MBI Fermentas, Deutschland, bezogen. Die Taq-Biotherm-Polymerase stammte von der Firma Rapidozym, Berlin.

Mittels PCR wurde die den Polymorphismus enthaltende DNA-Sequenz amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden daraufhin gelelektrophoretisch analysiert und anschließend über Nacht mit Restriktionsendonukleasen inkubiert. In einer Gelelektrophorese wurden die DNA-Fragmente aufgetrennt und mittels eines digitalen Videosystems Restriktionsmuster dokumentiert, welche Rückschlüsse auf den vorhandenen Polymorphismus ermöglichten.

Zur Amplifikation der entsprechenden DNA-Abschnitte wurden die Primer aus Tabelle 2.2 eingesetzt. Die Auswahl der Primer für die SNP 2677G>T/A und 3435C>T erfolgte nach bekannten Gensequenzen [Chen et al., 1990], (Accession Number rs. 2032582 vs. Accession Number rs. 1045642). Die PCR Primer wurden von der Firma Molbiol, Berlin, synthetisiert. Durch Verdünnung mit Aqua bidest. wurde eine Endkonzentration von 10  $\mu$ M eingestellt. Um eine spezifische Primer-Bindung zu erhalten, wurde bei der PCR eine Annealing-Temperatur gewählt, die aus den Temperaturoptima der beiden Primer (forward, reverse) gemittelt wurde.

Die Herstellung der PCR-Ansätze (Mastermix) der jeweiligen Exons erfolgte nach Tabelle 2.3. Zu jedem Ansatz wurde 2,0  $\mu$ l der DNA-Probe gegeben. Anschließend wurden die nun fertigen Proben im programmierbaren Thermostat (Thermocycler), Gene Amp PCR System 9700, nach den in Tabelle 2.4 angegebenen Temperaturverläufen amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden daraufhin über Nacht mit den in Tabelle 2.5 angegebenen Restriktionsendonukleasen inkubiert. Anschließend wurden die PCR-Fragmente gelelektrophoretisch getrennt und entsprechend des aufgetretenen Musters den genetischen Varianten von MDR1 zugeordnet (siehe Abb. 2.1 und 2.2).

Tabelle 2.2: Verwendete Primersequenzen

Primernamen	Sequenz	Polymorphismus
MDR-9 (Primer I)	5' TGC AGG CTA TAG GTT CCA GG	Exon 21 G-T
MDR-10A (Primer II)	5' TTT AGT TTG ACT CAC CTT CCC G	Exon 21 G-T
MDR-9 (Primer I)	5' TGC AGG CTA TAG GTT CCA GG	Exon 21 G-A
MDR-10 (Primer II)	5' GTT TGA CTC ACC TTC CCA G	Exon 21 G-A
MDR-11 (Primer I)	5' TGT TTT CAG CTG CTT GAT GG	Exon 26 C-T
MDR-12 (Primer II)	5' AAG GCA TGT ATG TTG GCC TC	Exon 26 C-T

Tabelle 2.3: Ansätze (Mastermix) für die MDR1 Polymorphismen 2677G&gt;T/A und 3435C&gt;T.

Substanz	Exon 21 G-A Volumen [ $\mu$ l]	Exon 21 G-T Volumen [ $\mu$ l]	Exon 26 C-T Volumen [ $\mu$ l]
10x Biotherm Puffer	2,00	2,00	2,00
MgCl	1,00	1,00	1,00
dNTP	2,00	2,00	2,00
Primer I	0,50	0,50	0,50
Primer II	0,50	0,50	0,50
Biotherm Taq	0,10	0,10	0,10
Aqua bidest.	13,90	13,90	13,90

Tabelle 2.4: Temperaturprogramme der verschiedenen PCR-Reaktionen für 35 Zyklen

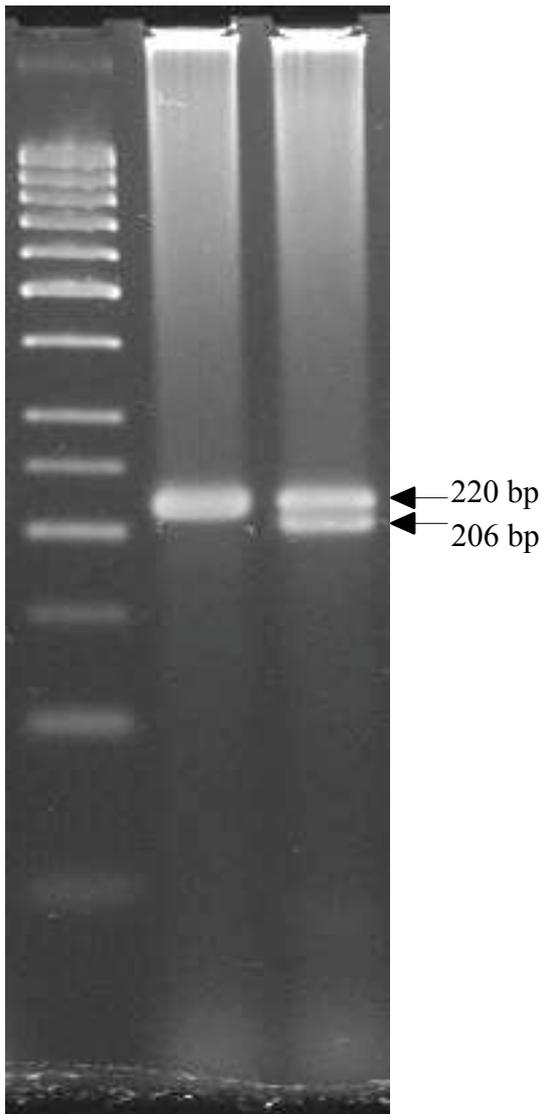
	Exon 21 G-A	Exon 21 G-T	Exon 26 C-T
Denaturierung intial	2 min/94 °C	2 min/94 °C	2 min/94 °C
Denaturierung x35	30sec/94 °C	30sec/94 °C	30sec/94 °C
Primeranlagerung x35	30sec/60 °C	30sec/60 °C	1 min/60 °C
Kettenverlängerung x35	1 min/72 °C	1 min/72 °C	1 min/72 °C
Kettenverlängerung terminal	7 min/72 °C	7 min/72 °C	7 min/72 °C
Kühlung	$\infty$ min/04 °C	$\infty$ min/04 °C	$\infty$ min/04 °C

Tabelle 2.5: RFLP Ansätze

	Exon 21 G-A	Exon 21 G-T	Exon 26 C-T
Aqua bidest. [ $\mu$ l]	7,50	7,50	7,50
Endonuklease	Bse NI	Bsh NI	Bsp 1431
Endonuklease [ $\mu$ l]	0,50	0,50	0,50
Puffer	B+Puffer 10x	0+Puffer 10x	Puffer 1431+
Puffer [ $\mu$ l]	2,00	2,00	2,00
PCR-Produkt [ $\mu$ l]	10,00	10,00	10,00

**MDR1 2677G>A**

Marker GG GA

**MDR1 2677G>T**

Marker GT TT GG

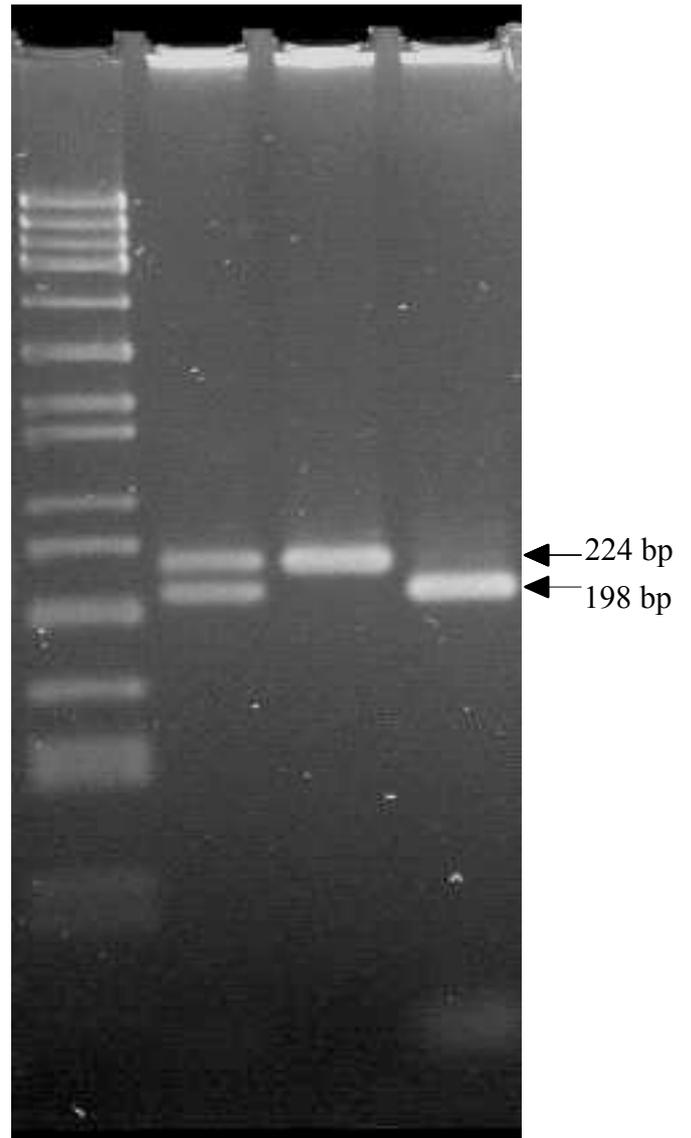


Abbildung 2.1: Restriktionsverdau Exon21 (2677G&gt;T/A)

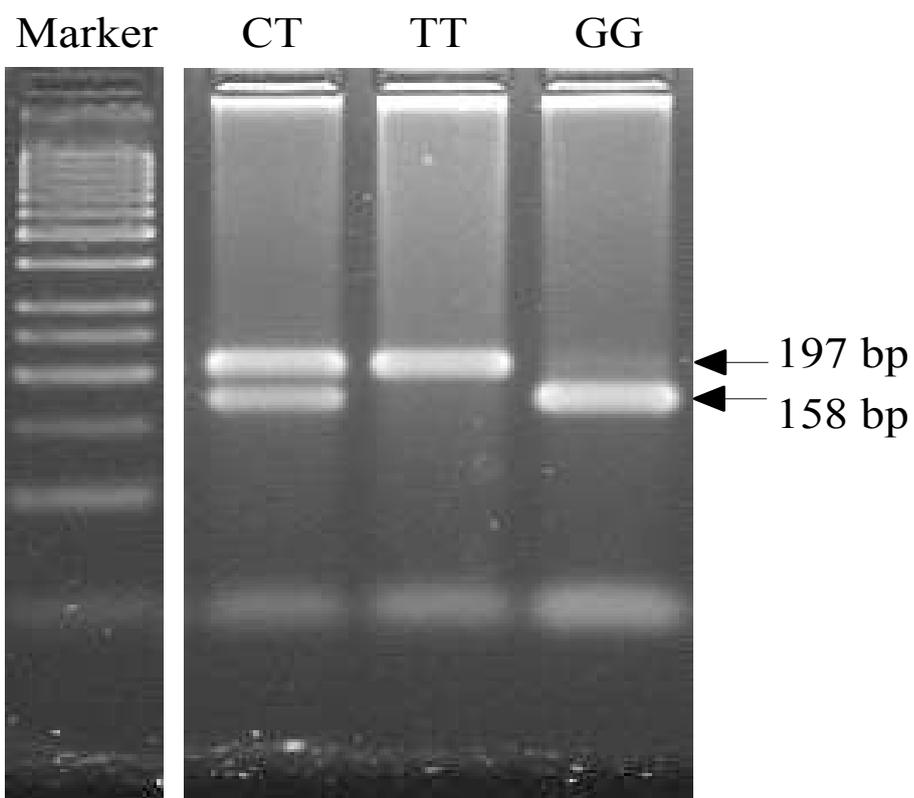
**MDR1 3435C>T**

Abbildung 2.2: Restriktionsverdau Exon26 (3435C>T)

### 2.3.3 Agarose Gel-Elektrophorese

#### Durchführung

Zur Durchführung der Elektrophorese wurden folgende Geräte und Substanzen verwendet:

- Elektrophoresekammer von Medizinische Diagnostische Produkte Protrans GmbH, Ketsch, Deutschland
- Videosystem Eagleeye® der Firma Stratagene, USA
- Bromphenolblau (Merck, Darmstadt), Deutschland
- Ficoll TM 400 von Amersham, Pharmacia Biotech AB, Schweden
- Sybr®-Green der Firma Molecular Probes (Portland, Oregon), USA
- Agarose von Eurogentech (Liege, Belgien)
- 50 bp Marker SMO373 von MBI Fermentas, Deutschland

Zur Herstellung des Agarose-Gels wurde ein Gemisch aus Agarose und 1xTBE-Puffer verwendet. Hierzu wurde 10xTBE-Puffer – hergestellt nach Tabelle 2.6 – 1:10 mit Aqua bidest verdünnt. Zuerst wurde das Gemisch unter Rühren kurz aufgekocht, wodurch ein durchsichtiges Gel entstand. Nach Abkühlung auf unter 50 °C wurde das Gel in einen Elektrophorese-Schlitten gegossen. Plastikämme mit dem gewünschten Taschenvolumen (50 µl) wurden in das noch flüssige Gel gesetzt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die Ämme entfernt und das Gel zum Probenauftrag in eine mit 1xTBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt. Es war darauf zu achten, dass das Gel vollständig von der Pufferlösung benetzt wurde. Vor dem Probenauftrag wurde zu den einzelnen PCR-Amplifikaten 10 µl Basenlaufpuffer (Tabelle 2.7) im Verhältniss 1:1 gegeben und gemischt. Der Basenlaufpuffer hielt die Proben in der Geltasche zurück und diente der Abschätzung der Laufgeschwindigkeit der PCR-Amplifikate. In eine weitere Geltasche wurde zur späteren Abschätzung der Basenlänge der PCR-Amplifikate ein Basenstandard – bestehend aus einer 50 bp (Basenpaar) DNA-Standard-Leiter (MBI Fermentas, Deutschland) – pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 120 V Spannung über einen Zeitraum von 45 bis 100 Minuten durchgeführt (siehe Tabelle 2.8). Anschließend wurden die Gele für ca. 60 Minuten in ein zweites Färbebad mit dem interkalierenden Farbstoff Sybr®-Green (Molecular Probes, Portland, Oregon) zur Markierung der nun aufgetrennten PCR-Amplifikate gelegt. Im letzten Schritt erfolgte die Visualisierung und Dokumentation der DNA-Banden im Videosystem Eagleeye®.

Tabelle 2.6: Ansatz des Tris-Borat-EDTA-Puffers (10xTBE)

Menge	Substanz	Konzentration
109 g	Tris	890 mM
55 g	Borsäure	890 mM
40 ml	EDTA(0,5 M, pH 8,0)	20 mM
ad 1000 ml	Aqua bidest.	

Tabelle 2.7: Ansatz des Markers für PCR-Produkte

Menge	Substanz	Konzentration
5 mg	Bromphenolblau	0,05 g/l
25 g	Ficoll®	250 g/l
ad 100 ml	1xTBE	

Tabelle 2.8: Restriktionsmuster der RFLP und Laufzeiten der Gelelektrophorese

	2677G>T	2677G>A	3435C>T
Enzym	BshNI	BseNI	Bsp1431
Restriktionsmuster (Wildtyp) [bp]	198/26	220	158/39
Restriktionsmuster (Mutation) [bp]	224	206/14	197
Spannung [V]	100	100	120
Laufzeit [min]	100	100	45
Restriktionstemperatur [ °C]	37	65	37
Konzentration Agarosegel [%]	3,5	3,5	3,5

### 2.3.4 Real-Time-PCR auf dem LightCycler® System

Das Prinzip des Lightcyclers beruht auf der Vervielfältigung eines DNA-Fragments mittels einer normalen Polymerase-Kettenreaktion. Zusätzlich werden zwei sogenannte Hybridisierungssonden verwendet, die während des Annealings sequenzspezifisch an das vervielfältigte PCR-Produkt binden. Die Hybridisierungssonden sind mit zwei verschiedenen Farbstoffen (Donor- und Akzeptor- Fluoreszenzfarbstoff) markiert. Bei unmittelbar benachbarter Hybridisierung der beiden Sonden mit der Zielsequenz und gleichzeitiger Anregung des Donorfluoreszenzfarbstoffes durch eine Lichtquelle wird Energie auf den Akzeptorfluoreszenzfarbstoff übertragen. Hierdurch wird der Akzeptorfluoreszenzfarbstoff angeregt und gibt Licht einer bestimmten Wellenlänge ab, die vom Lightcycler gemessen wird. Dieses Prinzip beruht auf dem FRET (fluorescence resonance energy transfer). Wenn die beiden Sonden nicht in unmittelbarer Nähe an das PCR-Produkt binden, entsteht auch keine messbare Fluoreszenz. Dies gewährleistet eine hohe Spezifität des Testprinzips.

Mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse kann das Vorliegen einzelner Punktmutationen innerhalb der Hybridisierungsbereiche der Sonden detektiert werden. Die doppelsträngigen PCR-Produkte zerfallen bei einer für sie charakteristischen Temperatur, der Schmelztemperatur, in ihre zwei Einzelstränge. Die Hybridisierungssonden lösen sich ebenfalls bei spezifischen Temperaturen von den PCR-Produkten. Da die spezifische Temperatur von der komplementären Basensequenz des PCR-Produktes abhängt, wird hierdurch eine Unterscheidung zwischen verschiedenen (mutierten bzw. nicht mutierten) PCR-Produkten möglich. Abb. 2.3 gibt die Veränderung der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Temperatur wieder. Die Schmelztemperaturen des Wildtyps (3435CC) und der Mutation (3435TT) liegen bei 64 °C und 55 °C.

#### Durchführung

Zur Bestimmung des Polymorphismus 3435C>T wurden Primer (MDR-11, MDR-12 aus der Tabelle 2.2 auf S. 13) und Hybridisierungssonden mit den in Tabelle 2.9 angegebenen Basensequenzen der Firma Molbiol, Berlin, verwendet.

Nach der Zugabe von 2,0 µl der DNA-Probe zum Lightcycler-PCR-Ansatz (Tabelle 2.10) wurden die Proben bei 94 °C für 30 Sekunden denaturiert. Anschließend wurde in 45 Zyklen bei 55 °C Annealingtemperatur und 72 °C Elongationstemperatur amplifiziert (Tabelle 2.11). Die Schmelztemperaturen der Genotypen 3435CC bzw. 3435TT liegen bei 64 °C und 55 °C. Die Schmelzkurve wurde für den Temperaturbereich 45 °C – 80 °C ermittelt (Tabelle 2.12).

Tabelle 2.9: Basensequenzen der Hybridisierungssonden

Sonde	Basensequenz
Donor (ancor)	5'-GAC AAC AGC CGG GTG GTG TCA
Akzeptor (sensor): LC Red640	5'-GGA AGA GAT CGT GAG GGC AG

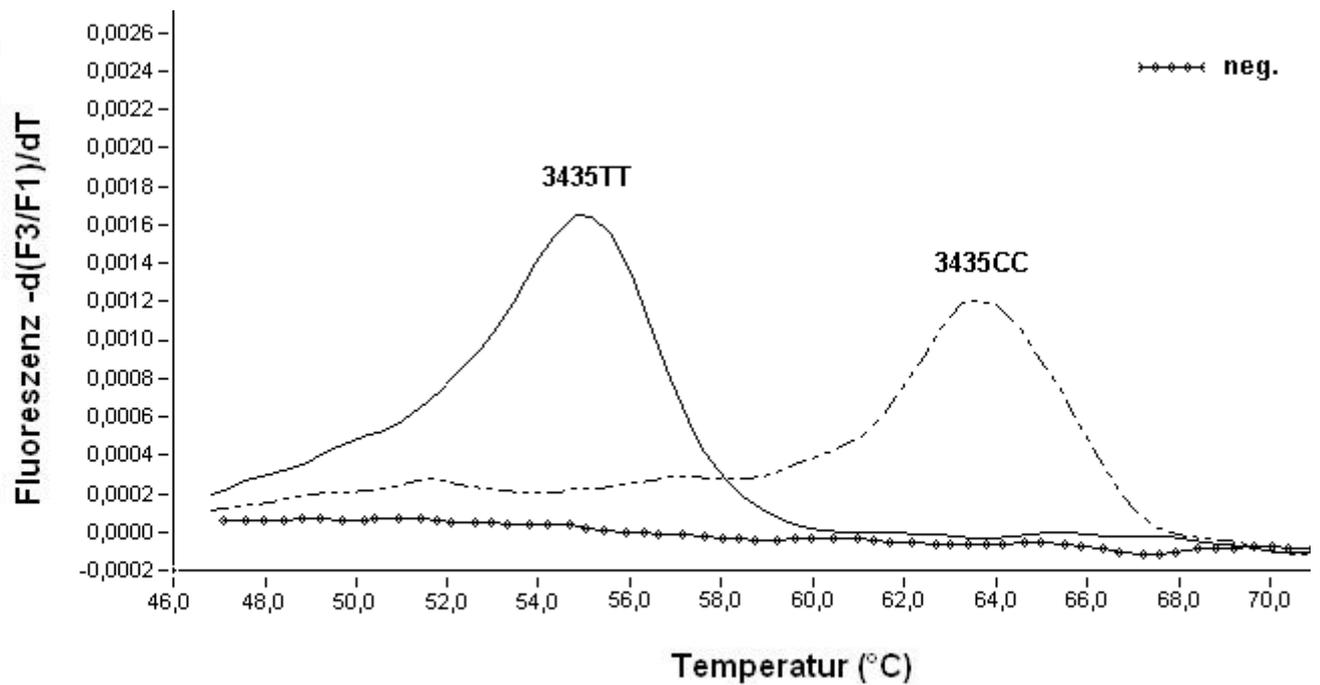


Abbildung 2.3: Schmelzkurve. Abgebildet sind die SNP 3435CC und 3435TT. Die gepunktete Linie entspricht der Negativ-Kontrolle.

Tabelle 2.10: Ansatz (Mastermix) für den SNP 3435C>T beim LightCycler

Substanz	Volumen [ $\mu$ l]
10x Biotherm Puffer	2,00
MgCl	1,00
dNTP	1,00
MDR-11	0,60
MDR-12	0,60
Biotherm Taq	0,20
C3435TAncor	0,40
C3435TSensor	0,40
BSA	0,60
DMSO	1,00
Aqua bidest.	12,20

Tabelle 2.11: Temperaturprofil der LightCycler-Amplifikation

Zieltemperatur [°C]	Dauer [sec]	Steigung [°C/sec]
94	0	20
55	4	20
72	4	2

Tabelle 2.12: Temperaturprofil der Schmelzkurve

Zieltemperatur [°C]	Dauer [sec]	Steigung [°C/sec]
94	40	20
45	120	20
80	0	0,1

## 2.4 Analytik Fexofenadin/Digoxin

Die Bestimmung der Blutkonzentration von Fexofenadin wurde mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) und UV-Detektion durchgeführt. Die Bestimmung der Digoxin-Konzentrationen im Plasma und Urin erfolgte mit einem Immunoassay, Cedia®, der Firma Roche (Mannheim, Deutschland). Der Messbereich der Digoxin-Konzentration lag zwischen den Werten 0,15–4,00 ng/ml.

Die Messungen wurden von Herrn Dr. rer. nat. Bauer vom Institut für klinische Pharmakologie der Charité, Campus Mitte, durchgeführt.

## 2.5 Statistische Berechnungen

Es wurden deskriptive statistische Verfahren zur Ermittlung von Median und Spannweite herangezogen.

Die Ermittlung der Fallzahl von acht Probanden pro Studiengruppe basierte auf einzelnen Abschätzungen der Fallzahl in Bezug auf die unterschiedlichen Hypothesen dieser Studie. Die dabei ermittelte höchste Fallzahl der drei Berechnungen bildete die Grundlage für die Gruppengröße der Gesamtstudie.

Die Berechnungen basierten auf einem zweiseitigen ungepaarten t-Test. Für den Fehler erster Art  $\alpha$  wurde ein Wert von 5 %, für den Fehler zweiter Art  $\beta$  ein Wert von 20 % gewählt. Die Abschätzungen zu den einzelnen Hypothesen der Studie ergaben folgendes:

1. Die MDR1-Genotypen 2677GG/3435CC, 2677GG/3435TT und 2677TT/3435TT beeinflussen die Pharmakokinetik von Fexofenadin bei Einmalgabe. Ausgehend von der Fläche unter

der Kurve ( $AUC_{0-4}$ ) bei gesunden Probanden, nach Einmalgabe von 180 mg Fexofenadinhydrochlorid (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $1213,5 \text{ ng} \cdot \text{h/ml} \pm 307,8 \text{ ng} \cdot \text{h/ml}$ ) [Drescher et al., 2002], ergab sich eine Fallzahl von acht Probanden pro Gruppe unter der Annahme, dass der Unterschied in der  $AUC_{0-4}$  von Fexofenadinhydrochlorid zwischen den Genotypen 40 % beträgt.

2. Die MDR1-Genotypen 2677GG/3435CC, 2677GG/3435TT und 2677TT/3435TT haben Einfluss auf die Pharmakokinetik von Digoxin nach einer Einmalgabe. Ausgehend von der  $AUC_{0-4}$  bei gesunden Probanden, nach einmaliger Dosis von 0,5 mg Digoxin (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $5,39 \text{ ng} \cdot \text{h/ml} \pm 0,81 \text{ ng} \cdot \text{h/ml}$ ) [Becquemont et al., 2001], ergab sich eine Fallzahl von sieben Probanden pro Gruppe unter der Annahme, dass der Unterschied in der  $AUC_{0-4}$  von Digoxin zwischen den Genotypen 25 % beträgt.
3. Die MDR1-Genotypen 2677GG/3435CC, 2677GG/3435TT und 2677TT/3435TT haben Einfluss auf die Pharmakokinetik von Digoxin im Fließgleichgewicht. Basierend auf Daten der  $AUC_{0-4}$  von Digoxin im Fließgleichgewicht bei gesunden Probanden (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $5,60 \text{ ng} \cdot \text{h/ml} \pm 0,90 \text{ ng} \cdot \text{h/ml}$ ) [Johne et al., 2002] ergab sich eine Fallzahl von acht Probanden pro Gruppe unter der Annahme, dass der Unterschied in der  $AUC_{0-4}$  von Digoxin im Fließgleichgewicht zwischen den Genotypen 25 % beträgt.

Zum Vergleich zwischen den Gruppen wurden parameterfreie Tests angewandt (SPSS Version 11.0, SPSS Inc. USA). Aufgrund niedriger Fallzahlen innerhalb der drei Gruppen konnte nicht von einer normalverteilten Grundgesamtheit ausgegangen werden. Für den Vergleich zwischen den drei Gruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test angewandt. Zwei Gruppen wurden mittels Mann-Whitney-U-Tests verglichen. Nach Möglichkeit wurde der exakte p-Wert zur Ermittlung der Signifikanz eines Ergebnisses errechnet. Ansonsten wurde der exakte p-Wert mittels der Monte-Carlo-Signifikanz basierend auf 10.000 Stichprobentabellen bestimmt.

## 2.6 Berechnung der Haplotypen/Genotypen

In der PCR ist keine Zuordnung zwischen einzelnen Allelen und den zugehörigen Chromosomen möglich. Somit wurden für die 1005 Probanden die Haplotypen mittels des Programms Phase R.O, Version 2.0 [Stephens et al., 2001], statistisch aus den einzelnen Polymorphismen der Positionen 2677 und 3435 ermittelt.

Da die Polymorphismen 2677G>T und 3435C>T in der Studie homozygot vorlagen, befanden sich auf beiden Chromosomen die gleichen Haplotypen (homozygoter Haplotyp). Hierdurch konnte der Haplotyp der drei getesteten Gruppen uneindeutig und ohne statistische Berechnungen aus dem jeweiligen Genotyp der Gruppe bestimmt werden.

# Kapitel 3

## Ergebnisse

### 3.1 Genotyp-Verteilung bei 1005 gesunden Probanden

Ein Kollektiv von 1005 gesunden Probanden wurde für die MDR1-SNP 2677G>T/A und 3435C>T genotypisiert, um Teilnehmer für die nachfolgende klinische Studie zu gewinnen (Tab. 3.1). Ausgehend von der SNP-Allelverteilung der MDR1-Varianten 2677G>T/A und 3435C>T im Probandenkollektiv wurden Haplotypen mit Hilfe des Programms Phase Version 2.0 berechnet (Tab. 3.2). In die Studie wurden lediglich Probanden eingeschlossen, die homozygote Träger der Haplotypen 2677G/3435C, 2677G/3435T und 2677T/3435T waren. Hieraus ergeben sich die Genotypen 2677GG/3435CC, 2677GG/3435TT und 2677TT/3435TT. Die Seltenheit des Genotyps 2677GG/3435TT (s. Tab. 3.3), der sich aus dem homozygoten Haplotyp 2677G/3435T herleitet, erforderte die Genotypisierung eines entsprechend großen Probandenkollektivs (n=1005).

Tabelle 3.1: Häufigkeit von Allelen und Genotypen der MDR1-SNP 2677G>T/A und 3435C>T bei 1005 gesunden Probanden.

cDNA-Position	Allel	n	%	(95%-CI)	Genotyp	n	%	(95%-CI)
2677	G	1130	56,2	(53,6–58,9)	GG	307	30,6	(26,8–34,5)
	T	840	41,8	(39,2–44,4)	GT	492	49,0	(44,8–53,2)
	A	40	2,0	(1,3–2,8)	GA	24	2,4	(1,4–3,9)
					TA	14	1,4	(0,6–2,6)
					TT	167	16,6	(13,6–19,9)
					AA	1	0,1	(0,0–0,7)
3435	C	941	46,8	(44,6–49,0)	CC	223	22,2	(19,1–25,5)
	T	1069	53,2	(51,0–55,4)	CT	495	49,3	(45,4–53,1)
					TT	287	28,6	(25,2–32,0)

Die cDNA Position basiert auf der Erstbeschreibung der MDR1-Sequenz nach [Chen et al., 1990].

CI: Konfidenzintervall

Tabelle 3.2: Berechnete Haplotyp-Häufigkeiten des MDR1, abgeleitet aus den MDR1-SNP 2677G>T/A und 3435C>T.

Haplotyp	berechnete Häufigkeit	
	n	%
2677G/3435C	866	43,1
2677T/3435T	794	39,5
2677G/3435T	256	12,8
2677T/3435C	52	2,6
2677A/3435C	30	1,5
2677A/3435T	12	0,6

Tabelle 3.3: Häufigkeit der kombinierten MDR1-Genotypen, abgeleitet aus den SNP 2677G>T/A und 3435C>T.

Genotyp	Häufigkeit	
	n	(%)
2677GT/3435CT	362	36,0
<b>26773435GG/CC</b>	<b>184</b>	<b>18,3</b>
<b>2677TT/3435TT</b>	<b>149</b>	<b>14,0</b>
2677GT/3435TT	107	10,6
2677GG/3435CT	99	9,9
<b>2677GG/3435TT</b>	<b>24</b>	<b>2,3</b>
2677GT/3435CC	23	2,2
2677TT/3435CT	16	1,6
2677GA/3435CC	14	1,4
2677TA/3435CT	11	1,1
2677GA/3435CT	6	0,6
2677GA/3435TT	4	0,4
2677TA/3435TT	3	0,3
2677TT/3435CC	2	0,2
2677AA/3435CT	1	0,1
2677TA/3435CC	-	0,0
2677AA/3435CC	-	0,0
2677AA/3435TT	-	0,0

## 3.2 Demografische Daten der Probanden

Es wurden 22 Probanden in den ersten und 21 Probanden in den zweiten Studienabschnitt entsprechend ihrer Haplotypen eingeschlossen. Davon hatten 10 Probanden den Genotyp 2677GG/3435CC und 8 Probanden den Genotyp 2677TT/3435TT. Von 24 Individuen des Genotyps 2677GG/3435TT (s. Tab. 3.3) konnten nur 4 in die Studie eingeschlossen werden; die übrigen erfüllten entweder die Ein- und Ausschlußkriterien nicht oder waren nicht mehr bereit, an der Studie teilzunehmen. In der Tabelle 3.4 sind die demografischen Daten der Probanden zusammengefasst. Im Digoxin-Teil der Studie gab es nur drei Probanden mit dem Genotyp 2677GG/3435TT, da ein Proband sein Einverständnis für diesen Teil der Studie zurücknahm. Deshalb ergaben sich – abweichend von Tabelle 3.4 – für den Digoxin-Teil folgende Daten: Alter 28,0 (26,0-34,0) Jahre, Größe 194,0 (175,0-198,0) cm, Gewicht 87,0 (74,0-100,0) kg und Body Mass Index 24,2 (22,2-26,2) kg/m<sup>2</sup>. Genotypisierungen wurden grundsätzlich zweimal vorgenommen – beim ersten Screening der Probanden und zur Absicherung des Ergebnisses nach Einschluss der Versuchsteilnehmer.

Tabelle 3.4: Demografische Daten der Probanden aufgeteilt nach Genotypen.

Genotyp	2677GG/3435CC n=10	2677GG/3435TT n=4	2677TT/3435TT n=8	p-Wert
Alter [Jahre]	27,5 (23,0-39,0)	27,0 (26,0-34,0)	29,5 (22,0-39,0)	n.s.
Größe [cm]	180,5 (162,0-188,0)	190,5 (175,0-198,0)	180,5 (175,0-194,0)	n.s.
Gewicht [kg]	77,0 (63,0-98,0)	84,0 (74,0-100,0)	79,0 (71,0-90,0)	n.s.
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	24,0 (20,7-30,6)	23,7 (22,2-26,6)	23,6 (22,2-26,3)	n.s.

Angegeben sind Median und Spannweite.

n.s.: nicht signifikant.

## 3.3 Pharmakokinetik von Fexofenadin nach Einmalgabe

Zur Charakterisierung der Pharmakokinetik von Fexofenadin wurden  $AUC_{0-4}$ ,  $AUC_{0-24}$ ,  $C_{max}$ ,  $t_{max}$  und  $t_{1/2}$  für die drei verschiedenen Haplotypen bestimmt. Tabelle 3.5 fasst die Ergebnisse nach einer einmaligen Fexofenadingabe von 168 mg zusammen.

Die Gruppe mit dem Genotyp 2677TT/3435TT erreichte in den ersten vier Stunden die größte Fläche unter der Kurve  $AUC_{0-4}$  (1267,7 mg · h/l). Dieselbe Gruppe erreichte  $t_{max}$  am schnellsten und hatte auch die höchste Maximalkonzentration  $C_{max}$  (499,90 mg/ml). Die geringste Fläche unter der Kurve im Intervall von 0 bis 4 Stunden  $AUC_{0-4}$  und im Intervall von 0 bis 24 Stunden  $AUC_{0-24}$  erreichte die Gruppe mit dem Genotyp 2677GG/3435TT. Letztere Gruppe zeigte auch die geringste Maximalkonzentration  $C_{max}$  (409,83 mg/ml). Abbildung 3.1 stellt die Konzentrations-Zeit-Profile der drei Gruppen nach Einmalgabe von 168 mg Fexofenadin dar.

## PK Fexofenadin

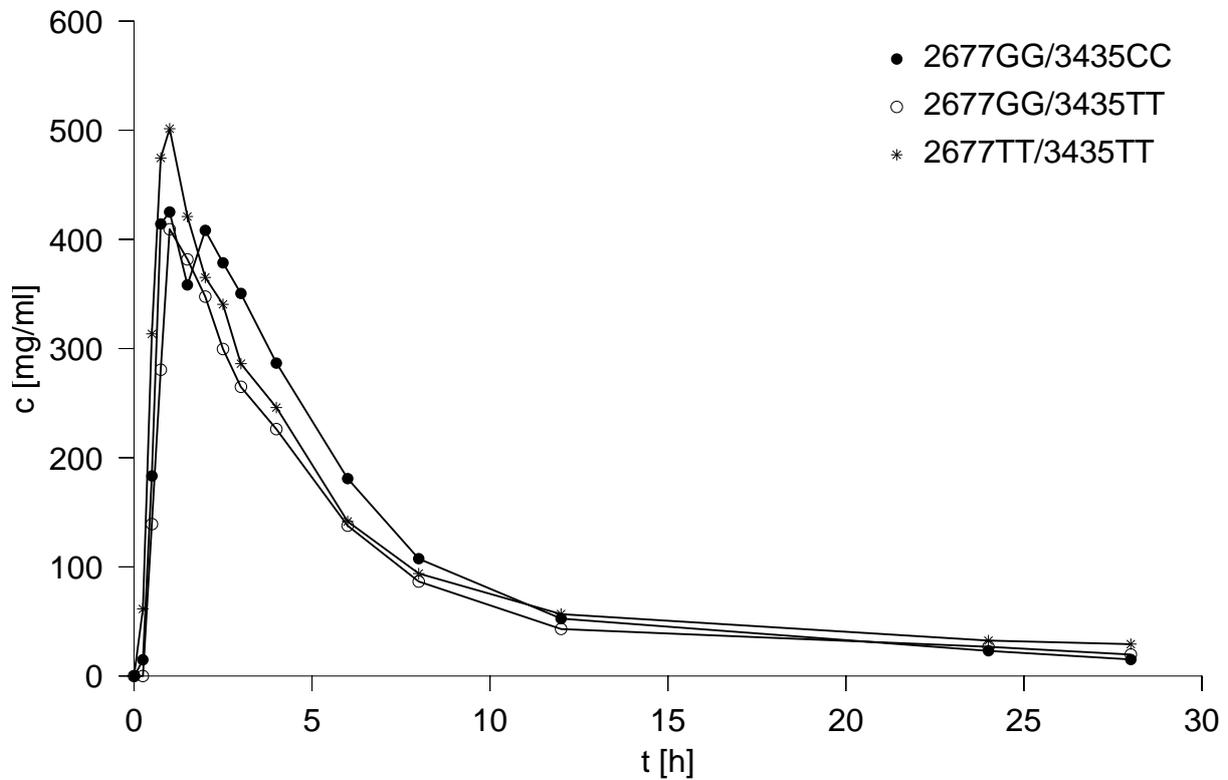


Abbildung 3.1: Vergleich der Konzentrations-Zeit-Profile von Fexofenadin zwischen den drei Studiengruppen. Dargestellt sind die Mediane der Fexofenadin-Plasmakonzentrationen.

Tabelle 3.5: Pharmakokinetische Daten nach einmaliger Fexofenadingabe von 168 mg.

Genotyp	2677GG/3435CC n=10	2677GG/3435TT n=4	2677TT/3435TT n=8	p-Wert
$AUC_{0-4}$ [ $\mu\text{g} \cdot \text{h/l}$ ]	1120 (655-2041)	1086 (670-1840)	1268 (784-2791)	n.s.
$AUC_{0-24}$ [ $\mu\text{g} \cdot \text{h/l}$ ]	3257 (1617-4004)	2368 (1166-4411)	2884 (1863-5256)	n.s.
$C_{\text{max}}$ [mg/ml]	474 (209-740)	410 (282-582)	500 (262-1087)	n.s.
$t_{\text{max}}$ [h]	1,67 (0,50-2,60)	1,52 (1,00-2,00)	1,00 (0,80-3,00)	n.s.
$t_{1/2}$ -Elimination [h]	11,54 (4,30-28,00)	9,86 (2,10-22,10)	14,98 (3,00-38,00)	n.s.

Angegeben sind Median und Spannweite.

n.s.: nicht signifikant.

Insgesamt zeigten sich beim Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede in den Parametern  $AUC_{0-4}$ ,  $AUC_{0-24}$ ,  $C_{max}$ ,  $t_{max}$  oder der Eliminationshalbwertszeit  $t_{1/2}$  zwischen den drei Gruppen. Die p-Werte wurden mittels der exakten Methode nach Monte-Carlo mit 99 % Konfidenzniveau errechnet.

### 3.4 Pharmakokinetik nach einmaliger Digoxingabe

Bestimmt wurden für die drei verschiedenen Haplotypen  $AUC_{0-4}$ ,  $AUC_{0-12}$ ,  $C_{max}$ ,  $t_{max}$  und  $t_{1/2}$ . Tabelle 3.6 fasst die Ergebnisse nach einer einmaligen Digoxingabe von 0,25 mg zusammen. Nach Digoxin-Einzelgabe lag ein Großteil der Konzentrationen zum Abnahmezeitpunkt 24 h nach Applikation unterhalb des validierten Bestimmungsbereichs der Meßmethodik. Eine Kalkulation der Eliminationshalbwertszeiten ( $t_{1/2}$ ) und der  $AUC_{0-24}$  nach Digoxin-Einzelgabe war daher nicht möglich. Dementsprechend wurden lediglich die  $AUC_{0-12}$ -Werte der drei Gruppen verglichen.

Die kleinste Fläche unter der Kurve nach vier Stunden ( $AUC_{0-4}=1,85 \mu\text{g} \cdot \text{h/l}$ ) sowie nach 12 Stunden ( $AUC_{0-12}=2,96 \mu\text{g} \cdot \text{h/l}$ ) hatte die Gruppe mit dem Genotyp 2677GG/3435TT. Sie erreichte in der kürzesten Zeit ( $t_{max}=0,5 \text{ h}$ ) die geringste Maximalkonzentration ( $C_{max}=1,00 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Die größten Flächen unter der Kurve nach vier Stunden ( $AUC_{0-4}=2,36 \mu\text{g} \cdot \text{h/l}$ ) bzw. 12 Stunden ( $AUC_{0-12}=3,75 \mu\text{g} \cdot \text{h/l}$ ) wurden in der Gruppe mit dem Genotypen 2677GG/3435TT beobachtet. Das Konzentrations-Zeit-Profil nach einer einmaligen Digoxingabe von 0,25 mg zum Zeitpunkt  $t=0$  für die drei Gruppen wird in Abb. 3.2 dargestellt.

Im Kruskal-Wallis-Test ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen für  $t_{max}$  ( $p=0,006$ ). Die Maximalkonzentration wurde am schnellsten von der Gruppe mit dem Genotypen 2677GG/3435TT erreicht gefolgt von den Genotypen 2677TT/3435TT und 2677GG/3435CC (s. Abb. 3.3). Der Einzelvergleich der drei Gruppen mittels des Mann-Whitney-U-Tests bestätigte einen signifikanten Unterschied der  $t_{max}$ -Werte zwischen der Gruppe mit dem Genotypen 2677GG/3435TT zur Gruppe mit dem Genotypen 2577GG/3435CC ( $p=0,017$  bei exakter 2-seitiger Signifikanz) und der Gruppe mit dem Genotypen 2677TT/3435TT ( $p=0,036$  bei exakter 2-seitiger Signifikanz). Zwischen den Gruppen mit dem Genotypen 2677GG/3435CC und dem Genotypen 2577TT/3435TT gab es keine statistisch signifikanten Differenzen ( $p=0,127$ ).

## PK Digoxin, Einzeldosis

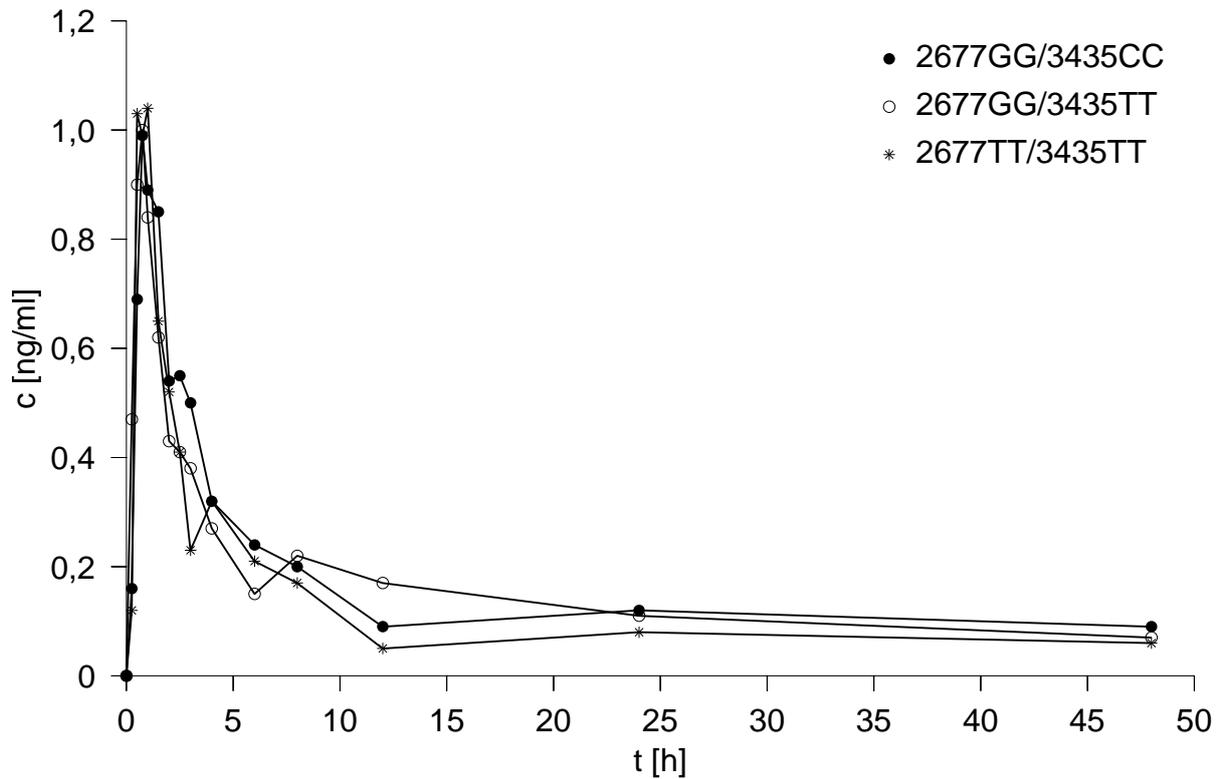


Abbildung 3.2: Konzentrations-Zeit-Verlauf nach einmaliger Digoxingabe von 0,25 mg für die drei verschiedenen Genotypen. Dargestellt sind die Mediane der Digoxin Konzentration.

Tabelle 3.6: Pharmakokinetische Daten bei einmaliger Digoxingabe.

	2677GG/3435CC n=10	2677GG/3435TT n=3	2677TT/3435TT n=8	p-Wert
$AUC_{0-4}$ [ $\mu\text{g} \cdot \text{h/l}$ ]	2,36 (1,42-4,05)	1,85 (1,37-2,28)	2,03 (0,91-3,77)	n.s.
$AUC_{0-12}$ [ $\mu\text{g} \cdot \text{h/l}$ ]	3,75 (2,20-7,48)	2,96 (2,64-3,32)	3,36 (1,06-6,85)	n.s.
$C_{\text{max}}$ [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]	1,19 (0,71-1,71)	1,00 (0,90-1,39)	1,12 (0,48-2,24)	n.s.
$t_{\text{max}}$ [h]	1,23 (0,73-2,60)	0,50 (0,48-0,73)	0,75 (0,50-1,00)	0,006

Angegeben sind Median und Spannweite.

n.s.: nicht signifikant.

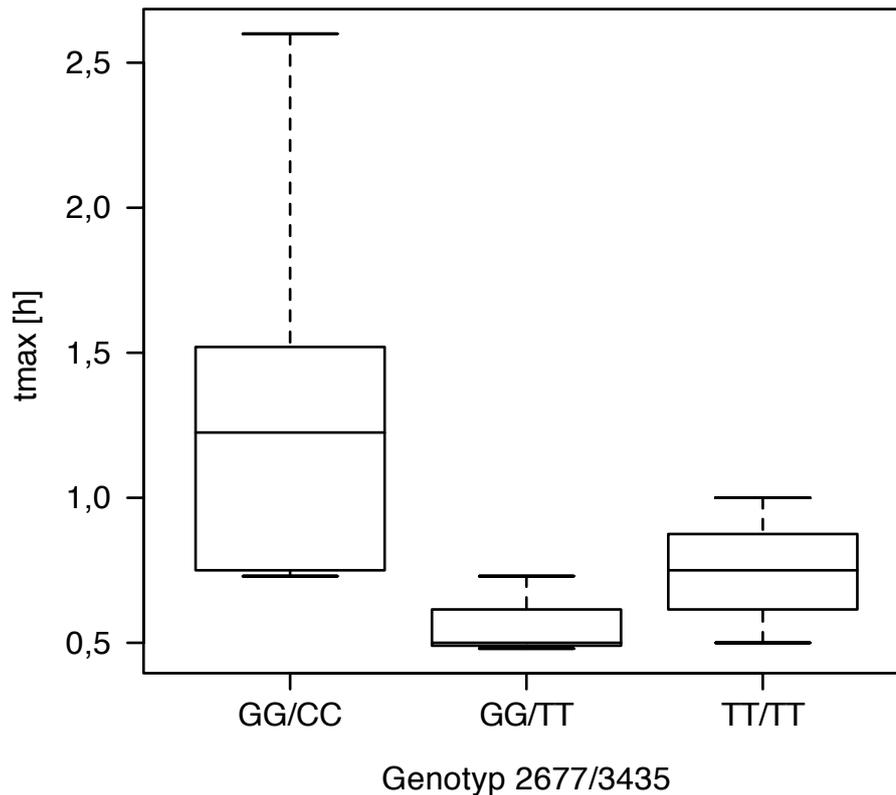


Abbildung 3.3: Whisker-Box-Plot-Diagramm zur Darstellung der  $t_{\max}$ -Werte der drei Gruppen nach Digoxin-Einmalgabe.

### 3.5 Pharmakokinetik von Digoxin nach Mehrfachgabe

Nach zweitägiger Aufsättigung mit 0,5 mg Digoxin pro Tag und Fortsetzung der Digoxin-Gabe mit 0,25 mg pro Tag über drei Tage erreichten die Probanden ein Fließgleichgewicht (Steady State) der Digoxin-Konzentration am Studientag 5. Tabelle 3.7 fasst die Ergebnisse der Pharmakokinetik zusammen.

Die Gruppe mit dem Genotyp 2677GG/3435CC erreichte im Mittel die größten Flächen unter den Kurven ( $AUC_{0-4}=5,83 \mu\text{g} \cdot \text{h/l}$ ,  $AUC_{0-24}=19,42 \mu\text{g} \cdot \text{h/l}$ ); in dieser Gruppe wurden auch längere Halbwertszeiten beobachtet ( $t_{1/2}=37,04 \text{ h}$ ). Eine höhere Maximalkonzentration wurde im Mittel von den Gruppen mit dem Genotypen 2677GG/3435CC ( $C_{\max}=1,98 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) und dem Genotypen 2677TT/3435TT ( $C_{\max}=1,98 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) erreicht, und zwar in kürzerer Zeit (Genotyp 2677GG/3435CC,  $t_{\max}=0,76 \text{ h}$ ; Genotyp 2677TT/3435TT,  $t_{\max}=0,75 \text{ h}$ ). Im Kruskal-Wallis-Test zeigten sich bei keinem der bestimmten Parameter ( $AUC_{0-4}$ ,  $AUC_{0-24}$ ,  $t_{\max}$ ,  $C_{\max}$ ,  $t_{1/2}$ ) statistisch signifikanten Unterschiede. Abb. 3.4 stellt die Konzentrations-Zeit-Verläufe der drei Gruppen dar. Die Menge ausgeschiedenen Digoxins im 24h Sammelurin  $A_{e0-24}$  und die renalen Clearance Werte  $Cl(\text{renal})$  unterschieden sich ebenfalls nicht statistisch signifikant zwischen den unterschiedlichen Genotypen (siehe Tabelle 3.7).

## PK Digoxin, Mehrfachgabe

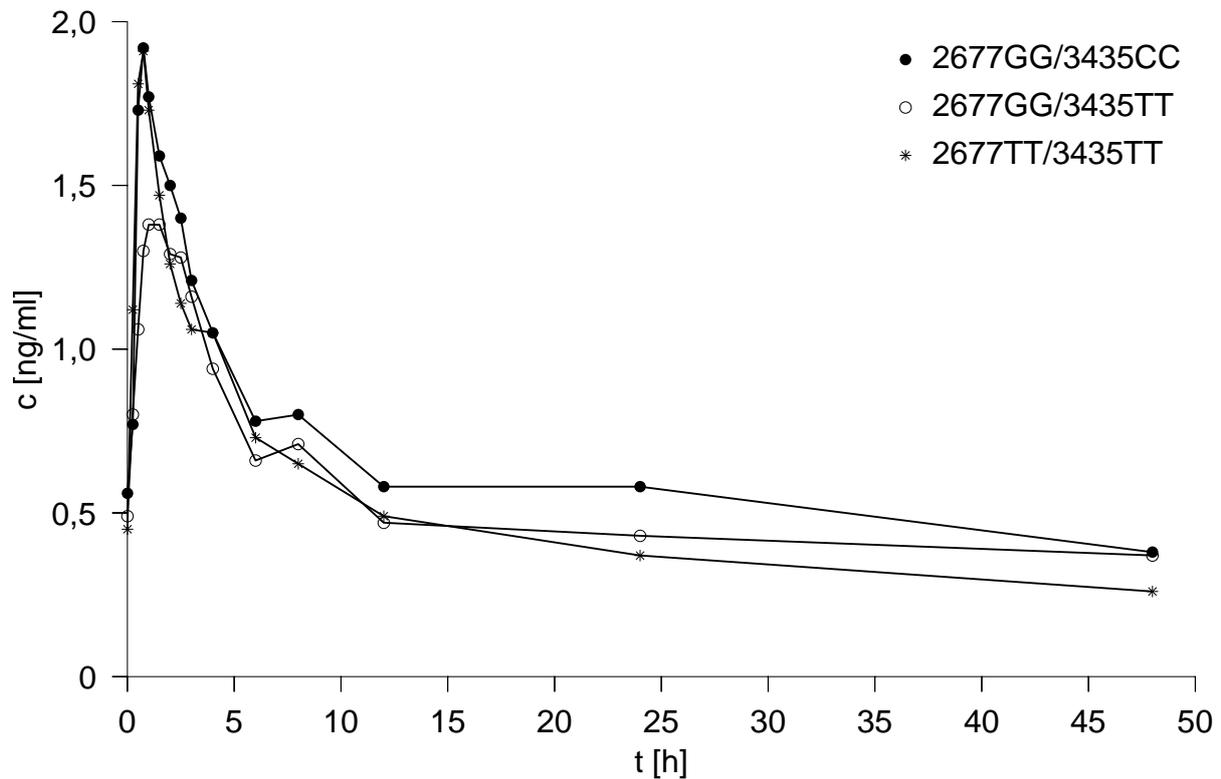


Abbildung 3.4: Konzentrations-Zeit-Verläufe der drei Gruppen nach Mehrfachgabe von Digoxin. Bei den Konzentrationswerten handelt es sich um die Mediane.

Tabelle 3.7: Pharmakokinetische Daten nach mehrfacher Digoxingabe.

Genotyp	2677GG/3435CC n=10	2677GG/3435TT n=3	2677TT/3435TT n=8	p-Wert
AUC <sub>0-4</sub> [ $\mu\text{g} \cdot \text{h/l}$ ]	5,83 (4,32-7,80)	5,18 (2,40-5,37)	5,21 (3,43-6,91)	n.s.
AUC <sub>0-24</sub> [ $\mu\text{g} \cdot \text{h/l}$ ]	19,42 (13,44-24,78)	16,58 (11,18-17,11)	15,62 (8,60-22,87)	n.s.
C <sub>max</sub> [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]	1,98 (1,51-2,86)	1,49 (0,78-1,99)	1,98 (1,29-2,95)	n.s.
t <sub>max</sub> [h]	0,76 (0,72-1,50)	0,98 (0,98-2,00)	0,75 (0,50-1,05)	n.s.
t <sub>1/2</sub> -Elimination [h]	37,04 (23,00-65,90)	35,22 (24,60-39,00)	33,57 (19,50-51,60)	n.s.
Ae <sub>0-24</sub> [ $\mu\text{g}$ ]	149,5 (135,6-198,9)	137,8 (116,7-150,2)	138,5 (72,6-196,0)	n.s.
Cl(renal) [ml/min]	0,509 (0,412-0,697)	0,499 (0,409-0,806)	0,453 (0,299-0,873)	n.s.

Angegeben sind Median und Spannweite.

n.s.: nicht signifikant.

# Kapitel 4

## Diskussion

Neben der Familie der Cytochrom-P450-Enzyme wird den Arzneimitteltransportern zunehmend Bedeutung in der Pharmakokinetik von Arzneimitteln zuerkannt. Das MDR1(ABCB1)-Produkt P-Glykoprotein wird in verschiedenen Geweben wie z. B. dem Gastrointestinaltrakt und der Blut-Hirn-Schranke exprimiert, wo es an der Sekretion seiner Substrate ins Darmlumen bzw. an der Aufrechterhaltung der Funktionsweise der Blut-Hirn-Schranke beteiligt ist. P-Glykoprotein besitzt ein breites Substratspektrum und transportiert eine Reihe pharmakologisch aktiver Substanzen, wodurch ihm eine besondere Bedeutung unter den Transportern zukommt.

### 4.1 Häufigkeiten und Allelverteilung der SNP 2677G>T und 3435C>T

Verschiedene SNP sind für das MDR1-Gen in afrikanischen, asiatischen und kaukasischen Populationen beschrieben worden [Hoffmeyer et al., 2000, Cascorbi et al., 2001, Kim et al., 2001]. In der vorliegenden Studie wurden die Polymorphismen 2677G>T/A und 3435C>T bei 1005 Probanden bestimmt. So ergab sich für die SNP 2677G>T/A und 3435C>T die folgende Verteilung: 2677G (56 %), 2677T (42 %), 2677A (2 %), 3435C (47 %) und 3435T (53 %). Diese Häufigkeiten stimmen mit den Ergebnissen bisheriger Publikationen überein (siehe Tabelle 4.1). Am deutlichsten zeigte sich die Übereinstimmung beim Vergleich mit den Studien, welche ebenfalls mit deutschen Probanden durchgeführt wurden. So ergab sich beispielsweise für die Genotypisierung von 461 gesunden Probanden deutscher Herkunft die folgende Verteilung der SNP 2677G>T/A und 3435C>T: 2677G (56 %), 2677T (42 %), 2677A (2 %), 3435C (46 %) und 3435T (54 %) [Cascorbi et al., 2001].

Aus der SNP-Allelverteilung der MDR1-Varianten 2677TG>T/A und 3435C>T wurden mit Hilfe des Programms Phase Version 2.0 die Häufigkeiten der möglichen Haplotypen berechnet. Hierbei ergab sich keine gleichmäßige Verteilung der Häufigkeiten der unterschiedlichen Haplotypen wie man es bei einer Unabhängigkeit der einzelnen SNP erwarten würde. Die beiden häufigsten Haplotypen 2677G/3435C und 2677T/3435T unterstützen die These einer möglichen genetischen

Kopplung der beiden Positionen 2677 und 3435 [Horinouchi et al., 2002], d.h. 2677G ist eher mit 3435C assoziiert und 2677T eher mit 3435T.

#### 4.1.1 Ethnische Unterschiede

Unterschiedliche Häufigkeiten zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen wurden für die SNP C1236T, G2677T/A und C3435T beschrieben (siehe Tabelle 4.1). So fand sich der Wildtyp des Exon26 (3435CC) in der afrikanischen Bevölkerung häufiger als in der europäisch-asiatischen [Kim et al., 2001, Schaeffeler et al., 2001]. Die Ursache hierfür könnte eine höhere intestinale P-Glykoprotein-Expression bei Trägern des Wildtyps sein. Dies würde einen besseren Schutz vor den in tropischen Ländern endemisch auftretenden Gastroenteritiden bieten [Schaeffeler et al., 2001].

Der Genotyp 2677AA (Exon 21) war häufiger in der japanischen Bevölkerung als bei den Europäern zu beobachten [Tanabe et al., 2001, Horinouchi et al., 2002, Moriya et al., 2002]. Die funktionellen pharmakokinetischen Effekte dieses Polymorphismus sind noch weitgehend unbekannt. In der japanischen Bevölkerung konnte weiterhin das Allel 1236T (Exon12) häufiger als bei Kaukasiern nachgewiesen werden [Tanabe et al., 2001, Tang et al., 2002].

Tabelle 4.1: Allel Häufigkeiten der MDR1-Polymorphismen 2677G>T/A und 3435C>T.

Population	Anzahl	3435		2677			Studie
		C	T	G	T	A	
<b>Kaukasier</b>							
Deutsche	188	0,52	0,48				[Hoffmeyer et al., 2000]
Deutsche	461	0,46	0,54	0,56	0,42	0,02	[Cascorbi et al., 2001]
Deutsche	537	0,50	0,50				[Schaeffeler et al., 2001]
Deutsche	50	0,49	0,51	0,52	0,38	0,10	[Gerloff et al., 2002]
US-Amerikaner	37	0,46	0,54	0,54	0,46	n.b.	[Kim et al., 2001]
<b>Asiaten</b>							
Japaner	48	0,51	0,49	0,36	0,42	0,22	[Tanabe et al., 2001]
Japaner	117	0,62	0,38	0,44	0,36	0,20	[Horinouchi et al., 2002]
Japaner	13	0,54	0,46	0,39	0,46	0,15	[Moriya et al., 2002]
Chinesen	104	0,60	0,40	0,50	0,44	0,06	[Tang et al., 2002]
Malaisier	93	0,63	0,37	0,58	0,36	0,06	[Tang et al., 2002]
Inder	68	0,40	0,60	0,34	0,62	0,04	[Tang et al., 2002]
<b>Afrikaner</b>							
US-Amerikaner*	23	0,74	0,26	0,85	0,15	n.b.	[Kim et al., 2001]
US-Amerikaner*	41	0,78	0,22				[Schaeffeler et al., 2001]
Ghaner	172	0,90	0,10				[Schaeffeler et al., 2001]

\*Afrikanischer Abstammung.

n.b.: nicht bestimmt.

Der kombinierte Genotyp 1236TT/2677TT/3435TT wurde bei 62 % der Kaukasier aber nur bei 13 % der Afrikaner bestimmt [Kim et al., 2001]. Unterschiedliche Häufigkeiten der aus den SNP 1236C>T, 2677G>T und 3435C>T gebildeten Haplotypen wurden bei Chinesen, Indern und Malaysiern beschrieben [Tang et al., 2002]. In den drei ethnischen Gruppen wurden von 12 möglichen Haplotypen zwei bis drei häufiger als die übrigen beobachtet. Aus 247 DNA-Proben unterschiedlicher ethnischer Gruppen wurden *in silico* 64 verschiedene Haplotypen des MDR1-Gens ermittelt [Kroetz et al., 2003]. Die häufigsten Haplotypen (ABCB1\*1=Wildtyp und ABCB1\*13) unterscheiden sich in drei Positionen in Introns, zwei synonymen Positionen in Exon12 (1236) und Exon26 (3435) und einer nicht synonymen Position in Exon21 (2677). In Proben von US-Amerikanern afrikanischer Abstammung zeigte sich der Haplotyp ABCB1\*13 seltener, während der Haplotyp ABCB1\*1 in den verschiedenen ethnischen Gruppen gleichmäßig verteilt war. Die Haplotyp-Variation war bei den afrikanischen Proben mit 55 verschiedenen Haplotypen deutlich höher als bei den kaukasischen Proben mit 25 Haplotypen.

## 4.2 Funktionalität der SNP 2677G>T und 3435C>T

### 4.2.1 MDR1-mRNA-Expression

In einer retrospektiven Untersuchung an 21 gesunden kaukasischen Probanden wurde erstmals eine Korrelation zwischen dem Polymorphismus 3435C>T und der duodenalen P-Glykoprotein-Expression beschrieben [Hoffmeyer et al., 2000]. Probanden mit dem Genotypen 3435TT (n=5) hatten im Vergleich zu den Genotypen 3435CT (n=10) und 3435CC (n=6) eine erniedrigte P-Glykoprotein-Expression.

Ein eindeutiger Einfluss des SNP 3435C>T auf die MDR1-mRNA-Expression oder die P-Glykoprotein-Expression konnte in weiteren Studien nicht bestätigt werden. Einen gegenteiligen Trend zur obigen Untersuchung wies [Nakamura et al., 2002] nach. Von 11 japanischen Probanden hatte die Gruppe des Genotyps 3435TT (n=4) die höchste duodenale MDR1-mRNA-Expression im Vergleich zu den Genotypen 3435CT (n=4) und 3435CC (n=5). In einer Untersuchung mit deutschen Probanden ergab sich nach [Siegmond et al., 2002] für den SNP 3435C>T kein Effekt auf die duodenale mRNA-Expression (n=32, 3435CC=7, CT=16, TT=9) oder die duodenale P-Glykoprotein-Expression (n=37, 3435CC=9, CT=18, TT=10). In einer weiteren Studie, bei der 13 gesunden asiatischen Probanden Biopsien aus dem Duodenum entnommen wurden, war ebenfalls keine signifikante Korrelation zwischen der MDR1-mRNA-Expression und dem Polymorphismus 3435C>T vorhanden [Moriya et al., 2002].

Die Betrachtung weiterer P-Glykoprotein exprimierender Gewebe lieferte ebenfalls keine eindeutigen Resultate. Eine Untersuchung an 73 Plazenten kaukasischer Mütter konnte keinen Einfluss der MDR1-SNP 2677G>T, 3435C>T auf die plazentare MDR1-mRNA-Expression zeigen [Hitzl et al., 2004]. Allerdings war die Expression von P-Glykoprotein verringert, wenn Mutter und Kind gemeinsam den Genotypen 3435TT hatten bzw. bei der Mutter allein der Genotyp

2677TT/3435TT vorlag. Eine Untersuchung an 89 Plazenten japanischer Mütter fand keine signifikanten Unterschiede in der plazentaren P-Gp-Expression in Abhängigkeit vom mütterlichen SNP 3435C>T [Tanabe et al., 2001].

Tabelle 4.2 fasst die Ergebnisse von Studien zum Einfluss der SNP 2677G>T(A) und 3435C>T auf die mRNA-Expression zusammen.

Tabelle 4.2: Übersicht Studienergebnisse MDR1-mRNA- bzw. P-Gp-Expression.

Studie	Population	Parameter	Effekt
[Hitzl et al., 2004]	73 Kaukasier	Plazenta, mRNA	2677TT/3435TT <GG/CC 3435TT<CT/CC*
[Hoffmeyer et al., 2000]	21 Kaukasier	Duodenum, P-Gp	3435TT<CT<CC
[Nakamura et al., 2002]	13 Japaner	Duodenum, mRNA	3435TT>CT>CC
[Siegmond et al., 2002]	32 (37) Kaukasier	Duodenum, mRNA (P-Gp)	kein Effekt
[Moriya et al., 2002]	13 Japaner	Duodenum, mRNA	kein Effekt
[Tanabe et al., 2001]	89 Japanerinnen	Plazenta, P-Gp	kein Effekt

\*Nur bei gleichem Genotyp von Mutter und Kind, sonst kein Effekt.

## 4.2.2 MDR1-mRNA-Stabilität

Aufgrund eines schnelleren *in-vitro*-Abbaus der mRNA bei Vorliegen des 3435T-Allels im Vergleich zum 3435C-Allel in transfizierten Zelllinien wurde auf eine geringere MDR1-mRNA-Stabilität bei Vorhandensein des 3435T-Allels geschlossen [Wang et al., 2005]. Die Polymorphismen 1236C>T und 2677G>T, welche häufig mit dem SNP3435C>T assoziiert sind, zeigten in der Studie keinen Einfluss auf die mRNA-Stabilität. Berechnungen des Programms Mfold zur Bestimmung der Sekundärstruktur von MDR1-mRNA ließen jedoch vermuten, dass alle drei Polymorphismen alleine oder in Kombination die Stabilität der mRNA beeinflussen könnten. Diese These wurde durch den Nachweis einer verringerten hepatischen MDR1-mRNA-Expression für das 3435T-Allel anhand von 36 Leberautopsien gestützt [Wang et al., 2005].

Vom obigen Ergebnis ausgehend würde man für den Genotypen 3435TT einen erniedrigten Gehalt an MDR1-mRNA erwarten, was in den Studien zur mRNA-Expression in Abhängigkeit vom SNP3435C>T jedoch nicht immer gezeigt werden konnte (s. Tab. 4.2).

## 4.2.3 Transportfunktion des P-Glykoprotein

Ein erniedrigter Transport von Rhodamin in CD56+ Zellen beim Genotypen 3435TT könnte ein Hinweis auf einen Einfluss des SNP 3435C>T auf die Transportfunktion von P-Glykoprotein sein [Drescher et al., 2002]. Da es sich jedoch um einen synonymen Polymorphismus handelt, kann es

sich bei der Ursache des Effektes nicht um eine Veränderung des Proteins durch den Austausch einer Aminosäure handeln. In anderen Studien konnte ein Einfluss der SNP 2677G>T und 3435C>T auf den Rhodamin-Transport in CD56+ Zellen nicht bestätigt werden [Oselin et al., 2003].

Der Polymorphismus 2677G>T/A führt zum Austausch einer Aminosäure im P-Glykoprotein (Ala893Ser/Thr). Dieser Austausch könnte durch eine Veränderung der Sekundärstruktur die Transportfunktion des P-Glykoproteins beeinflussen. Passend hierzu hatten MDR1-Ser893 exprimierende Zellen nach einer 30-minütigen Inkubation mit Digoxin erniedrigte intrazelluläre Konzentrationen im Vergleich zum Wildtyp MDR1-Ala893 [Kim et al., 2001]. *In-vitro* wurde auch ein erniedrigter Km-Wert für den Vincristin-Transport von MDR1-893Ser im Vergleich zum Wildtyp und MDR1-893Thr bestimmt [Schaefer et al., 2006]. Die Clearance des Polymorphismus MDR1-893Thr war im Gegensatz zu den beiden anderen Varianten um mehr als das Doppelte erhöht. Diese Resultate könnten auf unterschiedliche Substrataffinitäten und Transportkapazitäten der verschiedenen Transporter hinweisen.

Beim Transport von Calcein-AM gab es zwischen MDR1-893Ser und MDR1-893Ala exprimierenden Zellen hingegen keinen signifikanten Unterschied [Kroetz et al., 2003]. Die transfizierten Zelllinien unterschieden sich neben den Polymorphismus 2677G>T allerdings noch in zwei synonymen SNP 1236 C>T, 3435C>T und drei weiteren SNP (Intron9-44A>G, Intron13+24C>T, Intron14+38A>G).

### 4.3 Funktionalität der untersuchten MDR1-Haplotypen

In vielen Studien wurden Korrelationen zwischen Polymorphismen des MDR1-Gens und pharmakokinetischen Effekten aufgezeigt. Aufgrund ihres häufigen Vorkommens wurden in den meisten Fällen die SNP 2677G>T und 3435C>T untersucht. Teilweise widersprachen sich die Ergebnisse einzelner Studien bei der Betrachtung einzelner SNP. Einige der widersprüchlichen Resultate könnten durch die Effekte mehrerer SNP begründet und durch die Analyse von Haplotypen teilweise wieder in Einklang gebracht werden.

Die Funktionalität der untersuchten Haplotypen leitet sich möglicherweise aus einer Kombination der Effekte der einzelnen SNP 2677G>T und 3435C>T ab. Während der SNP 2677G>T(A) durch einen Aminosäureaustausch zu einer Veränderung der Funktionalität des P-Glykoproteins führen könnte, handelt es sich beim SNP 3435C>T um einen synonymen Polymorphismus. Effekte des SNP3435C>T wären denkbar über eine genetische Kopplung zu Polymorphismen in der Promotorregion oder zu Sequenzen, welche die mRNA-Prozessierung, die mRNA-Stabilität oder das Splicing steuern. Ein direkter Einfluss des SNP 3435C>T auf die mRNA-Stabilität könnte ebenfalls möglich sein. Je nach Funktionalität der einzelnen SNP würden sich deren Effekte je nach Haplotyp synergistisch oder antagonistisch überlagern, woraus im einen Fall der pharmakokinetische Effekt verstärkt und im anderen Fall aufgehoben würde.

Der Einfluss der Genotypen 2677GG/3435CC, 2677GG/3435TT und 2677TT/3435TT des MDR1-Gens auf die Pharmakokinetik von Fexofenadin und Digoxin bei gesunden Probanden

wurde in der vorliegenden Studie untersucht. Es sollten die Ergebnisse von [Johne et al., 2002] verifiziert werden. Durch die Betrachtung von Haplotypen wurde ein möglicher gemeinsamer Effekt der einzelnen SNP 2677G>T und 3435C>T auf die Pharmakokinetik von Digoxin untersucht. Es ergaben sich höhere  $AUC_{0-4}$ - und  $C_{max}$ -Werte für Träger des Haplotypen 2677G/3435T (n=7) im Vergleich zu Trägern anderer Haplotypen (n=17). Träger des Haplotypen 2677G/3435C (n=16) zeigten im Vergleich zu Nichtträgern (n=8) erniedrigte  $AUC_{0-4}$ - und  $C_{max}$ -Werte. Keine signifikanten Unterschiede in den  $AUC_{0-4}$ - und  $C_{max}$ -Werten gab es zwischen Trägern (n=15) und Nichtträgern (n=9) des Haplotypen 2677T/3435T.

Aus den obigen Ergebnissen wurde auf die Existenz funktioneller Haplotypen geschlossen. Erst die Annahme eines dominanten Erbganges ermöglichte einen Vergleich der Digoxin-Kinetiken zwischen Trägern und Nicht-Trägern des untersuchten Haplotypen. Somit würden sich die Ergebnisse und die daraus gezogenen Schlussfolgerungen von [Johne et al., 2002] am besten mit homozygot vorliegenden Haplotypen bestätigen lassen. In der eigenen Studie wurden folglich die Genotypen 2677GG/3435CC, 2677GG/3435TT und 2677TT/3435TT untersucht. Entsprechend würde man so z.B. für den Genotyp 2677GG/3435TT die höchsten  $AUC_{0-4}$ - und  $C_{max}$ -Werte für Fexofenadin und Digoxin erwarten. Diese Erhöhung könnte durch Veränderungen der Expression oder der Transportfunktion des P-Glykoproteins erklärt werden.

#### 4.4 Fexofenadin-Kinetik-Vergleich mit anderen Studien

Für das Vorhandensein funktioneller Unterschiede zwischen den von uns untersuchten Haplotypen sprechen die Ergebnisse einer Studie mit 37 (20 Frauen) US-Amerikanern europäischer und 23 (20 Frauen) US-Amerikanern afrikanischer Abstammung [Kim et al., 2001]. Die Probanden erhielten eine einmalige Dosis von 180 mg Fexofenadin-HCl. Es ergaben sich bis zu 40 % geringere  $AUC_{0-4}$ -Werte beim Genotyp 1236TT/2677TT/3435TT (n=4) im Vergleich zum Genotyp 1236CC/2677GG/3435CC (n=6) [Kim et al., 2001]. Die Fexofenadin- $AUC_{0-4}$ -Werte waren auch bei den Trägern des Genotyps 3435TT (n=12) im Vergleich zum Genotypen 3435CC (n=9) in der Gruppe der europäisch-amerikanischen Probanden signifikant erniedrigt [Kim et al., 2001]. Ähnliche Resultate ergaben sich bei der Betrachtung des SNP 2677G>T mit geringeren  $AUC_{0-4}$ -Werten beim Genotyp 2677TT (n=10) im Vergleich zum Genotyp 2677GG (n=13).

Demgegenüber konnte in der eigenen Studie kein Einfluss der drei Genotypen 2677GG/3435CC, 2677GG/3435TT und 2677TT/3435TT auf die Pharmakokinetik von Fexofenadin in Einfachgabe nachgewiesen werden. Zum gleichen Ergebnis wie wir kommt eine prospektive klinische Studie mit 20 gesunden Probanden (6 Männer und 4 Frauen mit 3435CC bzw. 3 Männer und 7 Frauen mit 3435TT) kaukasischer Herkunft nach einer einmaligen Gabe von 180 mg Fexofenadinhydrochlorid [Drescher et al., 2002]. Die Gruppen der Genotypen 1236CC/2677GG/3435CC (n=7) und 1236TT/2677TT/3435TT (n=7) unterschieden sich in ihren pharmakokinetischen Parametern nicht signifikant voneinander. Somit war ein gemeinsamer Einfluss der SNP 1236C>T, 2677G>T und 3435C>T auf die Fexofenadin Pharmakokinetik nicht feststellbar. Eine zusätzliche Einzel-

SNP-Analyse ergab ebenfalls keinen Einfluss des SNP 3435C>T auf die  $AUC_{0,3}$ ,  $AUC_{0,\infty}$ ,  $t_{max}$ ,  $C_{max}$ ,  $t_{1/2}$ ,  $Ae(0,72h)$  oder die orale, renale bzw. nicht renale Clearance von Fexofenadin-HCl [Drescher et al., 2002]. Insgesamt wurden in der Studie die folgenden SNP bestimmt: Intron1 (Exon2-1), Exon2 (61G>A), Exon11 (1199G>A), Exon12 (1236C>T), Intron12 (Exon12+44), Exon21 (2677G>T/A), Exon 26 (3320A>C, 3421T>A). Hiervon führen die SNP 61G>A und 2677G>T/A zu einem Aminosäureaustausch im P-Glykoprotein.

In einer weiteren prospektiven Studie mit 33 koreanischen Probanden konnte ebenfalls kein gemeinsamer Einfluss der Polymorphismen 1236C>T, 2677G>T/A und 3435C>T auf die Pharmakokinetik von Fexofenadin festgestellt werden [Yi et al., 2004]. Hierzu wurden 12 Gruppen mit unterschiedlichen Genotypen in den drei Positionen mittels des Kruskal-Wallis-Tests miteinander verglichen. Die Gruppengröße lag hierbei zwischen einer bis maximal sechs Personen. Ein Unterschied ergab sich hingegen beim Vergleich der Fexofenadin-Kinetik bei sechs Gruppen mit den folgenden Genotypen: 2677GG/3435CC (n=5), 2677GT/3435CT (n=6), 2677TT/3435TT (n=6), 2677GA/3435CC (n=7), 2677TA/3435CT (n=6), 2677AA/3435CC (n=3). Die Träger des Genotyps 2677AA/3435CC hatten nach der Einmalgabe von 180 mg Fexofenadin-HCl vergleichsweise geringere  $AUC_{0-24}$ -Werte als alle anderen Gruppen. In der eigenen Studie wurde ein Einfluss eines A-Allels in Position 2677 nicht untersucht. Bei isolierter Betrachtung des SNP 3435C>T waren bei [Yi et al., 2004] die  $AUC_{0-24}$ -Werte bei Trägern des Genotyps 3435TT (n=6) im Vergleich zum Genotyp 3435CC (n=15) ebenfalls erhöht. Tabelle 4.3 fasst die Ergebnisse der Studien zu den erwähnten MDR1-Polymorphismen zusammen.

Die Diskrepanzen in den Ergebnissen der erwähnten Studien könnten auf das Vorhandensein von einem oder mehreren Influx-Transportern hinweisen, welche massgeblich an der Absorption von Fexofenadin aus dem Intestinaltrakt beteiligt sind. In diesem Falle würde die Absorption des Fexofenadin stärker von der Funktion dieser Transporter als vom P-Glykoprotein abhängen. Die Ergebnisse der eigenen Studie unterstützen diese These, da hier kein Einfluss der untersuchten MDR1-SNP auf die Pharmakokinetik von Fexofenadin feststellbar war. Fexofenadin liegt bei physiologischem pH-Wert als Zwitterion vor und unterliegt ohne spezielle Influx-Transporter *in-vitro* einem limitierten Transport ins Zellinnere (Caco-2 Zellen) [Cvetkovic et al., 1999]. Durch OATP-A, einem in Enterozyten und im Lebergewebe lokalisiertem Transportprotein, wird Fexofenadin

Tabelle 4.3: Übersicht Studienergebnisse Fexofenadin

Studie	Population	Fexofenadin	Parameter	Effekt
[Kim et al., 2001]	60 Kaukasier und Afrikaner	Einmaldosis, oral	AUC	1236TT/2677TT/3435TT > CC/GG/CC
[Yi et al., 2004]	33 Koreaner	Einmaldosis, oral	$AUC_{0-24}$	2677AA/3435CC < übrige Genotypen
[Drescher et al., 2002]	20 Kaukasier	Einmaldosis, oral	AUC	kein Effekt

aktiv ins Zellinnere transportiert [Cvetkovic et al., 1999]. Die Inhibition von intestinalem OATP-A wurde als Ursache einer Reduktion der Bioverfügbarkeit von Fexofenadin bei gleichzeitiger Einnahme mit Grapefruit-Saft diskutiert [Dresser et al., 2005].

## 4.5 Digoxin-Kinetik-Vergleich mit anderen Studien

Nimmt man nach den Ergebnissen von [Johns et al., 2002] für die Haplotypen 2677G/3435T und 2677T/3435T eine erhöhte bzw. erniedrigte Digoxin-Resorption an, so ließen sich hiermit unterschiedliche Pharmakokinetiken bei alleiniger Betrachtung des Genotyps 3435TT erklären. Eine Untersuchung an 15 asiatischen Probanden ergab beispielsweise nach einer Einfachgabe von 0,25 mg Digoxin niedrigere  $AUC_{0-4}$  Werte für den Genotyp 3435TT (n=6) im Vergleich zu den Genotypen 3435CT (n=4) und 3435CC (n=5) [Sakaeda et al., 2001]. In einer weiteren Studie mit 11 japanischen Probanden wurden nach endoskopischer Applikation von 0,25 mg Digoxin, welches aufgelöst in 5 ml isotonischer Salzlösung direkt über die Oberfläche des Duodenums gesprenkelt wurde, ebenfalls niedrigere  $AUC_{0-4}$ -Werte in der 3435TT-Gruppe (n=6) als in der 3435CC-Gruppe (n=5) bestimmt [Morita et al., 2003]. Die erniedrigten AUC-Werte der beiden Studien ergäben sich somit aus einer Überzahl an Trägern des Haplotyps 2677T/3435T in der Gruppe des Genotyps 3435TT.

Eine Untersuchung mit 32 gesunden Probanden, die in einer von drei Studien mit einer Digoxinkinetik nach einer Einmalgabe von 0,5 mg Digoxin teilgenommen hatten, erbrachte erhöhte AUC-Werte für den Genotyp 3435TT [Verstuyft et al., 2003]. Das untersuchte Probandenkollektiv war heterogen mit 25 Kaukasiern (20 Männer, 5 Frauen), 6 Afrikanern (2 Männer, 4 Frauen) und einem asiatischen Mann. Homozygote 3435TT-Träger hatten um 20 % höhere Plasmakonzentrationen als 3435CT- oder 3435CC-Träger. Für den Polymorphismus 2677G>T wurden ähnliche Trends beobachtet, die jedoch nicht statistisch signifikant waren [Verstuyft et al., 2003]. Passend hierzu wurden in einer vorausgegangenen retrospektiven Studie mit 14 gesunden Probanden [Hoffmeyer et al., 2000] nach der Einnahme von 0,25 mg Digoxin im Fließgleichgewicht signifikant höhere  $C_{max}$ -Werte in der 3435TT-Gruppe (n=7) im Vergleich zur 3435CC-Gruppe (n=7) nachgewiesen. Die höheren AUC-Werte ließen sich aus einer Überzahl an Trägern des Haplotyps 2677G/3435T in der Gruppe des Genotyps 3435TT erklären.

Ein weiterer Hinweis auf einen Einfluss der untersuchten Haplotypen auf die Resorption von Digoxin ergab sich aus einer Untersuchung mit 15 asiatischen Probanden [Kurata et al., 2002]. Es wurde ein erhöhter Digoxin-AUC-Wert und eine höhere Bioverfügbarkeit für den Genotypen 2677TT/3435TT im Vergleich zu 2677GG/3435CC bestimmt. Ein Effekt der SNP 2677G>T und 3435C>T auf die AUC bei intravenöser Applikation von Digoxin war nicht erkennbar. Insgesamt wurden drei Gruppen zu je fünf Personen mit den Genotypen 2677GG/3435CC, 2677GT/3435CT und 2677TT/3435TT gebildet. Die Probanden erhielten in einem Cross-Over-Design 0,5 mg Digoxin oral und intravenös sowie 0,25 mg Digoxin oral und intravenös am sechsten Tag während einer achttägigen oralen Gabe von 400 mg Clarithromycin. Zusätzlich wurde für den Genotyp

2677TT/3435TT bei oraler Digoxin Applikation eine Verringerung der renalen Clearance um 32 % im Vergleich zum Wildtyp 2677GG/3435CC nachgewiesen. Die abnehmende renale Clearance korrelierte mit einer zunehmenden Bioverfügbarkeit von Digoxin. Hieraus wurde auf eine gemeinsame Verringerung der renalen und intestinalen Clearance geschlossen.

Die Ergebnisse von [Gerloff et al., 2002] mit 50 deutschen Probanden zeigten in Übereinstimmung mit den eigenen Studienergebnissen nach Einmalgabe von 1 mg Digoxin hingegen keinen signifikanten Unterschied in der  $AUC_{0-4}$  für den Genotyp 2677TT/3435TT (n=6) im Vergleich zum Genotyp 2677GG/3435CC (n=7). Für die einzelnen Polymorphismen 2677G>T und 3435C>T sowie die SNP Intron1 (Exon 2-1), Exon2 (cDNA 61), Intron6 (Exon6+139), Exon11 (cDNA 1199) oder Intron16 (Exon 17-76) wurde ebenfalls kein Einfluss auf die Pharmakokinetik von Digoxin nachgewiesen.

Tabelle 4.4 fasst die Ergebnisse der Studien zu den erwähnten MDR1-Polymorphismen zusammen.

Tabelle 4.4: Übersicht Studienergebnisse Digoxin

Studie	Population	Digoxin	Parameter	Effekt
[Kurata et al., 2002]	15 Japaner	Einmaldosis, oral	AUC, Bioverfügbarkeit	2677TT/3435TT > GG/CC
[Johne et al., 2002]	24 Kaukasier	Steady State, oral	$AUC_{0-4}$ , $C_{max}$	2677T/3435T > G/C
[Hoffmeyer et al., 2000]	14 Kaukasier	Steady State, oral	$C_{max}$	3435TT > CC
[Verstuyft et al., 2003]	32 Kaukasier und Afrikaner	Einmaldosis, oral	$AUC_{0-24}$	3435TT > CC
[Sakaeda et al., 2001]	15 Japaner	Einmaldosis, oral	$AUC_{0-4}$	3435TT < CC
[Morita et al., 2003]	11 Japaner	Endoskop, duodenal	$AUC_{0-4}$	3435TT < CC
[Gerloff et al., 2002]	50 Kaukasier	Einmaldosis, oral	$AUC_{0-4}$ , $C_{max}$	Kein Effekt

## 4.6 Interpretation der eigenen Pharmakokinetiken

Insgesamt ergaben die eigenen Studienergebnisse keinen eindeutigen Hinweis auf eine klinisch relevante Funktionalität der untersuchten Haplotypen. Hinsichtlich des primären Zielparameters  $AUC_{0-4}$  ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den Pharmakokinetiken von Fexofenadin und Digoxin in Einfach- und Mehrfachgabe zwischen den verschiedenen Haplotypen.

Nach der Einmalgabe von Digoxin war beim Genotypen 2677GG/3435TT eine durchschnittlich um 33,3 % bzw. 59,3 % schnellere Absorption von Digoxin im Vergleich zu den Genotypen 2677TT/3435TT bzw. 2677GG/3435CC feststellbar. Zwischen den Genotypen 2677GG/3435CC und 2677TT/3435TT gab es keinen Unterschied in der Absorptionsgeschwindigkeit. Ein Grund hierfür könnten gegensätzliche Wirkungen des SNP 2677TT und des SNP 3435TT auf die Funktion oder Expression des duodenalen P-Glykoproteins sein. Die beiden gegensätzlichen Wirkungen würden sich in der Gruppe 2677TT/3435TT gegenseitig aufheben, so dass keine Unterschiede in der Digoxin-Pharmakokinetik festzustellen wären.

Der fehlende Unterschied von  $t_{\max}$  in der Fexofenadin-Kinetik zwischen den untersuchten Haplotypen mag einerseits an unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften der beiden Substanzen liegen, sie könnten aber auch an verschiedenen aktiven Zentren des P-Glykoproteins mit per se unterschiedlichen Transporteigenschaften binden.

In der Pharmakokinetik von Fexofenadin und Digoxin nach Mehrfachgabe wurden keine Differenzen in der Absorptionsgeschwindigkeit zwischen den drei Genotypen festgestellt. Möglicherweise ist die maximale Sekretionskapazität des duodenalen P-Glykoproteins bei Mehrfachgabe von Digoxin durch Akkumulationsprozesse überschritten, so dass Digoxin hauptsächlich über passive Diffusionsprozesse absorbiert wird. Die Barrierefunktion des P-Glykoproteins wäre somit ab einem gewissen Schwellenwert überwunden, wodurch Unterschiede in der Funktionsweise von P-Glykoprotein nicht mehr erkennbar wären. Fexofenadin wird wahrscheinlich über Influx-Transporter absorbiert, wodurch die Barrierefunktion des P-Glykoproteins überwunden würde.

#### 4.6.1 Einflussfaktoren und Störfaktoren

Neben P-Glykoprotein könnten auch andere Efflux-Transporter an der Absorption und Sekretion von Digoxin oder Fexofenadin im Duodenum beteiligt sein, was den Nachweis eines Unterschiedes in den Pharmakokinetiken zwischen den untersuchten Gruppen verhinderte. So gehören Fexofenadin und Digoxin zu den Substraten des Influx-Transporters OATP1B1 (des SLCO1B1-Gens) bzw. OATP1B3, früher OATP8, (des SLCO1B3-Gens) [Cvetkovic et al., 1999, Letschert et al., 2004, Niemi et al., 2005]. Influx-Transporter der OATP-Familie finden sich in verschiedenen Geweben wie der Leber, der Niere, der Blut-Hirn-Schranke und im Gastrointestinaltrakt [Gerloff, 2004]. Die Sekretion von Digoxin konnte in Caco-2-Zellen mittels einer Substanz (MK-571) inhibiert werden, welche MRP (multidrug resistance protein) und nicht P-Glykoprotein in seiner Funktion blockiert [Lowe et al., 2003]. Dies weist auf die Existenz eines alternativen, MK-571 sensitiven Digoxin-Transports in Caco-2-Zellen hin.

Beim Vergleich der eigenen Ergebnisse sind auch die chemischen und physikalischen Eigenschaften (Löslichkeit, pK-Wert, Molekulargewicht, etc.) sowie die Transport- und Metabolisierungswege der unterschiedlichen Testsubstanzen zu beachten. Digoxin wird hauptsächlich renal eliminiert, während Fexofenadin fäkal ausgeschieden wird. Aufgrund seiner Fettlöslichkeit kann Digoxin besser als Fexofenadin durch die Plasmamembran der Zelle diffundieren und damit die

Barrierefunktion von Zellepithelien überwinden. Die Absorption von Fexofenadin ist demnach wahrscheinlich stärker von der Anwesenheit entsprechender Transportproteine abhängig.

Bei niedrigem Magen-pH-Wert wurde eine zunehmende Hydrolyse von Digoxin nachgewiesen [Gault et al., 1980]. Weiterhin zeigte sich eine Zunahme von Metaboliten des Digoxins im Urin bei Stimulation der Magensäureproduktion mittels Gabe von Pentagastrin [Gault et al., 1981]. Ein Abbau von Digoxin zu inaktiven Metaboliten könnte auch über die Darmflora erfolgen. So stieg die Serumkonzentrationen von Digoxin nach einer fünftägigen Antibiotikabehandlung bis auf das Doppelte der Ausgangswerte an [Lindenbaum et al., 1981]. Die hepatische UDP-Glukuronyl-Transferase ist an der Metabolisierung von Digoxin beteiligt [Lacarelle et al., 1991], wodurch die Pharmakokinetik von Digoxin ebenfalls beeinflusst sein könnte.

Obwohl in der eigenen Studie der Konsum von Phytopharmaka sowie von Fruchtsäften und grünem Tee untersagt war, ist ein modulierender Einfluss anderer Lebensmittel auf die Funktion von P-Glykoprotein nicht ganz auszuschliessen. Standardisierte Mahlzeiten erhielten die Probanden lediglich an den Kinetiktagen. Der Verzehr von Knoblauch oder das Würzen von Speisen mit Pfeffer war während der Studie nicht untersagt. Piperin, ein Hauptinhaltsstoff des schwarzen Pfeffers, ist beispielsweise in der Lage, P-Glykoprotein zu inhibieren [Bhardwaj et al., 2002]. Knoblauch und Gelbwurz sind weitere Gewürze, die P-Glykoprotein inhibieren könnten – eine Induktion von P-Glykoprotein durch Knoblauch wird ebenfalls diskutiert [Zhou et al., 2004].

Schließlich sind die Fallzahlen in der Interpretation der Studienergebnisse zu berücksichtigen. Bereits wenige zufällige Ausreisser können innerhalb einer Gruppe mit geringer Fallzahl zu falsch positiv signifikanten Ereignissen führen. Andererseits wurde die Power durch die nicht erreichte Fallzahl in der Gruppe des Genotyps 2677GG/3435TT reduziert, was den Nachweis eines tatsächlich vorhandenen Unterschiedes erschwert.

## 4.7 Schlussfolgerungen

Möglicherweise resultieren klinisch relevante Einflüsse des MDR1-Gens auf die Gewebeverteilung oder die Bioverfügbarkeit einer Substanz aus einer Überlagerung der Effekte mehrerer Polymorphismen. Die Effekte der untersuchten SNP 2677G>T und 3435C>T zur Vorhersage der Pharmakokinetik von Fexofenadin oder Digoxin sind nach den eigenen Ergebnissen nicht ausreichend. Zum Verständnis des Einflusses genetischer Polymorphismen des MDR1-Gens auf die Pharmakokinetik dieser Substanzen bedarf es neben einer ausreichenden Anzahl von SNP für die Haplotypen-Analyse wahrscheinlich der Analyse von Haplotypen weiterer Gene von Transportern und Enzymen, welche am Metabolismus und Transport dieser Wirkstoffe beteiligt sind.

## 4.8 Zusammenfassung

Die funktionelle Bedeutung einzelner Polymorphismen des MDR1-Gens ist bisher unklar. Für den derzeit am besten untersuchten Polymorphismus, 3435C>T, liegen widersprüchliche Ergebnisse vor. Möglicherweise modifizieren andere genetische Varianten, wie z. B. 2677G>T/A, die funktionelle Bedeutung dieses Polymorphismus. [Johne et al., 2002] haben zwischen den Haplotypen 2677G/3435T, 2677G/3435C und 2677T/3435T statistisch signifikante Unterschiede in der Digoxin-Kinetik festgestellt. Es ist zu vermuten, dass sich diese Unterschiede am besten darstellen lassen, wenn diese Haplotypen homozygot vorliegen. Ziel dieser Arbeit war es, den Befund von [Johne et al., 2002] mit Hilfe von homozygoten Merkmalsträgern zu verifizieren, und zwar mit den Modellsubstraten Fexofenadin und Digoxin.

Zur Bestimmung der untersuchten MDR1-Genotypen wurde ein Kollektiv von 1005 gesunden Probanden für die MDR1-SNP 2677G>T/A und 3435C>T genotypisiert. Probanden der Genotypen 2677GG/3435CC (n=10), 2677GG/3435TT (n=4 im Fexofenadinteil, n=3 im Digoxinteil) und 2677TT/3435TT (n=8) erhielten Fexofenadin als Einmaldosis (Tag 1, 180 mg Fexofenadinhydrochlorid), Digoxin als Einmaldosis (Tag 6, 0,25mg) sowie Digoxin als Mehrfachdosis (Tag 8-9 0,25 mg morgens und abends, Tag 10-12 0,25 mg morgens).

Für Fexofenadin ergaben sich zwischen den drei Gruppen keine signifikanten Unterschiede in den Parametern  $AUC_{0-4}$ ,  $AUC_{0-24}$ ,  $t_{max}$ ,  $C_{max}$  oder  $t_{1/2}$ . Nach Einmalgabe von Digoxin war ein statistisch signifikanter Unterschied für  $t_{max}$ [h] ( $p=0,006$ ) feststellbar (2677GG/3435CC 1,23 (0,73–2,60), 2677GG/3435TT 0,50 (0,48–0,73), 2677TT/3435TT 0,75 (0,50–1,00)). In den übrigen Parametern  $AUC_{0-4}$ ,  $AUC_{0-24}$  und  $C_{max}$  unterschieden sich die Gruppen nicht weiter. Nach Digoxinmehrfachgabe waren keine signifikanten Unterschiede in einem der untersuchten Parameter  $AUC_{0-4}$ ,  $AUC_{0-24}$ ,  $t_{max}$ ,  $C_{max}$  oder  $t_{1/2}$  nachweisbar. Dies galt auch für die Menge ausgeschiedenen Digoxins im 24h-Sammelurin  $Ae_{0-24}$  und die renale Clearance.

Die Resultate der durchgeführten Untersuchung weisen auf keinen eindeutigen Einfluss der drei untersuchten Genotypen auf die Pharmakokinetik von Fexofenadin oder Digoxin hin. Zum Verständnis des Einflusses genetischer Polymorphismen des MDR1-Gens auf die Pharmakokinetik seiner Substrate bedarf es neben einer ausreichenden Anzahl von Varianten für die Haplotypen-Analyse auch der Analyse von Haplotypen weiterer Gene von Transportern und Enzymen, die mit dem P-Glykoprotein am Metabolismus und Transport von Wirkstoffen beteiligt sind.

# Literaturverzeichnis

- [Ambudkar et al., 2003] Ambudkar, S. V., Kimchi-Sarfaty, C., Sauna, Z. E., and Gottesman, M. M. (2003). P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene*, 22(47):7468–7485.
- [Becquemont et al., 2001] Becquemont, L., Verstuyft, C., Kerb, R., Brinkmann, U., Lebot, M., Jaillon, P., and Funck-Brentano, C. (2001). Effect of grapefruit juice on digoxin pharmacokinetics in humans. *Clin Pharmacol Ther*, 70(4):311–316.
- [Bhardwaj et al., 2002] Bhardwaj, R. K., Glaeser, H., Becquemont, L., Klotz, U., Gupta, S. K., and Fromm, M. (2002). Piperine, a major constituent of black pepper, inhibits human P-glycoprotein and CYP3A4. *J Pharmacol Exp Ther*, 302(2):645–650.
- [Cascorbi et al., 2001] Cascorbi, I., Gerloff, T., Johne, A., Meisel, C., Hoffmeyer, S., Schwab, M., Schaeffeler, E., Eichelbaum, M., Brinkmann, U., and Roots, I. (2001). Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther*, 69(3):169–174.
- [Chen et al., 1990] Chen, C.-j., Clark, D., Ueda, K., Pastan, I., Gottesman, M. M., and Roninson, I. B. (1990). Genomic organization of the human multidrug resistance (MDR1) gene and origin of P-glycoproteins. *J Biol Chem*, 265(1):506–514.
- [Cordon-Cardo et al., 1989] Cordon-Cardo, C., O'Brien, J. P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J. L., Melamed, M. R., and Bertino, J. R. (1989). Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86(2):695–698.
- [Cvetkovic et al., 1999] Cvetkovic, M., Leake, B., Fromm, M. F., Wilkinson, G. R., and Kim, R. B. (1999). OATP and P-glycoprotein transporters mediate the cellular uptake and excretion of fexofenadine. *Drug Metab Dispos*, 27(8):866–871.
- [de Lannoy and Silverman, 1992] de Lannoy, I. and Silverman, M. (1992). The MDR1 gene product, P-glycoprotein, mediates the transport of the cardiac glycoside, digoxin. *Biochem Biophys Res Commun*, 189(1):551–557.

- [Drescher et al., 2002] Drescher, S., Schaeffeler, E., Hitzl, M., Hofmann, U., Schwab, M., Brinkmann, U., Eichelbaum, M., and Fromm, M. F. (2002). MDR1 gene polymorphisms and disposition of the P-glycoprotein substrate fexofenadine. *Br J Clin Pharmacol*, 53(5):526–534.
- [Dresser et al., 2005] Dresser, G. K., Kim, R. B., and Bailey, D. G. (2005). Effect of grapefruit juice volume on the reduction of fexofenadine bioavailability: Possible role of organic anion transporting polypeptides. *Clin Pharmacol Ther*, 77(3):170–177.
- [Fojo et al., 1987] Fojo, A. T., Ueda, K., Slamon, D. J., Poplack, D. G., Gottesman, M. M., and I., P. (1987). Expression of a multidrug resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84(3):265–269.
- [Fromm, 2000] Fromm, M. (2000). P-glycoprotein. A defense mechanism limiting oral bioavailability and CNS accumulation of drugs. *Int J Clin Pharmacol Ther.*, 38(2):69–74.
- [Gault et al., 1980] Gault, H., Kalra, J., Ahmed, M., Kepkay, D., and Barrowman, J. (1980). Influence of gastric pH on digoxin biotransformation. Intra-gastric hydrolysis. *Clin Pharmacol Ther*, 27(1):16–21.
- [Gault et al., 1981] Gault, H., Kalra, J., Ahmed, M., Kepkay, D., Longerich, L., and Barrowman, J. (1981). Influence of gastric pH on digoxin biotransformation. Extractable urinary metabolites. *Clin Pharmacol Ther*, 29(2):181–190.
- [Gerloff, 2004] Gerloff, T. (2004). Impact of genetic polymorphisms in transmembrane carrier-systems on drug and xenobiotic distribution. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 369(1):69–77.
- [Gerloff et al., 2002] Gerloff, T., Schaefer, M., Johne, A., Oselin, K., Meisel, C., Cascorbi, I., and Roots, I. (2002). MDR1 genotypes do not influence the absorption of a single oral dose of 1 mg digoxin in healthy white males. *Br J Clin Pharmacol*, 54(6):610–616.
- [Hitzl et al., 2004] Hitzl, M., Schaeffeler, E., Hoche, B., Slowinski, T., Halle, H., Eichelbaum, M., Kaufmann, P., Fritz, P., Fromm, M. F., and Schwab, M. (2004). Variable expression of P-glycoprotein in the human placenta and its association with mutations of the multidrug resistance 1 gene (MDR1, ABCB1). *Pharmacogenetics*, 14(5):309–318.
- [Ho and Kim, 2005] Ho, R. H. and Kim, R. B. (2005). Transporters and drug therapy: implications for drug disposition and disease. *Clin Pharmacol Ther*, 78(3):260–277.
- [Hoffmeyer et al., 2000] Hoffmeyer, S., Burk, O., von Richter, O., Arnold, H. P., Brockmoeller, J., Johne, A., Cascorbi, I., Gerloff, T., Roots, I., Eichelbaum, M., and Brinkmann, U. (2000). Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(7):3473–3478.

- [Horinouchi et al., 2002] Horinouchi, M., Sakaeda, T., Nakamura, T., Morita, Y., Tamura, T., Aoyama, N., Kasuga, m., and Okumura, K. (2002). Significant genetic linkage of MDR1 polymorphisms at positions 3435 and 2677: functional relevance to pharmacokinetics of digoxin. *Pharm Res*, 19(10):1581–1585.
- [Johne et al., 1999] Johne, A., Brockmoeller, J., Bauer, S., Maurer, A., Langheinrich, M., and Roots, I. (1999). Pharmacokinetic interaction of digoxin with an herbal extract from St John's Wort (*hypericum perforatum*). *Clin Pharmacol Ther*, 66(4):338–345.
- [Johne et al., 2002] Johne, A., Koepke, K., Gerloff, T., Mai, I., Rietbrock, S., Meisel, C., Hoffmeyer, S., Kerb, R., Fromm, M. F., Brinkmann, U., Eichelbaum, M., Brockmoeller, J., Cascorbi, I., and Roots, I. (2002). Modulation of steady-state kinetics of digoxin by haplotypes of the P-glycoprotein MDR1 gene. *Clin Pharmacol Ther*, 72(5):584–594.
- [Kim et al., 2001] Kim, R. B., Leake, B. F., Choo, E. F., Dresser, G. K., Kubba, S. V., Schwarz, U. I., Taylor, A., Xie, H. G., McKinsey, J., Zhou, S., Lan, L. B., Schuetz, J. D., Schuetz, E. G., and Wilkinson, G. R. (2001). Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther*, 70(2):189–199.
- [Kim et al., 1999] Kim, R. B., Wandel, C., Leake, B., Cvetkovic, M., Fromm, M. F., Dempsey, P. J., Roden, M. M., Belas, F., Chaudhary, A. K., Roden, D. M., Alastair, J. J. W., and Wilkinson, G. R. (1999). Interrelationship between substrates and inhibitors of human CYP3A and P-glycoprotein. *Pharm Res*, 16(3):408–414.
- [Kroetz et al., 2003] Kroetz, D. L., Pauli-Magnus, C., Hodges, L. M., Huang, C. C., Kawamoto, M., Johns, S. J., Stryke, D., Ferrin, T. E., DeYoung, J., Taylor, T., Carlson, E. J., Herskowitz, I., Giacomini, K. M., and Clark, A. G. (2003). Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene. *Pharmacogenetics*, 13(8):481–494.
- [Krum et al., 1995] Krum, H., Bigger, J., Goldsmith, R., and Packer, M. (1995). Effect of long-term digoxin therapy on autonomic function in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 25(2):289–294.
- [Kurata et al., 2002] Kurata, Y., Ieiri, I., Kimura, M., Morita, T., Irie, S., Urae, A., Ohdo, S., Ohtani, H., Sawada, Y., Higuchi, S., and Otsubo, K. (2002). Role of human MDR1 gene polymorphism in bioavailability and interaction of digoxin, a substrate of P-glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther*, 72(2):209–219.
- [Lacarelle et al., 1991] Lacarelle, B., Rahmani, R., Sousa, d. G., Durand, A., Placidi, M., and Cano, J. (1991). Metabolism of digoxin, digoxigenin digitoxosides and digoxigenin in human hepatocytes and liver microsomes. *Fundam Clin Pharmacol*, 5(7):567–582.

- [Letschert et al., 2004] Letschert, K., Keppler, D., and Koenig, J. (2004). Mutations in the SLCO1B3 gene affecting the substrate specificity of the hepatocellular uptake transporter OATP1B3 (OATP8). *Pharmacogenetics*, 14(7):441–452.
- [Lindenbaum et al., 1981] Lindenbaum, J., Rund, D. G., Butler, V. P., Tse-Eng, D., and Saha, J. R. (1981). Inactivation of digoxin by the gut flora: Reversal by antibiotic therapy. *N Engl J Med*, 305(14):789–794.
- [Lowe et al., 2003] Lowe, S., Cavet, M. E., and Simmons, N. L. (2003). Evidence for a non-MDR1 component in digoxin secretion by human intestinal caco-2 epithelial layers. *Eur J Pharmacol*, 458(1-2):49–56.
- [Mooradian, 1988] Mooradian, A. D. (1988). Digitalis. An update of clinical pharmacokinetics, therapeutic monitoring techniques and treatment recommendations. *Clin Pharmacokinet*, 15(3):165–179.
- [Morita et al., 2003] Morita, Y., Sakaeda, T., Horinouchi, M., Nakamura, T., Kuroda, K., Miki, I., Yoshimura, K., Sakai, T., Shirasaka, D., Tamura, T., Aoyama, N., Kasuga, M., and Okumura, K. (2003). MDR1 genotype-related duodenal absorption rate of digoxin in healthy Japanese subjects. *Pharm Research*, 20(4):552–556.
- [Moriya et al., 2002] Moriya, Y., Nakamura, T., Horinouchi, M., Sakaeda, T., Tamura, T., Aoyama, N., Shirakawa, T., Gotoh, A., Fujimoto, S., Matsuo, M., Kasuga, M., and Okumura, K. (2002). Effects of polymorphisms of MDR1, MRP1 and MRP2 genes on their mRNA expression levels in duodenal enterocytes of healthy Japanese. *Bio Pharm Bull*, 25(10):1356–1359.
- [Nakamura et al., 2002] Nakamura, T., Sakaeda, T., Horinouchi, M., Tamura, T., Aoyama, N., Shirakawa, T., Matsuo, M., Kasuga, M., and Okumura, K. (2002). Effect of the mutation (C3435T) at exon 26 of the MDR1 gene on expression level of MDR1 messenger ribonucleic acid in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. *Clin Pharmacol Ther*, 71(4):297–303.
- [Niemi et al., 2005] Niemi, M., Kivistoe, K. T., Hofmann, U., Schwab, M., Eichelbaum, M., and Fromm, M. F. (2005). Fexofenadine pharmacokinetics are associated with a polymorphism of the SLCO1B1 gene (encoding OATP1B1). *Br J Clin Pharmacol*, 59(5):602–604. Letter to the Editors.
- [Oselin et al., 2003] Oselin, K., Gerloff, T., Mrozikiewicz, P. M., Paehkla, R., and Roots, I. (2003). MDR1 polymorphisms G2677T in exon 21 and C3435T in exon 26 fail to affect rhodamine 123 efflux in peripheral blood lymphocytes. *Fundam Clin Pharmacol*, 17(4):463–469.
- [Robbins et al., 1998] Robbins, D. K., Castles, M. A., Pack, D. J., Bhargava, V. O., and Weir, S. J. (1998). Dose proportionality and comparison of single and multiple dose pharmacokinetics of fexofenadine (MDL 16455) and its enantiomers in healthy male volunteers. *Biopharm Drug Dispos*, 19(7):455–463.

- [Russell et al., 1998] Russell, T., Stoltz, M., and Weir, S. (1998). Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tolerance of single- and multiple-dose fexofenadine hydrochloride in healthy male volunteers. *Clin Pharmacol Ther*, 64(6):612–621.
- [Sakaeda et al., 2001] Sakaeda, T., Nakamura, T., Horinouchi, M., Kakumoto, M., Ohmoto, N., Sakai, T., Morita, Y., Tamura, T., Aoyama, N., Hirai, M., Kasuga, M., and Okumura, K. (2001). MDR1 genotype-related pharmacokinetics of digoxin after single oral administration in healthy Japanese subjects. *Pharm Res*, 18(10):1400–1404.
- [Schaefer et al., 2006] Schaefer, M., Roots, I., and Gerloff, T. (2006). In-vitro transport characteristics discriminate wild-type ABCB1 (MDR1) from ALA893SER and ALA893THR polymorphisms. *Pharmacogenet Genomics*, 16(12):855–861.
- [Schaeffeler et al., 2001] Schaeffeler, E., Eichelbaum, M., Brinkmann, U., Penger, A., Asante-Poku, S., Zanger, U. M., and Schwab, M. (2001). Frequency of C3435T polymorphism of MDR1 gene in African people. *Lancet*, 358(9279):383–384.
- [Seelig, 1998] Seelig, A. (1998). A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein. *Eur J Biochem*, 251(1–2):252–261.
- [Siegmond et al., 2002] Siegmond, W., Ludwig, K., Giessmann, T., Dazert, P., Schroeder, E., Sperker, B., Warzok, R., Kroemer, H. K., and Cascorbi, I. (2002). The effects of the human MDR1 genotype on the expression of duodenal P-glycoprotein and disposition of the probe drug talinolol. *Clin Pharmacol Ther*, 72(5):572–583.
- [Sparreboom et al., 1997] Sparreboom, A., van Asperen, J., Mayer, U., Schinkel, A. H., Smit, J. W., Meijer, D. K. F., Borst, P., Noojen, W. J., Beijnen, J. H., and van Tellingen, O. (1997). Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(5):2031–2035.
- [Stephens et al., 2001] Stephens, M., Smith, N. J., Donnelly, P. (2001). A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet*, 68:978–989.
- [Tanabe et al., 2001] Tanabe, M., Ieiri, I., Nagata, N., Inoue, K., Ito, S., Kanamori, Y., Takahashi, M., Kurata, Y., Kigawa, J., Higuchi, S., Terakawa, N., and Otsubo, K. (2001). Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther*, 297(3):1137–1143.
- [Tang et al., 2002] Tang, K., Ngoi, S.-M., Gwee, P.-C., Chua, J. M., Lee, E. J. D., Chong, S. S., and Lee, C. G. L. (2002). Distinct haplotype profiles and strong linkage disequilibrium at the MDR1 multidrug transporter gene locus in three ethnic Asian populations. *Pharmacogenetics*, 12(6):437–450.

- [Thiebaut et al., 1987] Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M. M., Pastan, I., and Willingham, M. C. (1987). Cellular localization of the multidrug resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84(21):7735–7738.
- [Verschraagen et al., 1999] Verschraagen, M., Koks, C., Schellens, J., and Beijnen, J. (1999). P-glycoprotein system as a determinant of drug interaction: the case of digoxin-verapamil. *Pharmacol Res*, 40(4):301–306.
- [Verstuyft et al., 2003] Verstuyft, C., Schwab, M., Schaeffeler, E., Kerb, R., Brinkmann, U., Jailion, P., Funck-Brentano, C., and Becquemont, L. (2003). Digoxin pharmacokinetics and MDR1 genetic polymorphisms. *Eur J Clin Pharmacol*, 58(12):809–812. Epub 2003 Mar 1.
- [Wang et al., 2005] Wang, D., Andrew, J. D., Papp, A. C., Kroetz, D. L., and Sadee, W. (2005). Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435 C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics*, 15(10):693–704.
- [Yi et al., 2004] Yi, S.-Y., Hong, K.-S., Lim, H.-S., Chung, J.-Y., Oh, D.-S., Kim, J.-R., Jung, H.-R., Cho, J.-Y., Yu, K.-S., Jang, I.-J., and Shin, S.-G. (2004). A variant 2677A allele of the MDR1 gene affects fexofenadine disposition. *Clin Pharmacol Ther*, 76(5):418–427.
- [Zhou et al., 2004] Zhou, S., Lim, L. Y., and Chowbay, B. (2004). Herbal modulation of P-glycoprotein. *Drug Metab Rev*, 36(1):57–104.

# Danksagung

Herrn Prof. Dr. Ivar Roots, Institut für klinische Pharmakologie der Charité, Campus Mitte, danke ich für die Überlassung des Themas und die kollegiale Unterstützung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Dr. Andreas Johne danke ich herzlich für die zahlreichen fruchtbaren Diskussionen während der Durchführung der Studie. Frau Dr. Karla Köpke danke ich herzlich für ihre Unterstützung bei der Berechnung der Haplotypen. Weiterhin gilt mein Dank Herrn Dr. rer. nat. Steffen Bauer für die Durchführung der Bioanalytik. Ebenfalls danke ich Frau Dr. Gabriele Laschinski für ihre hilfreiche Kritik bei der Erstellung des Manuskripts.

# Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

# Selbständigkeitserklärung

Ich, Stefan Wudel, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema "Einfluss von Haplotypen des MDR1-Gens (Multidrug Resistance Gene) auf die Pharmakokinetik von Fexofenadin und Digoxin bei gesunden Probanden" selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Stefan Wudel

15. Januar 2007