

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

DISSERTATION

Bedeutung genetischer Polymorphismen in *OATP1B1* (*SLC21A6*) für die
Pharmakokinetik von Pravastatin - Nachweis gegensätzlicher Effekte der
Haplotypen *5 und *1*b*

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin
Berlin

von

Angela Stöckle

aus Kronach

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. Th. Gerloff

2. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. I. Cascorbi

3. Prof. Dr. med. R. Kreuz

Datum der Promotion: 19.03.2010

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Glossar | 5 |
| 1. Einleitung | 7 |
| 1.1 Individuelle Arzneimittelreaktionen - Bedeutung genetischer Polymorphismen | 7 |
| 1.2 Transmembrantransporter in der Pharmakotherapie | 9 |
| 1.3 Pravastatin als Substrat von OATP1B1 | 17 |
| 1.4 Problemstellung | 20 |
| 1.5 Zielsetzung der Arbeit | 21 |
| 2. Material und Methoden | 21 |
| 2.1 Studiendesign | 21 |
| 2.2 Gewinnung der DNA | 26 |
| 2.3 Genotypisierung | 29 |
| 2.4 Bestimmung der Pravastatinkonzentration mittels HPLC | 36 |
| 2.5 Zielparameter und statistische Analyse | 45 |
| 3. Ergebnisse | 46 |
| 3.1 Probandenbilanz | 46 |
| 3.2 Pharmakokinetische Parameter von Pravastatin | 46 |
| 4. Diskussion | 50 |
| 4.1 Genetische Polymorphismen in OATP1B1 - Forschungsstand im Überblick zum Zeitpunkt des Studienbeginns | 50 |
| 4.2 Diskussion und Vergleich der vorliegenden pharmakokinetischen | |

| | | |
|-----|--|----|
| | Ergebnisse für <i>OATP1B1*1b</i> und <i>OATP1B1*5</i> | 52 |
| 4.3 | Auswirkungen der Mutation T521C auf die Pharmakokinetik weiterer Medikamente | 58 |
| 4.4 | Auswirkungen von Polymorphismen in <i>OATP</i> auf die Pharmakokinetik anderer Statine | 59 |
| 4.5 | Andere hepatische Transporter und weitere Faktoren als Einflussvariablen in der Disposition von Statinen | 61 |
| 4.6 | Pharmakodynamische Auswirkungen von Polymorphismen in <i>OATP1B1</i> auf den therapeutischen Effekt von Pravastatin | 62 |
| 4.7 | Polymorphismen in <i>OATP1B1</i> als mögliche Modulatoren von Nebenwirkungen | 64 |
| 4.8 | Inhibitoren als zusätzliche modifizierende Faktoren der Transportrate | 65 |
| 4.9 | Relevanz einer routinemässigen Genotypisierung in der Statintherapie | 66 |
| 5. | Zusammenfassung | 69 |
| 6. | Literaturverzeichnis | 71 |
| 7. | Danksagung | 88 |
| 8. | Tabellarischer Lebenslauf | 89 |
| 9. | Publikationshinweis | 90 |
| 10. | Selbstständigkeitserklärung | 91 |

GLOSSAR

| | |
|---------------------|---|
| ABC | ATP-binding-cassette |
| ACE-Hemmer | Hemmstoffe des Angiotensin converting enzyme |
| Ae (0-12) | cumulative amount of drug excreted into urine , Kumulative Ausscheidung des Medikaments im Urin innerhalb 0-12 Stunden nach Einnahme |
| Allel | Zustandsform eines Genorts |
| ATP | Adenosintriphosphat, wichtigster Energielieferant des Intermediärstoffwechsels |
| AUC | Area under the curve, Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve |
| BCRP | Breast cancer resistance protein |
| BSEP | Bile salt exporting pump |
| Carrier | Transporter |
| C _{max} | Plasmaspitzenkonzentration |
| Cl _{renal} | renale Clearance; Plasmamenge, die pro Zeiteinheit von einer bestimmten Substanzmenge befreit wird |
| CNT | Concentrative nucleoside transporter |
| CYP 450-System | Cytochrom P450- System |
| DNA | Desoxyribonucleid acid |
| ENT | Equilibrative nucleoside transporter |
| Exon | codierende DNA-Teilsequenz eines Gens |
| Genotyp | bestimmte Allelkonfiguration an einem Genort |
| Haplotyp | einem Chromosom zuzuordnende Allelkombination eines Genortes |
| HEK293- Zellen | humane embryonale Nierenzellen |
| HeLa-Zellen | Linie von Tumorzellen, die einem Zervix-Karzinom entstammen, benannt nach der ursprünglichen Spenderin, Henrietta Lacks |
| Heterozygot | Verschiedene Allele auf beiden Chromosomen |
| HMG-CoA | β-Hydroxy-β-Methylglutaryl-CoA, entsteht bei der Biosynthese von Cholesterin durch Kondensation von Acetyl- und Acetoacetyl-Coenzym A |

| | |
|-------------------|--|
| HMG-CoA-Reduktase | β -Hydroxy- β -Methylglutaryl-CoA-Reduktase, Enzym, das HMG-CoA zu Mevalonsäure (Zwischenprodukt in der Biosynthese von Cholesterin) reduziert |
| Homozygot | Identische Allele auf beiden Chromosomen |
| MCT | Monocarboxylate transporters |
| MDCKII- Zellen | Madin-Darby canine kidney II cells, Kaninchennierenzellen |
| MDR1 | Multidrug resistance gene, Typ 1 |
| MRP | Multidrug resistance related protein |
| NTCP | Sodium-dependent taurocholate cotransporting polypeptide |
| OAT | Organic anion transporter, transportiert organische Anionen |
| OATP | Organic anion transporting protein, transportiert organische Anionen |
| OCT | Organic cation transporter, transportiert organische Kationen |
| PEPT | Proton/peptide cotransporter |
| Pgp | P-Glykoprotein, Genprodukt des MDR1 |
| Polymorphismus | Häufig vorkommende Variation (mind. 1 % Prävalenz) eines Gens |
| Primer | DNA-Startmoleküle |
| Promoter | Bindungsstelle für Regulatoren, am Anfang der DNA eines Gens gelegen |
| SLC | Solute Carrier |
| SNP | Single nucleotide polymorphism, Einzelbasenaustausch innerhalb eines Gens |
| t_{\max} | Zeit bis zum Erreichen der Pravastatin-Plasmaspitzenkonzentration |
| UAW | Unerwünschte Arzneimittelwirkung |
| Xenobiotika | Fremdstoffe |

1. EINLEITUNG

1.1 Individuelle Arzneimittelreaktionen – Bedeutung genetischer Polymorphismen

Wirksamkeit und Verträglichkeit von Arzneimitteln sind innerhalb der Bevölkerung sehr variabel. Von völliger Wirkungslosigkeit bis hin zu schweren tödlichen Reaktionen zeigt sich ein Spektrum individuell differierender Effekte, auch nach Applikation von Standarddosissen. Unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAWs) treten bei ca. 5 % der behandelten Patienten auf und sind damit häufige Ereignisse. Ungefähr 6,5 % aller Krankenhaus-Einweisungen werden durch UAWs ausgelöst¹⁸ und in den USA liegen schwere Arzneimittelzwischenfälle an vierter bis sechster Stelle der häufigsten Todesursachen⁶⁹. Unwirksame Arzneimitteltherapien und UAWs stellen einen volkswirtschaftlichen Kostenfaktor in Milliardenhöhe dar, dessen genauer Umfang sich bislang nur schätzen lässt.

Individuell unterschiedliche Reaktionen auf medikamentöse Therapien, auch bei äquivalenter Dosierung, beruhen auf Parametern wie Patientenalter und -geschlecht, Allgemein- und Ernährungszustand sowie Ernährungsform, Leber- und Nierenfunktion, Enzyminduktion oder –hemmung, Arzneimittelinteraktionen, Pathogenese und Ausprägungsgrad der zu behandelnden Erkrankung, sowie Begleiterkrankungen. Darüber hinaus gilt es heute als gesichert, dass genetische Unterschiede in erheblichem, lange unterschätztem Ausmaß die individuellen Reaktionen des Organismus auf Arzneistoffe beeinflussen. Dies betrifft im Wesentlichen molekulare Veränderungen vieler Proteine wie Stoffwechsellzyme, Arzneimittelrezeptoren und Transporter. Vor allem auf dem Gebiet der arzneistoffmetabolisierenden Enzyme sind eine Vielzahl erblicher Varianten beschrieben worden. Insbesondere das Cytochrom P450-System, eine Gruppe vorwiegend in der Leber vorkommender mischfunktioneller Oxygenasen, die wichtige Schritte des Arzneimittelmetabolismus regulieren, stellen zentralen Gegenstand intensiver Forschungen dar. Innerhalb dieses Systems existieren Allele (alternative Zustandsformen am selben Genlocus zweier homologer Chromosomen), die eine Reduktion bzw. das vollständige Fehlen, oder aber eine Steigerung der Enzymaktivität bewirken können. Beispielsweise sind genetische Varianten der Enzyme CYP2C9, CYP2C19 und CYP2D6 bekannte derartige Determinanten einer veränderten Pharmakokinetik und möglicherweise assoziiert mit Arzneimitteltoxizität oder verminderter therapeutischer Wirksamkeit^{20, 81, 110}. Dem Enzym CYP2D6 kommt angesichts der Vielzahl seiner Substrate eine hervorgehobene Bedeutung zu. Es weist einen hohen Grad interindividueller Variabilität auf, was im

Wesentlichen aus der Vielzahl genetischer Polymorphismen resultiert, die Expression und Funktion beeinflussen. In Abhängigkeit von Defizienz bzw. hoher Enzymaktivität besteht auch die Unterscheidung zwischen langsamen (*poor metabolizer*) und ultraschnellen Metabolisierern (*ultra-rapid metabolizer*). Der Phänotyp des langsamen Metabolisierers ist durch eine stark eingeschränkte Fähigkeit zur Nutzung CYP2D6 – abhängiger Metabolisierungswege von Medikamenten gekennzeichnet, dies betrifft bis zu 20 % aller klinisch verwendeten Medikamente.¹⁴⁴ Dabei steht die Häufigkeit des Auftretens dieser Genvarianten auch im Zusammenhang mit der jeweiligen ethnischen Herkunft ihrer Träger. Beispielsweise liegt mit 5 - 10 % innerhalb der weißen kaukasischen Bevölkerung eine relativ hohe Defizienz der Enzymaktivität von CYP2D6 vor, was im Wesentlichen auf einer hohen Frequenz der Varianten *CYP2D6*4* und *CYP2D6*5* beruht^{123, 84}, in der asiatischen Bevölkerung beträgt sie weniger als 1 %. Hingegen weisen bis zu 7 % der Kaukasier eine hohe Aktivität von CYP2D6 auf, vorwiegend infolge einer Genamplifikation.¹²³ Die durchschnittliche Enzymaktivität bei Afro-Amerikanern und Asiaten ist im Vergleich bedeutend geringer.

Erste Erwähnung fanden langsame Metabolisierer im Zusammenhang mit dem sympatholytischen Antihypertensivum Debrisoquin und dem Antiarrhythmikum Spartein, das wegen seiner oxytocinähnlichen Wirkung auch in der Geburtshilfe verwendet wurde¹¹². In den 1970er Jahren zeigten sich in Forschungsuntersuchungen unerwartete unerwünschte Effekte unter Einnahme dieser Medikamente. In Deutschland wurde bei 10 % der Frauen, die Spartein erhielten, eine sehr starke Wehentätigkeit beobachtet, die in einigen Fällen sogar zum Abort führte. Als Ursache fanden sich Varianten des Enzyms CYP2D6 und ein dadurch bedingter Oxidationsdefekt bei der Metabolisierung dieser Substanzen. Seither wurden eine Vielzahl von Allelen identifiziert, die in einer fehlenden, verminderten oder erhöhten Funktionalität der zugehörigen Proteinprodukte resultieren, jeweils mit unterschiedlichen klinischen Konsequenzen. So muss bei ultraschnellen Metabolisierern beispielweise die Dosierung einiger Pharmaka deutlich erhöht werden, um einen therapeutischen Effekt zu erzielen. Durch zahlreiche Studien gelten die Polymorphismen von CYP2D6 als einer der bestuntersuchten innerhalb des Arzneimittelmetabolismus. Routinetests zur Genotypbestimmung vor Beginn einer Arzneimittelbehandlung mit anschließender individueller Dosisanpassung haben bereits erste klinische Anwendung gefunden, dieses Verfahren bedarf jedoch noch weiterer Untersuchungen.

Für die komplexen Mechanismen von Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung von Arzneistoffen und Xenobiotika (Fremdstoffe) spielt jedoch auch der aktive Transport über

biologische Membranen mittels Transmembrantransporter eine wichtige Rolle. Zudem ist häufiges Auftreten genetischer Polymorphismen auch innerhalb der Gruppe der Arzneimitteltransporter bekannt.

Von einem Polymorphismus spricht man, wenn ein Allel eines Gens in der Bevölkerung in verschiedenen Variationen vorkommt, jedoch mit einer Prävalenz von mindestens 1 %. Dies kann den Austausch einer einzelnen Base (SNP = *single nucleotide polymorphism*) beinhalten, infolge dessen sich die zugehörige Aminosäuresequenz verändern kann – entsprechend besteht die Unterscheidung zwischen synonymen bzw. nicht-synonymen Polymorphismen.

Eine stetig zunehmende Zahl an Arzneistoffen konnte als Substrat, bzw. auch als Inhibitor von Transportern identifiziert werden, was die wachsende Bedeutung von Transportproteinen in der Pharmakokinetik und –genetik unterstreicht.

1.2 Transmembrantransporter in der Pharmakotherapie

1.2.1 Transmembrantransportsystem

Die Überwindung zellulärer Barrieren ist ein entscheidender Schritt auf dem Weg eines Arzneistoffes zu seinem Wirkort. Dies gilt auch für die Elimination vieler endogener Stoffwechselprodukte und Fremdstoffe, für die im Wesentlichen zwei Hauptausscheidungsmechanismen existieren: zum einen der Weg der renalen Ausscheidung für vorwiegend wasserlösliche Stoffe, zum anderen der Weg der biliären Exkretion über die Leber für überwiegend lipophile Substanzen.

Transportproteine sind in die Zellwand integrierte Membranproteine und befinden sich im Gewebe diverser für Absorption und Exkretion zuständiger Organe, beispielsweise im Darmepithel, in der Leber und den Tubulusepithelzellen der Niere^{3,72}. Sie wirken in einer Vielzahl physiologischer Prozesse mit, wie beispielsweise der Erhaltung der Homöostase auf Ebene von Zelle und Organismus durch den Import von essentiellen Nährstoffen für den Zellstoffwechsel und beim Export von Abfallprodukten und toxischen Komponenten. Ausserdem sind Transporter essentielle Bestandteile von Blut-Gewebe-Schranken wie der Blut-Hirn-, Blut-Plazenta-, und Blut-Testis-Schranke^{14,109}. In diesen sensiblen Organen dienen die

Transporter als Abwehrmechanismus zum Schutz des Gewebes gegen toxische Substanzen. Viele Carrier-Proteine sind pharmakokinetisch relevant.

Die intestinalen Absorptionseigenschaften bestimmen in großem Ausmaß die Bioverfügbarkeit von oral applizierten Medikamenten. Wesentliche Parameter diesbezüglich sind die Löslichkeit und Permeabilität einer Komponente. Die Membrangängigkeit von Medikamenten wurde lange Zeit als ein vorwiegend passiver Prozess betrachtet^{2, 6}. Demzufolge galten Größe, Ladung, Lipophilie und Flexibilität eines Moleküls als entscheidende Schlüsselfaktoren, was die Membranpassage anbelangt¹⁰⁰. Große hydrophile und starre Komponenten diffundieren viel langsamer durch Membranbarrieren als kleine lipophile und hoch flexible Arzneimittelmoleküle. Entsprechend dem Fortschritt in Identifizierung, molekularem Klonen und Charakterisierung von Transmembrantransportern wurden pharmakokinetische Eigenschaften von Medikamenten und Beeinflussung deren Bioverfügbarkeit zunehmend aktiven Carrier-vermittelten Prozessen zugeschrieben. So verschob sich die Vorstellung von einer vorwiegend passiven Diffusion hin zu dem neuen Konzept des aktiven Transports als einer Schlüsseldeterminante für Absorption und Verteilung von Arzneistoffen²⁵. In Abhängigkeit vom jeweiligen Substrat können tranportervermittelte und passive Diffusion gleichzeitig erfolgen¹²⁴. Durch die insgesamt begrenzte Expression von Transportproteinen unterliegt der Transportvorgang der Michaelis-Menten-Kinetik: mit zunehmender Konzentration des Substrats nähert sich die Transportrate einem nicht überschreitbaren Maximalwert. Bei Konkurrenz mehrerer Arzneistoffe um die Substratbindungsstelle eines Transporters kommt es oft zu erniedrigten Transportraten und Interaktionen, was durchaus auch als positiver Effekt genutzt werden kann. Beispielsweise verbesserte der β -Blocker Talinolol die Absorption des Herzglykosids Digoxin aufgrund dessen Verdrängung am intestinalen Effluxtransporter P-Glykoprotein¹⁴¹. Rifampicin steigert den Gehalt an intestinalem P-Glykoprotein und führt somit zu einer Verringerung der oralen Bioverfügbarkeit von Digoxin²⁹. Die Carrier-vermittelten Prozesse stellen daher häufig einen kritischen Punkt hinsichtlich einer effizienten Aufnahme bzw. Ausscheidung organischer Substrate und vieler Medikamente dar.

1.2.2 Klassifikation Aufnahme – Efflux

Transmembrantransporter lassen sich in Aufnahme- oder Exportsysteme unterscheiden, je nach Hauptrichtung des Substanztransports in die Zelle hinein oder aus ihr heraus. Sie weisen eine gemeinsame Sekundärstruktur auf, gekennzeichnet durch multiple membran-durchziehende Domänen mit wechselnden intra- und extrazellulären Segmenten (*loops*)⁷⁰.

Aufnahmecarrier übernehmen die Resorption einer Vielzahl von Nährstoffen und endogenen Komponenten wie Aminosäuren, Peptiden, Zuckern, Nukleosiden, Neurotransmittern, Gallensäuren und Vitaminen. Sie gehören zur Familie der SLC (*solute carrier*) Transporter. Die treibende Kraft der Aufnahmetransporter besteht im Wesentlichen in der Kopplung des Substrattransports an den Symport oder Antiport von Ionen (z.B. Na⁺, H⁺, oder HCO₃⁻). Deshalb ist die Aktivität dieser Transporter von der Erhaltung eines elektrochemischen Gradienten abhängig. Zu den Aufnahmetransportern gehören unter anderem die Familie der OATPs (*Organic anion transporting protein, SLCO*), OATs (*Organic anion transporters, SLC22A*), OCTs (*Organic cation transporters, SLC22A*), CNTs (*Concentrative nucleoside transporters*), ENTs (*Equilibrative nucleoside transporters*), MCTs (*Monocarboxylate transporters*) und PEPTs (*Proton/peptide co-transporter, SLC15A*)²⁶. Die in pharmakologischer Hinsicht am eingehendsten untersuchten Transporter sind Mitglieder der OATP-Familie und Dipeptid-Transporter. Dipeptid-Transporter besitzen ein breites Substratspektrum und haben für die intestinale Resorption peptidartiger Pharmaka, wie z. B. β-Laktam-Antibiotika und ACE-Hemmer, große Bedeutung^{23,43}. OCTs transportieren im Gegensatz zu OATPs hauptsächlich kleine organische Kationen. OCT1 war das erste beim Menschen beschriebene und charakterisierte Mitglied dieser Transporter-Familie³⁰. Es ist vorwiegend in der Leber lokalisiert. Zu seinem Substratspektrum gehören endogene Substanzen und eine Reihe von Medikamenten. Das Wissen über pharmakologische Auswirkungen der Transporter der SLC22-Familie ist gegenwärtig stetig zunehmend.

Einige Carrier-Systeme, besonders die Mitglieder der SLC2 – Familie, sind zu beidseitigem Substrattransport in der Lage, beispielsweise der natriumabhängige Aufnahmetransporter NTPC (*sodium-dependent taurocholate cotransporting polypeptide, SLC10A1*)³¹.

Efflux-Carrier regeln Ausscheidungsvorgänge vieler Fremd- und Arzneistoffe und sind in Organen mit Exkretionsfunktion, wie Leber und Niere, zu finden. Sie gehören hauptsächlich zur

großen und phylogenetisch alten ABC-Familie (*ATP-binding cassette*). Die treibende Kraft dieser Transportsysteme wird durch die Hydrolyse von ATP (Adenosintriphosphat) gewährleistet, so dass Substrate auch entgegen hoher Konzentrationsgradienten aus der Zelle gepumpt werden können. Pharmakologisch wichtige Mitglieder dieses Transportsystems ist die Familie der MRPs (*Multidrug resistance related protein*, *ABCC*), die vor allem an der Ausscheidung der in der Phase II –Reaktion konjugierten Arzneistoffe mitwirken, BCRP (*breast cancer resistance protein*, *ABCG*) und die P-Glykoprotein-Familie (*ABCB*) mit MDR1 (*Multidrug resistance protein 1*, *ABCB1*) und der Gallensalz-Exportpumpe BSEP (*bile salt exporting pump*, *ABCB11*). P-Glykoprotein (Pgp) wurde ursprünglich als einer der Hauptauslöser der sogenannten Multiresistenz gegen Zytostatika bekannt⁵³. Es kommt jedoch außer in Tumorzellen auch in vielen normalen Geweben, wie Darm, Leber, Niere, Blut-Gewebe-Schranken vor. Die ubiquitäre Lokalisation und das extrem breite Substratspektrum von P-Glykoprotein weisen auf eine sehr große Bedeutung bei der Disposition von Arznei- und Fremdstoffen hin. MRP2 (*multidrug resistance-associated protein 2*, *ABCC2*) hingegen wird in der apikalen Membran der Enterozyten, in der Leber, und auch in der Niere exprimiert, und beeinflusst womöglich sowohl die Absorption als auch die Elimination von Medikamenten^{64, 95}. Zu den Substraten der Effluxtransporter MRP2 und BCRP – die unter anderem an der kanalikulären Membran der Hepatozyten lokalisiert sind (s. *Abbildung 1*) - gehören beispielsweise auch Statine.

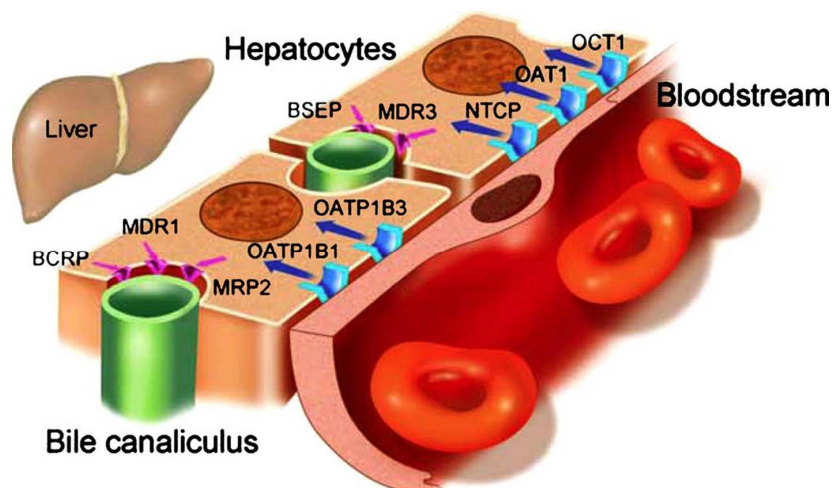


Abbildung 1:³⁸ In der Leber steuern Expression und Aktivität von Aufnahmetransportern (z.B. OATP1B1) – und Effluxtransportern (z.B. MRP2) den vektorialen Transport von exogenen und endogenen Substraten vom Pfortaderblut in die Gallenflüssigkeit.

Arzneistoffe können weiterer Biotransformation in den Hepatozyten unterliegen oder unverändert über die Galle ausgeschieden werden, wie im Fall von Pravastatin.

1.2.3 Genetische Polymorphismen in Transportern

Mit der initialen Sequenzierung des menschlichen Genoms wurde geschätzt, dass Transportproteine durch etwa 500 bis 1200 Gene codiert werden^{68,139}. Standen anfangs die in Phase I- und Phase II- Reaktionen involvierten hepatischen Stoffwechsellzymen im Vordergrund intensiver pharmakogenetischer Untersuchungen, so ergaben sich in den vergangenen Jahren auch zunehmend Hinweise auf pharmakokinetisch relevante Polymorphismen von Medikamententransportern.

Genetische Varianten, die die Transportfunktion *in vitro* beeinflussen, sind vor allem für das OATP-Transportsystem beschrieben worden, gefolgt vom Kationentransporter OCT1^{135,58}.

Das Fehlen des MRP2- Proteins als Folge bestimmter Mutationen im MRP2- Gen resultiert in konjugierter Hyperbilirubinämie, dem Dubin-Johnson-Syndrom⁶⁴; bisher ist aber nur sehr wenig über mögliche Auswirkungen von MRP2- und MRP1-Varianten auf die Pharmakokinetik von Arzneimitteln beim Menschen bekannt. Pgp (P-Glykoprotein) ist das am besten untersuchte und charakterisierte ABC-Transportsystem, für das sowohl *in vitro* als auch in klinischen Studien pharmakogenetisch relevante Polymorphismen nachgewiesen werden konnten^{8, 40, 60, 79, 115}. Evidenzen für die klinische Relevanz, die allerdings auch umstritten sind, finden sich in der Pharmakotherapie der HIV-Infektion und der Epilepsie.

1.2.4 OATP (*Organic Anion Transporting Polypeptid, SLCO*)

Bis heute wurden beim Menschen neun Isoformen des OATP- Transportsystems identifiziert. Sie weisen eine vergleichsweise hohe Substratspezifität auf und sind in einer Vielzahl von Geweben wie Leber, Niere, Gehirn und im Darm exprimiert¹²⁸, teilweise mit unterschiedlich präferierter Lokalisation. Es wurde gezeigt, dass die in der Leber an der basolateralen Membran der Hepatozyten lokalisierten OATPs eine wichtige Rolle bei der Extraktion amphoterer endogener Komponenten, Xenobiotika und Arzneistoffen aus dem Pfortaderblut spielen^{67,80}.

Zu den endogenen Substraten von OATP gehören Gallensäuren, Bilirubin, Schilddrüsenhormone, Prostaglandine, Steroide und Cholecystokinine und eine Reihe häufig eingesetzter und therapeutisch wichtiger Medikamente wie die ACE-Hemmer Enalapril und Temocaprilat^{49, 102}, das Antihistaminikum Fexofenadin¹⁷, Digoxin⁸³, Methotrexat¹³⁵, Benzylpenicillin¹²⁸, Rifampicin¹³⁶, und diverse HMG-CoA-Reduktase-Hemmer^{36, 39, 62, 66, 119}.

Viele der Mitglieder der OATP-Familie haben teilweise überlappende Substratspektren, während einige auch spezifische Präferenzen aufweisen. Dabei werden OATPs mit der geringsten Substratspezifität in der großen Gruppe von OATP1 zusammengefasst³¹. Mitglieder dieser Familie dienen der Entgiftung einer Vielzahl von Geweben und Verhindern die Ansammlung toxischer endogener Komponenten und Xenobiotika. OATPs mit enger gefasstem Substratspektrum steuern gezielt Prozesse im Cholesterol-, Prostacyclin- und Steroidmetabolismus und erfüllen spezifischere Funktionen in bestimmten Organen, zum Beispiel den Transport von Steroiden und Schilddrüsenhormonen in periphere Zielgewebe, beziehungsweise in die Nebennieren.

Hinsichtlich dieser vielfältigen Funktionen wurde das OATP-Transportsystem mit dem Cytochrom P450-System verglichen. Da OATPs nicht nur anionische, sondern auch neutrale und kationische Komponenten transportieren, ist der historische Name irreführend; es wurden deshalb Versuche unternommen, einen Ersatz durch eine systematische Nomenklatur zu finden. Die Gene der OATPs sind gegenwärtig in der *Solute Carrier* – Familie 21A (*SLC21A*) klassifiziert³¹. Innerhalb dieser Familie gelten OATP1B1 (früher bezeichnet als OATP-C, *SLC21A6*), OATP2B1 (OATP-B, *SLC21A9*) und OATP1B3 (OATP8, LST-2, *SLC21A8*) als die wichtigsten OATPs, die an der basolateralen Membran humaner Hepatozyten lokalisiert sind.

Durch die wachsende Anzahl bekannter Substrate hat dieses Transportsystem einen zunehmend höheren Stellenwert in der Pharmakokinetik gewonnen. In Verbindung mit Exporttransportern wie P-Glykoprotein und MRPs sind OATPs maßgeblich für die Disposition vieler Medikamente.
95, 38, 64, 142, 79, 115

Da sich dieses Transportsystem ubiquitär im ganzen Körper in Epithel- oder Endothelzellen diverser Organe befindet, ist die Frage nach pharmakokinetisch relevanten Genpolymorphismen und toxikologischen bzw. pathophysiologischen Konsequenzen von besonderem Interesse. Es konnten zahlreiche genetische Varianten für OATP1B1 und OATP2B1, ferner auch für OATP1B3 identifiziert werden, von denen einige die Aktivität des Proteins *in vitro* beeinflussen^{51, 56, 73, 82, 98, 106, 135} und auch *in vivo* mit einer veränderten Pharmakokinetik des Substrats Pravastatin assoziiert waren^{95, 96}.

1.2.5 OATP1B1 (SLCO1B1)

Der organische Anionentransporter OATP1B1 (Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1, früher auch bezeichnet OATP-C/OATP2/LST-1) mit der genetischen Kodierung *SLC21A6* kommt ausschließlich in der Leber vor¹. Er gehört zur Gruppe der an der basolateralen Membran der Hepatozyten exprimierten Transportproteine⁶³, die entscheidend für die aktive Aufnahme einer Reihe von endogenen und exogenen Stoffen aus dem Pfortaderblut in die Leber sind¹³². Zu den Substraten von OATP1B1 zählen neben organischen Anionen, Gallensäuren, Bilirubin, konjugierten Steroiden (Dehydroepiandrosteron, Östradiol-17 β -D-Glukoronid), Eikosanoiden (Prostaglandin E₂, Thromboxan B₂, Leukotrien C₄)^{41, 63, 128, 16, 129} auch Schilddrüsenhormone¹, Flavonoide¹⁴⁰, das Glykosid Oubain⁶⁷, der Folsäureantagonist Methotrexat¹³⁵, Antibiotika wie z.B. Benzylpenicillin¹²⁸, das Chinolon-Derivat Sparfloxacin¹²² sowie die antihypertensiven Wirkstoffe Temocaprilat⁴⁹ und Valsartan⁷⁵. In den letzten Jahren hat sich die Anzahl der diesem Substratspektrum nachweislich angehörenden Arzneimittel stetig erweitert; dazu gehören auch die Antidiabetika Repaglinid⁹¹ und Nateglinid¹⁴⁶, Lipidsenker wie Atorvastatin^{63, 56}, Pitavastatin¹³, Simvastatin-Säure¹⁰⁵, Rosuvastatin⁷¹, der aktive Metabolit SN-38 des Zytostatikums Irinotecan⁹⁷ und das neue Antimykotikum Caspofungin¹¹³. Vor Kurzem wurden auch die Endothelin-Rezeptorantagonisten Atrasentan⁵⁷ und Bosentan¹³⁷ als Substrate von OATP1B1 identifiziert. *Hsiang et al. 1999*⁴¹ und *Nakai et al. 2001*⁸⁸ zeigten anhand von *in vitro* –Studien, dass der Cholesterin-Synthese-Inhibitor Pravastatin ein spezifisches Substrat von OATP1B1 ist.

Das codierende Gen für OATP1B1 (*SLC21A6*) ist auf Chromosom 12 lokalisiert und setzt sich aus 14 Exons (DNA-Abschnitte, die als Code für ein spezifisches Polypeptid fungieren) zusammen. Es weist eine Reihe von allelischen Varianten (SNPs) auf^{135, 98, 82}. SNPs bezeichnen individuelle molekulare Abweichungen der DNA, meist in Form von Punktmutationen, die nur eine einzige Base betreffen. Die Veränderung der Basensequenz kann nach modifizierter Übersetzung in der Proteinbiosynthese auch die Aminosäuresequenz des betroffenen Proteins, und im äußersten Fall auch dessen ursprüngliche Funktionalität, bzw. Aktivität beeinflussen.

Haplotypen repräsentieren die Allelkombination eines Genlocus innerhalb eines Chromosoms. Sie kodieren je nach Konfiguration diverse Genotypen (bestimmte Allelkonfiguration an einem Genort) und treten in unterschiedlichen Frequenzen auf.

Anhand der Haplotypen-Analyse konnten *Tirona et al. 2001*¹³⁵ 16 Allele (*1b, *1c, *2 - *14) von OATP1B1 (OATP-C) in Weißen und Afro-Amerikanern identifizieren. Alle beschriebenen Polymorphismen führten zum Aminosäureaustausch in OATP1B1 (OATP-C) (*Abbildung 2*). Die Transportaktivität der Proteinvarianten mit den SNPs *2, *3, *5, *6, *9, *10, *12 und *13 für Östronsulfat und Östradiol-17 β -D-Glukoronid *in vitro* war im Vergleich zum nichtmutierten Wildtyp-Allel *1a in signifikantem Maße gemindert und belief sich auf 7-53 % des Werts des Referenzallels *1a.

Die Frequenzen der detektierten SNPs waren unter Weißen und Afro-Amerikanern je nach ethnischer Zugehörigkeit unterschiedlich. Die häufigsten Polymorphismen unter weißen Amerikanern betragen nach *Tirona et al. 2001*¹³⁵ für *OATP1B1**1b (Asn130Asp) 30 %, für *OATP1B1**4 (Pro155Thr) 16 % und für *OATP1B1**5 (Val174Ala) 14 %. Die Frequenzen der übrigen waren mit weniger als 2 % vergleichsweise gering.

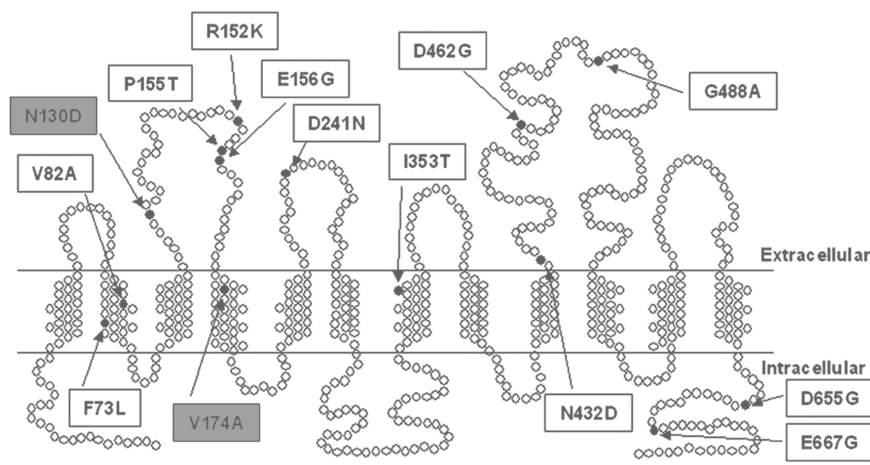


Abbildung 2:¹³⁵ Schematische Darstellung von SNPs in OATP1B1. Nichtsynonymer Austausch von Nucleotiden ist durch Pfeile gekennzeichnet. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Allele N130D (*OATP1B1**1b) und V174A (*OATP1B1**5) sind grau hervorgehoben.

Inzwischen wurden noch weitere Haplotypen von *SLCO1B1* entdeckt^{98, 96, 95, 104}, was den polymorphen Charakter dieses Gens weiter verdeutlicht. *Nozawa et al. 2002*⁹⁸ und *Nishizato et al. 2003*⁹⁶ identifizierten anhand von Untersuchungen innerhalb der japanischen Bevölkerung die für die Transportaktivität von OATP1B1 relevanten Allele *15 und *16. Das *OATP1B1**15-

Allel enthält den Austausch der Basenpaare A388G und T521C, resultierend im Aminosäuren-Austausch Asp130Ala174.

*Nishizato et al. 2003*⁹⁶ zeigten in einer pharmakokinetischen Studie *in vivo* eine reduzierte hepatische (totale und nichtrenale) Clearance des Lipidsenkers Pravastatin, sowie signifikant höhere Pravastatinspiegel bei Trägern des *OATP1B1**15- Allels im Vergleich zum homozygoten *1b- Genotyp. Bemerkenswerterweise befand sich unter den japanischen Probanden kein Träger des *OATP1B1**5- Allels. Auch hier schien die Verteilung der Haplotypen offensichtlich von der ethnischen Herkunft abhängig zu sein. Eine jüngste Untersuchung zur Verteilung von Allelfrequenzen und Haplotypen in unterschiedlichen ethnischen Gruppen verweist auf genetische Ähnlichkeiten von *SLCO1B1* in der türkischen und deutschen Bevölkerung, jedoch auf große Unterschiede hinsichtlich der Häufigkeit von SNPs und Haplotypen zwischen Kaukasiern, Afrikanern und Asiaten⁸⁷. Dies betrifft insbesondere auch die SNPs A388G und T521C. Von den 18 bekannten Polymorphismen von *OATP1B1* und den darauf basierenden Haplotypen schienen nur acht SNPs relevant für weitere funktionelle Untersuchungen bei Kaukasiern, Türken und Afrikanern (A388G, G411A, C463A, T521C, C571T, C597T, G1463C, A1929C)

1.3 Pravastatin als Substrat von OATP1B1

1.3.1 Charakterisierung und Wirkungsweise

Pravastatin gehört zur Gruppe der Statine, die als Inhibitor der HMG-CoA-Reduktase fungieren. In dieser Funktion senkt es die Blutfettwerte über zwei Mechanismen: zum einen hemmt Pravastatin reversibel und kompetitiv das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der hepatischen Cholesterinbiosynthese, das Hydroxymethylglutaryl – Coenzym A (HMG-CoA), und reduziert dadurch die intrazelluläre Cholesterinsynthese. Reaktiv kommt es zu einem Anstieg der Zahl der LDL- (*low density lipoprotein*) Rezeptoren an der Zelloberfläche und zu einem verstärkten Abbau von LDL, bzw. zu einer erhöhten LDL-Clearance im Blut. Außerdem bewirkt Pravastatin eine Hemmung der *de novo*- Synthese von LDL-Cholesterin und erreicht somit eine Senkung des LDL-Cholesterins und des Gesamtcholesterins, während das HDL- (*high density lipoprotein*) Cholesterin erhöht wird. Durch dieses Wirkprinzip ist Pravastatin zu einem verbreiteten Pharmakon gegen die Hypercholesterinämie avanciert⁴².

Eine LDL-Cholesterinsenkung wird sowohl in der Sekundär-, als auch in der Primärprävention von koronarer Herzkrankheit und Herzinfarkt empfohlen ²⁸. Anhand mehrerer Studien wurden hinsichtlich der Therapie mit HMG-CoA-Reduktase-Hemmern Senkungen des relativen Risikos für kardiovaskuläre Ereignisse um 20 % bestätigt. Für die Prävention und Behandlung der Folgeerkrankungen der Hypercholesterinämie ist dementsprechend eine Senkung des Gesamtcholesterins und der LDL-Serumkonzentration, sowie die Anhebung der HDL-Fraktion erstrebenswert.

Derzeit sind neben Pravastatin vier weitere Statine im klinischen Einsatz (Lovastatin, Simvastatin, Fluvastatin, Atorvastatin). Die jüngst entwickelten Statine sind Pitavastatin und Rosuvastatin, letzteres erhielt erst kürzlich die Zulassung in Deutschland.

Als Nebenwirkungen von Pravastatin werden vorübergehende und unter Therapie persistierende Erhöhungen der Lebertransaminasen beschrieben, gelegentlich können Kopfschmerzen, Schwindel, Müdigkeit und Brustschmerz auftreten. Desweiteren werden unkomplizierte Myalgien und Arthralgien beobachtet, in Einzelfällen wird das Auftreten einer schwer bis tödlich verlaufenden Rhabdomyolyse (Muskelzelluntergang der quergestreiften Muskulatur) mit gestörter Nierenfunktion infolge Myoglobinurie erwähnt. Darüber hinaus kann es zu Juckreiz und Exanthem, gastrointestinalen Beschwerden, Hypersensitivitätsreaktionen wie Blutdruckabfälle bis hin zum anaphylaktischen Schock und zu Blutbildveränderungen kommen ²². Da die myotoxischen Effekte der Statine konzentrationsabhängig sind ¹³², stellt sich die Frage, ob Individuen mit genetisch bedingt funktionell eingeschränkter Aktivität von OATP1B1 und der Konsequenz erhöhter Pravastatin-Plasma-Spiegel anfälliger für eine Pravastatin-induzierte Myopathie sind als Individuen mit einem normalen Phänotyp

1.3.2 Pharmakokinetik

Pravastatin zeichnet sich durch seine einzigartigen pharmakokinetischen Eigenschaften unter den anderen Cholesterolsyntheseinhibitoren aus. Die ausgeprägte Hydrophilie dieser Verbindung erklärt den geringen Absorptionsgrad im Gastrointestinaltrakt. Durch den Aufnahmetransporter OATP1B1 wird Pravastatin – im Gegensatz zu anderen Statinen - in hohem Maße aktiv vom portalvenösen Blut in die Hepatozyten transportiert ^{65, 143, 56, 36, 121, 38, 61}. Die transportervermittelte Aufnahme in die Leber ist ausschlaggebend für den hepato-selektiven

Wirkmechanismus und die Hemmung der Cholesterinsynthese. OATP1B1 wurde als wichtigster hepatischer Aufnahmetransporter von Pravastatin charakterisiert ⁸⁸.

Pravastatin wird als einziger der derzeitig routinemäßig eingesetzten HMG-CoA-Reduktase-Hemmer nur zu einem geringen Teil über das Cytochrom P450-System metabolisiert. *In-vitro*-Untersuchungen zur Metabolisierung von Pravastatin an humanen Darm- und Leberzellen zeigten, dass die Bildung der hydroxylierten Metabolite unter anderem über CYP3A4, einem Leberenzym des Cytochrom P450-Systems, erfolgt. Vergleichsuntersuchungen mit Lovastatin zeigten jedoch, dass der Metabolisierungsweg von Pravastatin über das Cytochrom P450-System eine vergleichsweise untergeordnete Rolle spielt ⁵².

Nach oraler Verabreichung werden etwa 20 % der Dosis über die Nieren, 70 % über die Fäces eliminiert ²². Der Hauptanteil wird unverändert ausgeschieden ²¹. Etwa 1,5 Stunden nach oraler Einnahme werden maximale Blutspiegel erreicht. Die Plasmaeliminationshalbwertszeit ($t_{1/2}$) beträgt etwa 1,5 bis 2 Stunden. Der Hauptmetabolit 3'-a-iso-pravastatin ist inaktiv und hat eine Halbwertszeit, die knapp unter der des Pravastatins liegt ¹⁰⁸. Die Bioverfügbarkeit liegt bei 17 % ²².

1.3.3 Pravastatin als Substrat weiterer Arzneimitteltransporter

Pravastatin ist neben weiteren Arzneimitteltransportern auch Substrat des Efflux-Transporters MRP2 ¹⁴². MRP2 ist in der apikalen kanalikulären Membran der Hepatozyten, des proximalen Tubulus der Niere und der Enterozyten von Duodenum und Jejunum lokalisiert ^{9, 24, 64} und vermindert daher womöglich die gastrointestinale Absorption und erleichtert die biliäre und renale Ausscheidung der Stoffe seines Substratspektrums (s. auch *Abbildung 1*).

Weitere Transporter, die womöglich eine untergeordnete Rolle in der Disposition von Pravastatin spielen, sind die Aufnahmetransporter OATP2B1 (OATP-B (*SLCO2B1*)) und der organische Anionentransporter OAT3 (*SLC22A8*), sowie die Efflux-Transporter BSEP (*bile salt export pump, ABCB11*) und BCRP (*breast cancer resistance protein, ABCG2*). Neben der Leber wird OATP2B1 in den Enterozyten des Dünndarms exprimiert ⁶², wo es womöglich die Absorption von Pravastatin erleichtert. OAT3 trägt wahrscheinlich zur Ausscheidung von Pravastatin über den Urin bei ¹²⁷. BSEP und BCRP werden in der kanalikulären Membran der Hepatozyten exprimiert ^{27, 78} und sind möglicherweise in die biliäre Elimination von Pravastatin

involviert ^{35, 37}, besonders unter Abwesenheit von MRP2. BCRP wird auch im Dünndarm exprimiert, wo es womöglich die Absorption von Pravastatin vermindert ⁷⁸.

1.3.4 Auswirkung genetischer Polymorphismen auf Blutplasmaspiegel von Pravastatin

Mehrere klinische Studien haben hohe interindividuelle Schwankungen des Blutplasmaspiegels von Pravastatin gezeigt ^{74, 103, 120}. OATP1B1 gilt als einer der hepatozellulären Hauptaufnahmetransporter von Pravastatin, dessen Aktivität als entscheidender, die Transportrate limitierender Faktor betrachtet wird ⁸⁸. Zudem bleibt dieses Substrat in seinem Metabolisierungsprozess vom Cytochrom P450– System weitgehend unabhängig. Deshalb wurde angenommen, dass zumindest ein Teil dieser interindividuellen Schwankungen möglichen Genpolymorphismen dieses Transportproteins zugeschrieben werden kann. Anhand einer klinischen Studie wurden kürzlich tatsächlich Effekte der Genvarianten *OATP1B1 *15* und *OATP1B1 *1b* auf die totale und nichtrenale Clearance von Pravastatin *in vivo* gezeigt ⁹⁶.

1.4 Problemstellung

Angesichts des Substratspektrums von OATP1B1 ist es denkbar, dass genetische Polymorphismen weitreichende pharmakologische, toxikologische und pathophysiologische Konsequenzen haben. Dabei lässt die breite Anwendung von Pravastatin im Rahmen der lipidsenkenden Behandlung Fragen über die Sicherheit der Therapie aufkommen.

Tatsächlich gelten Expression und Funktion von OATP1B1 als wichtiges, die Transportrate limitierendes Kriterium bezüglich der hepatischen Clearance von Pravastatin ^{143, 39}. Als Konsequenz einer reduzierten Transportfunktion und begrenzten Aufnahme in die Hepatozyten, den Hauptort der Elimination, und dadurch erhöhter Plasmaspiegel mit gesteigerter systemischer Exposition, ist eine Erhöhung der Rate unerwünschter Arzneimittelwirkungen denkbar. Dies könnte, insbesondere bei Langzeittherapie, zu Bedarf an Maßnahmen zur Dosisreduktion führen. Umgekehrt könnte eine durch genetische Varianten modifizierte Pharmakokinetik im Sinne einer gesteigerten Aufnahmefunktion und erniedrigter Plasmaspiegel ebenfalls eine Dosisanpassung zur Erzielung des gewünschten therapeutischen Effekts erfordern. Aus diesen Gründen sind Kenntnisse über die Auswirkungen von Varianten im OATP1B1-Gen auf pharmakokinetische Parameter erstrebenswert.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Auswirkung der bei Europäern am häufigsten auftretenden genetischen Polymorphismen des Transportproteins OATP1B1 (*OATP1B1* *1b und *5) auf die Pharmakokinetik einer Einzeldosis des Cholesterinsenkers Pravastatin soll anhand ausgewählter, gesunder Träger einer kaukasischen Bevölkerung in einer kontrollierten klinischen Studie untersucht werden.

Ferner sollen Relevanz, Vorteile und Möglichkeiten einer routinemäßigen Genotypisierung von OATP1B1 für eine medikamentöse Therapie diskutiert werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Studiendesign

Die Untersuchung wurde als offene, parallele Pilotstudie angelegt. Insgesamt wurden 30 gesunde männliche Probanden unterschiedlichen OATP1B1 - Genotyps bezüglich der Pharmakokinetik einer oralen Einmalgabe von 40 mg Pravastatin aus der Gruppe der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer untersucht und verglichen.

Die Studie wurde nach Zustimmung der lokalen Ethikkommission gemäss den Richtlinien der Good Clinical Practice am Institut für Klinische Pharmakologie der Charité durchgeführt und beim Senator für Gesundheit und Soziales entsprechend § 67, Absatz 1 AMG angezeigt. Die teilnehmenden Probanden wurden durch die studienbetreuenden Ärzte und Doktoranden in schriftlicher und mündlicher Form aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an der Studie.

2.1.1 Probandenauswahl und Einschlusskriterien

Die Auswahl der Probanden erfolgte aus einem Pool von 423 Freiwilligen aus dem Raum Berlin, bei denen eine Genotypisierung nach Polymorphismen des OATP1B1- Gens (*SLC21A6*) vorgenommen wurde. Anschließend wurden insgesamt 30 Probanden ausgewählt und drei verschiedenen Gruppen zugeteilt. Die erste Gruppe bestand aus zehn Wildtypträgern mit dem Genotyp *OATP1B1* *1a/*1a , die zweite Gruppe aus zehn heterozygoten oder homozygoten

Trägern des Allels *OATP1B1* *1b (Basenpaartausch A388G), die dritte Gruppe umfasste zehn Individuen mit der Mutation *OATP1B1* *5 (Basenpaartausch T521C) (*Tabelle 1*). Bei den Studienteilnehmern handelte es sich um gesunde männliche Nichtraucher im Alter zwischen 18 und 50 Jahren mit einem Körpergewicht ± 20 % gemäß Broca-Index. Alle Probanden waren kaukasischer Abstammung; zur Vermeidung systematischer Fehler wurde die Auswahl aus einer einheitlichen genetischen Population vorgenommen.

Über die Teilnahme an der Studie wurde nach Erhebung sämtlicher Untersuchungsparameter gemäß den unten genannten Ein- und Ausschlusskriterien vor Beginn der Messung entschieden. Die Prüfung zur Erfüllung der Kriterien erfolgte anhand eines Anamnesebogens und durch Erhebung von medizinischer Anamnese und körperlichem Status, einschließlich Feststellung

Tabelle 1: Charakteristika der Studienteilnehmer, gruppiert nach Haplotypen von OATP1B1

| | <i>Gruppe 1: *1a/*1a (n = 10)</i> | <i>Gruppe 2: *1a/*1b (n = 8)+ *1b/*1b (n = 2)</i> | <i>Gruppe 3: *1a/*5 (n = 10)</i> |
|---------------|--|--|---|
| Alter (Jahre) | 28 (20 – 37) | 31 (23 – 45) | 31 (24 – 46) |
| Gewicht (kg) | 79 (64 – 108) | 73 (66 – 86) | 74 (63 – 81) |
| Größe (cm) | 182 (168 – 193) | 178 (173 – 191) | 180 (173 – 191) |

Die Werte bezeichnen Mittelwert und Spannweite.

von Alter, Körpergröße und Gewicht, Messung von Körpertemperatur, Pulsfrequenz und Blutdruck, sowie Erstellung eines Zwölf-Kanal-EKGs. Zusätzlich wurde eine klinisch-chemische und hämatologische Routine-Blutuntersuchung vorgenommen, in deren Rahmen folgende Parameter bestimmt wurden: Elektrolyte, Glukose, Kreatinin, Harnstoff, Triglyzeride, Cholesterin, High-density-lipoprotein-Cholesterin, Low-density-lipoprotein-Cholesterin, Albumin, Kreatinkinase, C-Reaktives Protein, Aspartataminotransferase, Alaninaminotransferase, Gesamt-Bilirubin, Thromboplastinzeit, partielle Thromboplastinzeit,

Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozyten-, Leukozyten-, Thrombozytenanzahl sowie Hepatitis-B-surface-Antigen, Hepatitis-B-core-Antikörper und Hepatitis-C-Virus-Antikörper zum Ausschluss einer Hepatitis B bzw. Hepatitis C. Darüber hinaus wurde ein HIV-Test und ein Drogenscreening hinsichtlich Alkohol, Cannabinoide, Opioide, Benzodiazepine, Barbiturate und Cotinin durchgeführt. Im Rahmen der Urinanalyse wurden pH-Wert, Nitrit, Protein, Glukose, Ketone, Urobilinogen, Bilirubin, Blut und Leukozyten bestimmt. Die Probanden erhielten schriftliche und mündliche Erläuterungen zu Studieneinschränkungen und Ernährungshinweise.

2.1.2 Ausschlusskriterien

Ausgeschlossen wurden Probanden mit Störungen der Leber- und Nierenfunktion, floridem Magen-Darm-Ulkus in der Anamnese, Operationen des Gastrointestinaltraktes (ausgenommen davon: Appendektomie) oder einer innerhalb der letzten vier Wochen vor Studienbeginn stattgehabten interventionellen Diagnostik (z.B. Katheteruntersuchungen). Des weiteren fanden Probanden mit Muskelerkrankungen, Tumorleiden, Hepatitis, HIV-Infektion, Tuberkulose, Diabetes mellitus und neurologischen bzw. psychiatrischen Erkrankungen, sowie dauerhafter Begleitmedikation, Arzneimittelallergien in der Anamnese oder mit bekanntem Drogenabusus keine Zulassung zur Studienteilnahme. Ausgeschlossen wurden auch Probanden, die innerhalb der letzten zwei Monate an einer anderen Arzneimittelstudie teilgenommen oder Blut gespendet hatten, oder die ganz allgemein klinische Befunde aufwiesen, die eine Teilnahme hätten beeinträchtigen können. Zudem wurden keine Frauen in die Studie eingeschlossen, um eventuelle geschlechtsspezifische Auswirkungen auf die Pharmakokinetik von Pravastatin auszuschließen - beispielsweise eine mögliche Beeinflussung des Leberstoffwechsels durch zyklusabhängige Schwankungen von Östrogen. Allerdings existieren hinsichtlich des Faktors der Geschlechtszugehörigkeit als relevante Einflussgröße in diesem Rahmen derzeit unterschiedliche Forschungsergebnisse^{101, 94}.

2.1.3 Studienablauf

Die Kinetikmessung am jeweiligen Prüftag erstreckte sich über insgesamt 24 Stunden. In diesem Zeitraum erfolgten insgesamt 13 Blutentnahmen. Nach einer Nüchternblutentnahme aus einer peripher-venösen Verweilkanüle erhielten die Probanden die orale Studienmedikation von 40 mg Pravastin (*Pravasin protect*[®], 40 mg; Bristol Myers Squibb GmbH, München) zusammen mit 200 ml Wasser. Daraufhin wurden in Abständen von 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 1,30 h, 2 h, 3

h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h und 24 h nach Pravastatin-Einnahme Blutproben von jeweils 9 ml entnommen. Zusätzlich wurde Urin in den Perioden 0-12 h und 12-24 h gesammelt. Nach Ablauf der Messungen am ersten Prüftag wurden die Probanden über Nacht in ihre häusliche Umgebung entlassen. Die letzte Blutentnahme erfolgte am Morgen des zweiten Prüftags, zu der sich die Probanden noch einmal im Institut einzufinden hatten.

2.1.4 Diätetische Maßnahmen

Die Probanden hatten eine Nüchternphase von zehn Stunden vor bis vier Stunden nach Einnahme des Cholesterinsenkers einzuhalten. Nach Verabreichung der Testsubstanz erhielten sie zunächst Mineralwasser, im Anschluss standardisierte Mahlzeiten jeweils vier und zehn Stunden nach Medikamenteneinnahme. Weitere Nahrungsaufnahmen dazwischen waren nicht erlaubt. Jeweils 24 Stunden vor Einnahme des Medikaments bis nach der letzten Blutentnahme mussten die Teilnehmer auf den Genuss von Alkohol und xanthinhaltigen Speisen und Getränken (Kaffee, Tee, Cola, Schokolade, Kakao) verzichten, darüber hinaus auch auf Grapefruit- und chininhaltige Produkte aufgrund deren hemmenden Einflusses auf die Transportaktivität von OATP *in vitro*¹⁹. Der Konsum von Nikotin und Drogen war ab sieben Tagen vor Beginn bis zum Abschluss der Messung untersagt. Im Übrigen hatten die Probanden ab 72 Stunden vor der Voruntersuchung bis zum Abschluss der Studie Saunabesuche, Sonnenbäder und anstrengende körperliche Aktivitäten zu unterlassen, um eine hieraus resultierende Erhöhung der Kreatininkinase von einem eventuellen, medikamentös bedingten Anstieg abgrenzen zu können.

2.1.5 Weiterverarbeitung der Proben

Die Blutproben à 9 ml wurden in Polypropylen-Röhrchen mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) als Antikoagulanzen (*S-Monovette*® 2,7 ml Kalium-EDTA, No./REF 05.1167, Sarstedt) abgenommen und unmittelbar danach 10 min bei 5000 U/min zentrifugiert. (*Zentrifuge 5415c, Eppendorf*). Das so gewonnene Blutplasma wurde in Eppendorfgefäße à 2 ml überführt und bis zur Weiterverarbeitung bei -22 °C gelagert.

Für die Urinanalyse wurden von dem Urin der beiden Sammelperioden 0-12 h und 12-24 h jeweils 10 ml mit einem Kunststoff-Röhrchen (*Urin-Monovette*®, No./REF. 10.252, Sarstedt) entnommen und bis zur Weiterverarbeitung ebenfalls bei -22 °C gelagert.

2.1.6 Sicherheitskontrolle

2.1.6.1 Überprüfung der Probandencompliance und Vorsichtsmaßnahmen

Unmittelbar vor Einnahme der Testsubstanzen am Prüftag wurden die Probanden wiederholt im Rahmen einer Kurzanamnese über ihren Gesundheitszustand, begleitende Medikamenteneinnahmen, sowie Drogen-, Alkohol- und Nikotinkonsum befragt. Die Studienteilnehmer erhielten Hinweise über mögliche Durchführung weiterer Blut- und Urinkontrollen zur Überprüfung ihrer Angaben im Zweifelsfall und über sofortigen Ausschluss von der Studie bei positivem Testergebnis. Zur Minimierung gesundheitlicher Beeinträchtigungen wurden Blutdruck- und Pulskontrollen während der Messung vorgenommen. Eine körperliche Untersuchung und Kontrolle der übrigen, bereits im Rahmen der Voruntersuchung (unter 2.1.1) erhobenen Parameter wurde außerdem auch im Rahmen einer Nachuntersuchung innerhalb einer Woche nach dem Prüftag wiederholt.

2.1.6.2 Evaluierung von unerwünschten Ereignissen

Jedes aufgetretene unerwünschte Ereignis, das während oder nach der Kinetikmessung bei einer Versuchsperson auftrat, wurde erfasst und schriftlich dokumentiert. Dies geschah unabhängig davon, ob ein Zusammenhang mit dem Prüfpräparat bestand oder nicht.

2.1.6.3 Versicherungsschutz

Gemäß den Vorschriften des Arzneimittelgesetzes AMG § 40, Absatz 1 und Absatz 3, waren die Probanden gegen bei Blutentnahmen potentiell auftretende Schäden, sowie die therapeutisch nicht indizierte Einnahme des Cholesterinsenkers mit einer Deckung von bis zu 500.000 Euro versichert.

2.1.7 Fehlerminimierung

Die Hauptzielparameter, die in dieser Studie gemessen wurden, sind von der subjektiven Wahrnehmung der Probanden oder Studienärzte unabhängig (Arzneimittel-Blutkonzentrationen, Transportaktivitäten), so dass eine Randomisierung oder Blindung nicht notwendig war.

2.1.8 Dokumentation der Studie

Die erhobenen Daten (Anamnese, Laborergebnisse, unerwünschte Arzneimittelnebenwirkungen, Blutentnahme- und Laborprotokolle) wurden in eigens hierfür erstellten Prüfbögen

eingetragen, die zusammenhängend für 15 Jahre im Institut für Klinische Pharmakologie der Charité aufbewahrt werden.

2.1.9 Datenschutz

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

2.2 Gewinnung der DNA

Die DNA wurde aus kernhaltigen Leukozyten durch das Standard Phenol-Chloroform-Verfahrens extrahiert, bzw. aus nativen Blutproben gewonnen anhand des MagNA Pure LC Systems und des MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche DiagnosticsTM, Mannheim).

2.2.1. Lyse der Erythrozyten

Zunächst wurden etwa 5 ml aufgetautes EDTA-Vollblut mit 35 ml 1 x Erythrozyten-Lyse-Puffer versetzt und für mindestens 30 min bis maximal 2 h auf Eis inkubiert. Dies bewirkte eine Zerstörung der kernlosen Zellen, während die kernhaltigen Leukozyten aufgrund der höheren Membranstabilität intakt blieben. Die Proben wurden daraufhin in einer auf 4 °C vorgekühlten Beckmann- Zentrifuge für 30 min bei 2000 U/min zentrifugiert, die Überstände anschließend dekantiert und das Zellsediment mit jeweils 1,5 ml 1 x TEN-Puffer resuspendiert. Die Proben wurden bis zur DNA-Extraktion bei -20°C tiefgefroren. Chemikalien und Lösungen sind in *Tabelle 2* aufgeführt..

Table 2: *Chemikalien, Lösungen und Geräte zur Lyse der Erythrozyten*

| | |
|-----------------------------|--|
| 10 x Erythrozytenlysepuffer | 372 mg EDTA (MG = 372,2 g/mol) (Fa. Calbiochem) 10 g KHCO ₃ (MG = 100,1 g/mol) (Fa. Merck) 61,5 g NH ₄ Cl (MG = 53,49 g/mol) (Fa. Merck) |
| 1 x Erythrozytenlysepuffer | 10 x Erythrozytenlysepuffer 1 : 10 mit aqua bidest auf 1 l verdünnen |
| 10 x TEN- Puffer | 24,2 g TRIS/ HCl (MG = 121,14 g/mol) (Fa. Merck) 7,4 g EDTA (MG = 372,2 g/mol) 17,5 NaCl ₂ (MG = 58,44 g/mol) |
| 1 x TEN- Puffer | 10 x TEN- Puffer 1:10 mit aqua bidest auf 1l verdünnen |
| Falcon – Röhrchen (50 ml) | |
| Beckmann – Zentrifuge | Modell GS- 6R |

2.2.2 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion aus Leukozyten nach dem Standard-Phenol-Chloroform-Verfahren wurde in folgenden Arbeitsschritten durchgeführt: Nach Vorlegen von jeweils 1,5 ml Lysis-Puffer und 100 µl der frisch angesetzten Proteinase K-Lösung in sterilen Plastikröhrchen (PP-Röhrchen, Fa. Greiner) und Zugabe von je 1,5 ml der Leukozyten-Zellsedimente aus dem Arbeitsschritt Erythrozyten-Lyse erfolgte eine anschließende Inkubation im Brutschrank über Nacht unter leichtem Schütteln bei 37 °C. Daraufhin wurden die Proben mit 1,5 ml Phenol-Chloroform versetzt und für 2 h in einem Überkopfschüttler gemischt. Dabei diente Phenol der Ausfällung von Proteinen, die in Komplexen mit Nukleinsäuren vorliegen. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 2500 U/min (Beckmann-Zentrifuge GS-8R) wurden im Rahmen der Chloroform-Nachextraktion mindestens 2 ml der oberen, wässrigen Phase jeweils mit 1,5 ml Chloroform zwecks Eliminierung verbliebener Lipidbestandteile versetzt. Die Proben wurden für 30 min im Überkopfschüttler gemischt und erneut für 10 min bei 2500 U/min zentrifugiert. Im folgenden Arbeitsschritt wurde die DNA präzipitiert. Auf Gefäße mit 6 ml 96 %igem Ethanol und 100 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,5) wurden exakt 2 ml der vorausgegangenen Chloroform-Extraktion überpipettiert und kräftig per Hand geschüttelt, was zum Ausfallen der DNA führte. Nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur und ebenfalls zehnminütiger Zentrifugation bei 3000 U/min haftete das Präzipitat am Boden des Röhrchens. Der Überstand wurde vorsichtig

verworfen, die DNA durch Zugabe von 3 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und wiederum 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Nach wiederholter Verwerfung des Überstands wurden die Röhren 30 min zum Trocknen auf den Kopf gestellt, anschließend mit 200µl TE-Puffer versetzt und zum Lösen der DNA für mindestens 12 h bei 55 °C inkubiert. Nach Extraktion und Auflösung der DNA erfolgte deren photometrische Quantifizierung. Dabei erfasste die Messung sowohl die Menge als auch die Qualität der Extrakte. Den Richtwert hierfür bildete der Extinktionsquotient bei 280/260 nm, der zwischen 1,6 und 2,0 liegen sollte. Werte unter 1,5 deuteten auf eine Proteinverunreinigung hin. Die DNA wurde bis zur PCR-Analyse bei 4 °C in sterilen Gefäßen gelagert. Chemikalien und Lösungen siehe *Tabelle 3*.

Tabelle 3: Chemikalien und Lösungen zur DNA-Extraktion

Chemikalien

| | |
|--------------------------|--|
| Proteinase- K- Lösung | je Probe 2 mg Proteinase-K (Fa. Boehringer/Mannheim) in 100 µl 20 mM TRIS-HCl-Puffer lösen |
| Lysis-Puffer | Fertigpuffer (Fa. Applied Biosystems, Nr.9) |
| Phenollösung | Fertigpuffer (Fa. Applied Biosystems, Nr. 8) |
| Chloroform-Lösung | (Fa. Merck) |
| Ethanol, 96%ig und 70%ig | (Fa. Merck) |
| 3 M Natriumacetat | 40,8 g Natriumacetat (MG = 136,1 g/mol) (Fa. Merck) + 50 ml H ₂ O, mit Eisessig auf pH = 5,5 einstellen, auf 100ml mit H ₂ O auffüllen und autoklavieren |
| TE-Puffer | 10mM TRIS/HCl ; 0,1 mM EDTA (Fa. Calbiochem) |

2.2.3 DNA-Gewinnung mittels MagNA Pure LC Kit

Die Gewinnung der DNA aus nativen Blutproben anhand des MagNA Pure LC Systems (Fa. Roche) und des MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche Diagnostics™, Mannheim) erfolgte gemäß der Protokolle des Herstellers. Das Prinzip beruht zunächst auf Lyse der Blutproben durch Inkubation mit einem speziellen Puffer, der chaotrope Salze und Proteinase

K enthält. Magnetische Glaspartikel werden hinzugefügt, an deren Oberfläche die DNA gebunden wird. Ungebundene Substanzen werden durch mehrere Waschschrirte entfernt, dann wird die gereinigte DNA eluiert.

2.3. Genotypisierung

Eine Gruppe von 423 zufällig ausgewählten, die oben genannten Kriterien erfüllenden Probanden wurde auf das Vorliegen von 18 zuvor beschriebenen Polymorphismen^{135, 98} von *OATP1B1* (SNPs) untersucht. Die Bestimmung der individuellen Genotypen erfolgte mittels Polymerase- Kettenreaktion (PCR) und Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP) nach optimierten Methoden¹³⁵. Die Bezeichnung wurde entsprechend der zuvor veröffentlichten Nukleotid –Sequenzen von *OATP1B1* (GenBank Accession Nos. AC022335 und NM_006446) vorgenommen.

2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine relativ einfache *In-vitro*-Methode, durch die mittels DNA-Polymerasen spezifische DNA-Segmente vervielfältigt werden können. (Voraussetzung dafür ist, dass die Sequenz des nachzuweisenden DNA-Abschnittes zum größten Teil bekannt ist.) Zur Durchführung einer PCR werden genomische DNA , eine hitzestabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase), die vier zur DNA-Synthese notwendigen Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sowie zwei geeignete DNA-Startmoleküle (Primer) in einem geeigneten Reaktionspuffer inkubiert. Die einzelsträngigen Primer sind so auszuwählen, dass sie komplementär zu dem 5`- bzw. 3`- terminalen Ende des zu amplifizierenden DNA-Segmentes sind. Mit Hilfe eines vollautomatisierten, sogenannten Thermocyclers verläuft die PCR in temperaturgesteuerten Reaktionszyklen, wobei jeder Zyklus aus drei Schritten besteht. In der Phase der **Denaturierung** erfolgt die Trennung der Doppelstränge der Matrizen-DNA durch kurzfristiges Erhitzen auf 94-95 °C. Nach einer Temperaturerniedrigung auf 58-60 °C lagern sich die Primer an die Enden der ihnen komplementären Strangsegmente an (**Annealing**). Die Primer dienen dabei als Startpunkt für die sich anschließende **Elongation**. In dieser Phase erfolgt die Synthese der komplementären DNA-Stränge durch die DNA-Polymerase, die die Primer bei einer Temperatur von 72 °C in 5`-3`-Richtung verlängert. Am Ende dieses Zyklus liegen neu synthetisierte Doppelstränge vor, die zunächst noch keine definierte Länge haben. Da sie aber im

nächsten Zyklus selbst als Matrizen verwendet werden und an ihren Enden die Oligonukleotidsequenz der Primer tragen, entstehen ab dem dritten Durchlauf nur noch Produkte gewünschter Länge. Ab dem vierten Durchlauf erfolgt eine exponentielle Amplifizierung der Zielsequenz. Nach millionenfacher Vermehrung der DNA kommt es aufgrund der zunehmenden Hitzedenaturierung der DNA-Polymerase und des Verbrauchs an Nukleotiden und Primern zu einer Limitierung auf etwa 30 Zyklen.

2.3.2 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP)

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme bakterieller Herkunft, die spezifische Basensequenzen einer DNA-Doppelhelix erkennen und schneiden, wodurch Restriktionsfragmente unterschiedlicher Länge entstehen. Befindet sich im Bereich der Erkennungsfrequenz einer Restriktionsenzym-Schnittstelle ein genetischer Polymorphismus, resultiert ein verändertes Schnittmuster. Basensubstitution, Deletion oder Insertion eines oder mehrerer Nukleotide führen somit zu Neuauftreten oder Verlust von Schnittstellen und damit zur Verkürzung oder Verlängerung der Restriktionsfragmente. Dieses Phänomen wird Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) genannt und zum Nachweis von Punktmutationen ausgenutzt. In der anschließenden Gelelektrophorese wandern die Fragmente abhängig von ihrer Größe unterschiedlich schnell durch die netzähnlichen Polysaccharidstrukturen des Agarosegels und werden schließlich durch interkalierende Farbstoffe sichtbar gemacht.

2.3.3 Bestimmung der OATP1B1-Allele durch PCR-RFLP-Tests

Tabelle 4: Chemikalien für die PCR-RFLP-Tests

| Chemikalien | Hersteller |
|--------------------------------------|------------------------|
| 10 x PCR-Puffer | Rapidozym, Luckenwalde |
| 100 mM TRIS-Hydrochlorid [pH 8,8] | |
| 50 mM Ammoniumsulfat | |
| 250 mM Kaliumchlorid | |
| 20 mM Magnesiumsulfat | |

| | |
|------------------------------------|--|
| 3 oder 4 mM Magnesiumchlorid | Rapidozym, Luckenwalde |
| Deoxyribonukleosidtriphosphate | Rapidozym, Luckenwalde |
| Biotherm DNA Polymerase | Rapidozym, Luckenwalde |
| Qualex Gold™ Agarose (1 % und 3 %) | AGS, Heidelberg |
| PCR-Primer | TIB Molbiol, MWG |
| Restriktionsendonukleasen | Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland |
| Bromphenolblaupuffer | Merck |
| Sybr® Green stain | Invitrogen, Deutschland |
| 10x TBE-Puffer | 109 g Tris (Fa. Merck) + 55,6 g Borsäure (Fa. Merck) + 9,3 g EDTA (Fa. Merck) in 600 ml Deionat lösen, pH: 8,0-8,3 mit 1 N HCl einstellen, auf 1l mit Deionat auffüllen |
| 1x TBE-Puffer | 100ml 10x TBE-Puffer + 900 ml H ₂ O |

Tabelle 5: Geräte für die PCR-RFLP-Tests

| Geräte | Hersteller |
|---|---------------------|
| Thermocycler: Gene Amp® PCR System 9700 | Applied Biosystems |
| Videosystem Eagle Eye II | Stratagene |
| Zentrifugen | Eppendorf, Beckmann |
| Inkubationsschränke | Biometra |
| Halbautomatische Schüttler | Hoefer, Heidolph |
| Elektrophorese-Kammern und – Schlitten | Protrans |
| ABI Automatic Sequencing System ABI 310 | Prism Foster, USA |

Table 6 : Für PCR-RFLP-Tests benötigte Primer

| Exon | SNP | Primer | Allelvariante |
|-------|--|--|--|
| 2 | T217C | 5'-TGC CTA TTG ACA TTA TAT AGT CC-3' | <i>OATP1B1</i> *2, |
| | | 5'-GAT AAC CAG TGG TGT AAA GCA T-3' | <i>OATP1B1</i> *12 |
| 3 | T245C | 5'-CTT GGA CTC TAT TTG CAT CCA TTC-3' | <i>OATP1B1</i> *3, |
| | | 5'-CAA GGT ACT GAT AGT GGC ACA G-3' | <i>OATP1B1</i> *13 |
| 4 | A388G | 5'-GCA AAT AAA GG GAA TAT TTC TC-3' | <i>OATP1B1</i>*1b, |
| | | 5'-AGA GAT GTA ATT AAA TGT ATA C-3' | <i>OATP1B1</i>*14 |
| | | | <i>OATP1B1</i>*15 |
| | G411A | 5'-TTC ATC AGA AAA TTC AAC GTC-3' | <i>OATP1B1</i> *14 |
| | | 5'-AGA GAT GTA ATT AAA TGT ATA C-3' | |
| | G455A | geschachtelte PCR des PCR-Produkts für A388G mit Mismatch-Primer-Paar: | |
| | | 5'-TCA AAT TTT ATC ACT CAC TA-3' | <i>OATP1B1</i> *1c |
| | 5'-AGA GAT GTA ATT AAA TGT ATA C-3' | | |
| | C463A | wie bei A388G | <i>OATP1B1</i> *4, <i>OATP1B1</i> *14 |
| | A467G | wie bei A388G | <i>OATP1B1</i> *3, <i>OATP1B1</i> *13 |
| 5 | T521C | 5'-GTT AAA TTT GTA ATA GAA ATG C-3' | <i>OATP1B1</i>*5, |
| | | 5'-GTA GAC AAA GGG AAA GTG ATC ATA-3' | <i>OATP1B1</i>*15 |
| | | und geschachtelte PCR mit Mismatch-Primer-Paar: | |
| | | 5'-GGT CAT ACA TGT GGA TAT ACG-3' | |
| | | 5'-GTA GAC AAA GGG AAA GTG ATC-3' | |
| | C571T | geschachtelte PCR des ersten PCR-Produkts für T521C mit Mismatch-Primer-Paar: | |
| | | 5'-GGA ATA GGG GAG ACT CCC ATA GTA ACA-3' | <i>OATP1B1</i> *5a, <i>OATP1B1</i> *1b, <i>OATP1B1</i> *5, |
| | 5'-GGG ATA GGG GAG ACT CCC ATA GTA ACA-3' | <i>OATP1B1</i> *15 | |
| C597T | geschachtelte PCR des ersten PCR-Produkts für T521C mit Mismatch-Primer-Paar: | | |
| | 5'-GGG CTT TCT TAC ATT GAT GAT AT-3' | <i>OATP1B1</i> *5, <i>OATP1B1</i> *15, | |
| | 5'-GTA GAC AAA GGG AAA GTG ATC ATA-3' | <i>OATP1B1</i> *14 | |

| | | | |
|----|--------|---|---|
| 7 | G721A | 5'-TAC CTA TTA GAA CAT ATA TTT GG-3' 5'-AAG AGT GAA TTC AGT TAT TTG A-3' | <i>OATP1B1*1c</i> |
| 8 | T1058C | 5'-AAT CTT ACA TGA CTT ACG TTC AC-3' 5'-CCA CTT GGA ATA CAG TAT TTA G-3' | <i>OATP1B1*6</i> |
| 9 | A1294G | 5'-CAG AAA ACT CAT ATA TGA TTA CAA C-3' 5'-CAT ATT ATG CAA TTG ATA TAG TG-3' | <i>OATP1B1*7</i> |
| 10 | A1385G | 5'-TCT GCT TTC ACT TTA CTT CTT CC-3' 5'-GAA TAA GGA GAG GAA AGT AAA AAC-3' | <i>OATP1B1*8</i> |
| | G1463C | wie bei A1385G | <i>OATP1B1*9</i> |
| 14 | A1929C | 5'-GTT ATT ACA CAC AAT TTA AAC TG-3' 5'-GTT TGG AAA CAC AGA AGC AGA AG-3' | <i>OATP1B1*1b</i> |
| | A1964G | 5'-GTT ATT ACA CAC AAT TTA AAC TG-3' 5'-GTT TGG AAA CAC AGA AGC AGA AG-3' | <i>OATP1B1*10,</i> <i>OATP1B1*12</i> |
| | A2000G | geschachtelte PCR des PCR-Produkts für A1964G mit Mismatch-Primer-Paar: 5'-AAA TGG AAG TGT CAT GGG TG-3 5'-GTT TGG AAA CAC AGA AGC AGA AG-3' | <i>OATP1B1*11,</i> <i>OATP1B1*13</i> |

Table 7 : Restriktionsendonukleasen und verdaute RFLP-Fragmentlängen, basierend auf der Referenzsequenz bzw. den Polymorphismen

| Exon | SNP | Aminosäure-Austausch | Fragmentlänge des PCR-Produkts (bp) | Enzyme | Schnittmuster Wt Mut |
|------|--------------|----------------------|-------------------------------------|--------------------|------------------------------|
| 2 | T217C | F73L | 282 | <i>HindIII</i> | 194/88 282 |
| 3 | T245C | V82A | 272 | <i>CviRI</i> | 15/257 15/94/163 |
| 4 | A388G | N130D | 274 | <i>ClaI</i> | 274 119/155 |
| | G411A | S137S | 155 | <i>SalI</i> | 19/136 155 |

| | | | | | |
|----------|--------------|--------------|------------|----------------------|-----------------------------|
| | G455A | R152K | 107 | <i>BfaI</i> | 18/89 107 |
| | C463A | P155T | 274 | <i>HphI</i> | 185/89 274 |
| | A467G | E156G | 274 | <i>BstNI</i> | 274 197/77 |
| 5 | T521C | V174A | 178 | <i>FnuDII</i> | 178 20/158 |
| | C571T | L191L | 137 | <i>BseNI</i> | 137 32/105 |
| | C597T | F199F | 103 | <i>EcoRI</i> | 20/83 103 |
| 7 | G721A | D241N | 303 | <i>MboI + BgIII</i> | 209/94 303 |
| 8 | T1058C | I353T | 321 | <i>BseNI</i> | 102/219 102/80/139 |
| 9 | A1294G | N432D | 276 | <i>BbsI</i> | 276 68/208 |
| 10 | A1385G | D462G | 293 | <i>Fnu4HI</i> | 293 148/145 |
| | G1463C | G488A | 293 | <i>Fnu4HI</i> | 293 222/71 |
| 14 | A1929C | Leu643 Phe | 305 | <i>VspI</i> | 116/189 305 |
| | A1964G | D655G | 305 | <i>EcoRV</i> | 155/150 305 |
| | A2000G | E667G | 136 | <i>HphI</i> | 28/108 136 |

Wt = Wildtyp, Mut = Mutation

Zur Durchführung der PCR wurde je 1 µl genomische DNA zu 25 µl PCR-Mixtur hinzugefügt, bestehend aus 10 x PCR-Puffer (*Tabelle 4*), 2,5 µl MgCl₂ (3 oder 4 mM), 0,2 µl Desoxyribonukleosidtriphosphat und 1 U Biotherm DNA Polymerase. Nach Zugabe der spezifischen Vorwärts- und Rückwärts-Primer-Paare (*Tabelle 6*) erfolgte im Thermocycler die

PCR - Amplifikation. Diese bestand aus einer initialen Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Anlagerung der Oligonukleotide unter der Primer- spezifischen Temperatur für 30 s und Elongation bei 72 °C für 30 s. Zur Kontrolle der erfolgreichen Durchführung wurde im nächsten Schritt ein Gemisch aus 5 µl PCR-Produkt und 10 µl Bromphenolblaupuffer auf 1 % Agarosegel aufgetragen und in einer anschließenden Gelelektrophorese in 1x TBE-Puffer analysiert. (Elektrophorese: 30 min bei 120 Volt). Nach Anfärbung des Agarosegels mit Sybr® Green Nucleic Acid Stain in einem Bad aus Farbstoff und 1x TBE-Puffer galten Proben mit 274 bp- Bande, bzw. 178 bp- Bande als positiver Nachweis für die SNPs A388G bzw. T521C und wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Cla*I (A388G) und *Fnu*DII (T521C) verdaut. Die Auswertung erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung (60 min bei 100 Volt) auf 3 % Agarosegel in 1x TBE-Puffer. Die entstehenden Restriktionsmuster wurden mittels Ultraviolett-Durchleuchtung und digitalem Videosystem dokumentiert (*Abbildung 3*). Die Bestätigung der PCR-RFLP erfolgte durch PCR I Terminator DNA-Sequenzierung mittels ABI Automatic Sequencing System.



Abbildung 3a

PCR-RFLP-Analyse des A388G-Polymorphismus (Exon 4). Die Bandenmuster zeigen die Restriktionsfragmente (*Cla*I) von homozygoten Trägern des Wildtyps **1a* (AA, bei 274 bp), von heterozygoten (AG, 274 bp, 155 bp, 119 bp) und homozygoten Trägern der Mutation **1b* (GG, 155 bp und 119 bp) (Kontrolle, Marker)

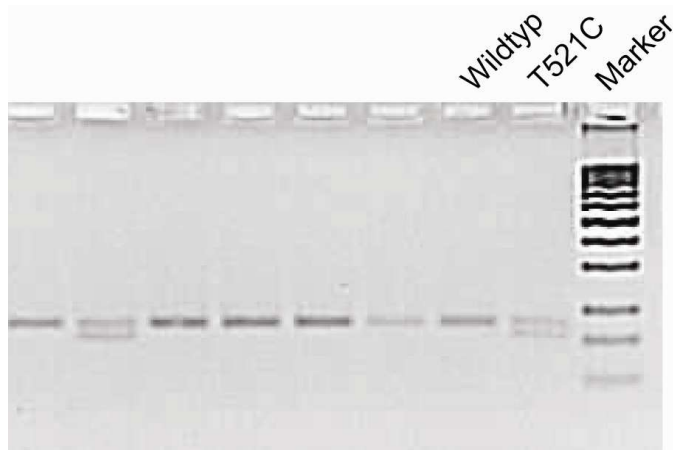


Abbildung 3b

PCR-RFLP-Analyse des T521C-Polymorphismus (Exon 5). Die Bandenmuster zeigen die Restriktionsfragmente (*FnuDII*) von homozygoten Trägern des Wildtyps *1a (TT, bei 178 bp) und von Heterozygoten der Mutation *5 (TC, 178 bp, 158 bp, 20 bp) (20 bp nicht zu sehen) (Marker)

2.4 Bestimmung der Pravastatinkonzentrationen mittels HPLC

2.4.1 Aufbau und Trennprinzip eines HPLC –Systems

Die Hochleistungsflüssigkeitchromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) ist eine Weiterentwicklung der Verteilungschromatographie und zeichnet sich durch hohe Auflösung und Empfindlichkeit, hohe Kapazität und vergleichsweise schnelle Durchführung aus. Sie beruht darauf, dass die einzelnen Substanzen eines Substanzgemisches voneinander getrennt und zwischen zwei miteinander nicht mischbaren Phasen verteilt werden. Auf diese Weise lassen sich die betreffenden Substanzen qualitativ sowie quantitativ bestimmen. Die ruhende Phase wird als stationäre Phase bezeichnet und wird durch das Material in einer Trennsäule repräsentiert, an der die andere, sogenannte mobile Phase, entlang fließt. Hierbei wird unter anderem, je nach Polarität der stationären Phase, zwischen Normalphasen- und Umkehrphasen-Chromatographie unterschieden. Im Fall der in der Untersuchung eingesetzten Umkehrphasen-Chromatographie oder RPLC (Reverse Phase Liquid Chromatography) sind die Träger der stationären Phase überwiegend Kieselgelpartikel, an die *hydrophobe* Substituenten kovalent gebunden sind; dahingegen besteht die mobile Phase aus einer *hydrophilen* Lösung, die mit einem wasserlöslichen organischen Lösungsmittel gemischt ist. Mittels einer Pumpe wird die

mobile Phase kontinuierlich durch die Säule mit der stationären Phase gepumpt, so dass sich zwischen beiden Phasen ein Milieu-Gleichgewicht einstellen kann. Zwischen Pumpe und Trennsäule befindet sich ein Probengeber (Autosampler), aus dem die Proben über das Injektionsventil in das System eingebracht werden. Auf der Trennsäule werden dann die Substanzen eines Stoffgemisches in Abhängigkeit von der Polarität der Substanz und den Eigenschaften von mobiler und stationärer Phase getrennt. Die von der Trennsäule mit unterschiedlicher Dauer zurückgehaltenen Substanzen gelangen anschließend in den Detektor. Dieser ist in der Lage, substanzspezifische Eigenschaften (Absorption des Lichts einer bestimmten Wellenlänge, Fluoreszenz, Redoxverhalten usw.) zu erkennen. Ein nachgeschalteter Integrator wandelt diese Signale in gut quantifizierbare Einheiten um und stellt diese als sogenannten Peak dar. Mittels der Peakfläche lässt sich dann die Menge einer bestimmten Substanz genau bestimmen.

2.4.2 Probenvorbereitung, Quantifizierung

Bevor die Proben chromatographisch analysiert werden können, müssen sie häufig vorbehandelt werden. Diese Vorbehandlungen bestehen aus Proteinfällungs- und Extraktionsschritten, die in der Ausbeute von Probe zu Probe variieren können. Um diese internen Schwankungen zu relativieren, wird jeder Probe vor der Extraktion eine Substanz (Interner Standard) in genau definierter Menge zugesetzt. Der Interne Standard ist eine dem Analyt chemisch verwandte Substanz und besitzt ähnliche Eigenschaften bei Extraktion, chromatographischer Trennung und Detektion. Er ermöglicht eine Beurteilung der Vollständigkeit der Extraktion und die Konzentrationsberechnung der zu bestimmenden Substanz durch Bildung des Peakflächenquotienten aus Analyt und Internem Standard.

Um die Konzentrationen der zu bestimmenden Substanzen berechnen zu können, benötigt man eine Eichreihe, welche die Substanz in definierten Konzentrationen enthält. Diese müssen so gewählt sein, dass die zu erwartenden Plasma- oder Urinkonzentrationen der Probandenproben innerhalb des Eichbereichs liegen. Die unbekannte Konzentration der Probandenproben lässt sich anhand der nach linearer Regression erhaltenen Eichgeraden berechnen. Die Linearität wird dabei charakterisiert durch den Korrelationskoeffizienten und gilt für den untersuchten Kalibrationsbereich.

2.4.3 Bestimmung von Pravastatin in Plasma und Urin mittels HPLC⁴

2.4.3.1 Chemikalien

Tabelle 8 : Chemikalien zur Probenaufbereitung für die HPLC-Analyse

| Chemikalien | Hersteller |
|-------------------------------|------------------------------------|
| Pravastatin | Bristol Myers Squibb GmbH, München |
| Clonazepam | Sigma |
| Methanol „LiChrosolv“ | Merck, Darmstadt |
| Acetonitril „LiChrosolv“ | Merck, Darmstadt |
| n-Hexan „LiChrosolv“ | Merck, Darmstadt |
| Kaliumdihydrogenphosphat p.A, | Merck, Darmstadt |

2.4.3.2 Geräte

Tabelle 9 : Geräte zur Probenaufbereitung für die HPLC-Analyse

| Geräte | Hersteller |
|---|------------|
| Wirbelmischer, REAX 2000 | Heidolph |
| Zentrifuge 5415c | Eppendorf |
| Überkopfschüttler, REAX 2 | Heidolph |
| Festphasenextraktionsgerät Benchmate II | Zymark |
| SPE-Extraktionskartuschen CEC 18 | UCT |
| Probenkonzentrator, DB-3 | Techne |
| Präzisionswaage MC-5 | Satorius |
| pH-Meter, CG-840 | Schott |
| Glasröhrchen | Schott |
| Injektionsgefäße, STVG 1.1 | Abimed |
| Präzisionspipetten | Eppendorf |

2.4.3.3 HPLC- Bedingungen

Table 10 : HPLC –Bedingungen

| Geräte / Chemikalien | | Hersteller | Einstellungen |
|----------------------|--|------------------------------|-------------------------|
| Pumpe: | LC 9A | Shimadzu, Duisburg | Flussrate: 1,0ml/min |
| Probengeber: | SIL 6A | Shimadzu | |
| Säulenofen: | CTO 6A | Shimadzu | Temperatur: 50 °C |
| UV- Detektor: | SPD6AV | Shimadzu | UV 239 nm |
| Säule: | Luna C18(2) 5µm, 250 x 4.6 mm I.D. | Phenomenex, Aschaffenburg | |
| Integration: | PC-Software Class LC10, Version 1.6 | Shimadzu | |
| Mobile Phase: | 30 % Acetonitril 70 % 0.05 M Kalium- dihydrogenphosphatpuffer (pH 2,3) | | |

2.4.3.4 Kalibrierstandards und Qualitätskontrollproben

Zunächst wurden für die Herstellung der Kalibratoren und Kontrollproben Arbeitslösungen von Pravastatin (80µl/ml Methanol) und dem Internen Standard Clonazepam (1µg/ml Methanol) hergestellt. Für die Kalibratoren und Qualitätskontrollproben wurden Aliquots der Pravastatin Arbeitslösung unter Stickstoff zur Trocknung eingeengt und in einer definierten Menge humanen Leerplasmas bzw. Leerurins aufgenommen. Aus diesen Proben wurden durch weitere Verdünnungen mit Leerplasma bzw. Leerurin die erforderlichen Kalibrator- und Kontrollproben niedrigerer Konzentrationen hergestellt. Die Konzentrationen, die für die Kalibration und Qualitätskontrolle verwendet wurden, sind in *Table 11* zusammengefasst:

Table 11: Pravastatin-Concentrations von Kalibratoren und Qualitätskontrollen

| <u>Plasma</u> | | <u>Urin</u> | |
|-------------------|---------------------------|-------------------|---------------------------|
| Kalibrator | Qualitätskontrolle | Kalibrator | Qualitätskontrolle |
| 0 ng/ml | 5,1 ng/ml | 0 ng/ml | 188 ng/ml |
| 1,9 ng/ml | 12,8 ng/ml | 125 ng/ml | 375 ng/ml |
| 3,8 ng/ml | 32,0 ng/ml | 250 ng/ml | 750 ng/ml |
| 7,5 ng/ml | 80,0 ng/ml | 500 ng/ml | 1500 ng/ml |
| 15,0 ng/ml | | 1000 ng/ml | |
| 30,0 ng/ml | | 2000 ng/ml | |
| 60,0 ng/ml | | | |
| 120,0 ng/ml | | | |
| 240,0 ng/ml | | | |

Die Kalibratoren und Kontrollproben wurden portioniert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

2.4.3.5 Probenaufbereitung

Plasma

Die Plasmaproben wurden nach Zugabe des internen Standards einer Proteinfällung mit Methanol unterzogen. Die Überstände wurden mit Wasser verdünnt und über eine Festphase extrahiert. Die Extraktionskartuschen wurden vor der Extraktaufgabe mit einem Gemisch aus Acetonitril und Wasser und mit reinem Wasser konditioniert. Nach Aufgabe des Extraktes wurden die Kartuschen mit Wasser, mit 5 % Methanol und mit n-Hexan gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem Gemisch aus Acetonitril und Wasser (1:1). Nach Einengung unter Stickstoff wurden die Trockenextrakte in $100\mu\text{l}$ 30 %igem Acetonitril gelöst und vollständig in das HPLC-System injiziert.

Urin

Zur Extraktion wurden $0,3\text{ ml}$ Urin mit $200\ \mu\text{l}$ internem Standard gemischt und anschließend mit $3,0\text{ ml}$ destilliertem Wasser verdünnt. Die weiteren Arbeitsschritte sind identisch mit denen der Plasmaproben. Für die Injektion in die HPLC wurden nur 5 bis $10\ \mu\text{l}$ verwendet.

2.4.4 Validierung

Mit Hilfe von Kalibratoren und Kontrollen kann bei quantitativen Bestimmungen die Richtigkeit (Erfassung systematischer Fehler) und die Präzision (Erfassung zufälliger Fehler) systematisch kontrolliert und überwacht werden. Definierte Qualitätskontrollproben werden in eine Analysenserie eingefügt und unter den gleichen Bedingungen wie Probandenproben analysiert. Das Prinzip der statistischen Qualitätskontrolle besteht darin, dass vom Analyseergebnis der Kontrollproben auf die Zuverlässigkeit der Probandenwerte geschlossen wird.

Richtigkeit

Als Maß für die analytische Richtigkeit (AR) gilt die relative Abweichung der Analyseergebnisse vom Nominalwert der Konzentration einer Probe. Die analytische Richtigkeit wird prozentual zur wahren (theoretisch erwarteten) Konzentration angegeben.

(AR = ermittelte Konzentration / theoretische Konzentration x 100%)

Präzision

Die Präzision ist ein Maß für die Reproduzierbarkeit der Analyseergebnisse bei wiederholter Durchführung einer analytischen Methode unter identischen Bedingungen. Die Bestimmung der Präzision erfolgt durch Verwendung der Kalibratoren und der Qualitätskontrollproben in jeder Messreihe. Man unterscheidet zwischen der *Intra-assay-Varianz* (serielle Varianz), die durch mehrfache ($n \geq 5$) Bestimmung der Qualitätskontrollproben an einem Messtag bzw. anhand eines Analysenansatz berechnet wird, und der *Inter-assay-Varianz*. Für letztere, auch zeitabhängige Varianz genannt, werden die gemessenen Qualitätskontrollproben über einen Zeitraum ausgewertet, der mehrere Messtage bzw. mehrere Analyseansätze beinhaltet. Für chromatographische Bestimmungen sind Schwankungen bis $\pm 15\%$ zulässig (Bestimmungsgrenze $\pm 20\%$).

Bestimmungsgrenze und Detektionslimit

Die Bestimmungsgrenze wird mit Hilfe der Kalibratoren und Kontrollen festgelegt und beschreibt die kleinste messbare Konzentration des Analyten in Plasma oder Urin, die noch mit einer definierten Richtigkeit und Präzision bestimmt werden kann ($\pm 20\%$; Inter-assay-Variationskoeffizient (VK) $< 20\%$ und Analytische Richtigkeit (AR) 80% bis 120%). Das Detektionslimit ist die Menge Analyt, die nach Injektion der Standardsubstanz ein Signal ergibt, das dreimal höher als das Grundrauschen der Basislinie ist.

2.4.5 Charakteristik der HPLC-Bestimmung von Pravastatin

Die Trennung von Pravastatin und dem Internen Standard Clonazepam verlief unter den gegebenen HPLC-Bedingungen optimal. Die Laufzeiten betragen 14 Minuten für Pravastatin und 20 Minuten für den Internen Standard. In den Leerplasma- und Leerurin-Proben wurden keine Interferenzen beobachtet, so dass eine ausreichende Selektivität gegeben war. *Abbildung 4* zeigt ein Chromatogramm einer Leerplasma-Probe (a), einer Qualitätskontroll-Probe mit einer Pravastatin-Konzentration von 32,0 ng/ml (b) und eine Plasmaprobe eines Probanden 1,5 h nach Gabe von 40 mg Pravastatin (c). *Abbildung 5* zeigt die Chromatogramme nach Analyse einer Leerurin-Probe (a), einer Qualitätskontroll-Probe mit 750 ng/ml (b) und einer Sammelurin-Probe 12 h nach Pravastatingabe (c).

Die Bestimmungsgrenze für Pravastatin betrug 1,9 ng/ml im Plasma mit einem Inter-assay-Variationskoeffizienten von 19,4 % und einer Analytischen Richtigkeit von 106 %. Für Urin lag die untere Bestimmungsgrenze bei 125 ng/ml mit einem Variationskoeffizienten von 6,8 % und einer Analytischen Richtigkeit von 91 %. Das Detektionslimit lag bei 1 ng. Im untersuchten Konzentrationsbereich bestand eine Assay-Linearität, im Plasma bis zu einer Konzentration von 200 ng/ml und im Urin bis zu Werten von 2000 ng/ml. Die Korrelationskoeffizienten betragen 0,99 im Mittelwert. Die Methodenparameter zur Charakterisierung der Linearität sind in *Tabelle 12* zusammengefasst.

Es wurde eine verlässliche und reproduzierbare Methode zur kombinierten Bestimmung der Pravastatinkonzentration in Humanplasma und Urin eingeführt, die eine automatische Festphasenextraktion mit Analyse durch Reversed-Phase HPLC und UV-Detektion beinhaltet.

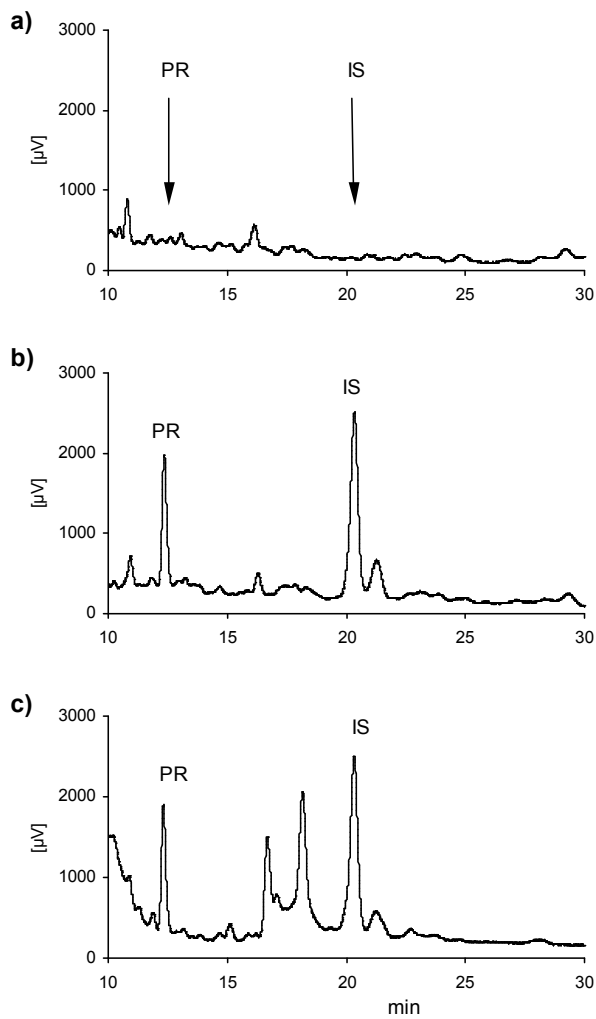


Abbildung 4:

Chromatogramm von Plasmaproben
a) Leerplasma-Probe; **b)** Qualitätskontrolle mit Pravastatin-Konzentration 32,0 ng/ml
c) Probandenprobe 1,5 h nach Einnahme von 40 mg Pravastatin

PR = Pravastatin; IS = Interner Standard

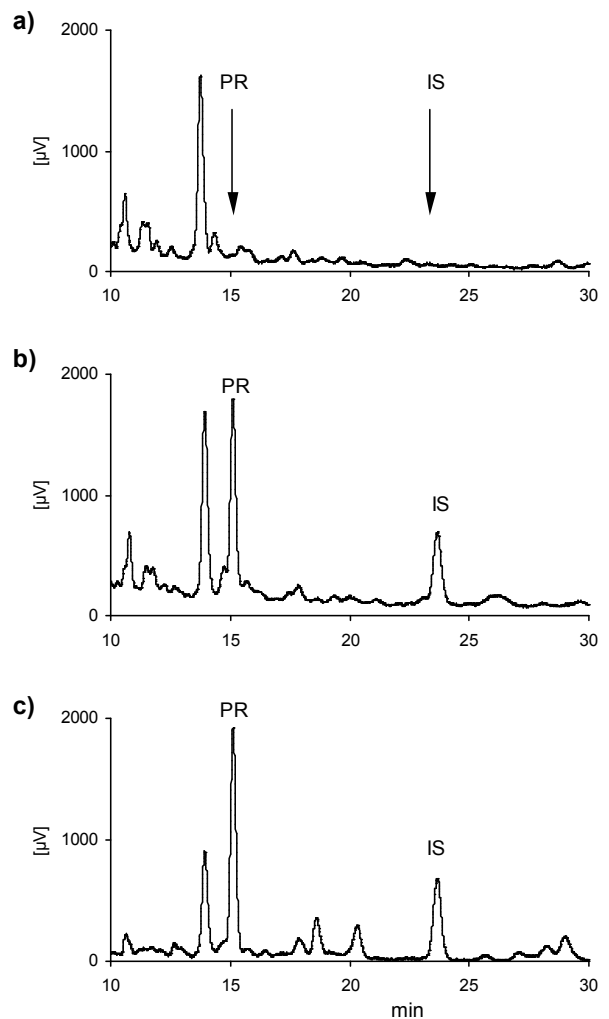


Abbildung 5:

Chromatogramm von Urinproben
a) Leerurin-Probe; **b)** Qualitätskontrolle 750 ng/ml Pravastatin;
c) Sammelurin 12 h nach Pravastatin-gabe

Table 12: Assay-Linearität für die Bestimmung von Pravastatin

| | | Mittelwert | Standardabweichung | Bereich | Anzahl |
|---------------|-------------|------------|--------------------|----------------|--------|
| Plasma | Anstieg | 0.016 | 0.0018 | 0.013 - 0.021 | 22 |
| | Intercept | 0.013 | 0.027 | -0.026 - 0.089 | 22 |
| | Korrelation | 0.999 | 0.001 | 0.997 – 1.000 | 22 |
| | | Mittelwert | Standardabweichung | Bereich | Anzahl |
| Urin | Anstieg | 0.002 | 0.0002 | 0.001 – 0.003 | 10 |
| | Intercept | -0.034 | 0.038 | -0.090 – 0.034 | 10 |
| | Korrelation | 0.9989 | 0.0007 | 0.997 – 0.999 | 10 |

Der Inter-assay-Variationskoeffizient für Pravastatin im Plasma (für Konzentrationen von 5,1 bis 80 ng/ml) betrug 9,1% bis 10,2%. Im Urin (Konzentrationen von 188 bis 1500 ng/ml) lag der Inter-assay-Variationskoeffizient zwischen 3,9% und 7,5% (*Table 13*).

Table 13: Intra-assay-Varianz, Inter-assay-Varianz und analytische Richtigkeit der Bestimmung von Pravastatin in Plasma und Urin

| | ng/ml | Intra-assay-varianz | | | Inter-assay-varianz | | |
|---------------|-------|---------------------|------|--------|---------------------|-------|--------|
| | | Anzahl | VK | AR | Anzahl | VK | AR |
| Plasma | 5.1 | 6 | 2.7% | 95.3% | 20 | 9.4% | 100.1% |
| | 12.8 | 6 | 3.5% | 99.2% | 18 | 10.2% | 99.5% |
| | 32.0 | 6 | 2.6% | 107.7% | 19 | 9.1% | 98.4% |
| | 80.0 | 6 | 0.9% | 106.1% | 19 | 9.8% | 98.3% |
| | ng/ml | Anzahl | VK | AR | Anzahl | VK | AR |
| Urin | 188 | 6 | 3.6% | 91.0% | 10 | 5.8% | 92.1% |
| | 375 | 6 | 5.3% | 91.1% | 10 | 6.2% | 97.9% |
| | 750 | 6 | 4.0% | 90.4% | 10 | 7.5% | 101.1% |
| | 1500 | 6 | 2.5% | 95.0% | 10 | 3.9% | 103.9% |

VK = Variationskoeffizient; AR = analytische Richtigkeit

2.5 Zielparameter und statistische Analyse

2.5.1 Hauptzielgröße

Das Hauptziel dieser Studie war der Vergleich von Auswirkungen der Haplotypen von *OATP1B1* *1a, -*1b und -*5 hinsichtlich der Kinetik von Pravastatin, dargestellt durch die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve AUC(0-6). Sie wurde gruppenspezifisch für jeden Genotyp ausgewertet. Die Berechnung erfolgte mit der linearen Trapez-Regel mit Hilfe des Software-Pakets WinNonlin (Professional Edition, version 3.3; Pharsight Corporation, Mountain View, Calif).

2.5.2 Nebenzielgrößen

Nebenzielgrößen charakterisieren das pharmakokinetische Profil von Pravastatin: Pravastatin-Plasmaspitzenkonzentration (C_{max}), Zeit bis zur Pravastatin-Plasmaspitzenkonzentration (t_{max}), Kumulative Ausscheidung im Urin innerhalb 0-12 Stunden nach Einnahme [A_e (0-12)], Renale Clearance (Cl_{renal}). Die Parameter für C_{max} und t_{max} wurden direkt von den ursprünglichen Messwerten abgeleitet. Die kumulative Ausscheidung im Urin (A_e) wurde aus dem Produkt von Urinkonzentration und Urinvolumen berechnet, das innerhalb der Stunden 0-12 gesammelt wurde.

2.5.3 Fallzahlabeschätzung

Die Gruppengröße orientierte sich an der in vorhergehenden Studien berichteten Variabilität der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve AUC (0-24 h) bei gesunden Probanden, die eine Einmaldosis von 40 mg Pravastatin erhielten (Mittelwert \pm Standardabweichung; $109,4 \pm 49,2$ ng \cdot h/ml)¹²⁵. Die Ermittlung der Fallzahl von zehn Probanden pro Gruppe erfolgte unter Anwendung des zweiseitigen t-Tests. Für den Fehler erster Art wurde ein Wert von 5 %, für den Fehler zweiter Art ein Wert von 20 % gewählt. Es galt die Annahme, dass die *OATP1B1*-Genotypen *1b/*1a und *1b/*1b, sowie *1a/*5 und *5/*5 Einfluss auf die Pharmakokinetik von Pravastatin in Einmalgabe haben und zu einem klinisch relevanten Unterschied von 60 % in der AUC (0–24h) von Pravastatin führen.

Der Vergleich zweier Gruppen wurde mit dem U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney vorgenommen, für die Betrachtung von mehr als zwei Gruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test benutzt. Dabei wurde $P < 5 \%$ als statistisch signifikant erachtet. Die Berechnungen erfolgten mittels SPSS (Version 11.0; SPSS Inc, Chicago, III).

3. ERGEBNISSE

3.1 Probandenbilanz

Zur Untersuchung des Einflusses der jeweiligen Haplotypen von *OATP1B1* auf das pharmakokinetische Profil von Pravastatin wurden die Studienteilnehmer in drei Gruppen eingeteilt; diese umfassten jeweils 10 Individuen, die entweder homozygote oder heterozygote Träger der der *OATP1B1*- Allele **1a*, **1b* oder **5* waren. (Tabelle 1). Nach erfolgtem initialen Screening der Gesamtheit von 423 Freiwilligen betragen die Allelfrequenzen 32,5 % für *OATP1B1*1a*, 36,5 % für **1b* und 15 % für **5*. Die Studie wurde nach den im Methodenteil beschriebenen Voraussetzungen durchgeführt.

Die oral verabreichte Studienmedikation von jeweils 40 mg Pravastatin wurde von den Probanden in der Regel gut vertragen. In drei Fällen traten gegen Ende des ersten Prüftags, ca. 9 Stunden nach Einnahme, leichtgradige Kopfschmerzen auf, in einem Fall zusätzlich Übelkeit und Erbrechen. Dies entspricht einer möglichen Nebenwirkungsrate von 4,6 % bzw. 6,2 %. Eine allmähliche Besserung der Symptome wurde ohne medikamentöse Gegenmaßnahmen erreicht. Bei keinem der Fälle kam es zu einem Studienabbruch oder Ausschluß aufgrund von Nichterfüllung der Regeln.

3.2 Pharmakokinetische Parameter von Pravastatin

Entsprechend der relativ kurzen Halbwertszeit der Plasmaelimination von Pravastatin von 95 bis 165 Minuten lagen die Plasmakonzentrationen bei einer Mehrzahl der Probanden acht bis 24 Stunden nach oraler Einnahme unterhalb der Nachweisgrenze der Bestimmungsmethode. Somit wurde die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) nur für bis zu sechs Stunden nach Medikamentenverabreichung berechnet. Die Clearance von Pravastatin – der Quotient aus verabreichter Dosis und Fläche unter der Blutspiegel-Zeit-Kurve (AUC) und zugleich Maß für

die Eliminationsleistung - konnte aus gleichem Grund nicht genau bestimmt werden. Deshalb wurde die Kumulative Ausscheidung im Urin (A_e) für den Zeitraum null bis zwölf Stunden untersucht.

3.2.1 Pharmakokinetische Parameter von Pravastatin im Plasma bezüglich *OATP1B1* *1a -, *OATP1B1* *1b - und *OATP1B1* *5 - Haplotyp

Statistisch signifikante Unterschiede fanden sich für den Hauptzielparameter $AUC(0 - 6)$ von Pravastatin unter allen drei Studiengruppen (Kruskal-Wallis-Test $p = 0,006$). Träger des Haplotyps *OATP1B1* *5 hatten eine deutlich höhere Plasmakonzentration von Pravastatin im Vergleich zu homozygoten Probanden des Wildtyps *OATP1B1* *1a oder Individuen der Gruppe *OATP1B1* *1b, die den niedrigsten Medikamentenspiegel aufwiesen (*Abbildung 6*). Innerhalb

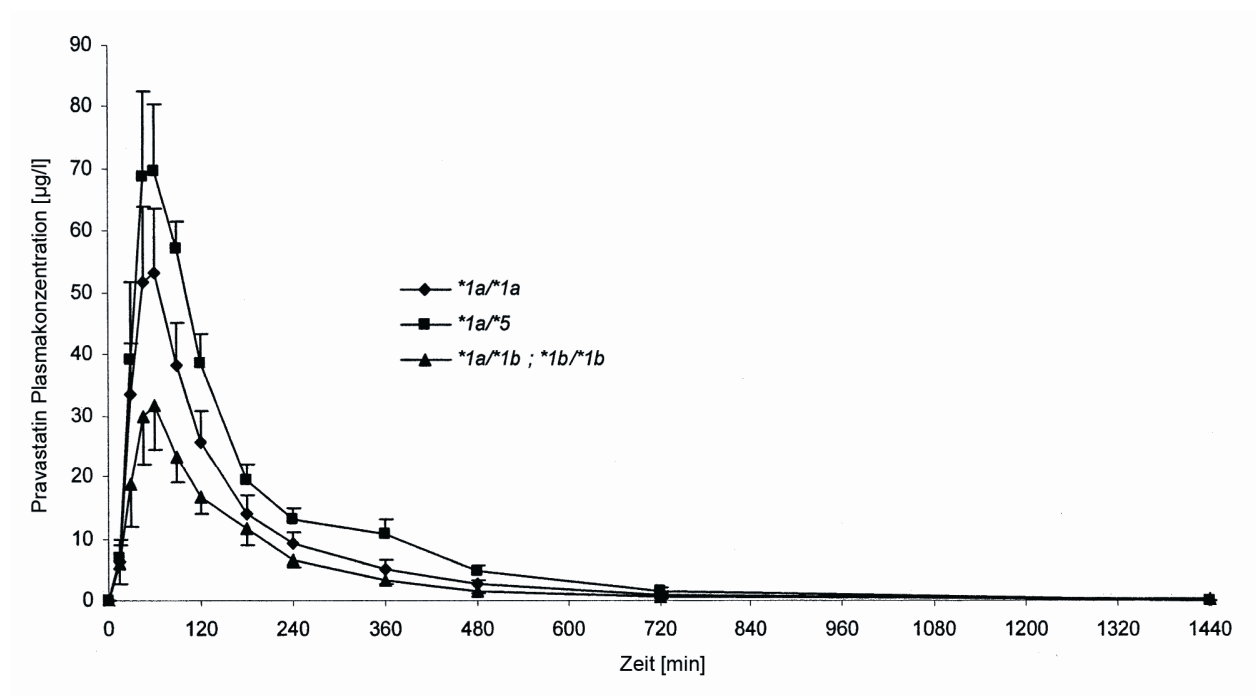


Abbildung 6: Plasmakonzentration – Zeit - Kurven von Pravastatin bei gesunden männlichen kaukasischen Probanden, die entweder homozygote oder heterozygote Träger des Haplotyps *OATP1B1* *1a, *1b oder *5 sind. Die Werte bezeichnen den Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert. Zum Zeitpunkt 0 erhielten die Probanden 40 mg Pravastatin oral.

der Gruppe *OATP1B1* *5 konnten die höchsten Werte für $AUC(0 - 6)$ gemessen werden ($163 \pm 64,4 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$). Diese unterschieden sich signifikant von den Werten der für *OATP1B1* *1a

homozygoten Studienteilnehmer ($AUC(0-6) = 114,5 \pm 68,5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$) (Mann-Whitney-Test $p = 0,049$) und den Ergebnissen für die Gruppe der homo- und heterozygoten Träger von *OATP1B1* *1b ($AUC(0-6) = 74,8 \pm 35,6 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$) (Mann-Whitney-Test $p = 0,002$) (Tabelle 14, Abbildung 7A). Der errechnete Mittelwert für $AUC(0-6)$ der Gruppe *5 betrug 142 % im Vergleich zur Referenzgruppe *1a. Obwohl statistisch nicht signifikant, lagen die Werte für $AUC(0-6)$ und auch die Plasmaspitzenkonzentration (C_{max}) der Gruppe *OATP1B1* *1b unterhalb denen der Träger des Haplotyps *OATP1B1* *1a. $AUC(0-6)$ der Gruppe *1b belief sich dabei auf 65 % des Referenzwerts der Wildtypträger. Für den Haplotyp *OATP1B1* *1b homozygote Probanden wiesen allerdings keine niedrigeren Werte für $AUC(0-6)$ und C_{max} auf im Vergleich zu heterozygoten Individuen desselben Haplotyps.

Tabelle 14: Auswirkungen von *OATP1B1* *1a, -*1b und -*5 Haplotypen auf pharmakokinetische Parameter von Pravastatin nach einer oralen Einzeldosis von 40 mg bei 30 gesunden männlichen kaukasischen Probanden

| | Gruppe 1 | Gruppe 2 | Gruppe 3 | P-Wert aller Gruppen [†] | P-Wert Gruppe 1 vs. Gruppe 2 [‡] | P-Wert Gruppe 1 vs. Gruppe 3 [‡] | P-Wert Gruppe 2 vs. Gruppe 3 [‡] |
|--|---------------------|--|--------------------|---|---|---|---|
| Haplotypen Paar | *1a/*1a (n = 10) | *1a/*1b (n = 8) oder *1b/*1b (n = 2) | *1a/*5 (n = 10) | | | | |
| $AUC(0-6)$ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$) | 114,5 $\pm 68,5$ | 74,8 $\pm 35,6$ | 163 $\pm 64,6$ | 0,006 | NS | 0,049 | 0,002 |
| C_{max} ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) | 58,3 $\pm 37,7$ | 36,7 $\pm 21,4$ | 84,3 $\pm 32,1$ | 0,009 | NS | NS | 0,004 |
| t_{max} (h) | 1,0 (0,8-2,0) | 1,0 (0,8-3,0) | 1,0 (0,5-1,5) | NS | NS | NS | NS |
| Ae (0-12) (μg) | 2908 ± 1576 | 1658 ± 899 | 3693 ± 1482 | 0,008 | 0,049 | NS | 0,002 |

Die Daten bezeichnen Mittelwert \pm Standardabweichung (Median und Spannweite bei t_{max}).

$AUC(0-6)$: Fläche unter der Plasma-Konzentrations-Zeit-Kurve binnen 0 bis 6 Stunden; C_{max} : Plasma-Spitzen-Konzentration; t_{max} : Zeit bis zum Erreichen von C_{max} ; Ae (0-12) : Kumulative Menge des im Urin ausgeschiedenen Medikaments binnen 0 bis 12 Stunden; NS : nicht signifikant.

[†]: Kruskal-Wallis-Test für Unterschiede zwischen allen 3 Gruppen; [‡]: Mann-Whitney-Test für 2 Gruppen.

Die maximale Konzentration C_{max} einer Substanz im Plasma beschreibt indirekt deren Resorption. Signifikante Unterschiede für C_{max} ergaben sich lediglich zwischen Ergebnissen der

Gruppen 2 und 3, insofern übertraf der Wert der *5 - Haplotypen den der Gruppe *1b um mehr als das Zweifache. Der Parameter t_{\max} ist ein Maß für die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Konzentration C_{\max} . Er betrug bei allen Studiengruppen im arithmetischen Mittel 1,0 h und zeigte somit im Vergleich keinen signifikanten Unterschied.

3.2.2 Pharmakokinetische Parameter von Pravastatin im Urin bezüglich *OATP1B1* *1a -, *OATP1B1* *1b - und *OATP1B1* *5 - Haplotyp

Die Ausscheidungsraten von unverändertem Pravastatin stimmten mit den Daten für die Kinetik von Pravastatin im Plasma überein (*Tabelle 14*). Die innerhalb der ersten zwölf Stunden ausgeschiedenen Mengen von Pravastatin [Ae (0 –12)] waren bei Probanden mit dem Haplotyp *OATP1B1* *5 um 30 % grösser gegenüber denen der homozygoten Trägern des Wildtyp – Allels *OATP1B1* *1a (*Abbildung 7B*), obwohl der Unterschied statistisch nicht signifikant war.

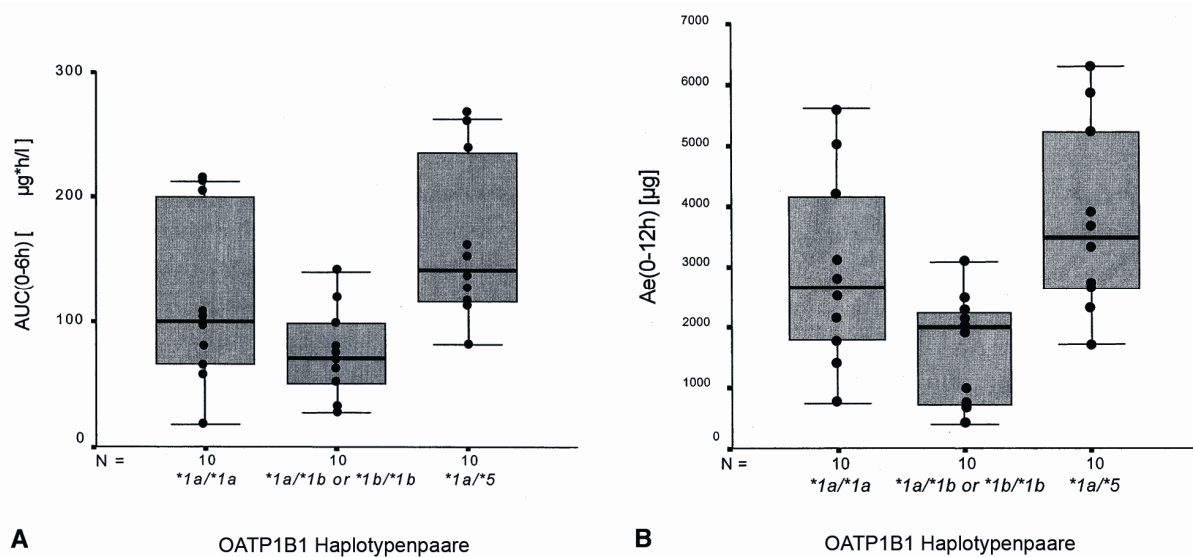


Abbildung 7: Werte der Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve in der Zeit 0 bis 6 Stunden [AUC(0-6)] (**A**) und der im Urin ausgeschiedenen Menge in der Zeit 0 bis 12 Stunden [Ae(0-12)] (**B**) für Pravastatin nach einer oralen Einzeldosis von 40 mg in Abhängigkeit zu den untersuchten *OATP1B1*- Haplotypen. Die Werte sind in Tukey Boxplots zusammengefasst. Die horizontale Linie innerhalb jedes Kastens repräsentiert den statistischen Median. Die untere und obere Begrenzung des Kastens stellt jeweils das untere (25.) und das obere (75.) Quartil dar. Die Whiskers erstrecken sich vom 25. und 75.Quartil bis zu den entferntesten Datenpunkten noch innerhalb der 1,5 fachen Interquartildistanz vom 25. bis zum 75.Quartil. Individuelle Messwerte sind als ausgefüllte Kreise gekennzeichnet. N bezeichnet die Nummer von Individuen in jeder Gruppe.

Individuen der Gruppe *OATP1B1* *1b hatten allerdings die niedrigsten Ausscheidungsraten und unterschieden sich signifikant von der Kontrollgruppe des Wildtyps *OATP1B1* *1a und der Gruppe der *5 – Haplotypen (Mann-Whitney-U-Test $p = 0,049$ bzw. $0,002$). Gemessen am Mittelwert betragen die Werte der Gruppe *1b (1658 ± 899) mit 57 % knapp die Hälfte im Vergleich zur Kontrollgruppe (2908 ± 1576), während sich der Unterschied zwischen den Gruppen *1b und *5 (3693 ± 1482) auf mehr als das Doppelte (223 %) belief. Die Gesamtmenge an nachgewiesenem Pravastatin innerhalb der ersten zwölf Stunden lag bei Werten zwischen $399,75$ und $6286,45 \mu\text{g}/12 \text{ h}$ und belief sich damit auf 1 % bis 16 % der oralen Dosis.

4. DISKUSSION

4.1 Genetische Polymorphismen in *OATP1B1*-

Forschungsstand im Überblick zum Zeitpunkt des Studienbeginns

OATPs repräsentieren eine Familie von Genen, die den Transport einer breiten Vielzahl endogener und exogener Substrate, einschließlich Medikamente, steuern. Die Verteilung dieser Transportproteine in vielen essentiellen Geweben, wie Leber, Niere, Darm und Blut-Hirn-Schranke⁵⁹, veranschaulicht deren bedeutenden Beitrag hinsichtlich Absorption, Distribution und Exkretion von Arzneimitteln und Fremdstoffen. Die vorherrschende, wenn nicht sogar ausschließliche Expression von *OATP1B1* (*SLCO1B1*) an der basolateralen Membran der Hepatozyten verweist auf eine mögliche Schlüsselfunktion dieses Transporters bei der Extraktion von Substraten aus dem Pfortaderblut.

Im Vorlauf der hier vorliegenden Untersuchung zeigten aktuelle Analysen des *OATP1B1*-Gens das Auftreten einer Vielzahl genetischer Polymorphismen^{135, 98, 82}; dabei konnte für die meisten dieser SNPs der Einfluss auf die Transportfunktion des Proteins *OATP1B1* *in vitro* nachgewiesen werden^{135, 98, 82, 96, 106}. Folglich sind Polymorphismen von *SLCO1B1* womöglich auch mit einer veränderten Pharmakokinetik von Arzneimitteln des betreffenden Substratspektrums assoziiert. Der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl- CoEnzym A- Reduktase-Inhibitor Pravastatin, der in der lipidsenkenden Therapie häufig zur Anwendung kommt, wurde als gutes Transportsubstrat von *OATP1B1* identifiziert⁸⁸. Dieser, neben dem jüngst

entwickelten Rosuvastatin äusserst hydrophile Arzneistoff, wird - im Gegensatz zu anderen Statinen - in hohem Maße durch aktive Transportmechanismen von der Leber aufgenommen ^{65, 143}. OATP1B1 wurde als wichtigster hepatischer Aufnahmetransporter von Pravastatin charakterisiert ⁸⁸.

Mehrere pharmakokinetische Studien haben eine hohe interindividuelle Variabilität der Pravastatinkonzentration im Blutplasma gesunder Probanden nachgewiesen ^{99, 103, 120, 74, 89} und veranschaulichen den Bedarf zur Klärung der zugrundeliegenden Ursachen.

Vor kurzem lieferte eine Studie innerhalb eines japanischen Probandenkollektivs einen guten Nachweis dafür, dass die Clearance der Modells substanz Pravastatin mit Polymorphismen von *OATP1B1* assoziiert ist ⁹⁶. Bei Trägern des *OATP1B1* *15- Allels war die totale und nicht-renale Clearance signifikant vermindert im Vergleich zu den Individuen mit dem *OATP1B1* *1b- Allel. Bemerkenswerterweise findet sich die Variante T521C (Val174Ala) in *OATP1B1* *5 und *OATP1B1* *15, und der einzige Unterschied zwischen diesen beiden Allelen ist das zusätzliche Vorliegen der Mutation A388G (Asn130Asp) in *OATP1B1* *15. Allerdings konnten somit die pharmakokinetischen Effekte der im Haplotyp *OATP1B1* *15 kombinierten SNPs A388G und T521C (Asp130 und Ala174) nicht getrennt untersucht werden, weil die Allelfrequenzen für jeden einzelnen dieser zwei SNPs in isolierter Form in der japanischen Bevölkerung anscheinend zu niedrig waren - ganz im Gegensatz zur initialen Haplotypenanalyse von *Tirona et al. 2001* ¹³⁵ bei weißen und schwarzen Amerikanern. Außerdem wurden die Testpersonen in dieser Studie nicht durch vorherige Genotypisierung der jeweiligen spezifischen SNPs ausgewählt und zahlenmäßig statistisch signifikanten Prüfungsgruppen zugeordnet.

Unabhängig davon zeigte eine folgende Studie innerhalb einer kaukasischen Bevölkerung ebenfalls signifikant erhöhte Werte für die AUC (0-12) von Pravastatin bei Trägern der SNPs T521C und -G11187A, einem neu entdeckten Polymorphismus in der Promoterregion von *OATP1B1*, gegenüber dem Referenzgenotyp. Bei heterozygoten Trägern des Allels *15 (das die Varianten A388G und T521C enthält) und heterozygoten Trägern des Allels *17 (das die Varianten -G11187G, A388G und T521C enthält) war die mittlere AUC (0-12) von Pravastatin 93 % bzw. 130 % höher als im Vergleich zu Nicht-Trägern ⁹⁵. Allerdings wurden auch in dieser Untersuchung die Effekte der SNPs T521C und A388G nicht isoliert voneinander dargestellt und es erfolgte keine entsprechende Stratifizierung der Prüfungsgruppen nach den jeweiligen Genotypen.

4.2 Diskussion und Vergleich der vorliegenden pharmakokinetischen Ergebnisse für *OATP1B1*1b* und *OATP1B1*5*

In der hier vorliegenden Studie konnten die Haplotypen *OATP1B1 *5* (Ala 174) und **1b* (Asp130) unabhängig voneinander mit homozygoten Trägern des Wildtypallels *OATP1B1 *1a* verglichen werden. Nach einer oralen Einmalgabe von 40 mg Pravastatin stimmten die Werte der mittleren Plasmakonzentration bei allen Studienteilnehmern mit Messergebnissen früherer pharmakokinetischer Studien mit nichtgenotypisierten gesunden Probandengruppen überein ^{103, 120, 74}.

Für den Hauptzielparameter, die Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve AUC (0-6) von Pravastatin, fanden sich unter den drei Studiengruppen statistisch signifikante Unterschiede (s. *Tabelle 14*). Interessanterweise weisen diese Daten auf inverse Effekte zwischen den jeweiligen Varianten der *OATP1B1*- Allele hin. Während Träger von *OATP1B1 *5* im Vergleich zur Kontrollgruppe des Wildtyps **1a* eine deutlich höhere Bioverfügbarkeit ($P = 0,049$) des Medikaments aufwiesen, veränderte das *OATP1B1 *1b*- Allel das pharmakokinetische Profil von Pravastatin in die entgegengesetzte Richtung, wenn auch statistisch nicht signifikant gegenüber der Referenzgruppe **1a*. Die AUC von Pravastatin betrug 142 % bei Individuen der Variante *OATP1B1 *5* und war 65 % geringer bei Trägern des **1b* Allels im jeweiligen Vergleich mit *OATP1B1*1a* homozygoten Individuen.

Die Gesamtmenge an Pravastatin im Urin innerhalb von zwölf Stunden nach Einnahme betrug jeweils zwischen 1 % bis 16 % der oralen Dosis, was mit Ergebnissen früherer Berichte übereinstimmt ^{101, 138}. Für Individuen des Haplotyps **5* war die Pravastatinkonzentration im Urin um 30 % größer im Vergleich zur Referenzgruppe **1a*, auch wenn dieser Unterschied statistisch nicht signifikant war (s. *Tabelle 14*, *Abbildung 7B*). Allerdings hatten Probanden der Gruppe **1b* die niedrigsten Ausscheidungsraten und unterschieden sich statistisch signifikant ($P = 0,049$) von Mitgliedern der Kontrollgruppe **1a*. Quantitative Veränderungen in der Ausscheidung von Pravastatin im Urin [Ae (0-12)] zwischen den Haplotyp – Gruppen stimmen mit den Unterschieden in der Plasmakonzentration überein und weisen darauf hin, dass diese Messwerte für Urin nur die Unterschiede der Plasmakonzentration reflektieren. *OATP1B1* wird nicht in der menschlichen Niere exprimiert. Deshalb haben die verschiedenen Haplotypen von *OATP1B1* wahrscheinlich keine spezifischen Auswirkungen auf renale Ausscheidungsvorgänge, die zu einer Veränderung der renalen Clearance führen.

Anhand der Messungen ergab sich eine um 35 % niedrigere AUC nach oraler Einnahme von 40 mg Pravastatin bei Probanden mit Haplotyp **1b* (Genotyp **1a/*1b* oder **1b/*1b*) gegenüber der Referenzgruppe (Genotyp **1a/*1a*), was auf eine anscheinend vermehrte portale Aufnahme von Pravastatin durch das *OATP1B1 *1b*- Allel hinweist.

Dieser hier *in vivo* beobachtete Effekt wird unterstützt durch kinetische Messergebnisse von *Tirona et al. 2001*¹³⁵ bezüglich der Aufnahme von Östronsulfat in mit *OATP1B1 *1b*- cDNA transfizierte HeLa- Zellen (Linie humaner Tumorzellen). Sowohl der Parameter für die Substrataffinität, die Michaelis-Menten-Konstante (K_m), als auch die intrinsische Clearance (V_{max} / K_m) veränderten sich zugunsten eines effizienteren Transports von Östronsulfat durch die Variante *OATP1B1 *1b* im Vergleich zum Wildtyp-Allel **1a*, obgleich die gesamte funktionelle Veränderung als nicht signifikant gewertet wurde. Für die Variante *OATP1B1 *5* zeigte sich allerdings eine deutliche Verminderung der intrinsischen Clearance und der Transportaktivität für Östronsulfat (und Östradiol-17 β -D-Glukoronid) gegenüber **1a*. Der Effekt des **1b*- Allels erschien hier nicht gleichermaßen evident wie der des **5*- Allels.

Weitere *In-vitro*-Untersuchungen lieferten bezüglich den Auswirkungen der Variante *OATP1B1 *1b* teilweise abweichende, beziehungsweise weniger eindeutige Ergebnisse. So beobachteten *Nozawa et al. 2002*⁹⁸ und *Iwai et al. 2004*⁵¹ bei Untersuchungen mit transfizierten HEK293-Zellen (humane embryonale Nierenzellen) kaum Unterschiede in der Membranlokalisation und Transportaktivität von *OATP1B1 *1b*^{98, 51, 56} und *OATP1B1 *5*^{98, 51} für die typischen Substrate Östronsulfat bzw. Östradiol-17 β -D-Glukoronid im Vergleich zum Standardallel *OATP1B1 *1a*. Dennoch fanden sich aber erhöhte Werte für die Transportgeschwindigkeit der Variante **1b* gegenüber dem Referenzallel **1a*⁵¹. Ein bemerkenswerter Unterschied bestand außerdem in der Aufnahme von Östronsulfat in HeLa- Zellen – hier betrug die Transportaktivität der Variante *OATP1B1 *1b* 125 % im Vergleich zum Referenzwert des Wildtypallels **1a* ($P < 0,01$)⁵⁶. Von einer ebenfalls beinahe vergleichbaren Transportrate der Variante *OATP1B1 *1b* gegenüber *OATP1B1 *1a* für ein anderes Substrat- das Zytostatikum Irinotecan bzw. dessen aktiven Metaboliten SN-38 - berichteten außerdem *Nozawa et al. 2005*⁹⁷ im Rahmen einer *In-vitro*-Studie.

Die teilweise geringe Konsistenz dieser Ergebnisse *in vitro* zu den initialen Untersuchungen von *Tirona et al. 2001*¹³⁵ ist womöglich mit unterschiedlicher funktioneller Expression des Allels in HeLa- Zellen und HEK293- Zellen verbunden. Es ist auch möglich, dass unterschiedliche

experimentelle Bedingungen, wie zusätzliche Chemikalien für Transfektion der Zellen oder unterschiedliche Substratkonzentrationen zur Bewertung der Kinetikparameter hierfür ursächlich sind.

Darüber hinaus wurde auch an anderer Stelle von variierenden Transportaktivitäten in *OATP1B1* *1b exprimierenden MDCKII- Zellen (Madin-Darby canine kidney II cells, Kaninchennierenzellen) gegenüber dem Wildtypallel *OATP1B1* *1a berichtet. Diese Messungen ergaben ähnliche Transportaktivitäten für das Substrat Östradiol-17 β -Glukoronid, eine Erhöhung der Aktivität für Bromosulphophtalein und erniedrigte Werte für Cholyltaurin⁸². Der Polymorphismus *OATP1B1**1b befindet sich im zweiten extrazellulären Segment (*loop*) des Proteins OATP1B1. Die Ergebnisse legen nahe, dass dieses Segment in die Substraterkennung involviert ist und Mutationen in diesem Bereich, insbesondere der Polymorphismus *1b, womöglich die Transporteigenschaften des gesamten Proteins beeinflussen. Das Vorliegen des Polymorphismus *1b scheint daher auch mit Veränderungen der jeweiligen Substratspezifität assoziiert, was sich möglicherweise auch auf das Niveau der Transportaktivität auswirkt.

Die hier vorliegende Untersuchung zeigt, dass Träger von *OATP1B1* *1b eine erhöhte hepatische Clearance für Pravastatin aufweisen, im Vergleich zu Individuen der Variante *OATP1B1* *1a. Gleiches wurde von *Maeda et al 2006*⁷⁵ in einer späteren Studie innerhalb eines japanischen Probandenkollektivs berichtet: Die Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve AUC von Pravastatin war bei Trägern der Variante *1b / *1b um 35 % niedriger gegenüber der AUC bei *1a / *1a – Trägern, was konsistent ist mit den hier vorgelegten Ergebnissen. Auch die AUC von Individuen des Genotyps *1b/*15 lag 45 % unter der AUC der Träger von *1a/*15. Im Vergleich zu anderen Studien zeigte sich hier bemerkenswerterweise keine signifikante Erhöhung der AUC von Pravastatin bedingt durch das *OATP1B1**15-Allel. In einer darauffolgenden Untersuchung der Disposition von Pravastatin bei weißen und schwarzen Amerikanern wurde außerdem auch von tendenziell erniedrigten Werten für die AUC von Pravastatin bei homozygoten Trägern des *1b – Allels (G388G) im Vergleich zu homozygoten Trägern des *1a- Allels (A388A) berichtet, obgleich dieser Unterschied statistisch nicht signifikant war³⁷. *Nishizato et al. 2003*⁹⁶ berichteten in einer vorhergehenden Studie mit japanischen Trägern des *OATP1B1* *15- Allels von einer signifikanten Verminderung der totalen und nichtrenalen Clearance im Vergleich zu den Individuen mit dem *OATP1B1* *1b- Allel. Allerdings war hierbei die orale Clearance von Pravastatin bei Probanden mit *1a / *1a- und *1b / *1b- Genotyp ähnlich.

Angesichts der hier vorliegenden Ergebnisse *in vivo* stellt sich aber zudem die Frage, ob auch *in vitro* die Aufnahme von Pravastatin in transfizierte Zellen der Variante *OATP1B1 *1b* gesteigert ist. *Kameyama et al. 2005*⁵⁶ untersuchten Transportcharakteristika für die Aufnahme von Statinen in HEK293- Zellen. Die Messwerte für die Transportaktivität für Pravastatin, Atorvastatin und Cerivastatin in *OATP1B1 *1b* exprimierenden Zellen waren kaum unterschiedlich im Vergleich zu denen des Wildtyps *OATP1B1 *1a* und bestätigten somit nicht die Ergebnisse der hier vorliegenden Untersuchung.

Dennoch sind die hier erhobenen Daten einer der ersten Berichte, die darauf hinweisen, dass verbesserte Transporteigenschaften *in vitro*, bedingt durch polymorphe Transportergene - wie initial von *Tirona et al. 2001*¹³⁵ gezeigt - tatsächlich die Pharmakokinetik eines Medikaments *in vivo* verändern. Vorhergehende klinische Studien konnten den Effekt der Haplotypen *OATP1B1 *1b* und *OATP1B1 *5* nicht parallel isoliert darstellen.

Unbekannt bleibt dabei allerdings der Grund für gegensätzliche Ergebnisse anderer vorausgehender *In-vitro*- Untersuchungen. Als mögliche Erklärung kommen experimentelle Bedingungen in Betracht, so auch die fragliche Vergleichbarkeit verschiedener Zelltypen wie HEK293- Zellen und HeLa- Zellen untereinander oder auch ein möglicher höherer Expressionsgrad von *OATP1B1*1b* im Vergleich zu *OATP1B1*1a* in der Leber. Dies könnte anhand von Untersuchungen des relativen Expressionsgrades von *OATP1B1*1a* und **1b* in mehreren Proben humaner, im voraus genotypisierter Hepatozyten geprüft werden.

Grundsätzlich bleibt jedoch auch eine generelle Übertragbarkeit zwischen Transportverhältnissen *in vitro* und *in vivo* fraglich. Trotz teilweise fehlendem Nachweis signifikant funktionaler Veränderungen durch das Allel *OATP1B1 *1b* in einigen *In-vitro*- Versuchen ist hinsichtlich der *In-vivo*-Effekte des SNP A388G besondere Aufmerksamkeit geboten: diese Variante ist im zweiten extrazellulären Segment des Proteins lokalisiert, und ein Aminosäureaustausch an dieser Stelle ändert vermutlich die Substratspezifität und damit womöglich auch die Transportaktivität von *OATP1B1*.

Im Hinblick auf den Haplotyp *OATP1B1 *1b* trägt die vermehrte Aufnahme einiger Arzneimittel aus dem Pfortaderblut vermutlich zu einer niedrigeren oralen Bioverfügbarkeit bei und darüber hinaus zu einem vermehrten hepatischen *First-pass*-Mechanismus bestimmter

Komponenten. Weitere *In-vivo*- Studien sind erforderlich, um den isolierten Effekt des *1b - Allels umfassender zu charakterisieren und die hier vorgestellten Ergebnisse zu bestätigen. Da der Effekt der SNPs von den getesteten Substraten abhängig zu sein scheint^{82, 48}, ist die funktionelle Analyse einer breiten Anzahl von Substraten von großem Interesse. Im Fokus steht hierbei zudem die Identifikation weiterer funktional wirksamer SNPs mit möglichem Einfluss auf die Substratspezifität oder Aktivität von Arzneimitteltransportern.

Die Variante *OATP1B1* *5 hingegen war in der vorliegenden Untersuchung mit einer verminderten Transportaktivität und einer deutlichen Zunahme der Pravastatin-Plasmakonzentration assoziiert. Dies ist konsistent mit weiteren Studienergebnissen - erhoben an kaukasischen und japanischen Trägern der Haplotypen *OATP1B1**5, *15 oder *17. Auch hier beeinflussten dieses Allele offensichtlich die Pharmakokinetik von Pravastatin im Sinne einer Erhöhung des Statin-Blutspiegels^{95, 96}. Eine spätere kleine Pilot-Studie erbrachte zudem den Nachweis einer Erhöhung der AUC von Pravastatin und der mittleren Plasmaspitzenkonzentration C_{max} bei Trägern des *15- und *17-Allels unter Einnahme multipler Gaben von 40 mg Pravastatin über einen Zeitraum von drei Wochen gegenüber der Kontrollgruppe⁴⁷. Diese Ergebnisse finden auch Bestätigung durch eine jüngste Studie, in der weiße und schwarze Amerikaner des Genotyps *SLCO1B1* *1a /*15 gegenüber Trägern des Genotyps *SLCO1B1* *1a /*1a bzw. *SLCO1B1* *1b/*1b deutlich erhöhte Werte für die Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve AUC von Pravastatin aufwiesen (45 % bzw. 80 %) ³⁷. Beim Genotyp *SLCO1B1* *15 /*15 lagen die Werte für AUC vergleichsweise noch höher (92 % bzw. 149 %). Allerdings trat auch hier die Variante 521C fast ausschließlich in Verbindung mit dem Allel 388G auf, eine getrennte Untersuchung wie in der hier vorliegenden Studie war nicht gegeben.

Unterstützt werden diese Ergebnisse auch durch *In-vitro*- Beobachtungen: So war der Wert für die normalisierte Geschwindigkeit V_{max} für den Transport von Östradiol-17 β -Glukoronid durch *OATP1B1* *15, abhängig vom Grad der Proteinexpression auf der Membranoberfläche von HEK293- Zellen, deutlich reduziert im Vergleich zum Wildtypallel⁵¹. *Kameyama et al. 2005*⁵⁶ berichteten von einer signifikant verminderten ($P < 0,05$) Transportaktivität der Varianten *5, *15 und *15 + *C1007G* (einem neuen Haplotyp, entdeckt in einem Patienten mit Pravastatin-induzierter Myopathie) für die Substrate Östradiol-17 β -Glukoronid und Östronsulfat, und zwar sowohl in HEK293- Zellen als auch in HeLa- Zellen. HEK293- Zellen der Varianten *OATP1B1*

*5, *15, *5 + C1007G und *15 + C1007G zeigten außerdem auch eine deutlich verminderte Aktivität für den Transport von Pravastatin⁵⁶.

Betrachtet man die hier vorliegenden Ergebnisse vor diesem Hintergrund, scheint es, dass der pharmakokinetische Effekt des *OATP1B1* *5 -Allels den Effekt von *OATP1B1* *1b dominiert, gleich einer Schlüsselfunktion des SNP T521C, der einen Haupteffekt auf die funktionellen Eigenschaften von *OATP1B1* *15 hat. Die bisherigen Daten aus *In-vitro*-Studien bezüglich Transportfunktion und Grad der Proteinexpression der *OATP1B1*-Varianten klären allerdings den Molekularmechanismus nicht, der den gegensätzlichen pharmakokinetischen Effekten dieser beiden Allele zugrunde liegt^{136, 98, 82}. Immunozytochemische Analysen von HeLa- bzw. HEK293- Zellreihen *in vitro* ergaben, dass die von den Allelen *OATP1B1**1a und *OATP1B1**1b kodierten Proteine hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert sind, während die Varianten *OATP1B1* *5 und *OATP1B1* *15, trotz teilweise gegensätzlicher Berichte, sowohl an der Plasmamembran als auch im Intrazellularraum zu finden sind^{56, 135, 98, 51, 50}. Somit ist die reduzierte Transportaktivität dieser Proteinvarianten vermutlich hauptsächlich auf die fehlerhafte, durch den SNP T521C verursachte, verminderte funktionelle Expression von *OATP1B1* an der Oberfläche der Zellmembran zurückzuführen^{56, 135, 82}.

Schließlich machen die hier gewonnenen Ergebnisse deutlich, dass im Vergleich mit homozygoten Individuen des Genotyps *OATP1B1* *1a ein Haplotyp der untersuchten Varianten von *OATP1B1* ausreichend ist, um entweder den Pravastatin-Plasmaspiegel (*OATP1B1* *5) oder die kumulative Ausscheidung des unveränderten Medikaments im Urin (*OATP1B1* *1b) signifikant zu verändern. Homozygote Probanden des *OATP1B1* *1b- Haplotyps hatten keine niedrigeren Werte für die Plasmaspiegel-Zeit-Kurve AUC (0-6) und die maximale Plasmakonzentration C_{max} im Vergleich zu heterozygoten Trägern dieses Haplotyps. Dabei umfasste das Probandengut jedoch nur zwei homozygote Träger der Variante -*1b gegenüber acht heterozygoten Trägern, wodurch die diesbezügliche allgemeine Aussagekraft im Vergleich zwischen diesen beiden Subgruppen etwas gemindert ist. In der Probandenpopulation der hier vorliegenden Untersuchung befanden sich zudem keine homozygoten Träger des *OATP1B1* *5- Allels, so dass diesbezüglich keine vergleichenden Aussagen getroffen werden können.

*Nishizato et al. 2003*⁹⁶ und *Ho et al. 2007*³⁷ berichteten allerdings von höchsten Werten für die Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve AUC bei homozygoten Träger des Genotyps C521C (*OATP1B1* *5/*5) im Vergleich zu mittleren Werten bei heterozygoten Individuen der Variante T521C (*OATP1B1* *1a/*5) bzw. niedrigsten Werten bei Trägern des Wildtyps T521T

(*OATP1B1* *1a/*1a), gleich einem Gen-Dosis-Effekt für das T521C- Allel bezüglich der systemischen Exposition von Pravastatin. Dies konnte jedoch durch Untersuchungen von *Niemi et al. 2004*⁹⁵ nicht bestätigt werden – hier wurde von einer sogar geringeren Erhöhung der AUC bei homozygoten Träger des Genotyps C521C gegenüber heterozygoten Individuen der Variante T521C berichtet.

Die Analyse der Haplotypen zeigte, dass die SNPs A388G, T521C, sowie der den Promoter-SNP -G11187A enthaltende Haplotyp *OATP1B1* *17 einen besonders verstärkten Effekt auf die Erhöhung der AUC (0-12) von Pravastatin haben. Dieses Ergebnis legt nahe, dass möglicherweise auch weitere Genvarianten in Verbindung mit einem funktionell signifikanten SNP den betreffenden Phänotyp modifizieren; somit kann auch das Auftreten weiterer SNPs neben T521C für den Phänotyp von *OATP1B1* von entscheidender Bedeutung sein. Daher erscheint die Haplotypen-Analyse aussagekräftiger als die isolierte Untersuchung der einzelnen SNPs. Weitere Studien sind erforderlich, um den effektivsten SNP oder Haplotyp für die Voraussage des *OATP1B1* Phänotyps zu identifizieren.

4.3 Auswirkungen der Mutation T521C auf die Pharmakokinetik weiterer Medikamente

Der Basenpaar-Austausch T521C, der im Aminosäuren-Austausch Val174Ala in *OATP1B1* resultiert, ist mittlerweile Gegenstand einer zunehmenden Zahl an Studien mit der Frage nach möglichen Auswirkungen auf die Pharmakokinetik weiterer Arzneistoffe. Die Verbindung zwischen dem SNP T521C und einer jeweils erhöhten Plasmakonzentration einer Reihe von Medikamenten *in vivo* wurde inzwischen aufgezeigt - darunter Atrasentan⁵⁷, Bosentan¹³⁷, Fexofenadin⁹², Pitavastatin^{13, 45}, Simvastatin-Säure¹⁰⁵, Repaglinid⁹¹, Nateglinid¹⁴⁶, Rosuvastatin⁷¹. Darüber hinaus zeigten *In-vitro*-Untersuchungen eine signifikant erniedrigte Transportaktivität zahlreicher Allelvarianten von *OATP1B1*, einschließlich der Varianten -*1b und -*5, bezüglich der Aufnahme des Antibiotikums Rifampicin¹³⁶. Somit ist das Spektrum an Medikamenten, deren Pharmakokinetik von *OATP1B1* *5 bekanntermaßen beeinflusst wird, stetig im Wachsen begriffen. Eine jüngste Studie mit koreanischen Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom unter Therapie mit Irinotecan zeigte signifikant erhöhte Werte für die AUC von SN-38, dem aktiven Metaboliten von Irinotecan, und erniedrigte Werte für dessen Clearance bei Patienten der Genotypen T521C und C521C, sowie bei Individuen mit dem

Genotyp -A11187A³². Die Analyse der Haplotypen ergab, dass sich bei mindestens einfachem Vorliegen des Haplotyps *OATP1B1* *15 (mit den SNPs A388G und T521C) eine signifikant höhere AUC von SN-38 gegenüber *OATP1B1* *1a oder -*1b zeigte. Auch der Haplotyp *OATP1B1* *17 (mit den SNPs -G11187A, A388G und T521C) zeigte den Trend zu einer erhöhten Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve AUC von SN-38, was statistisch jedoch nicht signifikant war. Daraus ergibt sich auch in diesem Kontext ein weiterer Hinweis, dass die Transportaktivität von OATP1B1 in grossem Ausmaß von der Variante *SLCO1B1* T521C abhängig zu sein scheint.

4.4 Auswirkungen von Polymorphismen in *OATP* auf die Pharmakokinetik anderer Statine

Untersuchungen haben demonstriert, dass das Protein OATP1B1 auch in die hepatozelluläre Aufnahme anderer Statine wie Atorvastatin, Rosuvastatin, Simvastatin, Cerivastatin, Lovastatin und Fluvastatin, zumindest anteilig, involviert ist^{41, 121, 114, 119, 66}. Kürzlich wurde in einer koreanischen Studie erstmals *in vivo* der Einfluss genetischer Varianten von OATP1B1 auf die Pharmakokinetik von Pitavastatin beschrieben¹³. Hier war der *SLCO1B1* *15 - Haplotyp assoziiert mit einem erhöhten Plasmaspiegel von Pitavastatin und einer verminderten Aufnahme der Substanz vom Pfortaderblut in die Hepatozyten. Auch berichteten kürzlich *Ieiri et al 2007*⁴⁵ über erhöhte Pitavastatin-Plasmaspiegel bei Trägern der Variante T521C. Es muss jedoch ergänzt werden, dass Pitavastatin zugleich auch Substrat von OATP1B3 (OATP8, LST-2, *SLC21A8*) ist³⁶. Angesichts der häufig überlappenden Substratspezifität von Mitgliedern derselben Genfamilie stellt die Identifizierung selektiver Substrate eine bedeutende Herausforderung dar. So zeigten *Ho et al. 2006*³⁹ anhand von *In-vitro*-Versuchen, dass mehrere Mitglieder der OATP-Familie, einschließlich 1B1, 1B3, 2B1 und 1A2, zum Transport von Rosuvastatin fähig sind. Darüber hinaus waren auch hier natürlich auftretende Polymorphismen von OATP1B1, einschließlich *5, *9, *15 und *18, mit einem deutlichen Abfall der Aufnahmeaktivität gegenüber Rosuvastatin verbunden. In einer *In-vivo*-Studie unter Kaukasiern und Asiaten war das Vorliegen des T521C- Allels bei kaukasischen Probanden ebenfalls mit einer erhöhten Plasma-Rosuvastatin-Konzentration assoziiert⁷¹. *Choi et al. 2007*¹² berichteten in einer Studie unter Koreanern von einer wesentlichen Erhöhung der AUC von Rosuvastatin für *OATP1B1**15/*15 im Vergleich zu *1a/*1a und *1b/*1b, während sich allerdings zwischen Individuen des Genotyps *1a/*1a und *1b/*1b kein signifikanter Unterschied in der

Pharmakokinetik von Rosuvastatin ergab. Letzteres Ergebnis steht in Kontrast zu den Resultaten der hier vorliegenden Untersuchung und denen der Studie von *Maeda et al. 2006*⁷⁵ mit japanischen Probanden, die den Nachweis einer signifikant höheren AUC für Pravastatin in der Studiengruppe **1a/*1a* gegenüber **1b/*1b* erbrachte. Dies könnte ein weiterer Hinweis sein, dass es zwischen den Effekten der SNPs in *OATP1B1* bezüglich der diversen ethnischen Gruppen oder verschiedenen Statine Unterschiede gibt.

Allerdings ergaben *In-vitro*- Untersuchungen ebenfalls eine verminderte Transportaktivität *OATP1B1* *5 und - *15- exprimierender HEK293- Zellen gegenüber den Statinen Atorvastatin und Cerivastatin, jedoch in geringerem Ausmaß im Vergleich zu Pravastatin; für Simvastatin zeigte sich diesbezüglich kein deutlicher Aktivitätsabfall⁵⁶. Generell ist jedoch auch hier Vorsicht geboten bei der einfachen Übertragung von experimentellen *In-vitro*- Ergebnissen auf die Verhältnisse am Lebenden. Auch in dieser Hinsicht besteht weiterer Klärungsbedarf der zugrundeliegende Mechanismen.

Im Übrigen scheinen bei der Mehrzahl der Statine auch andere Transportmechanismen eine entscheidende Rolle zu spielen, wie beispielsweise die passive Diffusion bei der Passage der Zellmembran im Fall des stark lipophilen Simvastatin. Zur Einschätzung der Effekte genetischer Polymorphismen in *OATP1B1* auf die Disposition von Statinen *in vivo* ist die Gesamtheit aller involvierten Transportmechanismen und Metabolisierungswege in Betracht zu ziehen. Die Vielfalt der möglichen Effekte der Genotypen von *OATP1B1* auf andere Substrate lässt sich anhand der Ergebnisse für Pravastatin nicht vorausberechnen, weil der Anteil von *OATP1B1* am gesamten Metabolisierungsprozess im Verhältnis zu anderen Clearance – Formen für jedes Substrat unterschiedlich sein kann. Die Statine Atorvastatin, Simvastatin und Lovastatin beispielsweise werden hauptsächlich über CYP3A4 metabolisiert^{15, 11}, das für die Verstoffwechslung von Pravastatin jedoch kaum eine Rolle spielt.

Von einer durch die Variante *OATP1B1* *1b möglicherweise gesteigerten Transportaktivität gegenüber anderen Statinen *in vitro*, bzw. von einem dadurch modifizierten Effekt der Senkung des Plasmacholesterins mittels Pravastatin *in vivo* wurde bislang nicht berichtet. Es bleibt fraglich, ob diesbezügliche Änderungen der Pharmakokinetik, wie sie in der hier vorliegenden Studie beobachtet wurden, tatsächlich pharmakodynamische Auswirkungen haben.

4.5 Andere hepatische Transporter und weitere Faktoren als Einflussvariablen in der Disposition von Statinen

Neben den Effekten von SNPs in *OATP1B1* sind womöglich auch genetische Polymorphismen weiterer Transporter in die hepatische Clearance von Statinen involviert. Kürzlich wurde Fluvastatin als Substrat von zwei weiteren hepatischen Hauptaufnahme-transportern - OATP2B1 (OATP-B, *SLC21A9*) und OATP1B3 (OATP8, LST-2, *SLC21A8*) - identifiziert⁶⁶ und Pravastatin ausserdem auch als pH-abhängiges Substrat von OATP2B1 (OATP-B)⁶². OATP2B1 wird neben der Leber auch in den Enterozyten des Dünndarms exprimiert und erleichtert womöglich die intestinale Absorption von Pravastatin^{62, 95}. In einer kürzlichen klinischen Studie wurde allerdings keine Assoziation zwischen der individuellen Variabilität der Pharmakokinetik von Pravastatin und Genotypen des Aufnahme-transporters OATP2B1 oder der Efflux-transporter P-Glykoprotein MDR1 (*ABCB1*) und MRP2 (*ABCC2*) beobachtet⁹⁵. Auch eine jüngste klinische Studie ergab keinen Zusammenhang zwischen häufig vorkommenden Polymorphismen der Efflux-transporter MRP2 (*ABCC2*), BSEP (*ABCB11*) und BCRP (*ABCG2*) und Unterschieden in der Pharmakokinetik des Substrats Pravastatin³⁷. Daten hinsichtlich der funktionellen Signifikanz dieser Polymorphismen sind bislang sehr begrenzt. Eine weitere Charakterisierung der Funktionen und Substratspezifitäten aller hepatischen OATPs und Transporter sowie möglicher begleitender Polymorphismen ist wünschenswert.

Es besteht insgesamt eine breite Variabilität im individuellen Ansprechen auf eine Statin-Therapie und hinsichtlich deren lipidsenkender Wirksamkeit. Die zugrundeliegenden Ursachen hierfür sind noch weitgehend unbekannt^{54, 76}, jedoch werden genetische Zusammenhänge hierfür beinahe selbstverständlich als ursächlich erachtet. So haben sich Pharmakokinetik und Pharmakogenetik von Statinen seit kurzem als Bereich intensiver Forschung etabliert^{77, 130}. Auswirkungen genetischer Polymorphismen in Aufnahme-transportern sind hierfür womöglich nur einer von mehreren Erklärungsansätzen.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie fanden sich signifikante interethnische Unterschiede in der Plasmaexposition von Pravastatin. Hier hatten weiße gegenüber schwarzen Amerikanern desselben Genotyps (T521C) deutlich höhere Werte für die Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve AUC und Plasmaspitzenkonzentration C_{max} ³⁷, was darauf hinweist, dass hinsichtlich der interethnischen und interindividuellen Variabilität der Disposition von Pravastatin möglicherweise auch zusätzliche, bislang undefinierte genetische oder umweltbedingte Faktoren

eine wichtige Rolle spielen. Es sei an dieser Stelle zudem nur kurz erwähnt, dass unlängst eine signifikante Assoziation zwischen zwei gewöhnlichen, eng verknüpften SNPs in dem die HMG-CoA-Reduktase codierenden Gen und einer Reduktion der Cholesterol-senkenden Wirkung von Pravastatin aufgezeigt werden konnte ¹⁰.

4.6 Pharmakodynamische Auswirkungen von Polymorphismen in *OATP1B1* auf den therapeutischen Effekt von Pravastatin

Da die Leber das Zielorgan der Statine ist und Pravastatin nahezu ausschließlich intrazellulär die Cholesterinsynthese in den Hepatozyten hemmt, dürfte der cholesterinsenkende Effekt bei Individuen mit *OATP1B1* *5- bzw. *15-Allel angesichts der eingeschränkten Transportfunktion vermindert sein, obwohl für die Pravastatin-Plasmaspiegel genau das Gegenteil gilt. Dies ist dahingehend eine ungewöhnliche Situation, insofern höhere Plasmamedikamentenspiegel eine geringere Arzneistoffwirkung zur Folge haben und somit in inversem Verhältnis zueinander stehen.

Für klinisch relevante Auswirkungen dieses pharmakogenetischen Effekts auf die Cholesterinsenkung bei Patienten gibt es erste Hinweise ¹²⁶. So zeigte kürzlich eine retrospektive Studie mit älteren japanischen Patienten, die wegen Hyperlipidämie mit Pravastatin, Atorvastatin oder Simvastatin behandelt wurden, dass die therapeutische lipidsenkende Wirksamkeit bei Trägern des 521C- Allels im Vergleich zu Homozygoten des Wildtyps 521T signifikant vermindert war, gemessen am Gesamtcholesterol-Plasmaspiegel nach Einmalgabe von Pravastatin. Eine verminderte lipidsenkende Wirkung wurde ausserdem auch für die Statine Atorvastatin und Simvastatin beobachtet. Zudem berichteten *Zhang et al. 2007* ¹⁴⁵ kürzlich von einer signifikanten Assoziation des Polymorphismus T521C mit einer Reduktion der cholesterinsenkenden Wirksamkeit bei chinesischen Patienten mit koronarer Herzerkrankung unter dreiwöchiger Therapie mit 20 mg Pravastatin. Heterozygote Träger der Variante T521C wiesen eine geringere Senkung des Gesamtcholesterins im Plasma auf als Patienten des Wildtyps T521T, möglicherweise als Folge einer verminderten intrazellulären Pravastatin-Konzentration. Zwischen den beiden Gruppen fand sich allerdings kein signifikanter pharmakodynamischer Unterschied hinsichtlich einer Senkung weiterer Plasmalipide, wie beispielweise des LDL-Cholesterins. Allerdings war die Gruppe der Wildtyp-Träger um das Vierfache grösser als die der Patienten mit vorliegendem Polymorphismus, was die Aussagekraft der Ergebnisse etwas

beeinträchtigt. Auch eine weitere Studie lieferte den Hinweis, dass bei gesunden Trägern des Haplotyps *OATP1B1* *17 (der die SNPs –G11187A, A388G und T521C enthält) nach oraler Einnahme einer Einzeldosis die Aufnahme von Pravastatin in die Hepatozyten behindert wird, und damit in höheren Pravastatin-Plasmakonzentrationen, jedoch niedrigeren intrahepatozytären Pravastatin-Konzentrationen und damit in einem geringeren inhibitorischen Effekt der Cholesterinsynthese resultiert ⁹³. Demzufolge ist die cholesterinsenkende Wirkung von Pravastatin bei Trägern des *17- Haplotyps womöglich ebenfalls vermindert.

Im Gegensatz dazu war der SNP T521C in einer kürzlichen retrospektiven Studie mit 462 Patienten unter Behandlung mit Pravastatin nicht mit einer Minderung dessen lipidsenkender Wirkung assoziiert ¹³¹. Ebenfalls ergab sich diesbezüglich kein wesentlicher Unterschied in einem Probandenkollektiv der Haplotypen *15 und *17 unter dreiwöchiger Einnahme von täglich 40 mg Pravastatin im Vergleich zur Referenzgruppe ⁴⁷. Hier wurde unter anderem gezeigt, dass der *SLCO1B1*- Polymorphismus bei Einfach- und Mehrfachgaben von Pravastatin ähnliche Auswirkungen im Sinne einer Erhöhung der AUC zu haben scheint. Es gab jedoch keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der lipidsenkenden Wirksamkeit von Pravastatin zwischen den verschiedenen Gruppen. Der Effekt der Polymorphismen auf die Pharmakokinetik von Pravastatin im *Steady-state* weist darauf hin, dass andere Aufnahmetransporter, die an der sinusoidalen Membran der Hepatozyten lokalisiert sind, die reduzierte Aktivität von *OATP1B1* nicht in signifikantem Ausmaß kompensieren ⁴⁷. Theoretisch ist es denkbar, dass für den *OATP1B1*-vermittelten Aufnahmetransport defiziente Hepatozyten Anpassungsmechanismen entwickeln, wie beispielsweise kompensatorische *Up*-Regulation oder Nutzung anderer Aufnahmetransporter; dies scheint jedoch nicht der Fall zu sein, wenn man die ähnlichen Effekte von Einfach- und Mehrfachgabe von Pravastatin berücksichtigt ^{96,95,47}.

Ob und in welchem Ausmaß *OATP1B1*- Polymorphismen die inhibitorischen Effekte von Pravastatin und anderer Statine auf die Cholesterinsynthese während einer Langzeitbehandlung (über einen Monat hinaus) gegenüber Verabreichung einer Einzeldosis beeinflussen, und ob dabei unterschiedliche Dosierungen eine Rolle spielen, bleibt eine Frage mit weiterem Klärungsbedarf.

4.7 Polymorphismen in *OATP1B1* als mögliche Modulatoren von Nebenwirkungen

Statine werden in therapeutischer Anwendung in einer Dosierung von bis zu 40 mg/Tag in der Regel gut toleriert, was auch in klinischen Langzeitstudien gezeigt wurde¹⁰⁷. Es gibt jedoch zwei ungewöhnliche, aber potentiell ernsthafte unerwünschte Nebenwirkungen: zum einen die Erhöhung der Leberenzyme bei weniger als 2 % der Patienten, zum anderen das Auftreten von Abnormalitäten der Skelettmuskulatur, die von benigner Myalgie bei 0,5 bis 2,5 % der Patienten, über Myopathie bei bis zu 3 % der Patienten, bis zu lebensbedrohlicher Rhabdomyolyse reichen. Da die myotoxischen Effekte der Statine (Myopathie, Rhabdomyolyse) jedoch konzentrationsabhängig sind¹³², stellt sich die Frage, ob Individuen mit funktionell eingeschränkter Aktivität von *OATP1B1* und der Konsequenz erhöhter Pravastatin-Plasma-Spiegel anfälliger für eine Pravastatin-induzierte Myopathie sind, als Individuen mit einem normalen Phänotyp. Tatsächlich wurde kürzlich berichtet, dass bei japanischen Patienten mit Myopathie, aufgetreten nach Einnahme von Pravastatin (beziehungsweise Atorvastatin), die Frequenz von *OATP1B1* *15 signifikant höher war, als bei Patienten ohne Myopathie⁸⁵. Darüber hinaus wurde eine isoliert auftretende, neue Mutation auf Exon 12 von *OATP1B1* entdeckt - die Variante T1628G, die vermutlich eng mit dem Phänomen der Myopathie assoziiert ist; allerdings wurde deren Vorkommen nur mit einer sehr niedrigen Frequenz von < 1% in der japanischen Bevölkerung angegeben⁸⁵. Eine aktuelle genomweite Assoziationsstudie¹¹⁶ konnte den Nachweis erbringen, dass zumindest eine gängige, nichtkodierende Variante im *SLCO1B1*-Gen (rs4363657, Intron 11, Chromosom 12) signifikant das Risiko einer Simvastatin-induzierten Myopathie erhöht. Eine deutliche Risikoerhöhung wurde zudem auch für Träger des C-Allels des T521C-Polymorphismus (rs4149056) bei gleichzeitiger Einnahme höherer Statin-Dosierungen oder gleichzeitiger Einnahme anderer Medikamente wie dem *OATP1B1*-Inhibitor Ciclosporin oder Amiodaron aufgezeigt. Zudem wurde ein niedrigeres Myopathie-Risiko bei Trägern der G-Variante von A388G (rs2306283) beobachtet.

Zur genaueren Abschätzung des möglichen Einflusses und eventueller Risiken der *SLCO1B1*-Polymorphismen auf die Toleranz und Sicherheit einer Pravastatin-Therapie bedarf es weiterer Untersuchungen.

Eine Studie zur Pharmakodynamik des *OATP1B1*- Substrats SN-38, dem aktiven Metaboliten des Zytostatikums Irinotecan, lieferte weitere Erkenntnisse. So kam es bei koreanischen

Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom und mit Genotyp *SLCO1B1* T521C oder C521C unter Therapie mit Irinotecan im Vergleich zum Genotyp T521T auch zu höherer Inzidenz einer Neutropenie im Sinne einer unerwünschten Arzneimittelwirkung ³². Die Werte für die Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve AUC von SN-38 waren bei den Patienten, die Träger des Polymorphismus waren, ebenfalls signifikant erhöht. Hingegen war die Variante A388G mit vermehrtem Auftreten von Diarrhoen assoziiert. Erklären lässt sich dies durch die Vermutung, dass bei Vorliegen der Varianten T521C und –G11187A und erhöhten Plasmaspiegeln auch eine verminderte hepatobiliäre Exkretion und verminderte Exposition der Enterozyten gegenüber SN-38 vorlag. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Genotyp und Ansprechen des Tumors auf die Chemotherapie ergab sich nicht.

Zusammenfassend finden sich also auch hier Hinweise auf eine Assoziation zwischen einer genetisch modifizierten Transportaktivität von OATP1B1 und dem Auftreten unerwünschter Arzneimittelwirkungen.

4.8 Inhibitoren als zusätzliche modifizierende Faktoren der Transportrate

Diverse Arzneistoffe konnten kürzlich als Inhibitoren von OATP1B1 identifiziert werden und geben nützliche Information über die Rolle einer Reihe von Transportern bezüglich der Disposition von Pravastatin. So war die gleichzeitige Behandlung mit dem Immunsuppressivum Ciclosporin, einem potenten OATP1B1-Inhibitor ¹¹⁹, assoziiert mit einem mehrfachen Plasmakonzentrationsanstieg von Pravastatin und mehrerer anderer Statine ^{121, 86, 33, 34}. Auch zeigten sich unter paralleler Verabreichung von Ciclosporin erhöhte Plasmaspiegel des Antidiabetikums Repaglinid, das über Cytochrom P450 2C8 und 3A4 metabolisiert wird und zugleich ein Substrat von OATP1B1 ist. Der Polymorphismus T521C war hierbei gegenüber dem Referenztyp T521T mit einem noch deutlicheren Anstieg der Plasmakonzentration von Repaglinid verbunden. Zudem wurden inhibierende Effekte von Indinavir, Saquinavir und Rifamycin auf die Transportaktivität von OATP1B1 beobachtet ⁷, was zugleich auch auf einen Zusammenhang zur Rate an aufgetretenen Fällen von unkonjugierter Hyperbilirubinämie beim Menschen unter diesen Medikamenten hinweist. Auch das Fibrat Gemfibrozil ¹¹⁸ oder Makrolide wie Clarithromycin, Erythromycin, Roxithromycin ¹¹⁷ senken womöglich das Nutzen-Risiko-Verhältnis der Statintherapie, indem die Aufnahme in die Hepatozyten, den essentiellen Ort der Wirkungsentfaltung, unterbunden wird mit dem Resultat einer

Verminderung des gesamten weiteren hepatischen Transports und der biliären Exkretion. Ein erhöhtes Myotoxizitäts-Risiko ist auch hier eine denkbare weitere Konsequenz einer erhöhten Plasma-Statinkonzentration⁹⁰.

Insgesamt fanden sich zunehmend Hinweise, dass Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Medikamenten sowie zwischen Medikamenten und endogenen Substanzen, die dem betreffenden Substratspektrum von OATP1B1 angehören, für die Modifikation der Transportraten eine bedeutende Rolle spielen⁷. Weitere Kenntnisse über Beeinflussung der pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften von Medikamenten durch Polymorphismen in Transportproteinen, sowie mögliche, die Aufnahmefunktion inhibierende Mechanismen sind deshalb erforderlich. Allerdings limitiert dabei der Mangel an transporterspezifischen Inhibitoren die Einflussprüfung individueller Transporter auf die Gesamtdisposition von Medikamenten.

4.9 Relevanz einer routinemäßigen Genotypisierung in der Statintherapie

4.9.1 Bedeutung häufiger Allelfrequenzen innerhalb einer Bevölkerung

Die Allelfrequenzen der SNPs A388G und T521C in *OATP1B1* betragen bei der Gesamtheit der für die vorliegende Studie genotypisierten Probanden 36,5 % und 15 %, was übereinstimmt mit den zuvor bei weißen Amerikanern und Japanern beobachteten, interethnisch jedoch stark differierenden Häufigkeiten. Kürzlich wurde von großen Unterschieden hinsichtlich der Häufigkeit von SNPs und Haplotypen zwischen Kaukasiern, Afrikanern und Asiaten berichtet⁸⁷. Unter den bisher bekannten SNPs in *OATP1B1* wurde die Variante A388G mit höchsten Frequenzen bei weißen Amerikanern, schwarzen Amerikanern und Japanern beobachtet, mit Häufigkeiten von 30 %, 74 % und 60 – 63 %^{135, 98, 96}. Obwohl das Auftreten der Variante T521C bei weißen Amerikanern und Japanern mit einer Allelfrequenz von 14 %, beziehungsweise 11–16 % als gewöhnlich erscheint, ist deren Vorkommen bei schwarzen Amerikanern mit nur 2 % relativ niedrig¹³⁵. Beide Varianten kommen bei Europäern und weißen Amerikanern oft unabhängig voneinander vor, bei Japanern oft assoziiert. So ist interessanterweise die Allelfrequenz von *OATP1B1* *5, das nur den SNP T521C enthält, bei Japanern relativ niedrig (0 – 0,7 %), ganz im Gegensatz zu der hohen Frequenz von *OATP1B1* *5 bei weißen Amerikanern (14 %) ^{135, 98, 96}. Japaner mit der Variante T521C haben zugleich den SNP A388G (*OATP1B1* *15), und zwar mit einer Häufigkeit von 10 bis 15 %^{98, 96}. Der Haplotyp *OATP1B1* *15 wurde

auch bei einem kaukasischen Probandenkollektiv entdeckt ⁹⁵. In der Studienpopulation der hier vorliegenden Untersuchung war die Variante *OATP1B1* *15 hingegen nicht aufgetreten.

Das insgesamt jedoch relativ häufige Vorkommen der betreffenden Allele lässt auf deren Bedeutung für die Disposition von Medikamenten schließen und impliziert deren mögliche Relevanz hinsichtlich Beeinflussung von Wirksamkeit und Auftreten unerwünschter Arzneimittelwirkungen in der Gesamtbevölkerung. Berichte über Allelfrequenzen funktionell signifikanter SNPs in *OATP1B1* in verschiedenen ethnischen Gruppen ^{135, 98, 96, 95, 71, 104, 87} lassen bei etwa 2-5 % der Individuen verschiedener Populationen mit Wahrscheinlichkeit deutlich erhöhte Plasma-Pravastatin-Konzentrationen erwarten. Bedeutsam bleibt dabei auch, dass der Einfluss von *OATP1B1*-Polymorphismen auf die Pharmakokinetik verschiedener Statine womöglich abhängig von der jeweiligen ethnischen Abstammung ist ^{134, 37}. In dieser Hinsicht bedarf es weiterer Untersuchungen.

4.9.2 Vorteile einer initialen Genotypisierung vor Beginn der Pharmakotherapie

Die Bestimmung genetischer Polymorphismen in *OATP1B1* könnte für die Vorhersage der therapeutischen Wirksamkeit und des Risikos einer Behandlung mit Pravastatin im Sinne einer individualisierten Medizin nützlich sein und zur Identifizierung von Patienten mit einer potentiell niedrigen Ansprechrate oder einer exzessiv hohen systemischen Arzneimittelexposition vor Beginn der Behandlung beitragen. Denkbar ist, dass eine jeweilige Genotyporientierte Dosierung von Pravastatin und gegebenenfalls sogar parallele Verabreichung eines möglichen *OATP1B1* – Induktors die Medikamentenverfügbarkeit in den Zielgeweben erhöht. Dabei mag die Wahl eines geeigneten Behandlungsverfahrens für individuelle Patienten nicht nur vom therapeutischen Standpunkt aus, sondern auch hinsichtlich des Kosten-Nutzen-Verhältnisses von großem Vorteil sein, da Arzneimittel zur Behandlung von Lebensstilbedingten Krankheiten, zu denen auch die Statine zählen, langfristig verschrieben werden. Angesichts des umfassenden Substratspektrums von *OATP1B1* erscheint für die Zukunft eine initiale Genotypisierung auch für das Therapieregime weiterer Medikamente als interessante und bedenkenswerte Maßnahme.

Da auch endogene Komponenten, wie Bilirubin, Bilirubinkonjugate und Gallensäuren dem *OATP1B1*-vermittelten Transport unterliegen, kann eine verminderte Transportaktivität auch die Anfälligkeit für bestimmte Krankheiten beeinflussen, wie z.B. das Gilbert-Syndrom.

Kürzliche Studien zeigten, dass Blutspiegel von unkonjugiertem Bilirubin bei Japanern und Taiwanern mit *SLCO1B1* A388G- oder T521C- Allelvarianten höher waren^{46, 44} als bei Trägern des Wildtypallels. Mit dem Wissen um die individuelle Disposition könnten auch hier berücksichtigende und vorausschauende Maßnahmen im jeweiligen Behandlungsverlauf ergriffen werden.

Mit der kürzlichen Entwicklung von PCR FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) Assays für die *OATP1B*- Polymorphismen A388G und T521C wurde gegenüber den konventionellen Methoden der allelspezifischen PCR und PCR RFLP eine robuste und schnelle Alternative von hoher Konsistenz und Reliabilität geschaffen⁵, die die Genotypisierung im Rahmen epidemiologischer Studien und womöglicher künftiger klinischer Routineuntersuchungen hinsichtlich einer gezielten individualisierten Pharmakotherapie deutlich erleichtern könnte und praktisch einfacher realisierbar erscheinen lässt. Ein ähnliches Ziel verfolgt die Methode der PyrosequencingTM Screening Assays zur Erfassung der drei potentiell funktionellen *SLCO1B1*-Varianten der DNA-Positionen 11187, 388 und 521¹¹¹. Dieser Screeningtest hat sich als schnelles und reliables Verfahren erwiesen und könnte ebenfalls dem spezifischen Nachweis der jeweiligen Mutation und den damit verbundenen klinisch relevanten Auswirkungen dienen.

Des Weiteren existiert die Überlegung der Erstellung eines einheitlichen Klassifikationssystems der Aktivität von *SLCO1B1* in schnelle, mittlere und langsame Metabolisierer in Abhängigkeit von der Funktionalität des jeweiligen Genotyps⁵⁷. Eine derartige Einteilung könnte nützlich sein, um mögliche Arzneimittelwechselwirkungen oder potentielle Effekte von *OATP1B1* – Inhibitoren im voraus zu berücksichtigen und um das Verständnis für die Disposition einer Vielfalt von Substraten zu erleichtern.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die zwei untersuchten Haplotypen *OATP1B1* *1*b* und *OATP1B1* *5 die Transportfunktion von *OATP1B1* *in vivo* interessanterweise gegensätzlich zu beeinflussen scheinen. Obwohl die gegenwärtigen Ergebnisse als vorläufig betrachtet werden sollten und weiterer Bestätigung bedürfen, sind sie potentiell von wichtiger Bedeutung - auf deren Basis lässt sich vermuten, dass *OATP1B1*-Haplotypen in beachtlichem Ausmaß ursächlich sind für die interindividuelle Variabilität in der Disposition von Arzneistoffen, die dem Substratspektrum dieses Transportproteins zugehörig sind.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Der organische Anionentransporter OATP1B1(SLCO1B1) ist ein Transportprotein, das an der sinusoidalen Membran der Hepatozyten lokalisiert ist und die Aufnahme einer Vielzahl von Substraten, einschließlich Arzneistoffen, aus dem Pfortaderblut in die Leber steuert. Kürzliche Untersuchungen zeigten, dass genetische Polymorphismen von OATP1B1 dessen Transportfunktion beeinflussen. Die mögliche Konsequenz einer veränderten Pharmakokinetik mit individueller Medikamenten-Disposition, auch hinsichtlich einer hohen intersubjektiven Variabilität in der Pharmakotherapie, ist interessanter Diskussionsgegenstand einer zunehmenden Zahl von Untersuchungen.

Zielstellung: Die pharmakogenetischen Effekte der Haplotypen *OATP1B1* (*organic anion transporting polypeptide 1B1*) *1a, *1b (A388G) und *5 (T521C) auf die Pharmakokinetik einer Einzeldosis des Cholesterinsenkers Pravastatin bei weißen Europäern wurden untereinander verglichen.

Methoden: Nach Genotypisierung von 423 Freiwilligen wurden 30 gesunde männliche Probanden kaukasischer Abstammung entsprechend ihres *OATP1B1* – Haplotyps ausgewählt und einer Gruppe zugeordnet. Jede der drei Gruppen umfasste zehn Individuen, die entweder homozygote oder heterozygote Träger der Variante *OATP1B1* *1a, *1b oder *5 waren. Nach einer Einzeldosis von 40 mg Pravastatin wurden die kinetischen Parameter der Disposition für Pravastatin gemessen. Hauptzielgröße war die Plasmakonzentrations–Zeit–Kurve in der Zeit null bis sechs Stunden nach Medikamenteneinnahme [AUC(0-6)]. Die Pravastatin-Konzentrationen in Plasma und Urin wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitchromatographie (HPLC) bestimmt.

Ergebnisse: Die Messwerte für AUC(0-6) bei Probanden der Genotypen *1a/*1a, *1a/*1b oder *1b/*1b und *1a/*5 betragen jeweils $114,5 \pm 68,6 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$, $74,8 \pm 35,6 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$ und $163,0 \pm 64,6 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$ mit hoch signifikanten Unterschieden zwischen allen drei Studiengruppen ($P = 0,006$) und zwischen den Trägern des Haplotyps *1b und *5 ($P = 0,002$). Eindrucksvoll war, dass die Werte für AUC (0-6) der Gruppe *OATP1B1* *1b um mehr als 60 % niedriger waren gegenüber der Gruppe des Haplotyps *OATP1B1* *1a, obwohl dieser Unterschied keine statistische Signifikanz erreichte. Allerdings war in der Gruppe der *OATP1B1* *1b - Allelträger die Menge an über den Urin ausgeschiedenem Pravastatin in der Zeit null bis zwölf Stunden [Ae (0-12)] signifikant vermindert ($1729 \pm 907 \mu\text{g}$) im Vergleich zur Kontrollgruppe des Wildtyps *OATP1B1* *1a ($2974 \pm 1590 \mu\text{g}$) ($P = 0,049$). Innerhalb der Gruppe *OATP1B1* *5 wurden die höchsten Werte für AUC (0 – 6) gemessen. Diese unterschieden sich signifikant von den Werten der für *OATP1B1* *1a homozygoten Studienteilnehmer ($P = 0,049$) und den

Ergebnissen für die Gruppe der homo- und heterozygoten Träger von *OATP1B1* *1b ($P = 0.002$); der Mittelwert für AUC (0 – 6) der Gruppe *5 betrug 142 % im Vergleich zur Referenzgruppe *1a.

Schlussfolgerung: Ein signifikanter Effekt der untersuchten *OATP1B1*- Haplotypen auf die Disposition von Pravastatin war feststellbar. Während die Expression von *OATP1B1* *5 die hepatozelluläre Aufnahme von Pravastatin verzögerte, schien die Variante *1b die *OATP1B1*-abhängige Aufnahme des Medikaments zu beschleunigen. Die Transportfunktion von *OATP1B1* zeigte sich somit interessanterweise gegensätzlich beeinflussbar. Dies gilt als einer der ersten Berichte, die darauf hinweisen, dass verbesserte Transporteigenschaften *in vitro*, bedingt durch polymorphe Transportergene, tatsächlich die Pharmakokinetik eines Medikaments *in vivo* verändern. Vorhergehende klinische Studien konnten den Effekt der Haplotypen *OATP1B1* *1b und *OATP1B1* *5 nicht parallel isoliert darstellen. Vermutlich trägt die vermehrte Aufnahme einiger Arzneimittel aus dem Pfortaderblut zu einer niedrigeren oralen Bioverfügbarkeit bei und darüber hinaus zu einem vermehrten hepatischen first-pass Mechanismus bestimmter Komponenten.

Weitere *in vivo*- Studien sind erforderlich, um die hier vorgestellten Ergebnisse zu bestätigen. Dennoch lässt sich auf deren Grundlage vermuten, dass *OATP1B1*-Haplotypen auf bemerkenswerte Weise zur interindividuellen Variabilität in der Disposition von Arzneistoffen beitragen, die dem Substratspektrums dieses Transportproteins angehören.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abe T, Kakyo M, Tokui T et al. Identification of a novel gene family encoding human liver-specific organic anion transporter LST-1. *J Biol Chem* 1999; 274(24): 17159-17163.
2. Avdeef A. Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state). *Curr Top Med Chem* 2001; 1: 277-351.
3. Ayrton A, Morgan P. Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion. *Xenobiotica* 2001; 31: 469-497.
4. Bauer S, Mwinyi J, Stoeckle A, Gerloff T, Roots I. Quantification of pravastatin in human plasma and urine after solid phase extraction using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B* 2005; 818: 257-262.
5. Buijsch RA op den, Bekers O, Wijnen PA, Diejien-Visser MP van, Vries JE de. Rapid genotyping of the OATP1B1 polymorphisms A388G and T521C with real-time PCR FRET assays. *Pharmacogenomics* 2005; 6(4): 393-397.
6. Camenisch G, Folkers G, van de Waterbeemd H. Review of theoretical passive drug absorption, distribution and excretion. *Pharm Acta Helv* 1996; 71: 309-327.
7. Campbell SD, Morais de SM, Jinghai JX. Inhibition of human organic anion transporting polypeptide OATP1B1 as a mechanism of drug-induced hyperbilirubinemia. *Chem Biol Interact* 2004; 150(2): 179-187.
8. Cascorbi I, Gerloff T, Johne A et al. Frequency of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in Caucasians. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69: 169-174.
9. Chandra P, Brouwer KL. The complexities of hepatic drug transport: current knowledge and emerging concepts. *Pharm Res* 2004; 21(5): 719-35.

10. Chasman DI, Posada D, Subrahmanyam L, Cook NR, Stanton VP Jr, Ridker PM. Pharmacogenetic study of statin therapy and cholesterol reduction. *JAMA* 2004; 291: 2821-2827.
11. Chen C, Mireles RJ, Campbell SD et al. Differential interaction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors with ABCB1, ABCC2, and OATP1B1. *Drug Metab Disp* 2005; 33(4): 537-546.
12. Choi JH, Lee MG, Cho JY, Lee JE, Kim KH, Park K. Influence of OATP1B1 genotype on the pharmacokinetics of rosuvastatin in Koreans. *Clin Pharmacol Ther* 2007. Elektronische Publikation 13.Juni 2007.
13. Chung JY, Cho JY, Yu KS et al. Effect of OATP1B1 (SLCO1B1) variant alleles on the pharmacokinetics of pitavastatin in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 2005; 78: 342-350.
14. Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR, Melamed MR. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissue. *J Histochem Cytochem* 1990; 38: 1277-1287.
15. Corsini A, Bellosta S, Baetta R, Fumagalli R, Paoletti R, Bernini F. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol Ther* 1999; 84: 413-428.
16. Cui Y, König J, Leier I, Buchholz U, Keppler D. Hepatic uptake of Bilirubin and its conjugates by the human organic anion transporter SLC21A6. *J Biol Chem* 2001; 276(13): 9626-9630.
17. Cvetkovic M, Leake BF, Fromm MF, Wilkinson GR, Kim RB. OATP and P-Glycoprotein transporters mediate the cellular uptake and excretion of fexofenadine. *Drug Metab Dispos* 1999; 27(8): 866-871.
18. Davies EC, Green CF, Mottram DR, Pirmohamed M. Adverse drug reactions in hospital in-patients: a pilot study. *J Clin Pharm Ther* 2006; 31(4): 335-341.

19. Dresser GK, Bailey DG, Leake BF et al. Fruit juices inhibit organic anion transporting polypeptide- mediated drug uptake to decrease the oral bioavailability of fexofenadine. *Clin Pharmacol Ther* 2002; 71(1): 11-20.
20. Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: Translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 1999; 286: 487-491.
21. Everett DW, Chando TJ, Didonato GC, Singhvi SM, Pan HY, Weinstein SH. Biotransformation of pravastatin sodium in humans. *Drug Metab Dispos* 1991; 19(4): 740-8.
22. Fachinformation Pravasin® protect 2002, Firma Bristol-Myers Squibb.
23. Ganapathy ME, Brandsch M, Prasad PD, Ganapathy V, Leibach FH. Differential recognition of beta-lactam antibiotics by intestinal and renal peptide transporters, PEPT 1 and PEPT 2. *J Biol Chem* 1995; 270: 25672-25677.
24. Gerk PM and Vore M. Regulation of expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and its role in drug disposition. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302: 407–415.
25. Gerloff T. Impact of genetic polymorphisms in transmembrane carrier-systems on drug and xenobiotic distribution. *Arch Pharmacol* 2004; 369: 69-77.
26. Gerloff T., Roots I. Pharmakogenetik von Transmembrantransportern. Auswirkungen auf die Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung von Arzneistoffen. *Dtsch Med Wochenschr* 2003; 128: 2431-2436.
27. Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B et al. The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol Chem* 1998; 273: 10046-10050.

28. Gibbons RJ, Chatterjee K, Daley J et al. ACC/AHA/ACP-ASIM guidelines for the management of patients with chronic stable angina: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 1999; 33(7): 2092-197.
29. Greiner B, Eichelbaum M, Fritz P et al. The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. *J Clin Invest* 1999; 104(2): 147-153.
30. Gründemann D, Gorboulev V, Gambaryan S, Veyhl M, Koepsell H. Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature* 1994; 372: 549-592.
31. Hagenbuch B, Meier PJ. The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochem Biophys Acta* 2003; 1609: 1-18.
32. Han JY, Lim HS, Shin ES et al. Influence of the organic anion-transporting polypeptide 1B1 (*OATP1B1*) polymorphisms on irinotecan-pharmacokinetics and clinical outcome of patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2008; 59(1): 69-75.
33. Hedman M, Neuvonen PJ, Neuvonen M, Holmberg C, Antikainen M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of pravastatin in pediatric and adolescent cardiac transplant recipients on a regimen of triple immunosuppression. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 75: 101-109.
34. Hermann M, Asberg A, Christensen H, Holdaas H, Hartmann A, Reubsæet JL. Substantially elevated levels of atorvastatin and metabolites in cyclosporine-treated renal transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 76: 388-391.
35. Hirano M, Maeda K, Hayashi H, Kusuhara H, Sugiyama Y. Bile salt export pump (BSEP/ABCB11) can transport a nonbile acid substrate, pravastatin. *JPET* 2005; 314(2): 876-882.
36. Hirano M, Maeda K, Shitara Y, Sugiyama Y. Contribution of OATP2 (OATP1B1) and OATP8 (OATP1B3) to the hepatic uptake of pitavastatin in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 311: 139-146.

37. Ho RH, Choi L, Lee W et al. Effect of drug transporter genotypes on pravastatin disposition in European- and African-American participants. *Pharmacogenet Genomics* 2007; 17:647-656.
38. Ho RH, Kim RB. Transporters and drug therapy: Implications for drug disposition and disease. *Clin Pharm Ther* 2005; 78(3): 260 –277.
39. Ho RH, Tirona RG, Leake BF et al. Drug and bile acid transporters in rosuvastatin hepatic uptake: Function, expression, and pharmacogenetics. *Gastroenterology* 2006; 130: 1793-1806.
40. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O et al. 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* 2000; 97(7): 3473-3478.
41. Hsiang B, Zhu Y, Wang Z et al. A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide and identification of rat and human hydroxymethylglutaryl- CoA reductase inhibitor transporters. *J Biol Chem* 1999; 274 (52): 37161-37168.
42. Hsu I, Spinler SA, Johnson NE. Comparative evaluation of the safety and efficacy of HMG-CoA reductase inhibitor monotherapy in the treatment of primary hypercholesterolemia. *Ann Pharmacotherapy*, 1995; 29: 743–759.
43. Hu M, Zheng L, Chen J et al. Mechanisms of transport of quinapril in Caco-2 cell monolayers: comparison with cephalexin. *Pharm Res* 1995; 12: 1120-1125.
44. Huang CS, Huang MJ, Lin MS, Yang MS, Teng HC, Tang KS. Genetic factors related to unconjugated hyperbilirubinemia amongst adults. *Pharmacogenet Genomics* 2005; 15: 43-50.

45. Ieiri I, Suwannakul S, Maeda K et al. *SLCO1B1* (OATP1B1, an uptake transporter) and *ABCG2* (BCRP, an efflux transporter) variant alleles and pharmacokinetics of pitavastatin in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 2007; 82: 541-547.
46. Ieiri I, Suzuki H, Kimura M et al. Influence of common variants in the pharmacokinetic genes (OATP-C, UGT1A1, and MRP2) on serum bilirubin levels in healthy subjects. *Hepatol Res* 2004; 30: 91-95.
47. Igel M, Arnold KA, Niemi M et al. Impact of the *SLCO1B1* polymorphism on the pharmacokinetics and lipid-lowering efficacy of multiple-dose pravastatin. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 79: 419-426.
48. Ishikawa T, Truji A, Inui K et al. The genetic polymorphism of drug transporters: functional analysis approaches. *Pharmacogenomics* 2004; 5(1): 67-99.
49. Ishizuka H, Konno K, Naganuma H et al. Transport of temocaprilat into rat hepatocytes: role of organic anion transporting polypeptide. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 287(1): 37-42.
50. Ito K, Suzuki H, Horie T, Sugiyama Y. Apical/ basolateral surface expression of drug transporters and its role in vectorial drug transport. *Pharm Res* 2005; 22(10): 1559-1577.
51. Iwai M, Suzuki H, Ieiri I, Otsubo K, Sugiyama Y : Functional analysis of single nucleotide polymorphisms of hepatic organic anion transporter OATP1B1 (OATP-C). *Pharmacogenetics* 2004; 14: 749-757.
52. Jacobsen W, Kirchner G, Hallensleben K et al. Small intestinal metabolism of the 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase inhibitor Lovastatin and comparison with Pravastatin. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 291(1): 131-139.
53. Juranka PF, Zastawny RL, Ling V. P-glycoprotein: multidrug-resistance and a superfamily of membrane-associated transport proteins. *FASEB J*, 1989; 3: 2583-2592.

54. Kajinami K, Takehoshi N, Brousseau ME, Schaefer EJ. Pharmacogenetics of HMG-CoA reductase inhibitors: exploring the potential for genotype-based individualization of coronary heart disease management. *Artherosclerosis* 2004; 177: 219-234.
55. Kajosaari LI, Niemi M, Neuvonen M, Laitila J, Neuvonen PJ, Backman JT. Cyclosporine markedly raises the plasma concentrations of repaglinide. *Clin Pharmacol Ther* 2005; 78: 388-399.
56. Kameyama Y, Yamashita K, Kobayashi K, Hosokawa M, Chiba K. Functional characterization of SLCO1B1 (OATP-C) variants, SLCO1B1*5, SLCO1B1*15 and SLCO1B1*15 + C1007G, by using transient expression systems of HeLa and HEK293 cells. *Pharmacogenet Genomics* 2005; 15(7): 513-522.
57. Katz DA, Carr R, Grimm DR et al. Organic anion transporting polypeptide 1B1 activity classified by SLCO1B1 genotype influences atrasentan pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 79(3): 186-196.
58. Kerb R 2002, Brinkmann U, Chatskaia N et al. Identification of genetic variations of the human organic cation transporter hOCT1 and their functional consequences. *Pharmacogenetics* 2002; 12: 591-595.
59. Kim RB. Transporters and xenobiotic disposition. *Toxicology* 2002; 181-182: 291-297.
60. Kim RB, Leake BF, Choo EF et al. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 70: 189-199.
61. Kivistö KT, Niemi M. Influence of drug transporter polymorphisms on Pravastatin pharmacokinetics in humans. *Pharm Res* 2007; 24(2): 239-247.
62. Kobayashi D, Nozawa T, Imaj K, Nezu J, Tsuji A, Tamai I. Involvement of human organic anion transporting polypeptide OATP-B (SLC21A9) in pH-dependent transport across intestinal apical membrane. *Pharmacol Exp Ther* 2003; 306(2): 703-708.

63. König J, Cui Y, Nies AT, Keppler D. A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278: G 156-G 164.
64. König J, Nies AT, Cui Y, Leier I, Keppler D. Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity and MRP2-mediated drug resistance. *Biochem Biophys Acta* 1999; 1461: 377-394.
65. Komai T, Shigehara E, Tokui T et al. Carrier-mediated uptake of pravastatin by rat hepatocytes in primary culture. *Biochem Pharmacol* 1992; 43: 667-670
66. Kopplow K, Letschert K, König J, Walter B, Keppler D. Human hepatobiliary transport of organic anions analyzed by quadruple- transfected cells. *Mol Pharmacol* 2005; 68: 1031-1038.
67. Kullak-Ublick GA, Ismail MG, Stieger B et al. Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology* 2001; 120 (2): 525-533.
68. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860 – 921.
69. Lazarou J, Bruce H, Pomeranz H, Corey PN. Incidence of adverse drug reactions in hospitalised patients. *JAMA* 1998; 279: 1200-1205.
70. Leabman MK, Huang CC, Young J De et al. Natural variation in human membrane transporter genes reveals evolutionary and functional constraints. *PNAS* 2003; 100(10): 5896-5901.
71. Lee E, Ryan S, Birmingham B et al. Rosuvastatin pharmacokinetics and pharmacogenetics in white and Asian subjects residing in the same environment. *Clin Pharmacol Ther* 2005; 78: 330-341.
72. Lee VH. Membrane transporters: Review. *Eur Pharm Sci* 2000; 11: 541-550.

73. Letschert K, Keppler D, König J. Mutations in the SLCO1B3 gene affecting the substrate specificity of the hepatocellular uptake transporter OATP1B3 (OATP8). *Pharmacogenetics* 2004; 14(7): 441-452.
74. Lilja JJ, Kivistö KT, Neuvonen PJ. Grapefruit juice increases serum concentrations of atorvastatin and has no effect on pravastatin. *Clin Pharmacol Ther* 1999; 66: 118-127.
75. Maeda K, Ieiri I, Yasuda K et al. Effects of organic anion transporting polypeptide 1B1 haplotype on pharmacokinetics of pravastatin, valsartan, and temocapril. *Clin Pharm Ther* 2006; 79(5): 427-439.
76. Maitland-van der Zee AH, Boerwinkle E. Pharmacogenetics of response to statins: where do we stand ? *Curr Artheroscler Rep* 2005; 7: 204-208.
77. Maitland-van der Zee AH, Klungel OH, Stricker BH et al. Genetic polymorphisms: importance for response to HMG-CoA reductase inhibitors. *Artherosclerosis* 2002; 163: 213-222.
78. Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF et al. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res* 2001; 61: 3458-3464.
79. Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 75: 13-33.
80. Meier PJ, Eckhardt U, Schroeder A, Hagenbuch B, Stieger B. Substrate specificity of sinusoidal bile acid and organic anion uptake systems in rat and human liver. *Hepatology* 1997; 26(6): 1667-1677.
81. Meyer UA, Zanger UM. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37: 269-296.

82. Michalski C, Cui Y, Nies AT et al. A naturally occurring mutation in the SLC21A6 gene causing impaired membrane localization of the hepatocyte uptake transporter. *J Biol Chem* 2002; 277(45): 43058-43063.
83. Mikkaichi T, Suzuki T, Onogawa T et al. Isolation and characterization of a digoxin transporter and its rat homologue expressed in the kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(10): 3569-3574.
84. Mizutani T. PM frequencies of major CYPs in Asians and Caucasians. *Drug Metab Rev* 2003; 35: 99-106.
85. Morimoto K, Oishi T, Ueda S, Ueda M, Hosokawa M, Chiba K. A novel variant of OATP-C (SLCO1B1) found in a Japanese patient with Pravastatin-induced myopathy. *Drug Metab Pharmacokinet* 2004; 19(6): 453-455.
86. Mück W, Mai I, Fritsche L et al. Increase in cerivastatin systemic exposure after single and multiple dosing in cyclosporine-treated kidney transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther* 1999; 65: 251-261.
87. Mwinyi J, Köpke K, Schaefer M, Roots I, Gerloff T. Comparison of *SLCO1B1* sequence variability among German, Turkish, and African populations. *Eur J Clin Pharmacol* 2008; 64: 257-266.
88. Nakai D, Nakagomi R, Furuta Y et al. Human liver-specific organic anion transporter, LST-1, mediates uptake of pravastatin by human hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 297 (3): 861-867.
89. Neuvonen PJ, Kantola T, Kivistö KT. Simvastatin but not pravastatin is very susceptible to interaction with the CYP3A4 inhibitor itroconazole. *Clin Pharmacol Ther* 1998; 63: 332-341.
90. Neuvonen PJ, Niemi M, Backman JT. Drug interactions with lipid-lowering drugs: Mechanisms and clinical relevance. *Clin Pharm Ther* 2006; 80 (6): 565-581.

91. Niemi M, Backman JT, Kajosaari LI et al. Polymorphic organic anion transporting polypeptide 1B1 is a major determinant of repaglinide pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 2005; 77: 468-478.
92. Niemi M, Kivistö KT, Hofmann U, Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF. Fexofenadine pharmacokinetics are associated with a polymorphism of the SLCO1B1 gene (encoding OATP1B1). *Br J Clin Pharmacol* 2005; 59: 602-604.
93. Niemi M, Neuvonen PJ, Hofmann U et al. Acute effects of pravastatin on cholesterol synthesis are associated with SLCO1B1 (encoding OATP1B1) haplotype *17. *Pharmacogenet Genomics* 2005; 15: 303-309.
94. Niemi M, Pasanen MK, Neuvonen PJ. SLCO1B1 polymorphism and sex affect the pharmacokinetics of pravastatin but not fluvastatin. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 80: 356-366.
95. Niemi M, Schaeffeler E, Lang T et al. High plasma pravastatin concentrations are associated with single nucleotide polymorphisms and haplotypes of organic anion transporting polypeptide – C (OATP-C, SLCO1B1). *Pharmacogenetics* 2004; 14: 429-440.
96. Nishizato Y, Ieiri I, Suzuki H et al. Polymorphisms of OATP-C (SLC21A6) and OAT3 (SLC22A8) genes: consequences for pravastatin pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 2003; 73(6): 554-565.
97. Nozawa T, Minami H, Sugiura S, Tsuji A, Tamai I. Role of organic anion transporter OATP1B1 (OATP-C) in hepatic uptake of irinotecan and its active metabolite Sn-38: In vitro evidence and effect of single nucleotide polymorphisms. *Drug Metab Dispos* 2005; 33 (3): 434-439.
98. Nozawa T, Nakajima M, Tamai I et al. Genetic polymorphisms of human organic anion transporters OATP-C (SLC21A6) and OATP-B (SLC21A9): allelic frequencies in the Japanese population and functional analysis. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302: 804-813.

99. Ogawa K, Hasegawa S, Udaka Y, Nara K, Iwai S, Oguchi K. Individual difference in the pharmacokinetics of a drug, Pravastatin, in healthy subjects. *J Clin Pharmacol* 2003; 43: 1268-1273.
100. Palm K, Luthman K, Ungell AL, Strandhund G, Artursson P. Correlation of drug absorption with molecular surface properties. *J Pharm Sci* 1996; 85: 32-39.
101. Pan HY, Waclawski AP, Funke PT, Whigan D. Pharmacokinetics of pravastatin in elderly versus young men and women. *Ann Pharmacother* 1993; 27(9): 1029-1033.
102. Pang KS, Wang PJ, Chung AY, Wolkoff AW. The modified dipeptide, enalapril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, is transported by the rat liver organic anion transport protein. *Hepatology* 1998; 28: 1341-1346.
103. Park JW, Siekmeier R, Merz M et al. Pharmacokinetics of pravastatin in heart-transplant patients taking cyclosporin A. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2002; 40(10): 439-450.
104. Pasanen MK, Backman JT, Neuvonen PJ, Niemi M. Frequencies of single nucleotide polymorphisms and haplotypes of organic anion transporting polypeptide 1B1 SLCO1B1 gene in a Finnish population. *Eur J Clin Pharmacol* 2006; 62(6): 409-415.
105. Pasanen MK, Neuvonen M, Neuvonen PJ, Niemi M. SLCO1B1 polymorphism markedly affects the pharmacokinetics of simvastatin acid. *Pharmacogenet Genomics* 2006; 16(12): 873-879.
106. Pauli-Magnus C, Meier PJ. Pharmacogenetics of hepatocellular transporters. *Pharmacogenetics* 2003; 13: 189-198.
107. Pfeffer MA, Keech A, Sacks FM et al. Safety and tolerability of pravastatin in long-term clinical trials: prospective Pravastatin Pooling (PPP) Project. *Circulation* 2002; 105: 2341-2346.
108. Quion JAV, Jones PH. Clinical pharmacokinetics of pravastatin. *Clin Pharmacokinet* 1994; 27(2): 94-103.

109. Rao VV, Dahlheimer JL, Bardgett ME et al. Choroid plexus epithelial expression of MDR1 P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein contribute to the blood-cerebrospinal-fluid drug-permeability barrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(7): 3900-3905.
110. Rodrigues AD, Rushmore TH. Cytochrome P450 pharmacogenetics in drug development: in vitro studies and clinical consequences. *Curr Drug Metab* 2002; 3: 289-309.
111. Rohrbacher M, Kirchhof A, Skarke C, Geisslinger C, Lötsch J. Rapid identification of three functionally relevant polymorphisms in the OATP1B1 transporter gene using PyrosequencingTM. *Pharmacogenomics* 2006; 7(2): 167-176.
112. Roots I, Brockmöller J. Pharmakogenetik. In: Rietbrock N, Staib AH, Loew D, eds. *Klinische Pharmakologie*. 3. Aufl., Darmstadt: Steinkopff, 1996: 101-120.
113. Sandhu P, Lee W, Xu X et al. Hepatic uptake of the novel antifungal agent caspofungin. *Drug Metab Dispos* 2005; 33: 676-682.
114. Schneck D, Birmingham B, Zalikowski J et al. The effect of gemfibrozil on the pharmacokinetics of rosuvastatin. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 75: 455-463.
115. Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF. Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003; 43: 285-307.
116. SEARCH Collaborative Group – Link E, Parish S, Armitage J et al. SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy – a genomwide study. *N Engl J Med* 2008; 359 (8): 789-799.
117. Seithel A, Eberl S, Singer K et al. The influence of macrolide antibiotics on the uptake of organic anions and drugs mediated by OATP1B1 and OATP1B3. *Drug Metab Disp* 2007; 35: 779-786.

118. Shitara Y, Hirano M, Sato H, Sugiyama Y. Gemfibrozil and its glucuronide inhibit the organic anion transporting polypeptide 2 (OATP2/OATP1B1 = SLC21A6), mediated hepatic uptake and CYP2C8- mediated metabolism of cerivastatin: analysis of the mechanism of the clinically relevant drug-drug interaction between cerivastatin and gemfibrozil. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 311: 228-236.
119. Shitara Y, Itoh T, Sato H, Li AP, Sugiyama Y. Inhibition of transporter-mediated hepatic uptake as a mechanism for drug-drug interaction between cerivastatin and cyclosporin A. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 304: 610-616.
120. Siekmeier R, Gross W, März W. Determination of pravastatin by high performance liquid chromatography. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2000; 38(9): 419-425.
121. Simonson SG, Raza A, Martin PD et al. Rosuvastatin pharmacokinetics in heart transplant recipients administered antirejection regimen including cyclosporin. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 76: 167-177.
122. Spears KJ, Ross J, Stenhouse A et al. Directional trans-epithelial transport of organic anions in porcine LLC-PK1 cells that co-express human OATP1B1 (OATP-C) and MRP2. *Biochem Pharmacol* 2005; 69: 415-423.
123. Steijns LS, Van Der Weide J. Ultrarapid drug metabolism: PCR-based detection of CYP2D6 gene duplication. *Clin Chem* 1998; 44: 914-917.
124. Stenberg P, Luthman K, Artursson P. Virtual screening of intestinal drug permeability. *J Control Release* 2000; 65: 231-243.
125. Sugimoto KI, Ohmori M, Tsuruoka S et al. Different effects of St. John's Wort on the pharmacokinetics of simvastatin and pravastatin. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 70: 518-524.
126. Tachibana-Iimori R, Tabara Y, Kusuhara et al. Effect of genetic polymorphism of OATP-C (SLCO1B1) and lipid-lowering response to HMG-CoA inhibitors. *Drug Metab Pharmacokin* 2004; 19(5): 376-380.

127. Takeda M, Noshiro R, Onozato ML et al. Evidence for a role of human organic anion transporters in the muscular side effects of HMG- CoA reductase inhibitors. *Eur J Pharmacol* 2004; 483: 133-138.
128. Tamai I, Nezu JI, Uchino H et al. Molecular Identification and Characterization of Novel Members of the Human Organic Anion Transporter (OATP) Family. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 273: 251-260.
129. Tamai I, Nozawa T, Koshida M, Nezu J, Sai Y, Tsuji A. Functional characterization of human organic anion transporting polypeptide B (OATP-B) in comparison with liver-specific OATP-C. *Pharm Res* 2001; 18: 1262-1269.
130. Thompson GR, O'Neill F, Seed M. Why some patients respond poorly to statins and how this might be remedied. *Eur Heart J* 2002; 23: 200-206.
131. Thompson JF, Man M, Johnson KJ et al. An association study of 43 SNPs in 16 candidate genes with atorvastatin response. *Pharmacogenomics* 2005, 5: 352-358.
132. Thompson PD, Clarkson P, Karas RH. Statin-associated myopathy. *JAMA* 2003; 289: 1681-1690.
133. Tiribelli C, Lunazzi GC, Sottocasa GL. Biochemical and molecular aspects of the hepatic uptake of organic anions. *Biochem Biophys Acta* 1990; 1031(3): 261-275.
134. Tirona RG. Ethnic differences in statin disposition. *Clin Pharmacol Ther* 2005; 78: 311-316.
135. Tirona RG, Leake BF, Merino G, Kim RB. Polymorphisms in OATP-C: identification of multiple allelic variants associated with altered transport activity among European- and African- Americans. *J Biol Chem* 2001; 276: 35669-35675.

136. Tirona RG, Leake BF, Wolkoff AW, Kim RB. Human organic anion transporting polypeptide –C (SLCO21A6) is a major determinant of rifampicin- mediated pregnane X receptor activation. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 304: 223-228.
137. Treiber A, Schneiter R, Häusler S, Stieger B. Bosentan is a substrate of human OATP1B1 and OATP1B3: inhibition of hepatic uptake as the common mechanism of its interactions with cyclosporin A, rifampicin, and sildenafil. *Drug Metab Dispos* 2007; 35(8): 1400-1407.
138. Triscari J, Rossi L, Pan HY. Chronokinetics of pravastatin administered in the pm compared with am dosing. *Am J Ther* 1995; 2: 265-268.
139. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291: 1304-1351.
140. Wang X, Wolkoff AW, Morris ME. Flavonoids as a novel class of human organic anion-transporting polypeptide OATP1B1 (OATP-C) modulators. *Drug Metab Disp* 2005; 33: 1666-1672.
141. Westphal K, Weinbrenner A, Giessmann T, et al. Oral bioavailability of digoxin is enhanced by talinolol: evidence for involvement of intestinal P-glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther* 2000; 68: 6-12.
142. Yamazaki M, Akiyama S, Ni'inuma K, Nishigaki R, Sugiyama Y. Biliary excretion of pravastatin in rats: contribution of the excretion pathway mediated by canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) *Drug Metab Disp* 1997; 25(10): 1123-1129.
143. Yamazaki M, Suzuki H, Hanano M, Tokui T, Komai T, Sugiyama Y. Na(+) – independent multispecific anion transporter mediates active transport of pravastatin into rat liver. *Am J Physiol* 1993; 264: G36-44.

144. Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004; 369(1):23-37.
145. Zhang W, Chen BL, Ozdemir V et al. *SLCO1B1* 521T>C functional genetic polymorphism and lipid-lowering efficacy of multiple-dose pravastatin in Chinese coronary heart disease patients. *Br J Clin Pharmacol* 2007; 64(3): 346-352.
146. Zhang W, Yi-Jing H, Chun-Ting H et al. Effect of *SLCO1B1* genetic polymorphism on the pharmacokinetics of nateglinide. *Br J Clin Pharmacol* 2006; 62 (5): 567-572.
147. Zineh I. HMG-CoA reductase inhibitor pharmacogenomics: overview and implications for practice. *Future Cardiol* 2005; 1: 191-206.

7. DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. med. I. Roots für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, diese Promotionsarbeit an dem von ihm geleiteten Institut für Klinische Pharmakologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin, durchführen zu können.

Besonders danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Thomas Gerloff, der den wesentlichen Anteil an der Betreuung und damit am Gelingen dieser Arbeit hatte.

Ebenso gilt mein Dank all den weiteren Mitarbeitern des Instituts für Klinische Pharmakologie der Charité, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben, darunter Herrn Dr. rer. nat. Steffen Bauer, Frau Dr. med. Jessica Mwinyi und Herrn Dr. med. Andreas Johne, sowie den immer hilfsbereiten MTAs.

Von Herzen danke ich auch meiner Familie und meinen Freunden für ihre wohlwollende und unterstützende Begleitung in dieser Zeit.

8. TABELLARISCHER LEBENSLAUF

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

9. PUBLIKATIONSHINWEIS

Bauer S, Mwinyi J, Stoeckle A, Gerloff T, Roots I.

Quantification of pravastatin in human plasma and urine after solid phase extraction using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection.

J Chromatogr B 2005; 818: 257-262.

10. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

„Ich, Angela Stöckle, erkläre an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Bedeutung genetischer Polymorphismen in *OATP1B1 (SLC21A6)* für die Pharmakokinetik von Pravastatin - Nachweis gegensätzlicher Effekte der Haplotypen *5 und *1b 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.“

Berlin, 10.08.2009

Angela Stöckle