
3. Ergebnisse

3.1 *MDR1*-Polymorphismen

Im Rahmen der Studie erfolgte die Untersuchung von 8 Polymorphismen mittels PCR und RFLP und deren Auswirkung auf die Pharmakokinetik des P-gp-Substrates Digoxin. Beachtung fanden dabei die Genpolymorphismen, die in der kaukasischen Population mit einer Frequenz von mindestens 10% vorkommen (Exon 6+139C>T, Exon 17-76T>A, Exon 26 3435C>T) und Genvarianten, die mit einem Aminosäureaustausch einhergehen (Exon 2 61A>G, Exon 11 1199G>A, Exon 21 2677G>T>A) sowie ein nicht zu Aminosäureaustausch führender Genpolymorphismus in der Promoterregion des *MDR-1*-Gens (Exon 2-1 G>A). Für den Polymorphismus 61A>G in Exon 2, der zu einem Aminosäureaustausch von Asparagin gegen Asparaginsäure führt, wurde eine Allelhäufigkeit von 13% festgestellt. Unter den Probanden befand sich kein homozygoter Träger für das G-Allel. Für den 1199G>A Polymorphismus in Exon 11, der zum Austausch von Serin zu Asparagin führt, betrug die Allelfrequenz 4%. Auch hier gab es keine Probanden, die für das A-Allel homozygot waren. Bei dem dritten untersuchten Polymorphismus, der zu einem Aminosäureaustausch führt, handelte es sich um eine triallelische Variante in Exon 21. Für das Codon 893 wurden sowohl die Kombinationen GCT und TCT, als auch ACT identifiziert. Das GCT-Triplett, welches für Alanin kodiert, trat mit einer Allelhäufigkeit von 52% auf. Die Allelfrequenz für das Serin kodierende TCT-Triplett lag bei 38%. Für das ACT-Triplett, das für Threonin kodiert, wurde eine Allelfrequenz von 10% beschrieben. Für das A-Allel konnten keine homozygoten Träger unter den Probanden gefunden werden. Es waren 24% der Individuen homozygote Träger des G-Allels und 14% homozygot für das T-Allel.

Neben den oben genannten SNPs wurden zusätzlich 4 intronische und stille Polymorphismen untersucht, die nicht zu einem Aminosäureaustausch führen. Der stille Polymorphismus 3435C>T in Exon 26 wies dabei eine besonders hohe Allelfrequenz von 51% auf. Für das T-Allel wurden 13 homozygote Individuen gefunden. Auch die T>A-Variante in Intron 16 (Exon17-76) hatte eine hohe Allelfrequenz von 47%. Homozygote Träger für das A-Allel waren 22% der

Probanden. Für die C>T-Variante in Intron 6 (Exon 6+139) betrug die T-Allelfrequenz 39% und die Frequenz der homozygoten T-Allelträger 14%. Eine geringere Allelfrequenz mit 7% hatte der G>A-Polymorphismus in Intron 1 (Exon 2-1). Keiner der untersuchten Probanden war homozygot für das A-Allel. Die Genotyphäufigkeitsverteilung in der vorliegenden Studie zeigte keine signifikanten Deviationen vom berechneten Konfidenzintervall von 95% (nach dem Gesetz von Hardy-Weinberg). Die Verteilungshäufigkeit der Genotypen deckte sich gut mit den Ergebnissen vorheriger Studien an kaukasischer Bevölkerung (37, 38). In der Tabelle 3.1 werden die genannten Polymorphismen mit deren Genotyphäufigkeit getrennt dargestellt.

Tabelle 3.1: Darstellung der Polymorphismen mit Allel- und Genotyphäufigkeiten

Lokalisation	Position	Allel	Effekt	Allelhäufigkeit (%)	Genotyp	beobachtete Genotyphäufigkeit (%)	Genotyphäufigkeit 95% K.-I.
Intron 1	Exon 2-1	G A	Translations- initiierung ?	93,0 7,0	G/G G/A A/A	86,0 14,0 0,0	73,3-94,2 5,8-26,7 0,0-0,1
Exon2	cDNA 61	A G	21 Asn 21 Asp	87,0 13,0	A/A A/G G/G	74,0 26,0 0,0	59,7-85,4 14,6-40,3 0,0-0,1
Intron 6	Exon 6+139	C T	?	61,0 39,0	C/C C/T T/T	36,0 50,0 14,0	22,9-50,8 35,5-64,7 5,82-26,74
Exon 11	cDNA 1199	G A	400 Ser 400 Asn	98,0 2,0	G/G G/A A/A	96,0 4,0 0,0	86,3-99,5 0,5-13,7 0,0-0,1
Intron 16	Exon 17-76	T A	?	53,0 47,0	T/T T/A A/A	28,0 50,0 22,0	16,2-42,5 35,5-64,5 11,5-35,7
Exon 21	cDNA 2677	G T A	893 Ala 893 Ser 893 Thr	52,0 38,0 10,0	G/G G/T T/T G/A T/A A/A	24,0 42,0 14,0 14,0 6,0 0,0	13,1-38,2 28,2-57,0 5,8-26,7 5,8-26,7 1,3-16,6 0,0
Exon 26	CDNA 3435	C T	Wobble	49,0 51,0	C/C C/T T/T	24,0 50,0 26,0	13,1-38,2 35,5-64,5 14,6-40,3

Die Position der Polymorphismen bezieht sich auf das Referenztypallel der *MDR1*-DNA (GenBank Code AC002457/AC005068). Die Base A des ATG-Startcodons wurde an die erste Stelle gesetzt. Intronische SNPs werden auch beschrieben als Exon±n, wobei n für die Anzahl der vor- bzw. nachgeordneten Basen des Exons steht.

3.2 Ergebnisse der Digoxin-Kinetik

Die Probanden wurden für den jeweiligen Polymorphismus nach Referenztypallel, heterozygoter und homozygoter Variante eingeteilt. Für jeden Probanden wurde eine Kinetik mittels Mikropartikelenzym Immunoessay (MEIA) nach oraler Gabe von 1 mg Digoxin ermittelt. Die Abbildung 3.1 stellt die Konzentrations-Zeit-Kurven zweier Probanden der Genotypisierungsgruppen CC (Probandennummer G243) und TT (Probandennummer 16) für Exon 26 3435C>T anhand einer Liniengraphik im Vergleich dar. Diese beiden Kurven sind jedoch nicht repräsentativ für das Ergebnis der statistischen Auswertung. Sie dienen der Veranschaulichung der Spannweite zweier verschiedener Konzentrations-Zeitkurven.

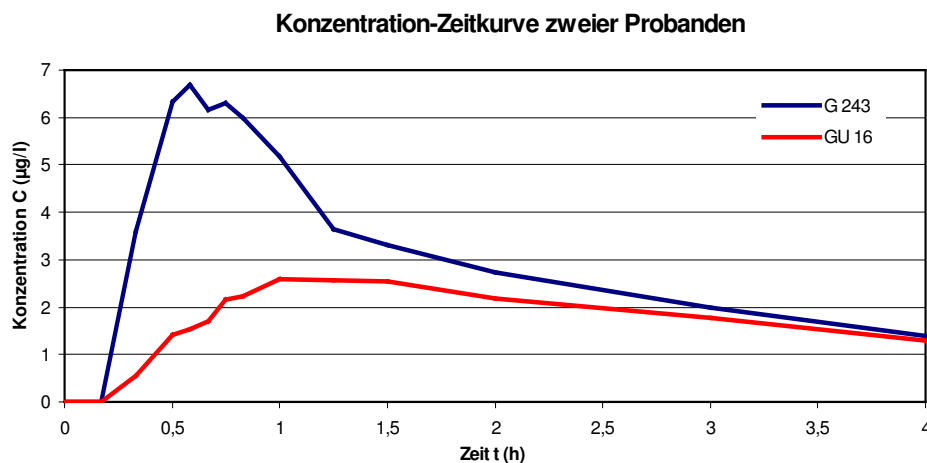


Abbildung 3.1: Beispielkinetiken der Probanden G234 und GU16.

3.3 Zusammenhang zwischen *MDR1*-Polymorphismen und Digoxin-Kinetiken

Nach Auswertung der Digoxin-Kinetiken wurde die Zielfrage geprüft, ob die jeweiligen Genotypen mit den kinetischen Parametern korrelieren. Dafür wurden die Ergebnisse für C_{max} , T_{max} und die AUC statistisch ausgewertet. Die gemessenen pharmakokinetischen Parameter des Referanztypallels und der Träger von Genpolymorphismen wurden verglichen unter Anwendung des nichtparametrischen Tests nach Kruskal-Wallis. Ein p-Wert unter 0,10 deutet auf einen Trend zwischen den einzelnen Genotypen hin.

In den Tabellen 3.2-4 sind die Medianwerte für AUC, C_{max} und T_{max} für jeden Polymorphismus und der Prüfwert als p angegeben. P-Werte wurden nicht angegeben für Probandengruppen mit $n < 4$.

Tabelle 3.2: AUC-Medianwerte

Lokalisation	Position	Genotyp	AUC Medianwert (g*h/l)	p-Wert
Intron 1	Exon 2-1	G/G	11,63	0,426
		G/A	10,04	
Intron 6	Exon 6+139	C/C	8,01	0,785
		C/T	11,63	
		T/T	9,66	
Intron 16	Exon 17-76	T/T	8,22	0,718
		T/A	11,63	
		A/A	8,01	
Exon 2	cDNA 61	A/A	8,01	0,091
		A/G	9,93	
Exon 11	cDNA 1199	G/G	9,38	
		G/A	10,21	
Exon 21	cDNA 2677	G/G	8,22	0,875
		G/T	10,66	
		T/T	8,22	
		G/A	10,96	
		T/A	10,76	
Exon 26	cDNA 3435	C/C	9,24	0,295
		C/T	6,93	
		T/T	9,38	
Exon 21/ Exon 26	cDNA 2677/3435	G/G C/C	9,06	0,393
		T/T T/T	9,06	

Tabelle 3.3: Tmax-Medianwerte

Lokalisation	Position	Genotyp	Tmax Medianwert t (h)	p-Wert
Intron 1	Exon 2-1	G/G	0,71	0,232
		G/A	0,93	
Intron 6	Exon 6+139	C/C	1,01	0,907
		C/T	0,71	
		T/T	1,63	
Intron 16	Exon 17-76	T/T	1,63	0,228
		T/A	0,71	
		A/A	1,01	
Exon 2	cDNA 61	A/A	1,01	0,815
		A/G	0,75	
Exon 11	cDNA 1199	G/G	0,89	
		G/A	1,18	
Exon 21	cDNA 2677	G/G	1,01	0,736
		G/T	0,8	
		T/T	1,63	
		G/A	1,04	
		T/A	0,69	
Exon 26	cDNA 3435	C/C	0,79	0,871
		C/T	1,38	
		T/T	0,89	
Exon 21/ Exon 26	cDNA 2677/3435	G/G C/C	0,9	0,478
		T/T T/T	1,11	

Tabelle 3.4: Cmax-Medianwerte

Lokalisation	Position	Genotyp	Cmax Medianwert (µg/l)	p-Wert
Intron 1	Exon 2-1	G/G	5,18	0,780
		A/G	3,63	
Intron 6	Exon 6+139	C/C	3,34	1,00
		C/T	4,52	
		T/T	3,34	
Intron 16	Exon 17-76	T/T	2,98	0,294
		T/A	5,18	
		A/A	3,34	
Exon 2	cDNA 61	A/A	3,34	0,382
		G/A	4,52	
Exon 11	cDNA 1199	G/G	3,82	0,198
		G/A	3,26	
Exon 21	cDNA 2677	G/G	3,34	0,648
		G/T	5,08	
		T/T	2,98	
		G/A	3,60	
		T/A	4,74	
Exon 26	cDNA 3435	C/C	4,73	0,799
		C/T	2,54	
		T/T	3,81	
Exon21/ Exon 26	CDNA 2677/3435	G/G C/C	3,48	0,712
		T/T T/T	3,69	

In den Abbildungen 3.2-4 sind die Zusammenhänge zwischen den Polymorphismen und den Werten für die AUC, Tmax und Cmax in Box plots graphisch dargestellt. Jedem Genotyp wurde dabei eine Box (rot) zugeordnet. Box plots sind sogenannte Quartillen-plots. Unterhalb des ersten Quartils (untere Grenze der Box) liegen 25% der Beobachtungen, darüber liegen 75%. Unterhalb des oberen Quartils (obere Grenze der Box) liegen analog 75% der Beobachtungen. Die horizontale Linie innerhalb der Box gibt den Medianwert an. Die Grenzen des durch Querstriche angegebenen Bereiches, der jeweils zu einer Box gehört (Range), geben den größten bzw. kleinsten erfassten Wert an. Unterhalb der x-Achse ist die Anzahl der Individuen pro Genotyp angegeben.

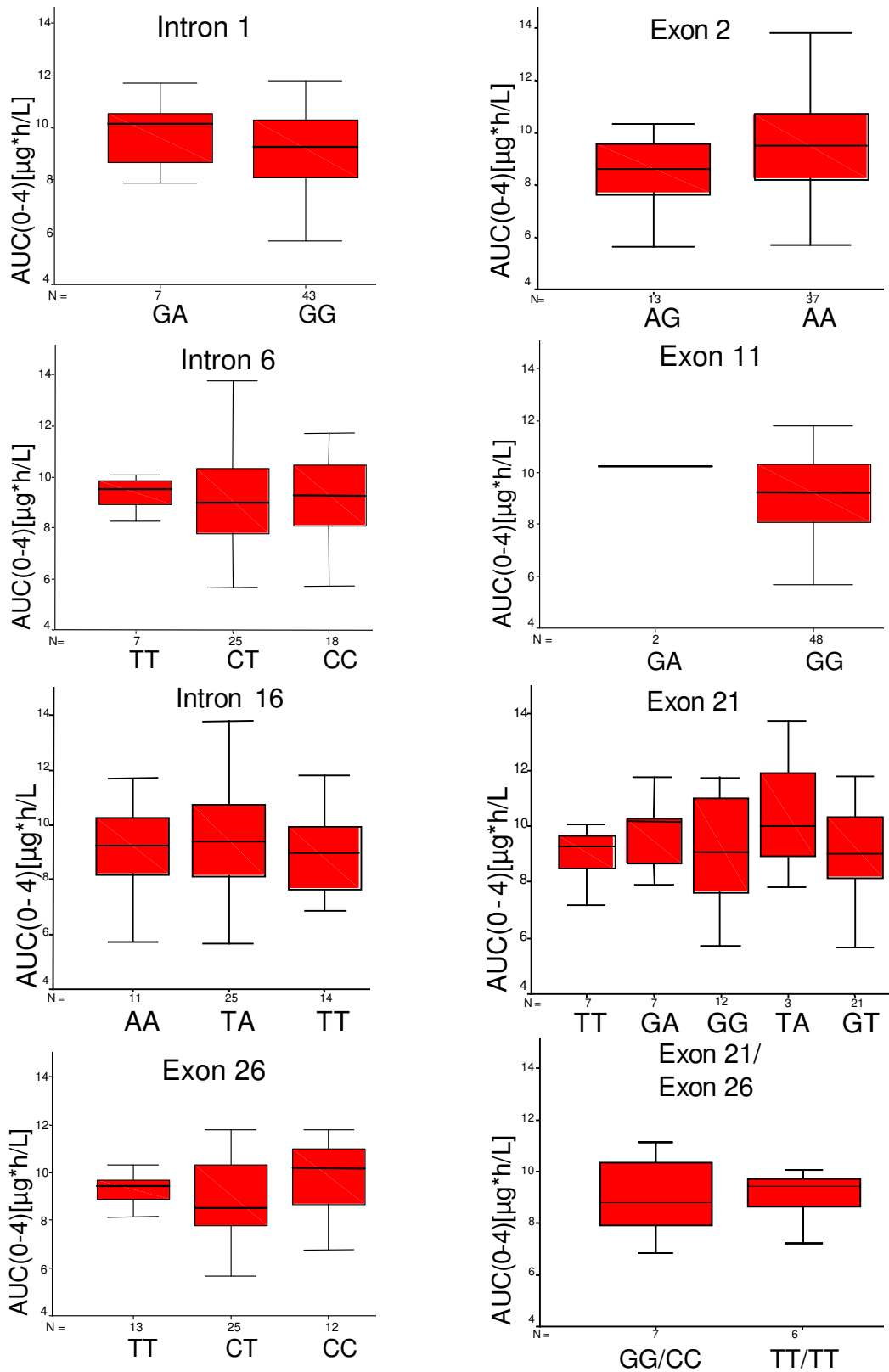
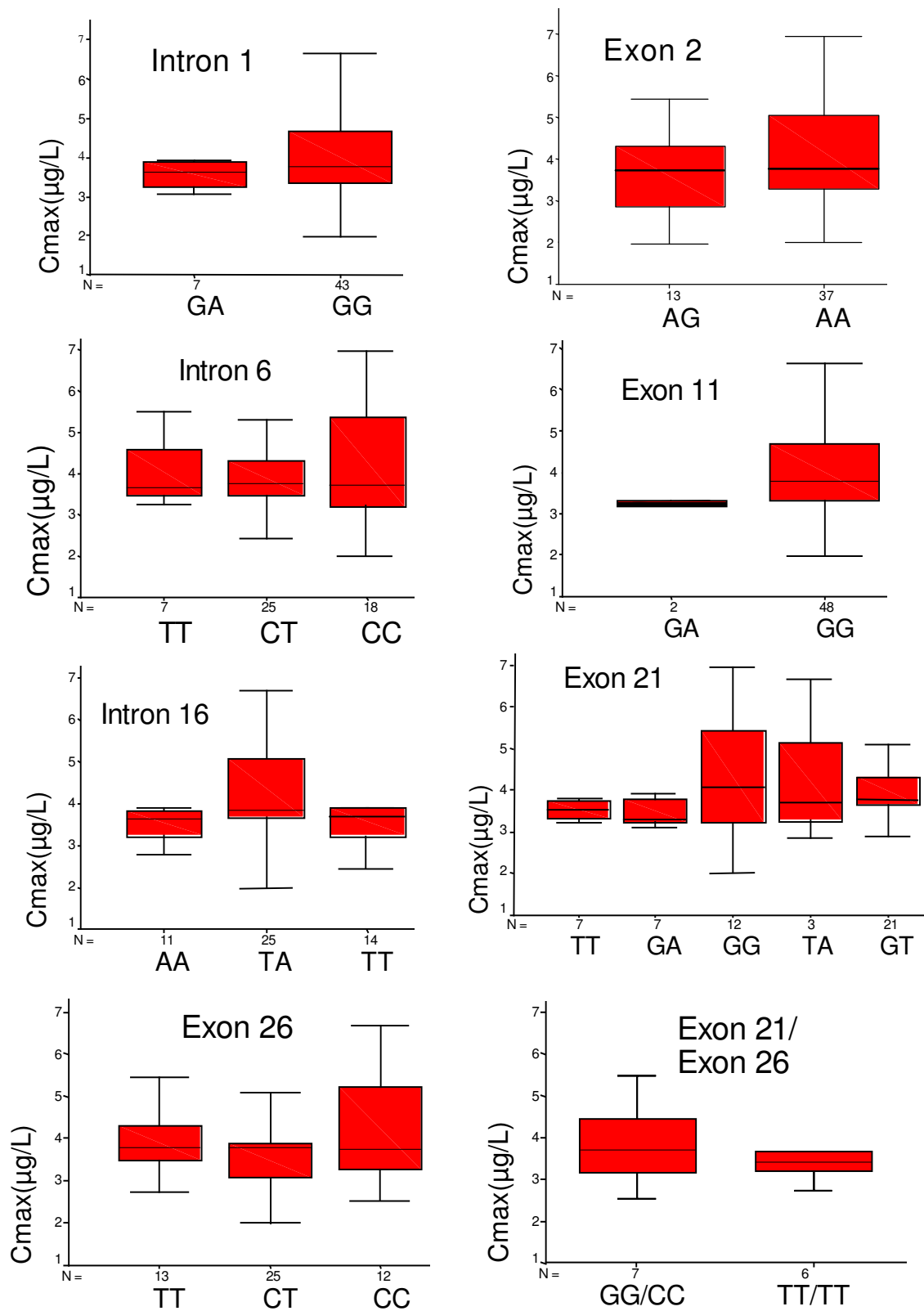


Abbildung 3.2: Abhängigkeit der AUC von den untersuchten Polymorphismen

Abbildung 3.3: Abhängigkeit der Tmax von den untersuchten Polymorphismen



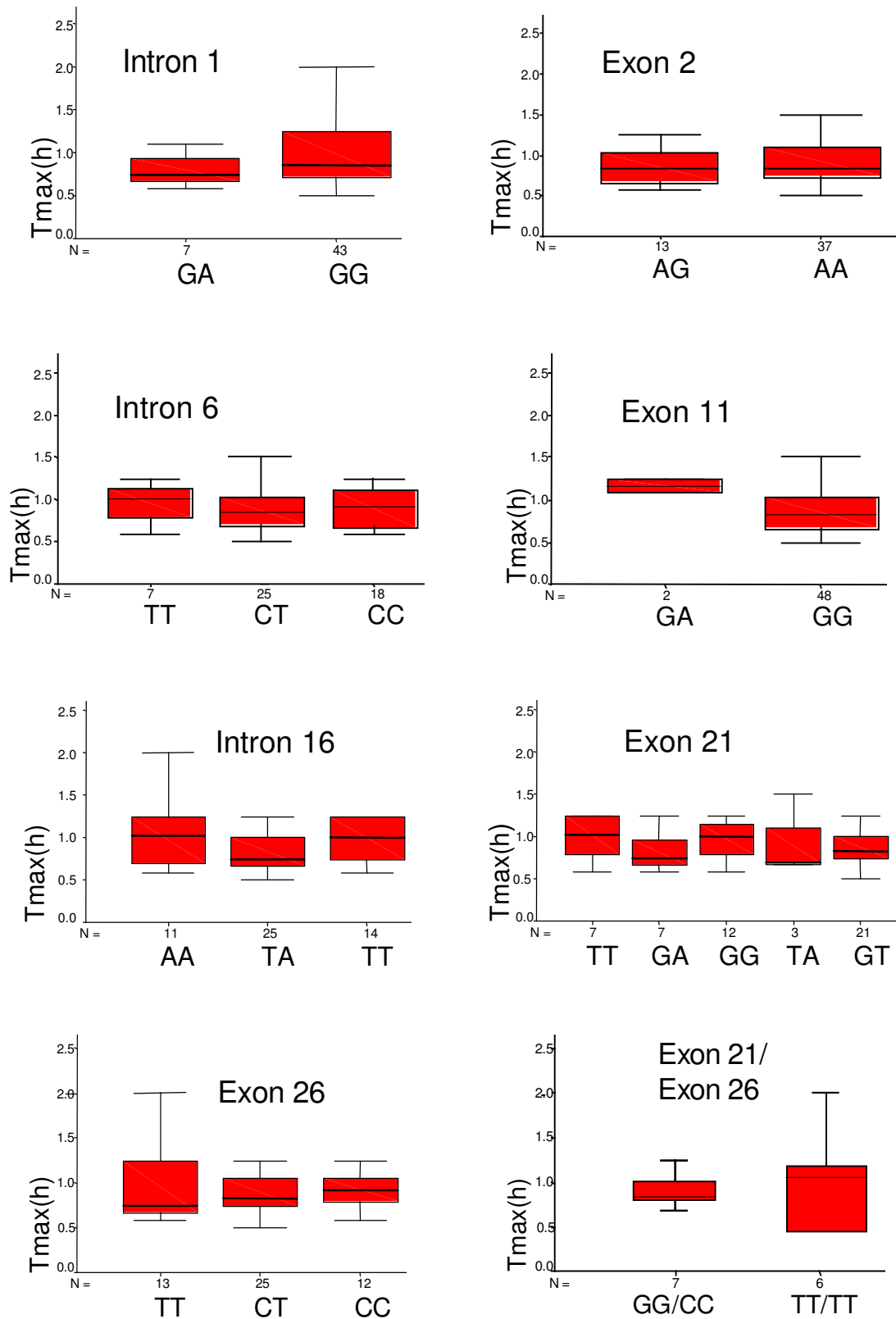


Abbildung 3.4: Cmax in Abhängigkeit von den Polymorphismen

Die Unterschiede in den kinetischen Parameteren der verglichenen Genotypen des 3435C>T-Genpolymorphismus in Exon 26 waren nicht signifikant [Medianwerte: AUC (rt)=9,24 (Angabe in $\mu\text{g}\cdot\text{h/l}$); AUC (het)=6,93; AUC (hom)=9,38; Cmax (rt) 4,73 (Angabe in $\mu\text{g/l}$); Cmax (het)=2,54; Cmax (hom)=3,81; Tmax (rt)=0,97 (Angabe in h); Tmax (het)=1,38; Tmax (hom)=0,89]. Die Berechnung der Signifikanz ergab folgende p-Werte: p (AUC)=0,295; p (Cmax)=0,799; p (Tmax)=0,871.

Beim Vergleich der Medianwerte für den Exon-2-Polymorphismus zeigten sich ebenso keine signifikanten Unterschiede [AUC (rt)=8,01; AUC (het)=9,93; Cmax (rt)=3,34; Cmax (het)=4,52; Tmax (rt)=1,1; Tmax (het)=0,75; p (AUC)=0,426; p (Cmax)=0,328; p (Tmax)=0,815]. Auch die Unterschiede für den Exon-11-Polymorphismus waren nicht signifikant [AUC (rt) 9,38; AUC (het)=10,21; Cmax (rt)=3,28; Cmax (het)=3,26; Tmax (rt)=0,89; Tmax (het)=1,18]. Nach Kruskal-Wallis ergaben sich folgende Werte: für die p (AUC)=0,267; für p (Cmax)=0,198 und für Tmax p=0,149. Die Medianwerte für den Exon-21-Polymorphismus, der wie auch die oben genannten Genpolymorphismen zu einem Aminosäureaustausch führt, zeigten keinen signifikanten Zusammenhang [p (AUC)=0,8; p (Cmax)=0,648, p (Tmax)=0,736].

Für die intronischen Polymorphismen, die nicht zu einem Aminosäureaustausch führten [Intron 1 (Exon 2-1); Intron 6 (Exon 6+ 139) und Intron 16 (Exon 17-76)], ergab die statistische Auswertung der Medianwerte für die AUC, Cmax und Tmax keinen signifikanten Unterschied.

Zusammenfassend konnten in keinem der Zielparameter AUC, Tmax und Cmax signifikante Differenzen zwischen den einzelnen Genotyp-Gruppen und dem Referenztyp parallel beobachtet werden. Auch nach Anpassen des individuellen Körpergewichts der Probanden an den idealen Body-Maß-Index zum Ausblenden interindividueller Differenzen und erneuter Gegenüberstellung der Genotyp-Gruppen (in dieser Arbeit nicht dargestellt) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den relevanten Parametern der Digoxin-Kinetik.

Der Vergleich von Allelkombinationen aus miteinander verknüpften *MDR1*-Polymorphismen ergab ebenfalls keine Differenzen zwischen Individuen mit dem Genotyp Exon 21 2677GG/Exon 26 3435 CC und Trägern des Genotyps Exon 21 2677TT/ Exon 26 3435TT. Weitere homozygote Allelkombinationen wurden aufgrund geringer Frequenzen nicht untersucht.
