

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie

(Prof. Dr. med. J. Brockmöller)

im Zentrum Pharmakologie und Toxikologie

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Erblichkeit in der Aktivität der Enzyme CYP2D6 und CYP2C9 sowie
des Transporters OATP1B1 unter Berücksichtigung der bereits
bekannten genetischen Varianten**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Johannes Matthaei

aus

Göttingen

Göttingen 2014

Dekan: Prof. Dr. Heyo K. Kroemer

I. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Jürgen Brockmöller

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Heike Bickeböller

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Margarete Schön

Tag der mündlichen Prüfung: 06.08.2014

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden teilweise im Rahmen eines Vortrags und eines Posters präsentiert:

Matthaei J: Heritability of the *in vivo* activities of hepatic enzymes CYP1A2, CYP2C9 and CYP2D6: Preliminary data of the TWINS study (gehalten am 11.10.2013), 15. Jahreskongress Klinische Pharmakologie, Düsseldorf, 10. / 11. Oktober 2013

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit beschränkt sich diese Arbeit auf die Verwendung männlicher Substantive (u. a. Studienteilnehmer, Proband) bzw. Pronomina, bezieht sich damit jedoch grundsätzlich im gleichen Maße auch auf weiblich Personen (u. a. Studienteilnehmerin, Probandin).

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.....	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Pharmakogenetik und -genomik und Individualisierte Medizin	1
1.1.1 Definition und beispielhafte Anwendungen in der Klinik.....	1
1.1.2 Gründe der Variation in Arzneimittelwirkungen und Nebenwirkungen	2
1.1.3 Kurzer historischer Abriss der Pharmakogenetik und -genomik.....	4
1.2 Genetische Variation im Arzneistoffmetabolismus	5
1.2.1 Arzneistoffmetabolismus.....	5
1.2.2 Cytochrom-P450-Enzyme (CYP).....	7
1.2.2.1 Das Cytochrom-P450-Enzym 2D6.....	7
1.2.2.2 Das Cytochrom-P450-Enzym 2C9	9
1.3 Genetische Variation im Arzneistofftransport	11
1.3.1 Arzneimitteltransport über Zellmembranen	11
1.3.2 Arzneimitteltransporter OATP1B1	12
1.4 Kurzer Abriss über weitere pharmakogenetisch relevante Variationen.....	12
1.5 Methoden der Erforschung genetischer Variation und Erbllichkeit.....	13
1.5.1 Bevölkerungsstudien	14
1.5.2 Familienstudien	14
1.5.3 Zwillingsstudien.....	15
1.6 Die in dieser Arbeit untersuchten Arzneimittel Torasemid und Metoprolol.....	17
1.6.1 CYP2D6: Testsubstanz Metoprolol.....	17
1.6.2 CYP2C9 und OATP1B1: Testsubstanz Torasemid.....	19
1.7 Aufgabenstellung	19
2 MATERIAL UND METHODEN.....	21
2.1 Studiendesign (Klinische Studie).....	21
2.1.1 Probandenauswahl.....	21
2.1.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien.....	21
2.1.1.2 Voruntersuchungen der Probanden	23
2.1.2 Verwendete Arzneimittel	23

2.1.3	Zeitlicher Ablauf der Studie	24
2.1.4	Allgemeines und Verhaltensmaßnahmen während der Studie	26
2.1.4.1	Ernährungs- und Verhaltensregeln	26
2.1.4.2	Studienabbruch	26
2.1.4.3	Ethische und rechtliche Aspekte	26
2.1.4.4	Änderungen des Studienprotokolls.....	27
2.1.4.5	Dokumentation durch <i>case report forms</i> (CRFs)	27
2.1.4.6	Datenschutz	28
2.2	Interventionen.....	29
2.2.1	EKG.....	29
2.2.2	Blutentnahmen	29
2.2.4	Verabreichung und Dosierung der Medikamente.....	29
2.3	Bioanalytische Methoden.....	30
2.3.1	Messungen der Blutkonzentrationen von Metoprolol und Torasemid	30
2.3.2	Genetische Typisierungen und Bestimmung des Zwillingsstatus	31
2.3.2.1	CYP2D6- CYP2C9- und OATP1B1-Polymorphismen.....	32
2.4	Pharmakokinetische Parameter und deren Bestimmung.....	33
2.5	Methoden der statistischen Datenauswertung	36
3	ERGEBNISSE	39
3.1	Demographische Daten	39
3.1.1	Studienteilnehmer.....	39
3.1.2	„Vorübung“: Erblichkeit von Gewicht, Größe und <i>body mass index</i>	39
3.1.3	Sicherheitsaspekte während der Studie	41
3.2	Genvarianten von CYP2D6, CYP2C9 und OATP1B1.....	42
3.3	CYP2D6 - Pharmakokinetik von Metoprolol.....	44
3.3.1	Pharmakokinetische Parameter in der Gesamtgruppe	44
3.3.2	Pharmakokinetische Parameter in den Gruppen der Monozygoten und Dizygoten	46
3.3.3	Erblichkeit der Variation der Metoprolol-Pharmakokinetik.....	49
3.3.3.1	Korrelationen und Näherungsformeln für Erblichkeit.....	49
3.3.3.2	Erblichkeit nach Strukturgleichungsmodellierung	53
3.3.3.3	Erblichkeitsberechnung aus intra- und interindividueller Variation.....	53
3.3.4	Berücksichtigung bereits bekannter Genotypen und anderer Einflussfaktoren	55
3.3.5	Zusammenfassung: Erblichkeit der CYP2D6-Aktivität	57
3.4	CYP2D6 - Pharmakokinetik von Alpha-Hydroxymetoprolol	58
3.4.1	Pharmakokinetische Parameter in der Gesamtgruppe	58
3.4.2	Erblichkeit der pharmakokinetischen Parameter von Alpha- Hydroxymetoprolol.....	58

3.5	CYP2C9 und OATP1B1 - Pharmakokinetik von Torasemid	59
3.5.1	Pharmakokinetische Parameter in der Gesamtgruppe	59
3.5.2	Pharmakokinetische Parameter in den Gruppen der Monozygoten und Dizygoten	61
3.5.3	Erblichkeit der Variation der Torasemid-Pharmakokinetik.....	63
3.5.3.1	Korrelationen und Näherungsformeln für Erblichkeit.....	63
3.5.3.2	Erblichkeit nach Strukturgleichungsmodellierung	65
3.5.3.3	Erblichkeitsberechnung aus intra- und interindividueller Variation.....	66
3.5.4	Berücksichtigung bereits bekannter Genotypen und anderer Einflussfaktoren	67
3.5.5	Zusammenfassung: Erblichkeit der CYP2C9- und OATP1B1-Aktivität	69
3.6	CYP2C9 und OATP1B1 - Pharmakokinetik von Hydroxytorasemid	70
3.6.1	Pharmakokinetische Parameter in der Gesamtgruppe	70
3.6.2	Erblichkeit der pharmakokinetischen Parameter von Hydroxytorasemid	71
4.	DISKUSSION	72
4.1	Erblichkeit der CYP2D6-Aktivität anhand der Pharmakokinetik der Testsubstanz Metoprolol	72
4.1.1	Pharmakokinetik von Metoprolol und Alpha-Hydroxymetoprolol	72
4.1.2	Erblichkeit der CYP2D6-Aktivität	73
4.2	Erblichkeit der CYP2C9- und OATP1B1-Aktivität anhand der Pharmakokinetik der Testsubstanz Torasemid	76
4.2.1	Pharmakokinetik von Torasemid und Hydroxytorasemid	76
4.2.2	Erblichkeit der CYP2C9-Aktivität	77
4.2.3	Erblichkeit der OATP1B1-Aktivität.....	78
4.3	Verfahren zur Ermittlung der Erblichkeit	80
4.4	Ausblick	84
5.	ZUSAMMENFASSUNG	86
6.	LITERATUR	88

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Übersicht zum Arzneistofftransport und -metabolismus	6
Abbildung 2 2-Kompartimentmodell	33
Abbildung 3 Biphasischer Verlauf im 2-Kompartimentmodell	34
Abbildung 4 Strukturgleichungsmodellierung	37
Abbildung 5 Erblichkeit demographischer Daten	40
Abbildung 6 Konzentrations-Zeit-Kurven von Metoprolol (Gesamtpopulation)	45
Abbildung 7 Konzentrations-Zeit-Kurven von Metoprolol (einzelne Zwillingspaare)	47
Abbildung 8 Korrelationen Nicht-Kompartimentanalyse (Metoprolol)	49
Abbildung 9 Ausreißer Korrelationskoeffizienten bei Metoprolol	52
Abbildung 10 Individueller Verlauf der AUC_{0-inf} (Metoprolol)	54
Abbildung 11 AUC_{0-inf} stratifiziert nach CYP2D6-Phänotyp	56
Abbildung 12 Erblichkeit der Aktivität von CYP2D6	57
Abbildung 13 Konzentrations-Zeit-Kurven von Torasemid (Gesamtpopulation)	60
Abbildung 14 Korrelationen Nicht-Kompartimentanalyse (Torasemid)	64
Abbildung 15 Individueller Verlauf der AUC_{0-inf} (Torasemid)	66
Abbildung 16 Aktivität von CYP2C9	68
Abbildung 17 Einfluss OATP1B1-Polymorphismus	69
Abbildung 18 Erblichkeit der Aktivität von CYP2C9 und OATP1B1	70
Abbildung 19 Erblichkeit der Aktivität von CYP2D6	76
Abbildung 20 Erblichkeit der Aktivität von CYP2C9 und OATP1B1	80

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 CYP2D6-Geno- und Phänotypen	9
Tabelle 2 CYP2C9-Varianten und interethnische Häufigkeitsunterschiede	10
Tabelle 3 Erblichkeitsberechnungen nach Vesell	16
Tabelle 4 Studienablauf	24
Tabelle 5 Studienphasen detailliert	25
Tabelle 6 Ernährungs- und Verhaltensregeln	26
Tabelle 7 Intra- und interindividuelle Variation	38
Tabelle 8 Demographische Daten der Studienpopulation	39
Tabelle 9 Strukturgleichungsmodellierung Demographie	41
Tabelle 10 Ergebnisse der CYP2D6-Geno- und Phänotypen	43
Tabelle 11 Ergebnisse der CYP2C9-Geno- und Phänotypen	43
Tabelle 12 Ergebnisse der OATP1B1-Polymorphismen	44
Tabelle 13 Ergebnisse der OATP1B1-Genotypen	44
Tabelle 14 Pharmakokinetische Parameter von Metoprolol (Gesamtpopulation)	46
Tabelle 15 Nicht-Kompartimentanalyse von Metoprolol (mono- versus dizygot)	48
Tabelle 16 Kompartimentanalyse von Metoprolol (mono- versus dizygot)	48
Tabelle 17 Korrelationen und Erblichkeit bei Metoprolol	51
Tabelle 18 Ausreißer Erblichkeit bei Metoprolol	52
Tabelle 19 Reproduzierbarkeit der Erblichkeitsschätzungen an 3 Studienphasen	52
Tabelle 20 Strukturgleichungsmodellierung der Erblichkeit von Metoprolol	53
Tabelle 21 Genetische Komponente (Metoprolol)	55
Tabelle 22 Multiple lineare Regressionsanalyse CYP2D6	56
Tabelle 23 Pharmakokinetische Parameter von Alpha-Hydroxymetoprolol	58
Tabelle 24 Korrelationen und Erblichkeit bei Alpha-Hydroxymetoprolol	59
Tabelle 25 Genetische Komponente (Alpha-Hydroxymetoprolol)	59
Tabelle 26 Pharmakokinetische Parameter von Torasemid (Gesamtpopulation)	61
Tabelle 27 Nicht-Kompartimentanalyse von Torasemid (mono- versus dizygot)	62
Tabelle 28 Kompartimentanalyse von Torasemid (mono- versus dizygot)	62
Tabelle 29 Korrelationen und Erblichkeit bei Torasemid	63
Tabelle 30 Strukturgleichungsmodellierung der Erblichkeit von Torasemid	65
Tabelle 31 Genetische Komponente (Torasemid)	67
Tabelle 32 Multiple lineare Regressionsanalyse CYP2C9 und OATP1B1	68
Tabelle 33 Pharmakokinetische Parameter von Hydroxytorasemid	70
Tabelle 34 Korrelationen und Erblichkeit bei Hydroxytorasemid	71
Tabelle 35 Genetische Komponente (Hydroxytorasemid)	71
Tabelle 36 Studien mit intravenöser Metoprololapplikation	73
Tabelle 37 Studien mit intravenöser Torasemidapplikation	76
Tabelle 38 Variation in der Aktivität von CYP2C9	78

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AE	unerwünschtes Ereignis (<i>adverse event</i>)
AIC	Akaike Informationskriterium (<i>Akaike information criterion</i>)
AR	unerwünschte Arzneimittelwirkung (<i>adverse reaction</i>)
Asn130Asp	Aminosäuresubstitution Asparagin → Asparaginsäure an Position 130
AUC	Fläche unter der Kurve (<i>area under the curve</i>)
AUMC	Fläche unter der ersten Momentkurve (<i>area under the first moment curve</i>)
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BMI	<i>body-mass-index</i>
Cl	Clearance
CRF	Dokumentationsformular (<i>case report form</i>)
CYP	Cytochrom-P450-Enzym
CYP2C9	Cytochrom-P450-Enzym 2C9
CYP2D6	Cytochrom-P450-Enzym 2D6
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
EM	schneller Metabolisierer (<i>extensive metabolizer</i>)
EudraCT	Register für Klinische Studien, die mit Humanarzneimitteln in der Europäischen Union durchgeführt werden (<i>European clinical trials database</i>)
H^2	Erblichkeit (<i>heritability</i>)
$H^{2(F)}$	Erblichkeit nach Falconer
$H^{2(V)}$	Erblichkeit nach Vesell
HEM	heterozygoter extensiver Metabolisierer
IM	intermediärer Metabolisierer
i.v.	intravenös
k.A.	keine Angabe
MR	Metabolisierungsquotient (<i>metabolic ratio</i>)
MRT	mittlere Verweildauer (<i>mean residence time</i>)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger-ribonucleic acid</i>)
n.s.	nicht signifikant

OATP1B1	Organisches Anionen Transport Polypeptid 1B1
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PM	langsamer Metabolisierer (<i>poor metabolizer</i>)
p.o.	per os
r_{DZ}	Pearson-Korrelationskoeffizient bei dizygoten Geschwistern
r_{MZ}	Pearson-Korrelationskoeffizient bei monozygoten Geschwistern
r^2	Bestimmtheitsmaß
SAE	schwerwiegendes unerwünschtes Ereignis (<i>serious adverse event</i>), ohne Klärung der Kausalität
SAR	schwerwiegende unerwünschte Arzneimittelreaktion (<i>serious adverse reaction</i>), Kausalität zumindest möglich
SD_b	interindividuelle (<i>between subject</i>) Standardabweichung
SD_w	intraindividuelle (<i>within subject</i>) Standardabweichung
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
SOP	Standard-Arbeitsanweisung (<i>standard operating procedure</i>)
SUSAR	Verdachtsfall einer unbekanntem schwerwiegenden Arzneimittelnebenwirkung (<i>suspected unexpected serious adverse reaction</i>)
TP	definierter Zeitpunkt während des Studienablaufs (<i>time point</i>)
TPMT	Thiopurin-Methyltransferase
$t_{1/2 \alpha}$	initiale Halbwertszeit
$t_{1/2 \beta}$	terminale Halbwertszeit beim 2-Kompartiment-Modell
$t_{1/2 \text{ Lambda } z}$	terminale Halbwertszeit
UM	ultraschneller Metabolisierer (<i>ultrarapid metabolizer</i>)
Val174Ala	Aminosäuresubstitution Valin → Alanin an Position 174
V_c	Volumen im zentralen Kompartiment (<i>central</i>)
V_E	Variation durch Umweltfaktoren (<i>environmental</i>)
V_G	genetische Variation
V_{iE}	Variation durch individuelle Umwelteinflüsse (<i>environmental</i>)
V_M	Variation durch Messfehler
V_P	phänotypische Variation
V_{sE}	Variation durch gemeinsame Umwelteinflüsse (<i>shared environmental</i>)
V_{ss}	Volumen im <i>steady state</i>

1 Einleitung

1.1 Pharmakogenetik und -genomik und *Individualisierte Medizin*

1.1.1 Definition und beispielhafte Anwendungen in der Klinik

Pharmakogenetik und Pharmakogenomik sind Forschungsbereiche der Pharmakologie. Ziel ist es, individuelle Besonderheiten von Arzneimittelwirkungen auf Grundlage der individuellen genetischen Ausstattung eines Menschen zu erklären (Evans und McLeod 2003). Arzneimittelwirkungen und alle weiteren biologischen Merkmale (Phänotypen) des Menschen weisen mehr oder weniger große Variation zwischen den Menschen auf. Als Erbllichkeit (*heritability*, H^2) bezeichnet man hier den Anteil der genetischen Variation an der Gesamtvariation des Phänotyps. Die Pharmakogenetik befasst sich in der Regel mit dem Einfluss spezifischer Gene und deren Varianten auf die Wirkungen und Nebenwirkungen von Arzneimitteln. Die Pharmakogenomik bezieht sich eher auf genomweite Analysen. Die Spannweite der Arzneimittelwirkung bei gleicher Dosis kann dabei individuell von Therapieversagen bis hin zu toxischer Überdosierung reichen. Auch die Analyse nicht-dosisabhängiger Arzneimittelnebenwirkungen (z.B. Allergie) gehört in den Bereich der Pharmakogenetik. Des Weiteren werden Untersuchungen zur erblichen Variation in Relation zu Krankheitsrisiken oft dem Bereich Pharmakogenetik zugeordnet.

Ein wichtiges Ziel pharmakogenetischer Untersuchungen wird auch mit dem Begriff der *Individualisierten Medizin* umschrieben. Mit Hilfe der *Individualisierten Medizin* soll jeder Mensch bei Krankheit eine stratifizierte Arzneitherapie erhalten. Je nach genetischen Ausstattungen, die mittels genetischer Tests identifiziert werden sollen, kann einem Patienten dann eine stratifizierte und weitgehend individuelle Pharmakotherapie verordnet werden, die möglichst nur die gewünschten Wirkungen hervorruft. Über- oder Unterdosierungen sollen so vermieden werden. Das Wort *stratifiziert* bedeutet, dass man meist nicht wirklich auf ein Individuum angepasste Lösungen finden kann. Es wird vielmehr die Therapie ausgewählt, die zu dem *Stratum*, der Schicht bzw. der Untergruppe, zu der der jeweilige Mensch gehört, passt. Dabei ist wichtig hervorzuheben, dass bei *Individualisierter Medizin* neben der genetischen Ausstattung sehr viele weitere individuelle Faktoren berücksichtigt werden müssen (Alter, Geschlecht und Begleiterkrankungen bis hin zu individuellen Wünschen der Patienten).

Ein Beispiel für die mögliche Anwendung pharmakogenetischen Wissens in der heutigen Arzneitherapie stellt die Bestimmung der Thiopurin-Methyltransferase (TPMT) dar, die

Antimetabolite aus der Gruppe der Thiopurine wie Azathioprin und 6-Mercaptopurin metabolisiert und inaktiviert. Nach Organtransplantationen und bei Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wird Azathioprin zur Immunsuppression eingesetzt. Dabei kann es bei einigen Genvarianten zu einer TPMT-Defizienz und folgender Akkumulation der zytotoxischen aktiven Metaboliten von Azathioprin im hämatopoetischen Gewebe kommen, wodurch eine Knochenmarksdepression hervorgerufen wird. Bei einer von 300 Personen bestehen ein kompletter TPMT-Mangel und ein resultierendes stark erhöhtes Risiko für Nebenwirkungen bei der Anwendung von Azathioprin (Sahasranaman et al. 2008). Eine vor Therapie durchgeführte TPMT-Genotypisierung (Bestimmung der Genvarianten, die bekanntermaßen zu Funktionsverlust des Enzyms führen) könnte dieses Risiko vermindern (McLeod und Siva 2002). Alternativ kann man in diesem Fall auch eine Phänotypisierung durchführen, indem man die Aktivität des Enzyms TPMT im Blut misst oder nach einer ersten Dosis von Azathioprin die Konzentrationen der Azathioprin-Metaboliten im Blut bestimmt.

1.1.2 Gründe der Variation in Arzneimittelwirkungen und Nebenwirkungen

Es ist bekannt, dass auf viele Medikamente nur ein Teil der Patienten anspricht und die Medikamentenwirkung je nach Therapiegebiet sehr variiert: So werden bei 20 bis 50% der Patienten, die mit Betablockern und Antidepressiva behandelt werden, unzureichende therapeutische Effekte erzielt oder die Therapie muss wegen Nebenwirkungen abgebrochen werden (Eichelbaum et al. 2002). Diese gegenwärtigen Unzulänglichkeiten der Arzneitherapie werden hier aus einem einfachen Grund hervorgehoben: Würde ein Medikament bei allen Menschen wirken und keine Nebenwirkungen verursachen, wäre nichts weiter mit Forschung im Bereich der Pharmakogenetik zu erklären oder zu verbessern. Nur herrschen derartig „paradiesische“ Zustände für die wenigsten Medikamente.

Statistisch betrachtet erfolgen 5,3% aller Krankenhauseinweisungen aufgrund von unerwünschten Nebenwirkungen (Kongkaew et al. 2008). Die Kosten der Hospitalisierungen belaufen sich dabei allein in Deutschland auf schätzungsweise 400 Millionen Euro im Jahr (Schneeweiss et al. 2002). In der Todesursachenstatistik stehen unerwünschte Arzneimittelwirkungen in den USA auf dem fünften Platz, noch vor Unfällen und Diabetes Mellitus (Nebert 1999). Die absoluten Zahlen für Todesfälle aufgrund von Arzneimittelnebenwirkungen in Deutschland liegen bei 16.000 – 25.000 pro Jahr (Pfunder 2013).

Es gibt vielfältige Erklärungsversuche für inter- und intraindividuelle Unterschiede in der Wirksamkeit von Medikamenten und für das Auftreten von Nebenwirkungen. Sowohl die Pharmakokinetik (Wirkungen des Körpers auf das Arzneimittel, also Absorption, Distribution, Metabolisierung, Elimination eines Stoffes) als auch die Pharmakodynamik (Wirkungen des Arzneimittels auf den Körper, also Stimulation und Blockade von Rezeptoren, Induktion und Inhibition von Enzymaktivitäten, Öffnung und Blockade von Ionenkanälen etc.) von Arzneimitteln variieren von Mensch zu Mensch. Daraus können inter- und intraindividuelle Unterschiede in der Wirkung und im Auftreten von Nebenwirkungen bei der Einnahme eines Arzneimittels erklärt werden (Evans und Relling 1999).

Variationen in Genen sind nur eine Ursache für diese Unterschiede. Dabei lassen sich Auswirkungen auf die interindividuellen Unterschiede in der Wirkung von Arzneimitteln mit genetischen Polymorphismen (ein monogen vererbtes Merkmal, das in mindestens zwei Phänotypen auftritt und eine Allelfrequenz in der Bevölkerung von mindestens 1% besitzt) und seltenen genetischen Varianten (die Allelfrequenz in der Bevölkerung beträgt weniger als 1%) erklären.

Weitere Ursachen für Unterschiede in der Pharmakokinetik und -dynamik von Arzneimitteln können durch Arzneimittelinteraktionen erklärt werden. Hier sind eine ganze Reihe von Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Arzneimitteln bekannt, die zu Nebenwirkungen oder Therapieversagen führen können (Cascorbi 2012). Auch Ernährungsfaktoren können für inter- und intraindividuelle Unterschiede im Stoffwechsel von Medikamenten verantwortlich sein: So können beispielsweise Milchprodukte aufgrund des hohen Kalziumanteils zu Komplexbildungen mit einigen Antibiotika und damit zu abgeschwächter Aufnahme im Magen-Darm-Trakt führen. Bei dem Versuch, den Einfluss von Alkohol auf die Konzentrationsverläufe des Kalzium-Antagonisten Felodipin zu bestimmen, wurde, um die Versuchsteilnehmer möglichst bezüglich der Frage, wer im Alkohol- und wer im Placebo-Arm ist, zu verblinden, bitterer Grapefruitsaft beigemischt. Dabei zeigte sich, dass Alkohol keinen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von Felodipin ausübt, der hinzugefügte Grapefruitsaft hingegen schon (Bailey et al. 1989). In weiteren Studien erkannte man, dass auch eine Reihe weiterer Arzneimittel (zum Beispiel Ciclosporin, Midazolam) durch Grapefruitsaft in ihrer Wirkung verstärkt oder abgeschwächt werden (Ho et al. 2001; Arayne et al. 2005). In Arzneimittelstudien ist es deshalb üblich, die Patienten oder Probanden während der Studiendauer auf einen Verzicht von Grapefruitsaft hinzuweisen. Alkohol und Zigarettenrauch können zusätzlich zu Veränderungen der Pharmakokinetik und

Pharmakodynamik von Arzneimitteln führen (Smith 2009). Allgemein bekannt ist auch, dass eine Nieren- und/oder Leberinsuffizienz zu einer Veränderung der Arzneimittelwirkung führen kann. Metaboliten werden im Falle einer Leberfunktionsstörung je nach Schweregrad vermindert oder nicht gebildet und entsprechend reduziert über die Galle ausgeschieden. Dies führt bei vielen Medikamenten je nach wirksamem Metaboliten zu Über- oder Unterdosierungen. Patienten mit einer Niereninsuffizienz können Arzneimittel nicht im normalen Maße über den Urin ausscheiden. Auch das Lebensalter spielt eine wichtige Rolle für den Arzneimittelstoffwechsel. Die kindlichen Nieren und die Leber sind bei Geburt noch nicht vollständig funktionsfähig und entwickeln sich in den ersten Lebensmonaten (Kearns et al. 2003). Alte Menschen haben in der Regel eine reduzierte Metabolisierungsfähigkeit. Gewicht, Geschlecht und Schwangerschaft sind weitere bedeutende Faktoren, die Einfluss auf die Wirkung eines Arzneimittels ausüben. Für die Wirksamkeit einer Pharmakotherapie ist selbstverständlich die Compliance eines Patienten von eminenter Bedeutung. Vor allem in der psychiatrischen Arzneimitteltherapie gibt es große Differenzen zwischen den verordneten Mengen und der tatsächlichen Einnahme eines Medikamentes (McDonald et al. 2002).

1.1.3 Kurzer historischer Abriss der Pharmakogenetik und -genomik

Der Ursprung der Pharmakogenetik und -genomik kann bereits in der Antike gefunden werden. So beschrieb Pythagoras ca. 500 vor Christus, dass einige Personen nach dem Verzehr der Fava-Bohne lebensbedrohliche Symptome entwickelten, die heute am ehesten als Hämolyse eingeordnet werden würden (Somogy 2008). Diese Beobachtungen der interindividuellen Nahrungsverträglichkeit wurden in den dreißiger Jahren des 19. Jahrhunderts um eine interindividuelle Variation bei der Einnahme von Arzneimitteln ergänzt. So begründete Garrod den Begriff der „Chemical Sensitivity“ und meinte damit, dass eine Standarddosis eines Stoffes nicht bei allen Menschen den gewünschten Effekt erzielt, sondern auch unwirksam oder toxisch sein kann (Garrod 1931). In einer der ersten pharmakogenetischen Studien wurde der erbliche Anteil an Unterschieden in der Fähigkeit, Phenylthiocarbamid zu schmecken, beschrieben. Dabei wurden erhebliche individuelle und auch interethnische Unterschiede gefunden. In der europäischen und nordamerikanischen Bevölkerung konnten 70% den Stoff schmecken, unter den Afro-Amerikanern lag diese Quote bei 91% (Somogy 2008). In den 1950 Jahren wurden drei wichtige pharmakogenetische Entdeckungen gemacht: 1) Im 2. Weltkrieg löste die Behandlung mit Primaquin, einem Mittel bei Malaria, bei 10% der afroamerikanischen Soldaten schwere

hämolytische Krisen aus. Der Grund hierfür liegt in einer Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Defizienz (Alving et al. 1956). 2) Kalow konnte die erblich bedingt teils sehr langen Apnoe-Phasen nach der Behandlung mit Succinylcholin mit individuellen Pseudocholinesterasen-Aktivitäten erklären (Kalow und Gunn 1957). 3) Die genetische Ursache für schnelle und langsame Acetylierung von Isoniazid wurde erforscht (Evans et al. 1960) und damit eine der Ursachen für gelegentliche schwere neuro- und hepatotoxische Effekte identifiziert. Motulsky verfasste einen ersten Review aus dem Bereich der Pharmakogenetik, in dem er feststellte, dass Erbllichkeit die interindividuellen Unterschiede in der Arzneimittelwirkung erklären könnte (Motulsky 1957). Der Begriff der „Pharmakogenetik“ als die Erforschung genetisch vererbter Bedingungen, die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Arzneimitteln beeinflussen, wurde 1959 von Friedrich Vogel geprägt. Vesell begann bereits in den 1960er Jahren erste Zwillingsstudien durchzuführen, um genetisch bedingte Unterschiede in der Pharmakokinetik zu erforschen (Vesell und Page 1968a; Vesell und Page 1968b; Vesell und Page 1968c). Dies war zu einer Zeit, als die spezifischen relevanten Enzyme und Transportproteine noch nicht identifiziert waren. Der CYP2D6-Polymorphismus wurde in den 1970er Jahren von Smith und Mahgoub sowie Eichelbaum entdeckt und nach den zur Identifizierung führenden Arzneimitteln Debrisoquin-Hydroxylase-Polymorphismus (Mahgoub et al. 1977) oder Spartein-Hydroxylase-Polymorphismus (Eichelbaum et al. 1979) benannt, wobei das Gen und die genetische Grundlage der Variation erst etwa 10 Jahre später molekulargenetisch charakterisiert werden konnte (Gonzalez et al. 1988). Über die nächsten Jahre wurden immer weitere CYP-Polymorphismen aufgeschlüsselt. Der bereits beispielhaft erwähnte Thiopurin-Methyltransferase-Mangel wurde 1980 entdeckt (Weinshilboum und Sladek 1980).

1.2 Genetische Variation im Arzneistoffmetabolismus

1.2.1 Arzneistoffmetabolismus

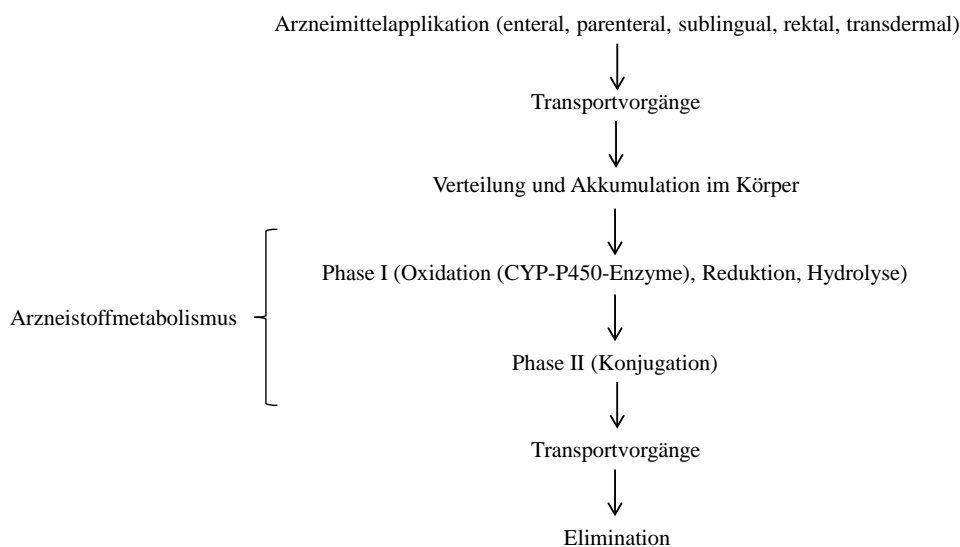
Der menschliche Körper besitzt die Fähigkeit, körperfremde Stoffe, wie beispielsweise Arzneimittel, mit Hilfe enzymatischer Reaktionen in Stoffwechselprodukte (Metabolite) umzuwandeln, deren Ausscheidung über die Leber oder die Nieren möglich ist. Somit wird einer Akkumulation toxischer Substanzen entgegengewirkt. Diese Vorgänge werden als Biotransformation im Rahmen des Arzneistoffmetabolismus bezeichnet und lassen sich in Phasen unterteilen, durch die eine Umwandlung lipophiler Stoffe in wasserlösliche Formen

und damit deren Ausscheidung erreicht wird. Dabei finden diese Reaktionen zu großen Teilen in der Leber statt.

In der Phase I des Arzneimittelstoffwechsels werden durch Oxidation, Reduktion und Hydrolyse funktionelle Gruppen eingeführt oder freigelegt. Oxidationsreaktionen spielen dabei die größte Rolle. Sehr viele der Oxidationsreaktionen werden durch Cytochrom-P-450 (kurz CYP) Monooxygenasen katalysiert. In der Phase II werden Konjugationen der Phase I-Produkte mit wasserlöslichen Molekülen vermittelt. Hierdurch können Arzneimittel leichter über die Nieren und Gallenwege ausgeschieden werden. Reaktionen der Phase II sind z.B. die Konjugation (Kopplung) mit Glutathion, Glukuronsäure oder Essigsäure, die durch Glutathion-S-Transferasen, UDP-Glucuronyltransferasen oder Arylamin-N-Acetyltransferasen katalysiert werden.

Bevor Substanzen in der Zelle metabolisiert werden können, müssen sie in die Zelle hineintransportiert werden. Und die Metabolite müssen später wieder aus der Zelle heraustransportiert werden. Bei physiologischen pH-Werten negativ geladene Medikamente werden zum Beispiel durch organische Anionentransporter der Familien OAT und OATP in Zellen hineintransportiert. Bei physiologischen pH-Werten positiv geladene Medikamente werden unter anderem durch die Kationentransporter OCT-1 bis -3 in Zellen hineintransportiert (Influx-Transport). Durch Vertreter der ATP-bindenden Kassetten (ABC)-Transporterfamilie wie das P-Glykoprotein (auch *multidrug resistance protein 1*, MDR1, genannt) werden insbesondere eher lipophile Medikamente aus der Zelle heraustransportiert (Efflux-Transport).

Abbildung 1 Übersicht zum Arzneistofftransport und -metabolismus



Schematische Darstellung des Weges von Arzneimitteln durch den Körper

1.2.2 Cytochrom-P450-Enzyme (CYP)

Cytochrom-P450-Enzyme (CYP) sind wesentlich für inter- und intraindividuelle Variation im Arzneistoffmetabolismus verantwortlich (Tucker 2000). Sie sind die wichtigsten Vertreter der Phase-I-Enzyme. Es handelt sich um ubiquitäre Enzyme, die auch in Bakterien und Pflanzen vorkommen. Beim Menschen sind 18 Subtypen mit zurzeit 57 nachgewiesenen und funktionellen CYP-Enzymen bedeutsam (Nelson 2009). CYP-Enzyme sind Hämoproteine, die zum größten Teil im endoplasmatischen Retikulum der Leberzellen verankert sind aber auch extrahepatisch exprimiert werden. Mit dem zentralen Eisenatom in den Proteinen wird Sauerstoff auf das Substrat nach folgender Formel übertragen (RH steht für das Substrat): $RH + O_2 + NADPH + H^+ \rightarrow R-OH + H_2O + NADP^+$. Diese Hydroxylierung ermöglicht die weitere Ausscheidung über die Galle und den Urin. Die Benennung (z. B. „CYP2D6“) erfolgt nach der Reihenfolge Familie („2“), Unterfamilie („D“) und Nummer für das einzelne Isoenzym („6“). Für den Arzneimittelstoffwechsel spielen dabei mit 70% aller Leber-Cytochrom-P-450-Enzyme die Untergruppen CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 und CYP3A die größte Rolle (Shimada et al. 1994). Diese Enzyme besitzen eine breite Substratspezifität, so dass der Metabolismus eines Arzneimittels häufig nicht nur durch ein einzelnes CYP-Enzym katalysiert wird, sondern durch eine Vielzahl dieser Enzyme. Der sogenannte *First-Pass-Effekt* von Arzneimitteln und damit das Ausmaß der Arzneimittelwirkung werden besonders durch die Aktivität der CYP-Enzyme beeinflusst. Viele CYP-Enzyme weisen funktionell bedeutsame Polymorphismen auf, so dass im menschlichen Organismus eine sehr große interindividuelle Variation der CYP-Enzyme vorliegt. Durch diese Polymorphismen kann es zu einer vollständigen Defizienz oder auch zu verstärkter Aktivität eines bestimmten Enzyms kommen. Hieraus können individuelle Unterschiede in Über- und Unterdosierungen bei Gabe der Standarddosis eines Medikamentes resultieren. Je nach CYP-Enzym-Familie sind eine Reihe von unterschiedlichen Polymorphismen bekannt, die unterschiedliche Enzymaktivitäten erklären können.

Im Folgenden werden die für diese Arbeit bedeutsamen Enzyme CYP2C9 und CYP2D6 sowie deren genetische Polymorphismen detailliert beschrieben.

1.2.2.1 Das Cytochrom-P450-Enzym 2D6

CYP2D6 ist das am meisten erforschte Enzym aus der Gruppe der Cytochrome-P-450. In den 60er und 70er Jahren des letzten Jahrhunderts wurden interindividuelle Unterschiede in den

Plasmakonzentrationen bei gleicher Dosis bezüglich der Arzneimittel Nortriptylin, Desipramin (Hammer und Sjoqvist 1967), Debrisoquin (Mahgoub et al. 1977) und Spartein (Eichelbaum et al. 1979) gefunden, die sich später alle als Substrate des Enzyms CYP2D6 herausstellten. Hieraus resultiert auch die Bezeichnung Spartein- und Debrisoquin-Polymorphismus. Eine erste molekulargenetische Charakterisierung des CYP2D6-Polymorphismus erfolgte einige Jahre später durch Gonzalez und Skoda (Gonzalez et al. 1988; Skoda et al. 1988). Es ist eine breite Palette von Arzneimitteln mit unterschiedlichsten Wirkstoffen bekannt, bei denen der Metabolismus teilweise oder komplett über CYP2D6 katalysiert wird. Hierzu gehören Antiarrhythmika der Klasse 1 (Ajmalin, Flecainid), Antidepressiva (Amitriptylin, Desipramin, Fluoxetin, Paroxetin), Neuroleptika (Haloperidol, Perazin), Betablocker (Metoprolol, Carvedilol), HT3-Antagonisten (Tropisetron) und Opioide (Oxycodon, Tramadol, Codein) (Eichelbaum et al. 2002). Insgesamt werden etwa 20-25% aller im klinischen Gebrauch befindlichen Arzneimittel über CYP2D6 verstoffwechselt, obwohl CYP2D6, gemessen an der Proteinexpression, nur einen geringen Anteil aller Cytochrom-P450-Enzyme in der Leber stellt (Ingelman-Sundberg 2005). CYP2D6 liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 22. Es sind bislang mehr als 100 verschiedene angeborene Varianten bekannt, die zu unterschiedlicher Enzymaktivität führen können. Interindividuell zeigt sich dies in ausgeprägten Unterschieden in der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik der über CYP2D6 aktivierten bzw. inaktivierten Arzneimittel.

Eine Aussage über den Phänotyp (Enzymaktivität) kann in vielen Fällen zuverlässig durch eine Genotypisierung getroffen werden (Sachse et al. 1997; Sachse et al. 1998; McElroy et al. 2000). Man unterscheidet je nach Kombination der autosomal-kodominant vererbten Allele fünf Phänotypen: langsame (*poor metabolizer* PM, 0 Aktivitätseinheiten), intermediäre (IM, 0,5 Aktivitätseinheiten), heterozygote schnelle (HEM, 1 Aktivitätseinheit), schnelle (*extensive metabolizer* EM, 1,5 bis 2 Aktivitätseinheiten) und ultraschnelle Metabolisierer (*ultrarapid metabolizer* UM, > 2 Aktivitätseinheiten). Die Bezeichnungen variieren gering zwischen den Autoren, sind aber ähnlich (Kirchheiner et al. 2004; Steimer et al. 2004). Tabelle 1 zeigt die Phänotypen von CYP2D6 bei Vorliegen entsprechender Genvarianten.

Tabelle 1 CYP2D6-Geno- und Phänotypen

Genvariante	PM	IM	EM	UM
	*3, *4, *5, *6	*9, *10, *17, *41	*1, *2, *35	*1 x 2, *2 x 2, *35 x 2
PM	PM (0)	IM (0,5)	HEM (1,0)	EM (2,0)
*3, *4, *5, *6				
IM		HEM (1,0)	EM (1,5)	UM (2,5)
*9, *10, *17, *41				
EM			EM (2)	UM (3)
*1, *2, *35				
UM				UM (4)
*1 x 2, *2 x 2, *35 x 2				

* beziffert jeweils die nummerierten genetischen Varianten im Gen CYP2D6, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden. PM = langsame Metabolisierer, IM = intermediäre Metabolisierer, HEM = heterozygot schnelle Metabolisierer, EM = schnelle Metabolisierer, UM = ultraschnelle Metabolisierer. In Klammern ist die Genaktivität dargestellt.

Eine Phänotypisierung kann auch durch die Gabe einer Testsubstanz, z. B. 10 mg Debrisoquin p.o., und Messung der Metaboliten nach einigen Stunden im Urin durchgeführt werden. Hierbei ist die Größe des Metabolischen Quotienten (= Konzentration der Ausgangssubstanz / Konzentration des Metaboliten) ausschlaggebend für die phänotypische Einordnung (Mahgoub et al. 1977).

Es liegt eine hohe interethnische Variation in der Häufigkeit der CYP2D6-Varianten vor. In der europäischen Bevölkerung findet man bei etwa 5 - 10% den langsamen Metabolisierertyp (PM) und bei 2 - 3% der Bevölkerung Genduplikationen und damit die erbliche Disposition für den ultraschnellen Metabolismus (UM). Etwa 65 - 80% der europäischen Bevölkerung werden den schnellen Metabolisierern (EM) zugeordnet. Für andere Populationen liegen andere Häufigkeiten vor (Bradford 2002). Es lässt sich ein von Norden nach Süden zunehmendes Vorkommen von ultraschnellen Metabolisierern erkennen. In Nordeuropa liegt die Frequenz von ultraschnellen Metabolisierern bei 1 - 2%, in Spanien bereits bei 10% und in Äthiopien bei etwa 30%. CYP2D6 zeigt eine hohe Affinität zu vielen Pflanzengiften, wie zum Beispiel Alkaloiden. So lässt sich möglicherweise das Nord-Süd-Gefälle evolutionär durch langandauernde Hungerphasen und damit die Notwendigkeit, auf ein breiteres Spektrum von Pflanzen als Nahrungsmitteln zuzugreifen, erklären (Ingelman-Sundberg 2005).

1.2.2.2 Das Cytochrom-P450-Enzym 2C9

Das Enzym CYP2C9 ist neben weiteren Isoenzymen (CYP2C8, CYP2C18 und CYP 2C19) Teil der CYP2C-Familie, die alle auf Chromosom 10 in einem Gencluster lokalisiert sind (Goldstein und de Morais 1994). In der menschlichen Leber stellt CYP2C9 mit circa 30% den

größten Teil aller CYP2C-Isoenzyme dar. Über 100 zurzeit verwendete Arzneimittel sind Substrate von CYP2C9, dies entspricht etwa 10% bis 20% aller häufig verschriebenen Medikamente (Kirchheiner und Brockmoller 2005). Unter anderen zählen hierzu das in den USA häufig verwendete Antikoagulanz Warfarin, die Angiotensin antagonistischen Losartan und Irbesartan, das Schleifendiuretikum Torasemid, das Antiepileptikum Phenytoin, der COX2-Hemmer Celecoxib und einige orale Antidiabetika (Rendic 2002). Des Weiteren ist CYP2C9 an der Metabolisierung von Fettsäuren und Steroidhormonen beteiligt. Es sind aktuell 58 Varianten bekannt (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c9.htm>; Stand Februar 2014). Für klinisch relevante interindividuelle Unterschiede im menschlichen Organismus sind jedoch bislang bei Populationen europäischer Abstammung vor allem zwei zum Aminosäureaustausch führende Mutationen von Bedeutung: CYP2C9*2 und CYP2C9*3. Der mit CYP2C9*1 bezeichnete Wildtyp enthält an der für Variationen relevanten Lokalisation die Aminosäuren Arginin und Isoleucin (Arg144/Ile359). Bei CYP2C9*2 liegt ein Austausch von Arginin durch Cystein vor (Cys144/Ile359), bei CYP2C9*3 findet ein Ersatz von Isoleucin durch Leucin statt (Arg144/Leu359) (Stubbins et al. 1996). Beide Variationen führen substratabhängig zu einer reduzierten Enzymaktivität von CYP2C9 (Kirchheiner und Brockmoller 2005). Interessant ist die Beschreibung einer kompletten Defizienz von CYP2C9 bei Vorliegen des inaktiven Allels CYP2C9*6, das bei 0,6% der afrikanischen Bevölkerung gefunden wurde (Kidd et al. 2001).

Die folgende Tabelle gibt Auskunft über Genotypfrequenz und Enzymaktivität in verschiedenen Bevölkerungsgruppen (Tabelle nach Kirchheiner und Brockmoller 2005):

Tabelle 2 CYP2C9-Varianten und interethnische Häufigkeitsunterschiede

Genotyp	Aktivität	Europäer[#]	Afrikaner[#]	Asiaten[#]
CYP2C9*1/*1	normal	65,3	87	96,5
CYP2C9*1/*2	gering erniedrigt	20,4	8,7	0
CYP2C9*2/*2	niedrig	0,9	0	0
CYP2C9*1/*3	niedrig	11,6	4,3	3,5
CYP2C9*2/*3	niedrig	1,4	0	0
CYP2C9*3/*3	sehr niedrig	0,4	0	0

[#] Angabe der Populationsfrequenz [%]; die genaue Aktivität in CYP2C9 ist substratabhängig. * bezieht die nummerierten und in dieser Studie untersuchten Genvarianten

Es ist ersichtlich, dass neben einer interindividuellen Variation auch eine ausgeprägte interethnische Variation im CYP2C9-Polymorphismus vorliegt. Studien belegen, dass Medikamente mit geringer therapeutischer Breite eine Anpassung der Dosierung je nach

Enzymaktivität erfordern können. Zu diesen Medikamenten zählen das bereits erwähnte Warfarin sowie Phenytoin, die bei homozygotem Vorliegen des Allels CYP2C9*3 zu ernststen Nebenwirkungen wie Blutungen oder Ataxie führen können (Goldstein 2001). Auch für orale Antidiabetika wie z.B. Sulfonylharnstoffe können Genvarianten in CYP2C9 möglicherweise eine klinische relevante Bedeutung haben (Holstein et al. 2011).

1.3 Genetische Variation im Arzneistofftransport

1.3.1 Arzneimitteltransport über Zellmembranen

Nach Aufnahme eines Arzneimittels gelangt dieses über den Blutfluss zu Leber und Nieren. In der Leber findet eine Umwandlung des Stoffes über Phase I und Phase II Enzyme mit anschließender Ausscheidung in die Gallenkanälchen statt. Die Aufnahme der Stoffe über die Zellmembranen ist durch biochemische Eigenschaften wie Größe, Lipophilität und Ladung reguliert. Zusätzlich gibt es eine Reihe von Transportern, die bestimmte endogene oder exogene Stoffe über die Zellmembran transportieren. Man kann zwischen Transportern unterscheiden, die Stoffe in eine Zelle transportieren (Influx-Transporter), und Transportern, die Substrate aus der Zelle hinaus schleusen (Efflux-Transporter) (Ho und Kim 2005). So besitzt der Mensch insgesamt 11 *organic anion transporting polypeptides* (OATP), die als Influx-Transporter wirken und durch die SLCO-Genfamilie codiert werden (Mikkaichi et al. 2004). Es sind eine Reihe von SNPs (Einzelnukleotid-Polymorphismen, *single nucleotide polymorphisms*) in der SLCO-Genfamilie bekannt, die Einfluss auf die Transportaktivität der OATPs ausüben (Tirona et al. 2001; Niemi et al. 2004). Zudem werden möglicherweise Arzneimittelinteraktionen durch OATP-Inhibitoren oder Induktoren ausgelöst.

Ein Beispiel für einen Efflux-Transporter stellt der *multidrug resistance protein 1* (MDR1) Transporter aus der Familie der ATP-bindenden Kassetten (ABC)-Transporter dar. Dieser spielt z. B. eine Rolle für die Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke sowie in der chemotherapeutischen Behandlung von Tumoren. Arzneimittel, die Substrate für MDR1 sind, sind durch die hohe Expression von MDR1 kaum zentral wirksam oder können nur in ungenügendem Maße an Tumorzellen wirken.

1.3.2 Arzneimitteltransporter OATP1B1

Der Transporter OATP1B1 (auch OATP2, OATP-C) befindet sich hauptsächlich an der basolateralen sinusoidalen Membran von menschlichen Hepatozyten und transportiert sowohl endogene Substrate (konjugierte und unkonjugierte Gallensäuren, Steroide, Eikosanoide und Schilddrüsenhormone) sowie eine Reihe von Arzneimitteln [unter anderen Statine, ACE-Hemmer und Torasemid (Vormfelde et al. 2008; Kalliokoski und Niemi 2009)]. Codiert wird OATP1B1 durch das SLCO1B1 Gen, das sich auf Chromosom 12 befindet (Kalliokoski und Niemi 2009). Besonders bedeutsam ist eine Mutation, die zum Austausch der Aminosäure Valin durch Alanin (Val174Ala) und in einer reduzierten Aktivität von OATP1B1 (Kameyama et al. 2005) resultiert. Häufig kann der Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) Asn130Asp (Austausch der Aminosäure Asparagin durch Asparaginsäure) nachgewiesen werden. Zwischen Val174Ala und Asn130Asp besteht ein Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium*). Das bedeutet in diesem Fall, dass die Kombination der beiden Polymorphismen gehäuft zusammen auftritt. Hieraus resultieren vier Haplotypen: Asn130Val174 (Synonym *1a), Asp130Val174 (*1b), Asn130Ala174 (*5) und Asp130Ala174 (*15). Es sind interethnische Unterschiede in Bezug auf die Allelfrequenz bekannt (Pasanen et al. 2008). Studien zeigen, dass Personen mit einem homozygoten Vorliegen der Mutation Val174Ala stark erhöhte Plasmakonzentrationsspiegel nach Gabe des HMG-CoA-Reduktasehemmers Pravastatin im Vergleich zu Personen ohne diese Mutation besitzen (Mwinyi et al. 2004; Ho et al. 2007). Unter 85 Patienten, die unter der Therapie mit Simvastatin eine Myopathie entwickelten, wiesen mehr als 60% eine Valin174Alanin-Mutation auf (Link et al. 2008). Bekannt ist auch, dass Cyclosporin die Plasmakonzentrationen von einigen Statinen erhöht, was möglicherweise durch eine Inhibition von OATP1B1 erklärt werden kann (Neuvonen et al. 2006).

1.4 Kurzer Abriss über weitere pharmakogenetisch relevante Variationen

Neben Variationen in Enzymen der Phase I und in Arzneimitteltransportern sind auch pharmakogenetisch relevante Variationen in Enzymen der Phase II bekannt. Hierzu zählt z.B. der Arylamin-N-Acetyltransferase 2 (NAT 2) Polymorphismus. Bei 55% der Europäer liegt eine erheblich reduzierte Aktivität vor (Kirchheiner et al. 2006). Stoffe wie Isoniazid, Hydralazin oder Sulfonamide verbleiben hierbei deutlich länger im Körper der betroffenen Personen und können zu Über- bis hin zu toxischen Dosierungen bei Standarddosis führen.

Genetische Variationen betreffen neben dem Arzneistoffmetabolismus und dem Arzneimitteltransport auch die Zielmoleküle von Arzneimitteln. So sind genetische Polymorphismen in den Beta-1- (Ser49Gly, Gly389Arg) und Beta-2- (Arg16Gly, Glu27Gln) Rezeptoren beschrieben, ohne dass jedoch bisher ein konsistent reproduzierbarer Zusammenhang zwischen Genotyp und Auswirkung auf die Rezeptoraktivität (und damit auf die Wirkung Beta-Rezeptor wirksamer Arzneimittel) gezeigt werden konnte (Brockmoller und Tzvetkov 2008).

1.5 Methoden der Erforschung genetischer Variation und Erbllichkeit

Interindividuelle Unterschiede in der Pharmakokinetik von Arzneimitteln lassen sich durch zwei Parameter beschreiben: 1. erbliche bzw. genetische Faktoren und 2. erworbene- bzw. Umweltfaktoren wie Ernährungsgewohnheiten (z.B. Rauchen und Alkohol) oder sportliche Aktivität. Erbllichkeit (*heritability*, H^2) beschreibt den Anteil an Variation bezüglich eines Phänotyps (V_P) der auf der genetischen Variation (V_G) innerhalb der untersuchten Population beruht ($H^2 = V_G / V_P$). Es lässt sich eine *broad* von einer *narrow heritability* unterscheiden. *Broad* bedeutet, dass sämtliche genetische Faktoren berücksichtigt werden (additive genetische Effekte, dominante genetische Effekte und Interaktionen). Bei der *narrow heritability* werden lediglich die additiven genetischen Effekte betrachtet. Schätzformeln zur Ermittlung der *broad heritability*, die auch in dieser Arbeit verwendet werden, sind die zunächst von Falconer eingeführte Formel ($H^{2(F)} = 2 * (r_{MZ} - r_{DZ})$) sowie die in Publikationen von Vesell verwendete Formel ($H^{2(V)} = r_{MZ} - r_{DZ} / 1 - r_{DZ}$), wobei in beiden Formeln r_{MZ} und r_{DZ} die Pearson Korrelationskoeffizienten der Messwerte monozygoter bzw. dizygoter Zwillinge sind (Falconer und MacKay 1996; Vesell 1978). Im Gegensatz dazu kann zum Beispiel bei der Analyse mittels Strukturgleichungsmodellierung zwischen additiven und dominanten Effekten differenziert werden (Rijsdijk und Sham 2002).

Nach Überlegungen von Werner Kalow lässt sich bei Arzneimitteln der erbliche Anteil von interindividuellen Unterschieden durch eine repetitive Gabe von Prüfsubstanzen und den Vergleich der intraindividuellen mit den interindividuellen Unterschieden in der Pharmakokinetik der verabreichten Arzneimittel quantifizieren (Kalow et al. 1998). Diese Methode basiert auf der Annahme, dass es sich bei Arzneimittelreaktionen um eine temporäre Erscheinung handelt und der erbliche Anteil deshalb durch die wiederholte Arzneimittelgabe ermittelt werden kann.

Andere Verfahren zur Erforschung genetischer Variationen und Erbllichkeit der Pharmakokinetik von Arzneimitteln sind Bevölkerungsstudien, Familienstudien und Zwillingsstudien. Sie werden im Folgenden näher beschrieben.

1.5.1 Bevölkerungsstudien

Die meisten Erkenntnisse in der Pharmakogenetik wurden in Studien an gesunden oder erkrankten Bevölkerungsstichproben gewonnen. Dabei wird einerseits der Phänotyp (z.B. Pharmakokinetik oder Nebenwirkung eines Medikaments) gemessen und andererseits der zugehörige Genotyp bestimmt. Hieraus ergibt sich dann, ob man besondere Phänotypen durch Genvarianten erklären kann.

Zudem können Bevölkerungsstudien zur Klärung interethnischer Unterschiede genetischer Variationen dienen. Hierbei wird das Auftreten bestimmter Genotypen in verschiedenen ethnischen Gruppen untersucht. Das Vorkommen von Unterschieden bezüglich der Prävalenz von Krankheiten oder der Häufigkeit bestimmter Genotypen in Bevölkerungsgruppen ist schon lange bekannt. Ein Beispiel hierfür ist die bereits erwähnte Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Defizienz. Etwa 400 Millionen Menschen sind weltweit erkrankt. Die Prävalenz unter Personen afrikanischen Ursprungs ist sehr viel höher als beispielsweise bei Europäern. Auch in Enzymen des Arzneistoffmetabolismus sind, wie oben dargestellt, zahlreiche interethnische Unterschiede beschrieben. Man erklärt sich Ursachen für interethnische Unterschiede als Anpassungsreaktion des Organismus auf regionale Umweltbedingungen.

1.5.2 Familienstudien

Bei Familienstudien betrachtet man den Anteil erblicher Faktoren innerhalb einer Familie. Verwandte ersten Grades (Eltern, Kinder, Geschwister) besitzen zu 50% übereinstimmende Gene. Neffen und Nichten stimmen statistisch zu 25% genetisch mit ihren Tanten und Onkeln überein. Bei Vorliegen eines interessierenden Phänotyps kann dabei durch Untersuchung der Verwandten abgeschätzt werden, ob eine höhere Prävalenz als in der Allgemeinbevölkerung vorliegt und damit eine erbliche Komponente zu vermuten ist. Bekannte Erbkrankheiten und möglicherweise auch der Modus der Vererbung (dominant versus rezessiv) können so innerhalb eines Stammbaums sichtbar gemacht werden. Eine häufige Anwendung von Familienstudien findet sich in der Psychiatrie, beispielsweise bei der Erforschung von

genetischen Einflussfaktoren auf ein Suchtverhalten. Auch in der Arzneimittelforschung werden Familienstudien angewendet, um den Erbgang eines Merkmals zu bestimmen (Vesell 1991). Familienstudien sind limitiert, da die Mitglieder einer Familie häufig gleichen Umweltfaktoren ausgesetzt sind und somit eine Differenzierung nach Erblichkeit bzw. gleichen Umweltfaktoren nicht möglich ist. Adoptionsstudien können diese Problematik umgehen, sind jedoch schwierig in ausreichender Teilnehmerzahl durchzuführen.

1.5.3 Zwillingsstudien

Zwillingsstudien bieten die Möglichkeit, genauer zwischen dem Einfluss von Umwelt- und genetischen Faktoren auf individuelle Merkmale wie die Pharmakokinetik von Arzneimitteln zu unterscheiden. Unterschieden werden muss zwischen monozygoten (eineiigen) und dizygoten (zweieiigen) Zwillingen. Monozygote Zwillingspaare sind zu 100% genetisch identisch. Dies resultiert durch eine einzelne befruchtete Eizelle, die sich in den Frühstadien der Entwicklung teilt. Dizygote Zwillinge teilen hingegen wie gewöhnliche Geschwister 50% der Erbanteile, jedoch mit dem Unterschied, dass durch ein gleiches Alter und auch das gleiche Alter der Mutter bei der Geburt, ein gemeinsamer Einfluss von Umweltfaktoren vorausgesetzt werden kann.

Die moderne Zwillingsforschung geht zurück auf Galton, der bereits in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts eine Studie an Zwillingen durchführte. Jedoch wurde damals noch nicht in mono- und dizygoten Zwillingen differenziert (Burbridge 2001). Die erste Studie mit der systematischen Unterscheidung von monozygoten und dizygoten Zwillingen wurde von Siemens zu Beginn des 20. Jahrhunderts durchgeführt. Dabei stellte er fest, dass bei es bei monozygoten Zwillingspaaren eine höhere Konkordanzrate (Übereinstimmungsrate) in der Anzahl von Muttermalen im Gesicht gibt als bei dizygoten (Ordonana et al. 2007).

Betrachtet man Zwillinge, lässt sich die Variation bestimmter Merkmale in drei Komponenten aufteilen: 1) Genetik (V_G), 2) gemeinsame Umwelteinflüsse (V_{sE}) und 3) individuelle Umwelteinflüsse (V_{iE}). Die Korrelationen bei monozygoten und dizygoten Zwillingen können wie folgt betrachtet werden:

$$\text{Korrelation}_{\text{monozygot}} = V_G + V_{sE}$$

$$\text{Korrelation}_{\text{dizygot}} = 0,5 * V_G + V_{sE}$$

Durch den Vergleich der Korrelationen lässt sich der genetische bzw. erbliche Anteil an der Variation verifizieren. Liegt bei monozygoten Zwillingen eine höhere Korrelation als bei

dizygoten Zwillingen vor, so lässt sich auf einen höheren erblichen Anteil in der Variation des betrachteten Merkmals schließen. Im Bereich der Pharmakologie wurden schon früh Zwillingsstudien angewendet, um zu evaluieren, in welchem Ausmaß die Variation in der Pharmakokinetik von Arzneimitteln durch genetische Faktoren oder durch Umweltfaktoren bedingt ist. Eine ganze Reihe von frühen Studien zeigte, dass interindividuelle Unterschiede im Metabolismus verschiedener Arzneimittel in hohem Maße durch genetische Ursachen bedingt sind. Untersuchte Arzneimittel waren unter anderen Phenylbutazon (Vesell und Page 1968a), Antipyrin (Vesell und Page 1968b), Nortriptylin (Alexanderson et al. 1969) und Dicumarol (Vesell und Page 1968c). Grundprinzip in all diesen Studien ist die Messung der Blutkonzentrationen nach Verabreichung eines Arzneimittels an mono- und dizygoten Zwillinge und die anschließende Ermittlung pharmakokinetischer Parameter (in den genannten Studien sind dies Halbwertszeit und Clearance). Die Erblichkeit wurde durch verschiedene Berechnungen ermittelt (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3 Erblichkeitsberechnungen nach Vesell

	Phenylbutazon	Antipyrin	Dicumarol
r_{MZ}	0,83	0,85	0,85
r_{DZ}	0,33	0,47	0,66
$H^{2(V)} = r_{MZ} - r_{DZ} / 1 - r_{DZ}$	0,75	0,72	0,56
$H^{2(F)} = 2 * (r_{MZ} - r_{DZ})$	1,0	0,76	0,38

r_{MZ} = Korrelationskoeffizient bei monozygoten Zwillingen, r_{DZ} = Korrelationskoeffizient bei dizygoten Zwillingen. Die Tabelle zeigt, dass je nach zugrunde gelegter Formel teilweise deutliche Unterschiede für den genetischen Einfluss berechnet werden. Je größer der ermittelte Wert für die beiden Formeln ist, umso größer ist der erbliche Anteil an der Gesamtvariation einzuordnen. Tabelle nach Vesell, 1989.

Die Möglichkeiten einer Genotypisierung bestanden jedoch zunächst noch nicht. Bei Feststellung einer genetischen Komponente wurden im Anschluss Familienstudien durchgeführt, um den Erbgang der Varianten zu bestimmen.

Für Zwillingsstudien sollen folgende Grundannahmen erfüllt sein, um die Ergebnisse auf die Gesamtpopulation übertragen zu können (Rijsdijk und Sham 2002):

- Monozygote und dizygoten Zwillingspaare teilen die auf sie wirkenden Umwelteinflüsse im gleichen Ausmaß
- Es liegen wenige bis keine Interaktionen zwischen Genen und Umweltfaktoren auf das beobachtete Merkmal vor
- Zwillinge unterscheiden sich nicht von der Allgemeinbevölkerung

Zur Evaluation des genetischen Anteils in der Variation der Aktivität von Cytochrom-P450-Enzymen wurde eine Zwillingsstudie mit 49 monozygoten und 34 dizygoten Zwillingspaaren durchgeführt, die die Aktivität von CYP1A2 untersucht hat (Rasmussen et al. 2002). Nach Gabe von 200 mg Koffein wurde die Koffein Ratio von Metaboliten im Urin als Marker für die CYP1A2-Aktivität ermittelt und mit Hilfe einer Strukturgleichungsmodellierung die Erbllichkeit berechnet. Hierbei wurden die Modellvariablen „additive genetische Effekte“ (A), „Effekte durch gemeinsame Umwelteinflüsse“ (C) und „Effekte durch individuelle Umwelteinflüsse“ (E) untersucht. Es zeigte sich eine Erbllichkeit von $A = 0,725$, so dass ein hauptsächlich erblicher Einfluss auf die interindividuelle Variation der Aktivität von CYP1A2 gefolgert wurde.

1.6 Die in dieser Arbeit untersuchten Arzneimittel Torasemid und Metoprolol

In dieser Arbeit werden Variationen im Stoffwechsel von Arzneimitteln betrachtet. Sämtliche Ergebnisse wurden im Rahmen der Zwillingsstudie „TWINS-II“ erhoben. Hierbei handelt es sich um eine Studie, bei der mit Hilfe der Auswertung pharmakokinetischer Parameter die Erbllichkeit der Variation in der Aktivität der Enzyme CYP2C9, CYP2D6 und des Arzneimitteltransporters OATP1B1 untersucht wurde. Frühere Studien haben bereits wiederholt den Einfluss genetischer Varianten der CYP-Enzyme 2C9 und 2D6 sowie des Transporters OATP1B1 auf die Absorption, Verteilung, Metabolisierung und Ausscheidung von Arzneimitteln gezeigt. Ziel bei „TWINS-II“ war es zu prüfen, inwiefern die interindividuelle Variation mit den bereits bekannten Genvariationen erklärt werden kann und welche Rolle bisher noch unbekannte Varianten spielen. Im Folgenden werden Metoprolol (Testsubstanz für CYP2D6) und Torasemid (Testsubstanz für CYP2C9 und OATP1B1) näher beschrieben.

1.6.1 CYP2D6: Testsubstanz Metoprolol

Metoprolol gehört zur Gruppe der Betablocker mit relativ hoher Beta-1-Selektivität („Kardioselektivität“) ohne intrinsische sympathomimetische Aktivität. Deutschlandweit ist Metoprolol mit einer definierten Tagesdosis von 892 Millionen im Jahr 2010 der am häufigsten verschriebene Betablocker. Metoprolol wird vor allem in der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen, wie arterieller Hypertonie, tachykarden Herzrhythmus-

störungen, Herzinsuffizienz und koronarer Herzkrankheit, eingesetzt. Es findet aber auch Anwendung bei der Anfallsprophylaxe von Migränepatienten und bei der Behandlung des essentiellen Tremors. Nebenwirkungen einer Therapie mit Metoprolol können unter anderen symptomatische Bradykardie, Müdigkeit, allergische Hautreaktionen, Parästhesien, Bronchospasmus, periphere Durchblutungsstörungen, Hypoglykämie und Potenzstörungen sein.

Nach oraler Applikation wird Metoprolol nahezu vollständig (ca. 95%) aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert. Durch einen ausgeprägten *First-Pass-Effekt* beträgt die systemische Verfügbarkeit bei oraler Applikation lediglich 35%. Die Ausscheidung von Metoprolol und seinen Metaboliten erfolgt zu etwa 95% über die Nieren mit einer Eliminationshalbwertszeit von 3 - 5 Stunden (Fachinfo-Beloc 2008). Der größte Anteil von Metoprolol wird in der Leber oxidativ metabolisiert und nur in sehr geringem Ausmaß unverändert über den Urin ausgeschieden (Regardh et al. 1974). Es sind drei Hauptmetabolisierungswege beschrieben (in Klammern jeweils die relative Häufigkeit zur gesamten ausgeschieden Menge) (Borg et al. 1975; Lennard et al. 1982):

1. O-Dealkylierung zu H105/22 mit anschließender Oxidation zu H117/04 (65%)
2. Hydroxylierung zu Alpha-Hydroxymetoprolol (10%)
3. Desaminierung der Isopropylamin-Seitenkette zu H104/83 (10%)

Die Metabolisierung zu H117/04 und die Reaktion zu Alpha-Hydroxymetoprolol sind CYP2D6-abhängig (McGourty et al. 1985). Metoprolol liegt als Razemat vor. Beide Enantiomere R- und S- Metoprolol werden über die dargestellten Metabolisierungswege abgebaut. Es kann eine leichte Enantioselektivität mit stärkerer Metabolisierung des R-Enantiomers beobachtet werden, die jedoch abhängig vom Phänotyp in CYP2D6 ist (Blake et al. 2013). Durch die CYP2D6-Abhängigkeit kann Metoprolol gut als Testsubstanz für die Aktivitätsmessung von CYP2D6 verwendet werden. Langsame Metabolisierer (PM) zeigten eine 6,2fach, intermediäre Metabolisierer (IM) eine 3,9fach höhere Plasmakonzentration von Metoprolol als schnelle Metabolisierer (EM) (Rau et al. 2002). Bei einer Langzeittherapie mit Metoprolol lässt sich keine Änderung in der Aktivität von CYP2D6 beobachten (Rau et al. 2002). Bei ultraschnellen Metabolisierern (UM) beträgt die Clearance von Metoprolol in etwa das 10fache der Clearance von langsamen Metabolisierern (PM). Die pharmakodynamischen Unterschiede (Herzfrequenzminderung, Blutdrucksenkung) sind jedoch wesentlich geringer ausgeprägt (Kirchheiner et al. 2004).

1.6.2 CYP2C9 und OATP1B1: Testsubstanz Torasemid

Torasemid ist ein sogenanntes Schleifendiuretikum. Es wirkt saluretisch im dicken Abschnitt der Henle-Schleife aufgrund einer Hemmung der renalen Natrium- und Chloridrückresorption. Torasemid ist auch bei stärkerer Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate von unter 20 ml/min noch wirksam.

Die Halbwertszeit beträgt 3 - 4 Stunden. Es unterliegt einem ausgeprägten hepatischen Metabolismus und wird über OATP1B1 in die Hepatozyten aufgenommen (Vormfelde et al. 2008). Dabei entstehen CYP2C9-abhängig 3 Metabolite mit unterschiedlichen Eigenschaften (Miners et al. 1995; Miners et al. 2000). Die Metabolite M1 (= Hydroxytorasemid) und M5 werden durch eine stufenweise Oxidation der Methylgruppe am Phenylring erzeugt. Der Metabolit M3 entsteht durch Ringhydroxylierung (Fachinfo-Torasemid 2006). Dabei geht die diuretische Wirkung im Wesentlichen von Torasemid selbst und dem Metaboliten M3 aus. M1 weist nur eine geringe diuretische Aktivität auf, M5 ist diuretisch unwirksam (Neugebauer et al. 1988). Torasemid unterliegt einer dosislinearen Kinetik. Die Elimination erfolgt zu 24% unverändert über die Niere und zu 57% in Form von Metaboliten. Den größten Anteil an der renalen Ausscheidung besitzt M5 mit 41% (M1 12%, M3 3%). Die totale Clearance beträgt 40 ml/min (renale Clearance = ca. 10 ml/min). Bei vorliegender Niereninsuffizienz sind die totale Clearance und die Eliminationshalbwertszeit unverändert. Allerdings verlängert sich die Halbwertszeit von M3 und M5, wobei die eigentliche Wirksamkeit und Wirkdauer unbeeinflusst bleiben. Eine Leberfunktionsstörung kann die Halbwertszeiten von Torasemid und dem Metabolit M5 verlängern. Eine Kumulation ist jedoch nicht zu erwarten. Ebenso konnte keine Abhängigkeit der Resorption von der Nahrungsaufnahme beobachtet werden (Fachinfo-Torasemid 2006).

Nebenwirkungen von Torasemid sind meist schwach ausgeprägt. Es kann der Wirkweise entsprechend zu Hypokaliämien und Hyperurikämien sowie orthostatischer Hypotension kommen. Ebenfalls sind eine Inappetenz oder Magenschmerzen beschrieben.

1.7 Aufgabenstellung

Variationen in der Pharmakokinetik von Medikamenten sind schon lange bekannt. In vielen Studien wurden sowohl intraindividuelle und interindividuelle als auch interethnische Unterschiede in der Pharmakokinetik von Arzneimitteln festgestellt. Ein nicht geringer Teil der interindividuellen und interethnischen Unterschiede ließ sich auf molekulargenetisch

definierte Varianten in Arzneimitteltransportern und in Arzneimittel-metabolisierenden Enzymen zurückführen.

Dabei lässt sich jedoch gegenwärtig mit den bereits bekannten Gen-Varianten nur ein Teil der interindividuellen Variation erklären. Unklar ist, wie groß der erbliche Anteil an Variation zwischen Personen ist, der auf bisher unbekanntem genetischen Varianten beruht. Zwillingsstudien bieten eine Möglichkeit, diesen erblichen Anteil genauer zu quantifizieren.

Zu diesem Zweck wurden im Rahmen der klinischen Studie „TWINS-II“ die Erblichkeit der Variation der Pharmakokinetik des Betablockers Metoprolol und des Diuretikums Torasemid untersucht. Diese beiden Medikamente interessierten hierbei weniger wegen ihrer therapeutischen Bedeutung, sondern vielmehr als Testsubstanzen für die Aktivitäten der Enzyme CYP2D6 (Metoprolol) und CYP2C9 (Torasemid) sowie des Transportproteins OATP1B1 (Torasemid). Hierzu wurde eine pharmakogenetische Studie an mono- und dizygoten Zwillingen durchgeführt. Dabei sollten Variationen in der Pharmakokinetik von Metoprolol als Variationen der Aktivität des Cytochroms 2D6 und Variationen in der Pharmakokinetik von Torasemid als Variationen der Aktivität des Cytochroms 2C9 sowie des Arzneimitteltransporters OATP1B1 interpretiert werden. Auch sollte analysiert werden, wie viel der pharmakokinetischen Variation durch die bekannten Gen-Varianten erklärt werden kann.

Zusammengefasst wurden folgende Ziele mit dieser Arbeit verfolgt:

1. Quantifizierung der Erblichkeit in der Variation der Aktivität der Enzyme CYP2D6, -2C9 und des Transporters OATP1B1.
2. Abschätzung des gegenwärtig erklärbaren Anteils dieser Erblichkeit durch die bekannten genetischen Varianten in der untersuchten Studienpopulation.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign (Klinische Studie)

2.1.1 Probandenauswahl

Frühere pharmakogenetische Studien, in denen monozygote und dizygote Zwillingspaare verglichen wurden, zeigten bereits, dass eine starke genetische Komponente in der Pharmakokinetik vieler Arzneimittel vorliegt (Vesell 1991). Es wurden jedoch nur geringe Anzahlen von Probanden untersucht und auch der molekulare genetische Hintergrund konnte damals noch nicht beschrieben werden. Zur weiteren Klärung, inwieweit sich Unterschiede in der Pharmakokinetik durch bekannte erbliche Mechanismen erklären lassen und wie viel noch unbekannt ist, wurden im Rahmen der Klinischen Studie „TWINS-II - *Open label repeated dose study for the evaluation of heritability of and genetic influences on drug pharmacokinetics*“ (EudraCT-Nummer: 2008-006223-31) monozygote und gleichgeschlechtliche dizygote Zwillingspaare untersucht. Zur Rekrutierung der Probanden wurden Zeitungsanzeigen in den Bundesländern Niedersachsen, Hessen und Thüringen geschaltet sowie Aushänge vor allem im Raum Göttingen und Hannover verteilt.

2.1.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien

In die Studie wurden gesunde monozygote und gleichgeschlechtliche dizygote Zwillingspaare eingeschlossen. Die Zwillingspaare konnten sowohl weiblich als auch männlich sein. Sie mussten im Alter von 18 bis 65 Jahren sein und ein Körpergewicht zwischen 50 – 120 kg bzw. einen *body-mass-index* (BMI) zwischen 18 – 33 kg/m² haben. Weibliche Probanden durften zu Beginn der Studie nicht schwanger sein und bereit sein, im gesamten Verlauf zuverlässige Kontrazeptionsmethoden anzuwenden. Raucher konnten in die Studie eingeschlossen werden, wenn beide Zwillinge ähnliche Rauchgewohnheiten aufwiesen (ein Unterschied von bis zu 10 Zigaretten am Tag wurde toleriert). Es durften keine pathologischen Befunde in der Voruntersuchung (Anamnese, körperliche Untersuchung, Blutdruckmessung, Herzfrequenzmessung, EKG, Körpertemperaturmessung, Drogentest im Urin, Routinelaboruntersuchung in Blut und Urin) auftreten. Zudem war das mündliche und schriftlich bestätigte und informierte Einverständnis zur Teilnahme an der Studie zwingend erforderlich (*informed consent*).

Für die Teilnahme an der Studie waren folgende Ausschlusskriterien zu beachten:

- Mitarbeiter am Institut für Klinische Pharmakologie
- Teilnahme an einer anderen Arzneimittelstudie 30 Tage vor Studienbeginn sowie während der Studie; Blut, Plasmaspende oder Thrombozytenspende in den letzten 30 Tagen vor Studienbeginn
- Jegliche pathologische Befunde in der Voruntersuchung, Anamnese und Routine-Laboruntersuchung, die nach Ansicht der Prüfärzte gegen eine Teilnahme sprechen
- Schwere Leber- und/oder Nierenfunktionsstörungen; Herz-Kreislaufkrankheiten, bei denen Beta-Blocker oder Coffein kontraindiziert sind; Asthma bronchiale (Stadium 2 bis 4); Raynaud Syndrom; Gastrointestinale Erkrankungen und Operationen, die die Pharmakokinetik der Prüfmedikation beeinflussen könnten
- Jegliche akute Erkrankung oder Fieber (Temperatur $> 37,5^{\circ}\text{C}$)
- Medikamenteneinnahme in den letzten sieben Tagen vor Studienbeginn und während der Studie [Ausnahmen: einzelnen Dosen von milden Analgetika (Aspirin, Paracetamol, Ibuprofen) durften ausschließlich des Zeitraums 6h vor bis 24h nach Einnahme der Prüfmedikation eingenommen werden, orale Kontrazeptiva und weitere Arzneimittel nach klinischer Abwägung durch die Prüfärzte zur Sicherheit der Probanden]
- Jede Form von Alkoholabusus und / oder Drogenabusus nach der Anamnese und / oder dem Drogenscreening
- Schwerwiegende bekannte Überempfindlichkeiten oder Anaphylaxie
- Bekannte Arzneimittelallergien gegen die Prüfmedikation (Ausnahme: bei Überempfindlichkeit gegen ein einzelnes Prüfmedikament kann die Studie unter Herausnahme des entsprechenden Arzneimittels durchgeführt werden)
- Bekannte Infektion mit HIV, Hepatitis B, Hepatitis C
- Unfähigkeit, die Probandeninformation zu verstehen und die Studienregeln zu befolgen

Die Kontrolle der Ein- und Ausschlusskriterien wurde auf entsprechenden Bögen in den Dokumentationsformularen (CRFs) notiert.

2.1.1.2 Voruntersuchungen der Probanden

Zunächst fanden das Vorgespräch sowie eine mündliche und schriftliche Aufklärung der Interessenten über die Studieninhalte statt. Die an der Studie Interessierten hatten die Möglichkeit, Fragen zu stellen, und ausreichend Zeit, sich hinsichtlich der Teilnahme an der Studie zu entscheiden. Nach einer schriftlichen Einverständniserklärung beider Probanden wurde eine ausführliche Anamnese erhoben und anschließend eine medizinische Voruntersuchung mit körperlicher Untersuchung sowie Blutdruck- und Pulsmessung und Aufzeichnung von einem 12-Kanal-EKG durchgeführt. Abschließend fand eine labormedizinische Untersuchung (Analysen erfolgten am Institut für Klinische Chemie, Universitätsmedizin Göttingen) statt, die folgende Parameter beinhalteten: Natrium, Kalium, Kalzium, AST, Kreatinin, gesamtes Bilirubin, Blutbild (Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten). Zudem wurden eine Urinkontrolle mittels Urinsticks (pH-Wert, Leukozyten, Nitrit, Protein, Glucose, Ketonkörper, Urobilirubin, Bilirubin, Blut/Hämoglobin), ein Urindrogenscreening sowie bei Frauen ein Urinschwangerschaftstest durchgeführt.

Der Abstand zwischen der Voruntersuchung und dem Studienbeginn durfte nicht mehr als sechs Wochen (42 Tage) betragen. Falls diese Zeitspanne überschritten wurde, waren eine erneute Blutentnahme sowie die Überprüfung der Studientauglichkeit im Rahmen einer Anamnese notwendig.

2.1.2 Verwendete Arzneimittel

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Erbllichkeit von Variationen der Arzneimittel Metoprolol (Beloc i.v. ®) und Torasemid (Torem 200 ®) betrachtet. Beide Medikamente wurden intravenös verabreicht. Die Lagerung der Arzneimittel erfolgte entsprechend den Anweisungen der Fachinformation (www.fachinfo.de) für die einzelnen Arzneimittel. Sie waren nur für das Studienpersonal zugänglich. Dafür wurde ein abschließbarer Kühltank bei einer Temperatur von + 2° bis + 8° C verwendet.

2.1.3 Zeitlicher Ablauf der Studie

Die Studie war in drei Studienphasen sowie eine vorangehenden Voruntersuchung aufgeteilt:

- Voruntersuchung (Visite 1)
- Studienphase 1 (Visite 2 + 3)
- Zeitabstand ≥ 7 Tage
- Studienphase 2 (Visite 4 + 5)
- Zeitabstand ≥ 7 Tage
- Studienphase 3 (Visite 6 + 7)

An allen drei Studienphasen wurde die gleiche Prüfmedikation verabreicht und die gleichen Untersuchungen und Probenentnahmen (Ausnahme: Blutentnahme für die Genotypisierung erfolgte nur an Studienphase 1) durchgeführt.

Eine Übersicht über den Ablauf der gesamten Studie gibt folgende Tabelle:

Tabelle 4 Studienablauf

	Voruntersuchung	Studienphase 1		Studienphase 2		Studienphase 3	
Visite	1	2	3	4	5	6	7
Einverständnis + Voruntersuchung	X						
Verabreichung der Prüfmedikation		X		X		X	
Blutentnahme Genotypisierung		X					
Blutentnahmen Pharmakokinetik		X	X	X	X	X	X

In den einzelnen Studienphasen wurden jeweils nach einem festen zeitlichen Schema die Prüfmedikation verabreicht sowie Blutentnahmen für die Pharmakokinetikanalysen abgenommen. Tabelle 5 gibt eine detaillierte Übersicht über die Studienphasen:

Tabelle 5 Studienphasen detailliert

<i>Time point</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Zeit [Minuten]	0	15	30	45	75	105	135	165	225	285	345	405	465	1425
Zeitfenster [+/- Minuten]	5	5	10	10	10	15	15	15	30	30	30	60	60	120
Prüfung Ein- / Ausschlusskriterien	x													
Abfrage weiterer Arzneimitteleinnahmen	x													x
Monitoring (Vitalzeichen + EKG)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Durchführung EKG	x	x	x											x
Urinanalyse, -schwangerschaftstest, -drogentest*	x													
Messung Körpertemperatur, Atemalkohol	x													x
<i>Adverse event monitoring</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Torasemid (2min Infusion) [mg]	2,5													
Metoprolol (20min Infusion) [mg]		5												
Blutentnahmen Pharmakokinetik	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Blutprobe Genotypisierung (nur Studienphase 1)	x													

* Bei Verdacht auf Drogenkonsum; Testung auf Amphetamine, Benzodiazepine, Kokain, Metamphetamine, Opiode, Cannabis

2.1.4 Allgemeines und Verhaltensmaßnahmen während der Studie

2.1.4.1 Ernährungs- und Verhaltensregeln

Während der Durchführung der einzelnen Studienphasen sowie ab 2 Wochen vor dem Beginn jeder Studienphase gab es eine Reihe von allgemeinen Verhaltensregeln, die von den Probanden eingehalten werden mussten. Dies diente zum einen der Sicherheit der Probanden, zum anderen sollte gewährleistet werden, dass die Wahrscheinlichkeit nahrungsmittelbedingter Veränderungen in der Pharmakokinetik der verabreichten Arzneimittel reduziert war.

Tabelle 6 Ernährungs- und Verhaltensregeln

Generell:	ab 2 Wochen vor Studienphase:	ab 1 Woche vor Studienphase:	ab 48 h vor und während der Studienphase:
Keinerlei Einnahme von Drogen; keine Einnahme von Arznei- oder Nahrungsergänzungsmitteln ohne vorherige Rücksprache mit dem Prüfarzt.	Keine Aufnahme von chininhaltigen Erfrischungsgetränken und von Grapefruit(saft)	Keine Aufnahme von Kaffee, Cola, Schwarzem Tee, Schokolade	Keine Aufnahme von Alkohol
	Keine Durchführung intensiver Diätmaßnahmen mit dem Ziel einer Gewichtsabnahme parallel zur Studie.	Keine intensive sportliche Aktivität oder Praktizierung von Risikosportarten	Keine Führung von Kraftfahrzeugen sowie Bedienung von Maschinen, an denen die Probanden sich selbst oder andere Menschen gefährden könnten bis 20 Stunden nach der letzten Arzneimitteleinnahme

2.1.4.2 Studienabbruch

Jedem Studienteilnehmer war es möglich, zu jedem Zeitpunkt, auch ohne Angabe von Gründen, die Teilnahme an der Studie zu beenden. Beim Auftreten von Ausschlusskriterien oder bei Non-Compliance der Studienteilnehmer wurde der Proband von den noch ausstehenden Studienterminen ausgeschlossen.

2.1.4.3 Ethische und rechtliche Aspekte

Der im Oktober 2008 eingereichte Antrag der Studie wurde im Dezember 2008 von der Ethikkommission Göttingen zustimmend bewertet und vom BfArM (Bundesinstitut für

Arzneimittel und Medizinprodukte) genehmigt. Die Anzeigepflicht gemäß § 67 AMG bei der zuständigen Landesbehörde in Braunschweig wurde im Februar 2009 erfüllt. Eine Versicherung für die Studienteilnehmer im Fall einer Schädigung im Zusammenhang mit dem Studienverlauf wurde bei der ECCLESIA mildenberger HOSPITAL GmbH, Klingenbergstrasse 4, 32758 Detmold mit der Versicherungsanmeldenummer 852 / 2008 - Gö3 abgeschlossen.

2.1.4.4 Änderungen des Studienprotokolls

Bei Änderungen oder Erweiterungen des Studienprotokolls wurden die Ethikkommission, das BfArM und die Landesbehörde vor der Umsetzung in Form eines Amendments unterrichtet. Substantielle Änderungen mussten von der Ethikkommission und dem BfArM genehmigt werden. Die Probanden mussten über die Änderungen aufgeklärt werden. In Form eines 1. Amendments wurde der Prüfplan am 09.03.2011 um einen Ernährungsbogen, eine Ausweitung des zulässigen Körpergewichtes sowie leichte Modifizierungen im Ablauf (beispielsweise kontinuierliches Monitoring während der gesamten Studienphase, Prüfung des Atemalkoholspiegels sowie stichprobenartiger Drogenurintest vor Arzneimittelgabe) erweitert. Im Rahmen eines 2. Amendments vom 26.03.2012 erfolgte die Hinzunahme einer weiteren Studienphase, an dem ausschließlich orale Medikation verabreicht wurde und der nicht Teil dieser Arbeit ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit beruhen ausschließlich auf der im Rahmen der ursprünglichen Genehmigung dokumentierten Studiendurchführung.

2.1.4.5 Dokumentation durch *case report forms* (CRFs)

Jede Intervention sowie jedes Ereignis, die während der Studie auftraten, wurden in Form eines *case-report-form* (CRF) dokumentiert. Nach der EG-Richtlinie 2001 / 20 werden verschiedene Formen von unerwünschten Ereignissen unterschieden (Europäische-Union 2001):

- *Adverse event* (AE) – unerwünschtes Ereignis: jedes schädliche Vorkommnis, das einem Patienten oder einem Prüfungsteilnehmer widerfährt, dem ein Arzneimittel verabreicht wurde, und das nicht unbedingt in kausalem Zusammenhang mit dieser Behandlung steht.
- *Adverse drug reaction* (AR) – unerwünschte Arzneimittelwirkung: jede schädliche und unbeabsichtigte Reaktion auf ein Prüfpräparat, unabhängig von dessen Dosierung.

„Arzneimittelwirkung“ bedeutet, dass ein ursächlicher Zusammenhang zwischen einem Arzneimittel und einem unerwünschten Ereignis zumindest möglich ist, d.h. ein Zusammenhang nicht ausgeschlossen werden kann. Die Intensität wird dabei in leicht oder mäßig angegeben.

- *Serious adverse event* (SAE) – schwerwiegendes unerwünschtes Ereignis: jedes schädliche Vorkommnis, das einem Patienten oder einem Prüfungsteilnehmer widerfährt, dem ein Arzneimittel verabreicht wurde, und das nicht unbedingt in kausalem Zusammenhang mit dieser Behandlung steht und zugleich tödlich oder lebensbedrohend ist, eine stationäre Behandlung oder deren Verlängerung erforderlich macht, zu einer bleibenden oder schwerwiegenden Behinderung oder Invalidität führt oder eine kongenitale Anomalie oder einen Geburtsfehler zur Folge hat.
- *Serious adverse reaction* (SAR) – schwerwiegende unerwünschte Arzneimittelwirkung: jegliche unerwünschte und zugleich schwerwiegende Reaktion, bei der mindestens ein Verdacht auf die kausale Beteiligung eines Arzneimittels besteht.
- *Suspected unexpected serious adverse reaction* (SUSAR) – Verdachtsfall einer unerwarteten schwerwiegenden Nebenwirkung: jegliche unerwünschte und zugleich schwerwiegende Reaktion, bei der mindestens ein Verdacht auf die kausale Beteiligung eines Arzneimittels besteht und die bisher noch nicht berichtet wurde oder deren Schweregrad den einer bekannten Reaktion signifikant übersteigt. Ein Verdachtsfall einer unerwarteten schwerwiegenden Nebenwirkung liegt also dann vor, wenn schädliche und unbeabsichtigte Begleiterscheinungen mit der Gabe dieses Arzneimittels in zeitlichem Zusammenhang stehen und nach angemessener Recherche andere Ursachen als die Gabe des Arzneimittels für die Begleiterscheinungen ausgeschlossen werden können. Damit handelt es sich um Nebenwirkungen, die nicht in der Fachinformation oder in der *investigator's brochure* beschrieben sind und in ihrem Auftreten sowohl unerwartet als auch in der Ausprägung als schwerwiegend eingestuft werden.

2.1.4.6 Datenschutz

Zur Wahrung des Datenschutzes wurden sämtliche Probandendaten in kodierter Form erhoben. Jeder Studienteilnehmer erhielt eine individuelle Studiennummer. Damit eine Zuordnung der Zwillinge zueinander möglich war, erhielten beide Zwillinge die gleiche Nummer mit dem Zusatz A bzw. B. Nur den an der Studie beteiligten Doktoranden und

Mitarbeitern (Prüfärzte, Study Nurse) war eine Zuordnung der Studiennummer zu den jeweiligen Probanden möglich. Die Lagerung der Dokumente, die die persönlichen Daten der Probanden enthielten, erfolgte getrennt von den Studienunterlagen. Die Analysen der Blutproben und Auswertungen der Ergebnisse wurde nur unter den Studiencodes durchgeführt.

2.2 Interventionen

2.2.1 EKG

Bei der Elektrokardiographie werden mittels der Messungen der elektrischen Reizleitung des Herzens Potentialdifferenzen zwischen den einzelnen Ableitungselektroden gemessen. Dadurch können Aussagen über Herzrhythmus, Frequenz, Lagetyp, Erregungsbildung, -ausbreitung und -rückbildung getroffen werden. Im Rahmen der „TWINS-II“ Studie wurde durch den Betablocker Metoprolol ein Arzneimittel verabreicht, dass bei bestimmten Rhythmusstörungen sowohl kontraindiziert ist als auch selbst arrhythmogen wirken kann. Aus diesen Gründen fand eine Durchführung eines Ruhe-EKGs (nach 5 minütigem ruhigem Liegen) sowohl während der Voruntersuchung als auch kontinuierlich während der Studienphasen statt.

2.2.2 Blutentnahmen

In den Studienphasen wurden zur Bestimmung der Pharmakokinetik der verabreichten Arzneimittel insgesamt 129 2,7 mL EDTA-Röhrchen Blut entnommen. Die Blutentnahme erfolgte dabei zu den Zeitpunkten TP 1 - 14 über eine Venenverweilkanüle und zu TP 15 über eine einzelne Blutentnahme mittels Butterfly. Nach 10 minütiger Zentrifugation und Überführung des Plasmas in ein 5 ml Polypropylen-Röhrchen (Firma Greiner, Frickenhausen) wurden die Proben bei Temperaturen von - 20 °C Grad (+/- 5 °C Grad) tiefgefroren.

2.2.4 Verabreichung und Dosierung der Medikamente

Die Studienmedikation wurde an den Studienphasen 1, 2 und 3 den Fachinformationen gemäß appliziert. Die Verabreichungen von 2,5 mg Torasemid erfolgten als Bolusinjektion zu Beginn der Studienphase als totales Volumen von 5 ml mittels Lösung in NaCl 0,9%.

Metoprolol wurde anschließend nach 15 Minuten mittels einer Kurzinfusion über 20 Minuten appliziert. Dabei wurde ein totales Volumen von 20 ml mittels Lösung in NaCl 0,9% verabreicht.

2.3 Bioanalytische Methoden

2.3.1 Messungen der Blutkonzentrationen von Metoprolol und Torasemid

Die Plasmakonzentrationen von Metoprolol, Alpha-Hydroxymetoprolol, Torasemid und Hydroxytorasemid wurden am Dr. Margarete-Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie Stuttgart durch Flüssigkeitschromatographie mit nachfolgender Detektion durch Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS-MS) bestimmt. Verwendet wurde das Agilent 6460 Triple Quadrupol Massenspektrometer (Agilent, Waldbronn, Germany), das an ein Agilent 1200 HPLC-System, bestehend aus Eluentenentgaser G1379B, binärer HPLC-Pumpe G1312B, Mikrotiterplatten-Autosampler G1367D und Säulenthermostat G1316B, gekoppelt war. Zur Messung der Plasmaproben wurde 100 µl Plasma mit 10 µl der internen Standards versetzt (Alpha-Hydroxymetoprolol-d5 [Toronto Research Chemicals, Nr. H948392], Metoprolol-d7 [Toronto Research Chemicals, Nr. M338792], Hydroxytorasemid-d7 [Toronto Research Chemicals, Nr. H96-9982], Torasemid-d7 [Toronto Research Chemicals, Nr. T548752]). Nach Mischen und 5 minütiger Pause erfolgte eine Proteinfällung mit 200 µl Acetonitril und anschließende Zentrifugation (10 min bei 13000 U/min, Eppendorf-Zentrifuge 5424 R). Der gesamte Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und bei 37°C vollständig unter Stickstoff abgeblasen. Nach Aufnahme des Rückstandes in 50 µl Eluens und erneuter Zentrifugation (5 min bei 13000 U/min) wurden 40 µl des Überstandes in eine Mikrotiterplatte pipettiert und 10 µl vom automatischen Probengeber in die HPLC-Anlage injiziert. Die Trennung erfolgte mittels einer US6240 reversed phase HPLC-Säule (Modulo-cart QK Strategy 5 pro 100x2.1mm, Interchim, Mannheim). Die Detektion der Analyten erfolgte nach Elektro-Spray-Ionisation. Eichgeraden wurden aus den Kalibrierproben durch gewichtete (1/x) lineare Regression des Peakflächenverhältnisses Analyt / Interner Standard gegen das Konzentrationsverhältnis Analyt / Interner Standard erhalten. Die entsprechenden Deuterium-markierten Analoga der Analyten wurden als interne Standards verwendet.

2.3.2 Genetische Typisierungen und Bestimmung des Zwillingsstatus

Zur Bestimmung der Genotypen wurde den Probanden einmalig an Studienphase 1 ein 2,7 ml EDTA-Blut Röhrchen abgenommen, das bei Temperaturen von $< -20\text{ °C}$ gelagert wurde. Nach Versand der Proben an das Labor des Instituts für Klinische Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen führten die zuständigen Mitarbeiter die notwendigen Prozesse durch. Alle Arbeitsschritte erfolgten in diesem Zusammenhang entsprechend den zuvor vereinbarten *standard operating procedures* (SOPs).

Mit Hilfe der Genotypisierung wurde auch die Bestimmung des Zwillingsstatus ermöglicht. Hierzu wurden neben den in dieser Arbeit besprochen Genotypen der Enzyme CYP2D6, CYP2C9 und OATP1B1 auch die Genotypen der Enzyme CYP2C19, CYP3A4, UGT2B7, OCT1 und OCT2 sowie ADRB1 und 2 bestimmt. Bei vollständiger Übereinstimmung zwischen den Zwillingen eines Paares wurde Monozygotie festgestellt, bei Unterschieden Dizygotie.

Methodisch wurde folgendermaßen vorgegangen: Zunächst wurde die DNA mit Hilfe des Bio Robot EZ1 (Firma Qiagen) gewonnen. Die Extraktion erfolgte hierbei automatisch durch eine Trennung der DNA mit magnetischen Partikeln aus dem Vollblut. Anschließend erfolgte eine Amplifikation der DNA mittels PCR (*polymerase chain reaction*; Polymerase-Kettenreaktion). Hierbei konnten unter Verwendung von zwei so genannten Primer definierte DNA-Abschnitte vervielfältigt werden. Primer sind synthetisch hergestellte Oligonukleotide, die auf den DNA-Einzelsträngen als Startpunkte für die DNA-Polymerase dienen. Der PCR-Prozess, bestehend aus etwa 25 bis 45 Zyklen, wurde in einem Thermocycler durchgeführt. Zunächst wurde die Doppelstrang-DNA auf $93\text{-}97\text{ °C}$ erhitzt. Durch Denaturierung entstanden unter Aufspaltung der Wasserstoffbrückenbindungen zwei Einzelstränge. Die Primer konnten nun nach Absinken der Temperatur auf $55\text{-}65\text{ °C}$ an die Einzelstränge binden (*annealing*). Durch erneute Anhebung der Temperatur auf 72 °C konnte die hitzestabile Taq-Polymerase die fehlenden Stränge komplementär mit freien Nukleotiden auffüllen (Elongation). Im Anschluss wurde die Reaktion wieder auf den Schmelzpunkt erhitzt, so dass ein neuer Zyklus beginnen konnte.

2.3.2.1 CYP2D6- CYP2C9- und OATP1B1-Polymorphismen

CYP2D6:

In dieser Arbeit wurden zur Bestimmung des CYP2D6 Polymorphismus die CYP2D6-Allele *2, *3, *4, *6, *9, *10, *17, *35 und *41, die CYP2D6-Gendeletion (Allel *5) und die CYP2D6-Duplikation bestimmt. Nach Amplifikation der DNA mittels PCR wurden die genannten Allele identifiziert. Durch die Verwendung fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleosidtriphosphate konnte die Bestimmung des Genotyps der einzelnen Varianten auf Grund der Retentionszeit und Farbe der Signale mit Hilfe der Gene Mapper v3.7 Software® (Applied Biosystems) durchgeführt werden. Basierend auf der Kombination der einzelnen Varianten wurden die CYP2D6-Allele bestimmt. Die Resultate der Elektrophorese wurden durch Elektrophorese-Diagramme aufgezeichnet, aus denen dann die Genotypen abgelesen werden konnten. Zur Bestimmung der Gesamtdeletion oder der Duplikation von CYP2D6 wurden zwei separate Reaktionen, die jeweils Primerpaare spezifisch für das duplizierte und das deletierte Allel enthielten, angewandt.

CYP2C9:

Der CYP2C9 Polymorphismus wurde mittels *real-time PCR* unter Verwendung von TaqMan® Sonden bestimmt. Hierbei handelte es sich um einzelsträngige Oligonukleotide, die spezifisch für die CYP2C9 Allele *2 und *3 waren. Während der PCR lagerten sich die Sonden spezifisch an den ihnen komplementären Strang der DNA an. Am 5'-Ende der Sonde befand sich ein Fluoreszenzmarker (Reporter). Entsprechend der Allele handelte es sich hierbei um VIC oder FAM. Der am 3'-Ende lokalisierte Quencher unterdrückte (neutralisierte) das Fluoreszenzsignal des Reporters, wenn sich beide Moleküle, Reporter und Quencher, in einem definierten Abstand zueinander befanden. Nun haben die Primer gebunden und der Strang wurde verlängert. Im Zuge der Amplifikation wurde die fluoreszenzmarkierte Sonde vom Einzelstrang abgespalten und hydrolysiert. Dies geschah durch die Taq-Polymerase, die zusätzlich zur Polymeraseaktivität auch eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität besaß. Dadurch wurde der definierte Abstand zwischen Reporter und Quencher aufgehoben, wodurch das Fluoreszenzsignal freigesetzt wurde. Es blieb auch nach der Fertigstellung der Doppelstränge bestehen. Das Signal wurde umso stärker, je mehr DNA amplifiziert wurde.

OATP1B1:

Die OATP1B1 Polymorphismen Asn130Asp und Val174Ala wurden mittels DNA-Sequenzierung typisiert.

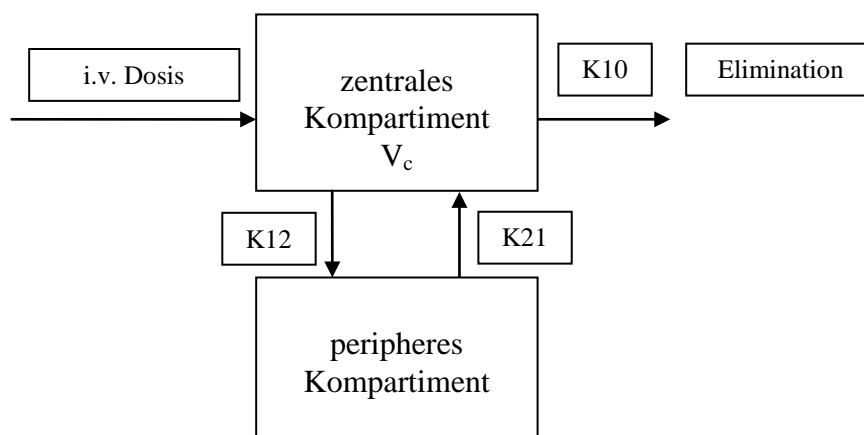
2.4 Pharmakokinetische Parameter und deren Bestimmung

Zur Beschreibung der Pharmakokinetik eines Arzneimittels im Körper werden Parameter ermittelt, die auf den Konzentrations-Zeit-Kurven in Körperflüssigkeiten nach Gabe einer definierten Dosis einer Substanz basieren. Einige der Parameter sind direkt aus den Konzentrationsverläufen zu ersehen (z.B. die Maximalkonzentration C_{\max}), überwiegend werden die Parameter anhand des Kurvenverlaufs berechnet oder geschätzt.

Es lassen sich zwei Vorgehensweisen in der Bestimmung der Parameter unterscheiden:

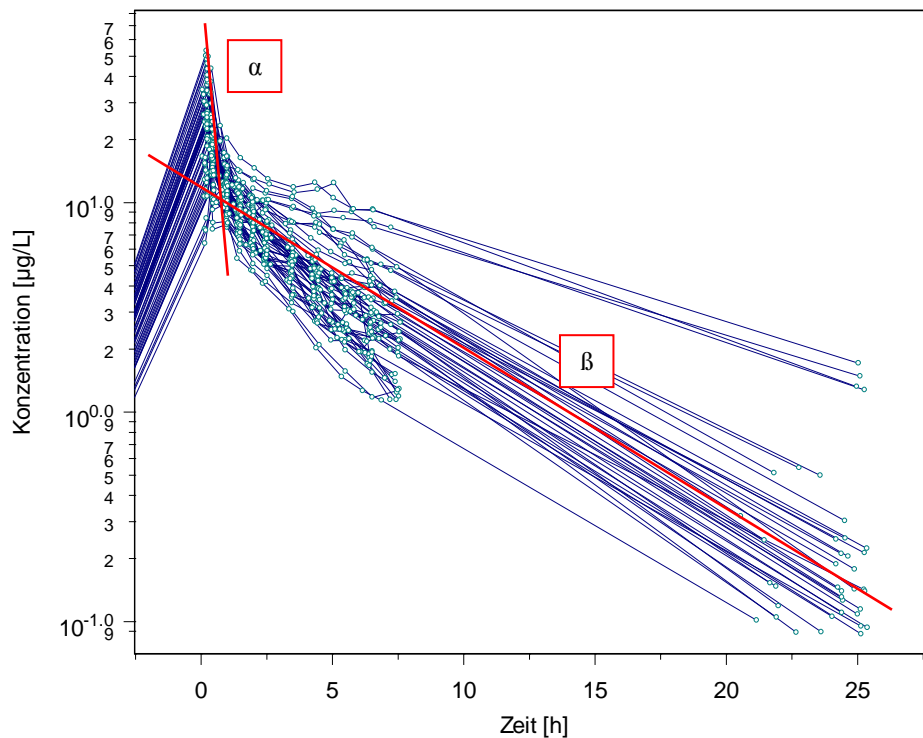
- Nicht-Kompartimentanalyse: Hierbei werden alle Parameter einzig aus den gemessenen Plasmakonzentrationen bestimmt. Mathematische Modellannahmen für die Vorgänge, die den Konzentrationsverläufen zu Grunde liegen, sind nicht notwendig. Eine Ausnahme bei der nichtparametrischen Analyse ist die terminal Halbwertszeit $t_{1/2 \text{ Lambda } z}$. Sie wird aus dem Konzentrationsabfall mindestens der letzten drei Messwerte bestimmt.
- Kompartimentanalyse: Die Kompartimentanalyse geht davon aus, dass der Körper aus einer bestimmten Anzahl von Räumen (Kompartimenten) besteht, in die sich ein verabreichtes Medikament verteilt. Ein Kompartiment ist dabei ein pharmakokinetisch einheitlicher Raum mit einem definierten Volumen. Ein Arzneimittel wird hieraus mit einer bestimmten Rate eliminiert. Es können Modelle mit unterschiedlicher Anzahl an Kompartimenten untersucht werden. In folgender Abbildung ist das in dieser Arbeit verwendete 2-Kompartimentmodell schematisch aufgezeichnet (Abbildung 2) und beispielhaft anhand von Konzentrations-Zeit-Kurven aus dieser Studie veranschaulicht (Abbildung 3).

Abbildung 2 2-Kompartimentmodell



Das zentrale Kompartiment V_c stellt das Blutvolumen dar. Hieraus verteilt sich das Arzneimittel mit der Geschwindigkeitskonstanten K_{12} in ein peripheres Kompartiment und wieder mit der Geschwindigkeitskonstanten K_{21} zurück in das zentrale Kompartiment V_c . Die Konstante K_{10} bestimmt die Elimination aus dem Körper.

Abbildung 3 Biphasischer Verlauf im 2-Kompartimentmodell



Die Abbildung zeigt logarithmierte Konzentrations-Zeit-Kurven beispielhaft nach 5 mg intravenöser Metoprololapplikation aller Studienteilnehmer an einer Studienphase, um das 2-Kompartimentmodell zu verdeutlichen. Die roten Geraden sind händisch eingezeichnet und stellen eine visuelle Abschätzung von zwei Eliminationszeiten dar. Man kann 2 Phasen erkennen. Zunächst verteilt sich das Arzneimittel schnell mit der Zeit $t_{1/2\alpha}$ in die Kompartimente und wird auch bereits zu geringen Teilen eliminiert. Anschließend wird das Medikament langsam mit der Zeit $t_{1/2\beta}$ aus dem peripheren Kompartiment zurückverteilt und eliminiert.

Bei intravenöser Applikation ist eine Unterscheidung nach Parametern möglich, die die Verteilung, und Parametern, die die Elimination eines Arzneimittels im Körper beschreiben (Angabe der in dieser Einheit verwendeten Einheiten in eckigen Klammern).

Verteilung:

- C_{\max} [$\mu\text{g/L}$]: Die Maximalkonzentration bezeichnet die maximale Konzentration, die im Blut nach Verabreichung eines Medikamentes gemessen wird (Nicht-Kompartimentanalyse) bzw. berechnet und geschätzt wird (Kompartimentanalyse).
- AUC [$\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$]: Die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (*area under the curve*) eines Medikamentes im Blut stellt eine Größe dar, durch die die Bioverfügbarkeit eines Medikamentes ausgedrückt wird. Die AUC stellt die Gesamtexposition des Körpers gegenüber einem Arzneimittel dar und ist proportional der Menge eines Arzneimittels, das den Blutkreislauf erreicht. Betrachtet man den

Kurvenverlauf, erkennt man einen linearen Anstieg bis zur Maximalkonzentration mit einem anschließend eher exponentiellen Kurvenverlauf. Zur Berechnung der AUC in dieser Arbeit wurde deshalb mittels der log-linearen Trapezregel die Fläche bis zur letzten Messung bestimmt. Es erfolgte also bis zu C_{\max} eine lineare und darauffolgend bis zum letzten Messzeitpunkt eine logarithmische Interpolation. Anschließend wurde die Restfläche vom letzten Messzeitpunkt an entsprechend dem Konzentrationsabfall der letzten drei bis fünf gemessenen Konzentrationen gegen unendlich (*infinity*) extrapoliert ($AUC_{0-\text{inf}}$). Alternativ kann auch lediglich die AUC bis zur letzten gemessenen Konzentration angegeben werden (AUC_{last}).

- MRT [h]: Die *mean residence time* entspricht der Zeit, die ein Molekül des verabreichten Arzneimittels im Durchschnitt im Körper verbleibt. Sie ist das arithmetische Mittel der Zeiten, in denen sich jedes einzelne Arzneimittel im Organismus aufhält, und fasst dabei alle Prozesse von Aufnahme, Verteilung, Metabolismus bis Elimination zusammen. Zur Berechnung der MRT benötigt man neben der AUC auch die erste Momentkurve, AUMC. Die Berechnung erfolgt nach der Formel $MRT = AUMC / AUC_{0-\text{inf}}$.
- V_c und V_{ss} [L]: Das Verteilungsvolumen ist ein fiktives Volumen, in das sich die verabreichte Dosis gleichmäßig verteilt. Dabei gibt es ein Volumen des zentralen Kompartiments (V_c), in das sich das Medikament nach Aufnahme verteilt, und ein Verteilungsvolumen im *steady state* (V_{ss}), das nach der Formel $V_{ss} = Cl \cdot MRT$ berechnet wird.
- $t_{1/2\alpha}$ [h]: Die Halbwertszeit zu Beginn des Konzentrations-Zeit-Verlaufs, in der sich das Medikament schnell in die Kompartimente verteilt sowie gering bereits aus dem Körper eliminiert wird.

Elimination:

- Cl [L/h]: Die totale Clearance quantifiziert die Elimination eines Arzneimittels aus dem Körper. Sie setzt sich aus der renalen und der extrarenalen Clearance zusammen, wobei extrarenal alles beschreibt, was nicht über die Niere eliminiert wird, hauptsächlich die Metabolisierung über die Leber. Die Berechnung der totalen Clearance lässt sich aus dem Quotienten der verabreichten Dosis und der *area under the curve* (AUC) durchführen (Totale Clearance = Dosis / AUC) und wird in dieser Arbeit aus $Dosis / AUC_{0-\text{inf}}$ berechnet.

- $t_{1/2 \text{ Lambda } z}$ [h]: Die terminale Halbwertszeit wird aus dem Abfall der letzten drei bis fünf Konzentrationen ermittelt. Dazu wird durch die logarithmierten Blutkonzentrationen eine Regressionsgerade gelegt. Der Abfall dieser Regressionsgeraden entspricht der so genannten Eliminationskonstanten ($\text{Lambda } z$). Die terminale Halbwertszeit wurde als Quotient des natürlichen Logarithmus von zwei und der Eliminationskonstante berechnet ($t_{1/2 \text{ Lambda } z} = \ln(2)/\text{Lambda } z$).
- $t_{1/2 \beta}$ [h]: Die Halbwertszeit, die den terminalen Konzentrationsabfall im 2-Kompartiment-Modell beschreibt und die Elimination sowie die Rückverteilung aus dem peripheren Kompartiment reflektiert.

2.5 Methoden der statistischen Datenauswertung

Die pharmakokinetischen Parameter dieser Arbeit (Metoprolol und Alpha-Hydroxymetoprolol, Torasemid und Hydroxytorasemid) wurden mittels des Programms WinNonlin™ Version 2.1 ermittelt. Die weitere statistische Datenauswertung und graphische Darstellung erfolgte mit Hilfe der Programme SigmaPlot™ Version 12.5, Microsoft Excel™ 2007, R™ Version 2.15.3, S-Plus® Version 6.2 und SPSS™ Version 21. Es wurden neben deskriptiven statistischen Analysen multiple lineare Regressionsanalysen vorgenommen. Die Berechnung der Korrelationskoeffizienten der monozygoten bzw. dizygoten Zwillinge sowie der zugehörigen 95%-Konfidenzintervalle erfolgte mit der Funktion „cor.test ()“ in R™.

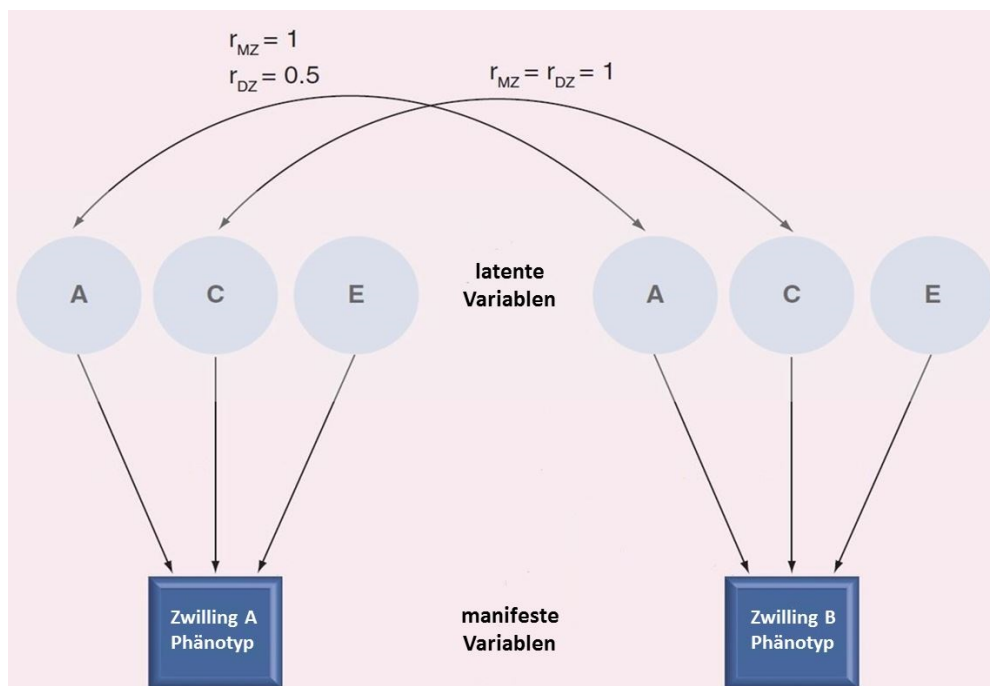
Zur Erblichkeitsberechnung wurden vier Methoden verwendet:

1. $H^{2(V)} = r_{MZ} - r_{DZ} / 1 - r_{DZ}$
2. $H^{2(F)} = 2 * (r_{MZ} - r_{DZ})$
3. Strukturgleichungsmodellierung, hier durchgeführt mit dem Programm R™ und dem Softwarepaket *mets* Version 0.2.3 (entwickelt von Klaus K. Holst und Thomas Scheike, Universität Kopenhagen, Dänemark)
4. Berechnung nach Kalow et al. (1998) basierend auf dem Verhältnis von intra- zu interindividuelle Varianz

Zu 3.: Der Hintergrund von Strukturgleichungsmodellierungen wird in Abbildung 4 präsentiert. Modelliert werden die Modelle ACE, ADE, AE und CE. Zur Auswahl des am besten passenden Modells wird ein Vergleich mit dem saturierten Modell mittels des Chi²-Tests vorgenommen. Das saturierte Modell besteht aus genau der Anzahl von Parametern, die in die Strukturgleichungsmodellierung eingegeben werden, bietet jedoch keine Möglichkeiten

zur Berechnung der latenten Variablen. Es wird das Modell aus der Gruppe ACE, ADE, AE und CE ausgewählt, das den niedrigsten Wert des AIC (*Akaike information criterion*) und damit die geringste Varianz der Residuen zeigt. Zudem wird mittels eines χ^2 -Test ermittelt, ob signifikante Unterschiede zwischen dem saturierten und dem getesteten Modell vorliegen. Ein Modell passt dann gut, wenn es sich nicht signifikant von dem saturierten Modell unterscheidet.

Abbildung 4 Strukturgleichungsmodellierung



Die Rechtecke entsprechen den Phänotypen der beiden Zwillinge eines Paares. In dieser Arbeit entspricht die $AUC_{0-\infty}$ dem Phänotyp. Die Kreise stellen die latenten Variablen dar, die von Interesse sind. Dies sind A (additive genetische Effekte), C (gemeinsame [*common*] Umwelteinflüsse) und E (individuelle Umwelteinflüsse [*unique environment*]). Durch Korrelationen zwischen diesen drei Variablen je nach Vorliegen eines monozygoten oder dizygoten Zwillingspaares (r_{MZ} und r_{DZ}) lassen sich diese latenten Variablen modellieren und Werte für die Parameter A, C, E berechnen. Zusätzlich kann noch die latente Variable D (dominante genetische Effekte) in die Modellierung mit einbezogen werden (in der Abbildung nicht dargestellt). Abbildung angepasst nach (Rahmioglu und Ahmadi 2010).

Zu 4.: Erläuterung zu Erbliehkeitsberechnungen durch die Methode zur Berechnung von Erbliehkeit in der Pharmakokinetik durch wiederholte Arzneimittelgaben (Kalow et al. 1998). Hier wird die intra- und interindividuelle Variation in der Pharmakokinetik durch die Standardabweichung und die Varianz (Quadrat der Standardabweichung) ausgedrückt und die genetische Komponente r_{GC} berechnet.

Tabelle 7 Intra- und interindividuelle Variation

Abkürzung	
SD_b	interindividuelle (<i>between</i>) Standardabweichung
SD_w	intraindividuelle (<i>within</i>) Standardabweichung
V_G	genetische Variation
V_E	Variation durch Umweltfaktoren (<i>environmental</i>)
V_M	Variation durch Messfehler

Erklärt sind hier die Abkürzungen für die Gleichungen auf der folgenden Seite.

Die Variation in der Pharmakokinetik soll dabei als Standardabweichung (SD) bzw. Varianz (SD^2) gemessen werden und kann in die Komponenten V_G , V_E , und V_M unterteilt werden. Für die Variation zwischen verschiedenen Personen (interindividuell) ergibt sich folgende Gleichung:

$$SD_b^2 = V_G^2 + V_E^2 + V_M^2$$

Die intraindividuelle Variation lässt sich durch

$$SD_w^2 = V_G^2 + V_E^2 + V_M^2$$

ausdrücken.

Unter der Annahme, dass bei repetitiven Gaben der genetische Anteil immer gleich ist, ergibt sich:

$$SD_w^2 = V_E^2 + V_M^2$$

Durch Kombination der Gleichungen SD_b^2 und SD_w^2 kann die genetische Komponente V_G^2 bestimmt werden:

$$SD_b^2 - SD_w^2 = V_G^2$$

Der Quotient V_G^2 / SD_b^2 (entspricht $SD_b^2 - SD_w^2 / SD_b^2$) wird als Maß für die Erblichkeit betrachtet. Kalow bezeichnet den ermittelten Wert aus dieser Gleichung als genetische Komponente r_{GC} .

$$r_{GC} = SD_b^2 - SD_w^2 / SD_b^2$$

3 Ergebnisse

3.1 Demographische Daten

3.1.1 Studienteilnehmer

In der vorliegenden Arbeit werden die Daten und Auswertungen von 29 in die Studie „TWINS-II“ eingeschlossenen Zwillingspaaren präsentiert. Die 58 Probandinnen und Probanden teilten sich auf 20 monozygote und 9 dizygote gleichgeschlechtliche Paare auf. Es bestand eine leichte Imbalance hinsichtlich der Geschlechterverteilung: 16 Zwillingspaare waren weiblich (55%), 13 Paare männlich (45%). Das mittlere Alter der gesamten Studienpopulation betrug 24,3 Jahre, das mittlere Gewicht 68,3 kg, die mittlere Größe 1,74 m und der mittlere BMI 22,6 kg/m².

Festzuhalten ist, dass die demographischen Daten der beiden Gruppen „monozygote Zwillinge“ und „dizygote Zwillinge“ vergleichbar waren.

Tabelle 8 Demographische Daten der Studienpopulation

	Total	Geschlecht		Alter	Gewicht	Größe	BMI
	n (% der jeweiligen Gruppe)	weiblich n	männlich n	[Jahre]	[kg]	[m]	[kg/m ²]
		Mittelwert (Standardabweichung)				Bereich	
Gesamt	58 (100)	32 (55)	26 (45)	24,3 (8,0) 18 – 56	68,3 (10,6) 53,5 – 94,4	1,74 (0,09) 1,57 – 1,95	22,6 (2,6) 17,7 – 30,2
Monozygot	40 (40)	22 (55)	18 (45)	24,7 (8,6) 18 - 56	69,3 (11,3) 53,5 – 94,4	1,74 (0,08) 1,57 – 1,93	22,8 (2,5) 18,3 – 30,2
Dizygot	18 (60)	10 (56)	8 (44)	23,6 (6,7) 18 - 36	66,1 (8,5) 55,5 – 81,0	1,73 (0,09) 1,62 – 1,95	22,1 (2,9) 17,7 – 27,9

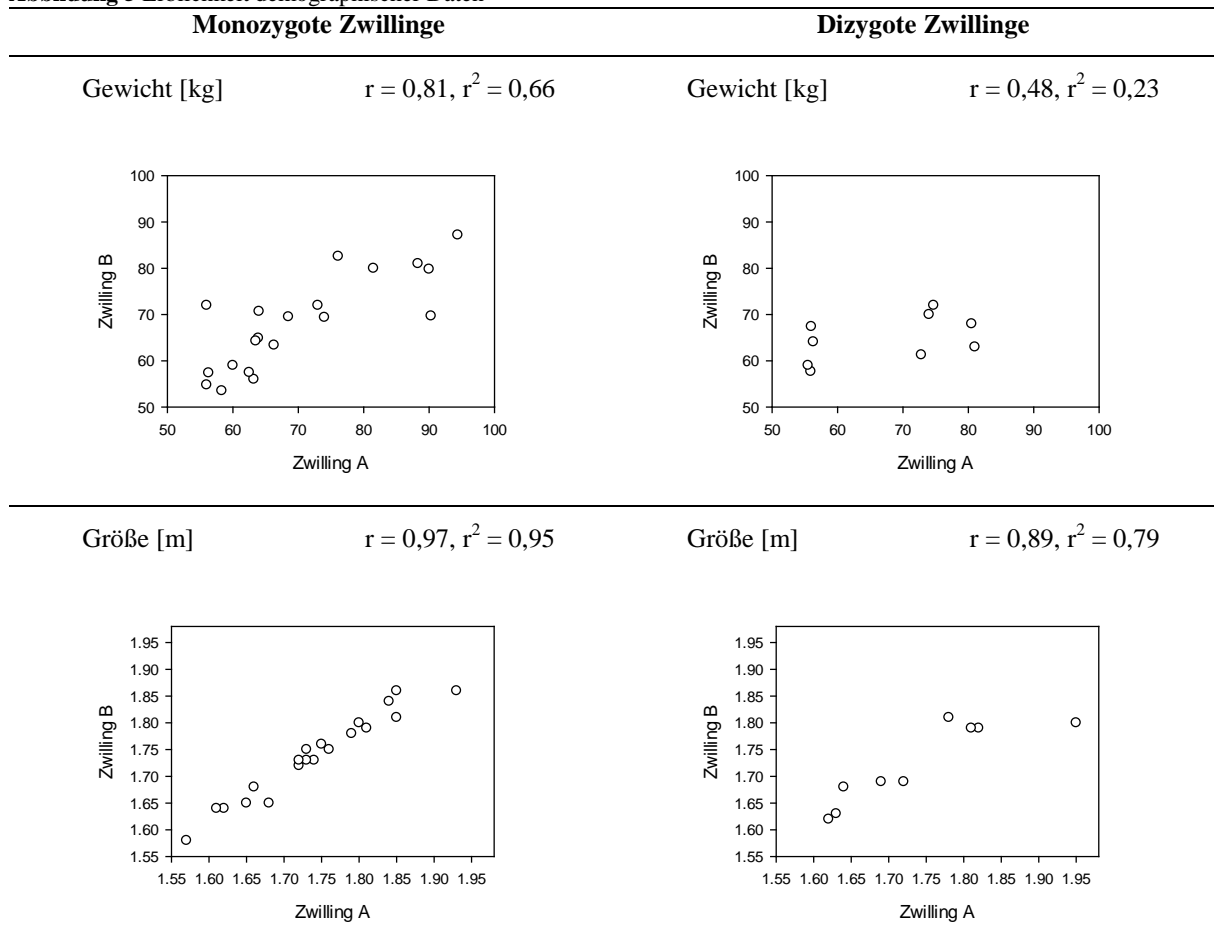
n = Anzahl

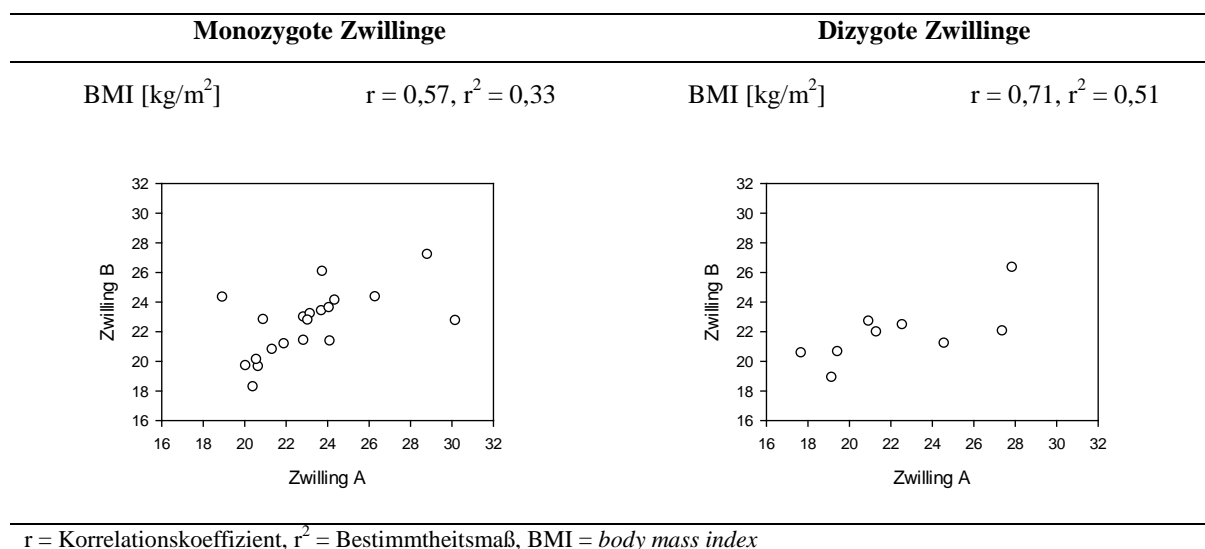
3.1.2 „Vorübung“: Erblichkeit von Gewicht, Größe und *body mass index*

Die Erblichkeit von Körpergewicht, Körpergröße und BMI ist bereits in vielen Studien untersucht worden (Ordonana et al. 2007; Dubois et al. 2012). Hier soll dies dennoch für die untersuchten Studienteilnehmer graphisch illustriert und mit den entsprechenden

Korrelationskoeffizienten belegt werden (Abbildung 5). Ersichtlich ist, dass alle Körpermaße bei monozygoten Zwillingen sehr ähnlich sind. Das Quadrat des Korrelationskoeffizienten wird auch als Bestimmtheitsmaß bezeichnet und gibt den Anteil der Variation der Werte der Y-Achse (hier Zwilling B), der durch die Werte der anderen Variable (X-Achse, hier Zwilling A) vorhersagbar ist, an. Also sind hier einfach gesagt bei den monozygoten Zwillingen 95% der Körpergröße, 66% des Gewichts und 33% des *body mass index* eines Zwilling durch den jeweils anderen erklärt. Bei dizygoten Zwillingen zeigen sich für die Kenngrößen Körpergröße und -gewicht ein geringeres Bestimmtheitsmaß. Die Werte für den Korrelationskoeffizienten und das Bestimmtheitsmaß des *body mass index* sind bei den dizygoten Zwillingen höher als bei den monozygoten Zwillingen.

Abbildung 5 Erbllichkeit demographischer Daten





Zusätzlich wurde eine Analyse mittels Strukturgleichungsmodellierung durchgeführt, um das Ausmaß der Erbllichkeit in der Variation der Körpermaße in der Studienpopulation zu berechnen. Hier zeigte sich eine große erbliche Rolle bezüglich der Körpergröße ($A = 89\%$), eine geringere bei dem Körpergewicht ($A = 49\%$) und keine Erbllichkeit im *body mass index* ($A = 0\%$, bestes Modell ist CE).

Tabelle 9 Strukturgleichungsmodellierung Demographie

	A	C	E
	additive genetische Effekte	gemeinsame (<i>common</i>) Umweltfaktoren	individuelle Umweltfaktoren (<i>unique environment</i>)
Gewicht	0,48	-	0,52
Größe	0,89	-	0,11
BMI	-	0,51	0,49

Dargestellt sind die Zahlen für die nach der Strukturgleichungsmodellierung am besten passenden Modelle. Die Auswahl wurde nach AIC-Kriterium und Vergleich zu dem saturierten Modell getroffen (niedriges AIC und hoher p-Wert sprechen für eine gute Anpassung).

3.1.3 Sicherheitsaspekte während der Studie

Die Studienmedikation wurde durchgehend gut vertragen. Es kam lediglich zu vereinzelten *adverse reactions* (ARs), die in einer symptomlosen Sinusbradykardie oder in leichtem Blutdruckabfall nach der Metoprololinfusion bestanden. Unspezifische leichte und kurz andauernde *adverse events* (AEs) wie Übelkeit, Kopfschmerzen und Müdigkeit wurden ebenfalls notiert. Im Verlauf der Studie traten 3 *serious adverse events* (SAEs) auf. Dies

waren eine Cholezystektomie bei Gallenblasensteinen, ein lumbaler Bandscheibenvorfall mit operativer Versorgung und eine Pyelonephritis mit stationärer Behandlung. Der Kausalzusammenhang zur Studienteilnahme wurde bei allen aufgetretenen SAEs von den Prüfarzten als unwahrscheinlich bzw. ohne Zusammenhang eingeordnet. Es wurden keine *serious adverse reactions* (SARs) oder *suspected unexpected serious adverse reactions* (SUSARs) festgestellt.

3.2 Genvarianten von CYP2D6, CYP2C9 und OATP1B1

Die Genotypisierungen erfolgten, um den Anteil der erblich bedingten Variation in einen unerklärten und einen durch bereits bekannte Varianten bestimmten Anteil zu differenzieren. Zusätzlich wurde durch die Genotypisierung der Zwillingsstatus monozygot vs. dizygot ermittelt. Dabei können natürlich auch dizygote Geschwister bezüglich einzelner Genotypen gleich sein, aber wenn zwei Personen bezüglich der in dieser Arbeit bestimmten 15 polymorphen Allele identisch sind, ist fast sicher, dass es sich um monozygote Zwillinge handelt; auf eine genaue statistische Analyse der Irrtumswahrscheinlichkeit wurde in dieser Arbeit verzichtet.

Für das Enzym CYP2D6 lassen sich die bekannten Genotypen den in der Einleitung beschriebenen fünf Phänotypen langsame Metabolisierer (*poor metabolizer*, PM), intermediäre Metabolisierer (IM), heterozygot schnelle Metabolisierer (HEM), schnelle Metabolisierer (*extensive metabolizer*, EM) und ultraschnelle Metabolisierer (*ultrarapid metabolizer*, UM) zuordnen. In dieser Arbeit werden 33 Personen mit einem CYP2D6 EM-Phänotyp, 21 Personen mit einem CYP2D6 HEM-Phänotyp und 4 Personen mit einem CYP2D6 IM-Phänotyp betrachtet (Tabelle 10).

Tabelle 10 Ergebnisse der CYP2D6-Geno- und Phänotypen

Genotyp CYP2D6	Anzahl	Phänotyp (Genaktivität)
*1/*1	11	EM (2)
*1/*2	9	EM (2)
*1/*4	14	HEM (1)
*1/*10	2	EM (1,5)
*1/*35	3	EM (2)
*1/*41	4	EM (1,5)
*2/*4	3	HEM (1)
*2/*5	2	HEM (1)
*2/*41	4	EM (1,5)
*4/*10	2	IM (0,5)
*4/*41	2	IM (0,5)
*10/*41	2	HEM (1)

* beziffert jeweils die nummerierten genetischen Varianten im Gen CYP2D6, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht und gefunden wurden. IM = intermediäre Metabolisierer, HEM = heterozygot schnelle Metabolisierer, EM = schnelle Metabolisierer.

Bezüglich des Enzyms CYP2C9 wurden 48 Personen mit hoher und 10 Personen mit niedrigerer Aktivität in die Studie eingeschlossen (Tabelle 11).

Tabelle 11 Ergebnisse der CYP2C9-Geno- und Phänotypen

Genotyp CYP2C9	Anzahl	Phänotyp (Aktivität)
*1/*1	32	hoch
*1/*2	14	hoch
*2/*2	2	hoch
*1/*3	10	niedrig

Die Aktivität ist hier für die Testsubstanz Torasemid angegeben (Vormfelde et al. 2004). Für andere Substanzen ist die Aktivität von CYP2C9 bei Vorhandensein von Allel *2 teilweise moderat oder deutlich erniedrigt (Kirchheiner und Brockmoller 2005).

Unter Betrachtung des OATP1B1-Polymorphismus ergaben sich 24 homozygote und 22 heterozygote Träger des Asn130-Allels sowie 12 homozygote Träger von Asp130. 38 Probanden waren homozygoter Träger des Val174-Allels, 17 Probanden heterozygot, 3 Probanden trugen homozygot das Ala174-Allel (Tabelle 12).

Tabelle 12 Ergebnisse der OATP1B1-Polymorphismen

Polymorphismus	homozygot	heterozygot	homozygot
	(Asn130 bzw. Val174)	(Asn/Asp, Val/Ala)	(Asp130 bzw. Ala174)
Asn130Asp	24	22	12
Val174Ala	38	17	3

Es ist bekannt, dass die beiden Polymorphismen Asn130Asp und Val174Ala häufig zusammen auftreten. Dementsprechend werden die Polymorphismen zusammenfassend mit den Genotypen *1a, *1b, *5 und *15 benannt. Der Austausch von Valin durch Alanin an Stelle 174 des OATP1B1-Gens kann in einer reduzierten Aktivität des Transporters und entsprechend höheren Plasmaspiegelkonzentrationen von Arzneimitteln resultieren.

Tabelle 13 Ergebnisse der OATP1B1-Genotypen

Genotyp	*1a/*1a	*1a/*1b	*1a/*5	*1a/*15	*1b/*1b	*1b/*15	*15/*15
Anzahl (58)	21	12	3	10	5	4	3
Aktivität	hoch	hoch	intermediär	intermediär	intermediär	niedrig	niedrig

Genotypen von OATP1B1, die sich aus der Kombination der Genvarianten an Codons130 und 174 ergeben:

*1a = Asn130Val174, *1b = Asp130Val174, *5 = Asn130Ala174, *15 = Asp130Ala174. Die Einflüsse auf die Enzymaktivität sind substratabhängig.

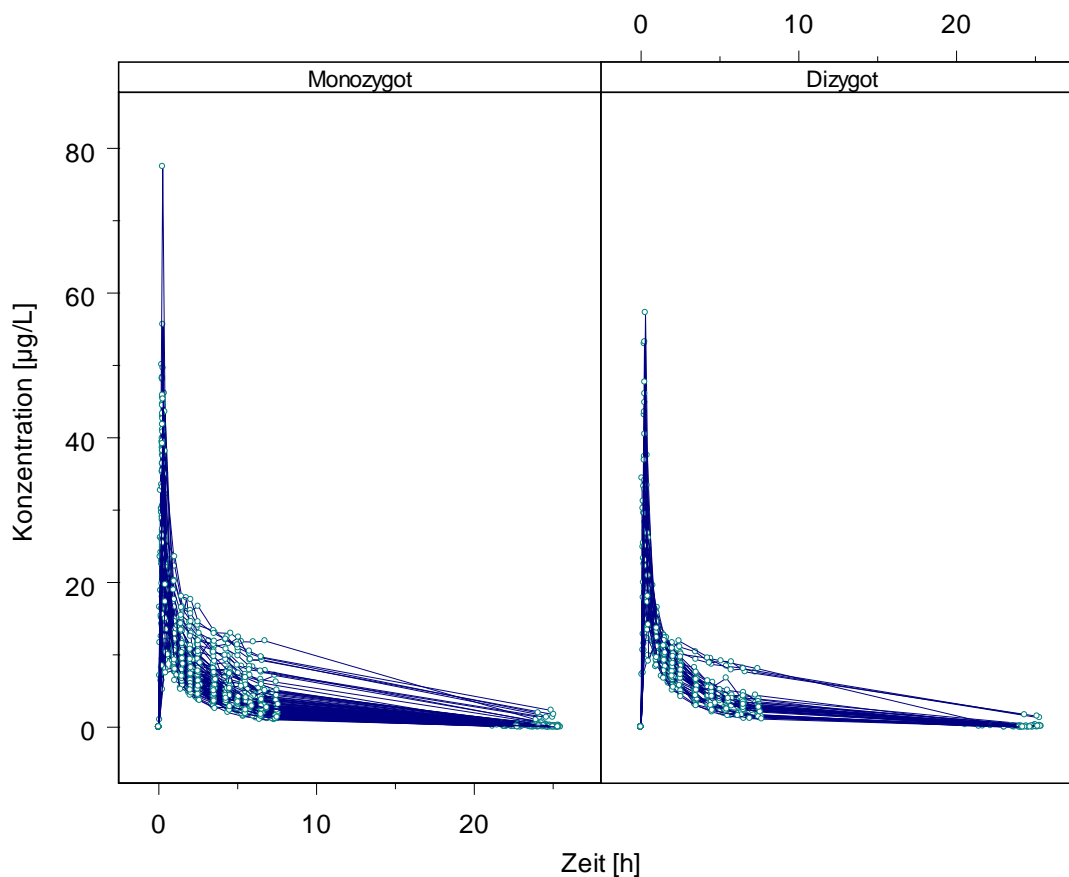
In der Studienpopulation waren am häufigsten Personen mit dem OATP1B1-Genotyp *1a/*1a vertreten (21 Probanden), am seltensten Personen mit dem Genotyp *15/*15 (3 Probanden).

3.3 CYP2D6 - Pharmakokinetik von Metoprolol

3.3.1 Pharmakokinetische Parameter in der Gesamtgruppe

Durch die definierten Blutentnahmen nach der Arzneimittelapplikation konnten Konzentrations-Zeit-Verläufe analysiert werden. Nachfolgende Abbildung zeigt, unterteilt nach mono- und dizygoten Zwillingen, die Konzentrationsverläufe von Metoprolol sämtlicher Studienphasen. Es ist zu erkennen, dass die maximale Konzentration während der intravenösen Applikation zum ersten Blutentnahmezeitpunkt erreicht wurde, dann nach Ende der Infusion schnell abfiel und im Anschluss eine zweite Phase mit langsamerem Konzentrationsabfall stattfand. In beiden Gruppen ist außerdem eine gewisse Streuung ersichtlich. Deutliche Unterschiede zwischen den beiden Gruppen sind jedoch nicht sichtbar.

Abbildung 6 Konzentrations-Zeit-Kurven von Metoprolol (Gesamtpopulation)



Dargestellt sind sämtliche Studientage mit Metoprololapplikation, die in die Auswertung dieser Arbeit eingegangen sind. Unterteilt hier in die Gruppen der Monozygoten und der Dizygoten. Insgesamt 162 Konzentrations-Zeit-Kurven.

Die Blutkonzentrationen bzw. Konzentrationsverläufe eines Arzneimittels werden zusammenfassend mit pharmakokinetischen Kenngrößen bzw. pharmakokinetischen Parametern beschrieben. Hierbei erfolgten eine Nicht-Kompartiment- und eine Kompartimentanalyse. Für die gesamte Studienpopulation sind die pharmakokinetischen Parameter für Metoprolol in Tabelle 14 zusammengefasst.

Der Median des primären Parameters $AUC_{0-\text{inf}}$ betrug $64,0 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$ [25 - 75% Quartil: $49,9 - 72,0 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$]. Die terminale Halbwertszeit $t_{1/2 \text{ Lambda } z}$ lag bei $3,83 \text{ h}$. Die maximalen Blutkonzentrationen waren in der Nicht-Kompartiment- und der Kompartimentanalyse vergleichbar ($28,0 \mu\text{g}/\text{L}$ versus $30,5 \mu\text{g}/\text{L}$). Auch in der Variation (Quotient aus maximalem zu minimalem Wert) konnten ähnliche Ergebnisse gezeigt werden ($9,2$ zu $8,9$). Insgesamt lag die Variation in den Parametern der Nicht-Kompartimentanalyse zwischen $3,8$ (V_{ss}) und $9,2$ (C_{max}) und betrug für die $AUC_{0-\text{inf}}$ $5,9$. Die Parameter V_c und $t_{1/2 \alpha}$ aus der Kompartimentanalyse zeigten mit 32 bzw. 60 eine sehr starke Variation.

Tabelle 14 Pharmakokinetische Parameter von Metoprolol (Gesamtpopulation)

<u>Nicht-Kompartimentalanalyse</u>	Einheit	Median	25%	75%	Bereich	Variation (Max/Min)
Maximale Blutkonzentration (C_{\max})	$\mu\text{g/L}$	28,0	24,3	35,1	8,41 – 77,5	9,2
Area under the curve 0-inf ($AUC_{0\text{-inf}}$)	$\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$	64,0	49,9	72,0	37,2 – 221	5,9
Clearance (Cl)	L/h	79,5	70,2	102	22,7 – 134	5,9
Mean residence time (MRT)	h	4,45	3,83	5,13	1,66 – 11,7	7,0
Verteilungsvolumen <i>steady state</i> (V_{ss})	L	350	299	396	175 – 666	3,8
Terminale Halbwertszeit ($t_{1/2\ \text{Lambda z}}$)	h	3,83	3,29	4,20	1,94 – 9,30	4,8

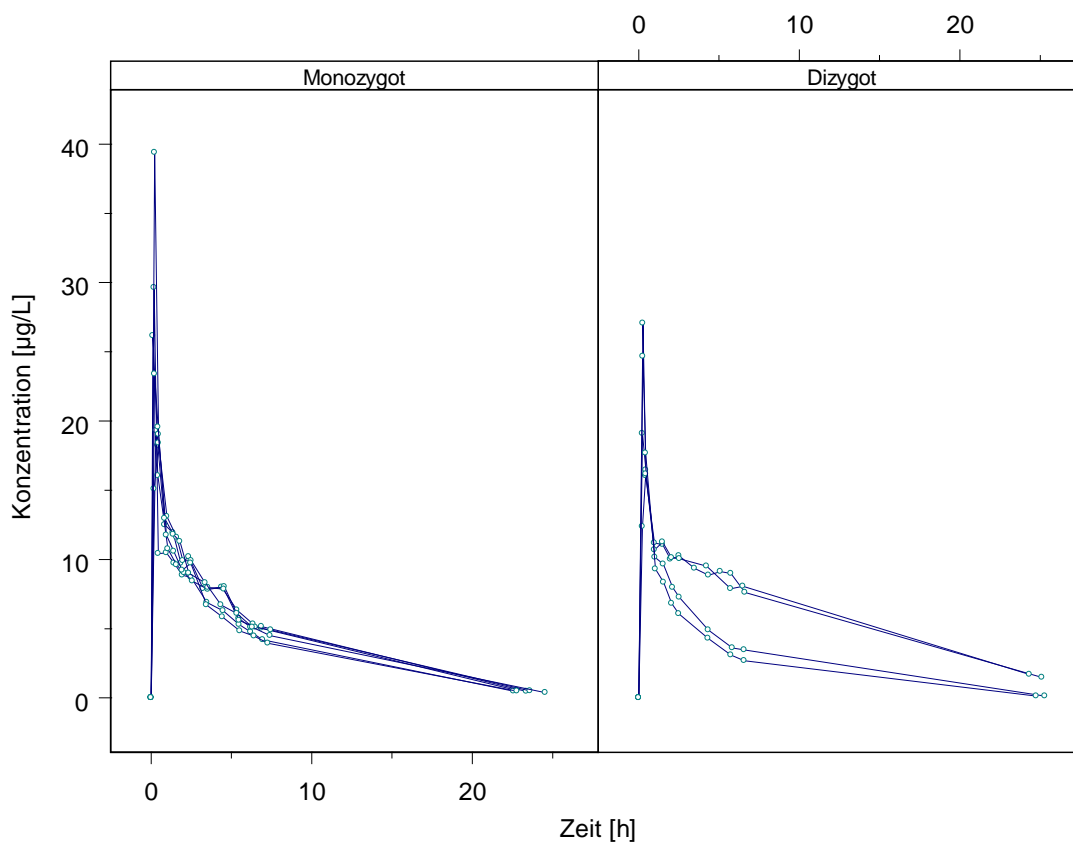
<u>Kompartimentalanalyse</u>	Einheit	Median	25%	75%	Bereich	Variation (Max/Min)
Maximale Blutkonzentration (C_{\max})	$\mu\text{g/L}$	30,5	22,3	42,0	8,97 – 79,6	8,9
Alpha-Halbwertszeit ($t_{1/2\ \alpha}$)	h	0,08	0,06	0,13	0,04 – 2,28	60
Beta-Halbwertszeit ($t_{1/2\ \beta}$)	h	2,82	2,41	3,57	1,74 – 7,74	4,4
Verteilungsvolumen zentrales Kompartiment (V_c)	L	72,4	43,6	147	18,7 – 606	32

Für die Nicht-Kompartimentalanalyse wurden insgesamt 162 Konzentrations-Zeit-Kurven (jeweils 1-3 Studienphasen pro Proband) ausgewertet. Bei der Kompartimentalanalyse waren die pharmakokinetischen Parameter mit dem Programm WinNonlinTM von 11 Studienphasen bzw. Dosierungen nicht mit ausreichender Präzision bestimmbar, so dass hier die Daten aus 151 Konzentrations-Zeit-Kurven präsentiert werden. Die Variation entspricht dem Quotienten aus maximalem Wert des Bereichs und minimalen Wert des Bereichs.

3.3.2 Pharmakokinetische Parameter in den Gruppen der Monozygoten und Dizygoten

Im Folgenden sollen die Unterschiede in den Konzentrations-Zeit-Kurven der Geschwister eines Zwillingspaares unter Betrachtung der Zuordnung zu Mono- oder Dizygotie gezeigt werden. Beispielhaft sind in Abbildung 7 die Konzentrationsverläufe eines mono- und eines dizygoten Zwillingspaares dargestellt. Man kann deutliche Unterschiede in den beiden Konzentrations-Zeit-Verläufen des dizygoten Zwillingspaares sehen, während die Profile für das monozygote Paar nahezu identisch sind.

Abbildung 7 Konzentrations-Zeit-Kurven von Metoprolol (einzelne Zwillingspaare)



Konzentrations-Zeit-Kurven von Metoprolol eines monozygoten Zwillingspaars (je Person hier 3 Studienphasen) und eines dizygoten Zwillingspaars (je Person hier nur 2 Studienphasen).

Unter Betrachtung der pharmakokinetischen Parameter sind vergleichbare Werte in der Gruppe der monozygoten und der Gruppe der dizygoten Zwillinge erkennbar (Tabelle 15 und 16). Die Mediane der $AUC_{0-\infty}$ betragen $60,1 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$ (monozygot) und $66,5 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$ (dizygot).

Die meisten Parameter in den Gruppen der mono- und dizygoten Zwillinge sind nicht wesentlich unterschiedlich, statistisch geprüft wurde das hier nur für die primäre Zielgröße $AUC_{0-\infty}$ mittels des Mann-Whitney-U-Tests ($p = 0,31$).

Tabelle 15 Nicht-Kompartimentalanalyse von Metoprolol (mono- versus dizygot)

<u>Nicht-Kompartimentalanalyse</u>						
<u>monozygot</u>	Einheit	Median	25%	75%	Bereich	Variation (Max/Min)
Maximale Blutkonzentration (C_{\max})	$\mu\text{g/L}$	26,1	19,5	38,4	8,41 – 77,5	9,2
<i>Area under the curve</i> 0-inf ($AUC_{0\text{-inf}}$)	$\mu\text{g}^*\text{h/L}$	60,1	49,8	75,3	37,2 – 221	5,9
Clearance (Cl)	L/h	82,6	66,4	101	22,7 – 134	5,9
<i>Mean residence time</i> (MRT)	h	4,47	3,72	5,62	1,66 – 11,6	7,0
Verteilungsvolumen <i>steady state</i> (V_{ss})	L	356	304	416	175 – 666	3,8
Terminale Halbwertszeit ($t_{1/2 \text{ Lambda } z}$)	h	3,82	3,30	4,42	1,94 – 8,66	4,5

<u>dizygot</u>	Einheit	Median	25%	75%	Bereich	Variation (Max/Min)
Maximale Blutkonzentration (C_{\max})	$\mu\text{g/L}$	27,7	19,8	37,0	11,6 – 52,3	4,9
<i>Area under the curve</i> 0-inf ($AUC_{0\text{-inf}}$)	$\mu\text{g}^*\text{h/L}$	66,5	51,4	74,1	40,7 – 158	3,9
Clearance (Cl)	L/h	75,2	67,5	97,3	31,7 – 123	3,9
<i>Mean residence time</i> (MRT)	h	4,21	3,46	5,20	2,34 – 11,7	5,0
Verteilungsvolumen <i>steady state</i> (V_{ss})	L	336	289	369	223 – 458	2,1
Terminale Halbwertszeit ($t_{1/2 \text{ Lambda } z}$)	h	3,79	2,96	4,11	2,06 – 9,30	4,5

Tabelle 16 Kompartimentalanalyse von Metoprolol (mono- versus dizygot)

<u>Kompartimentalanalyse</u>						
<u>monozygot</u>	Einheit	Median	25%	75%	Bereich	Variation (Max/Min)
Maximale Blutkonzentration (C_{\max})	$\mu\text{g/L}$	30,6	21,8	41,5	8,97 – 79,6	8,9
Alpha-Halbwertszeit ($t_{1/2 \alpha}$)	h	0,07	0,07	0,13	0,04 – 2,28	60,3
Beta-Halbwertszeit ($t_{1/2 \beta}$)	h	3,23	2,52	3,80	1,74 – 7,74	4,4
Verteilungsvolumen zentrales Kompartiment (V_c)	L	62,9	46,0	156	20,6 – 606	29,5

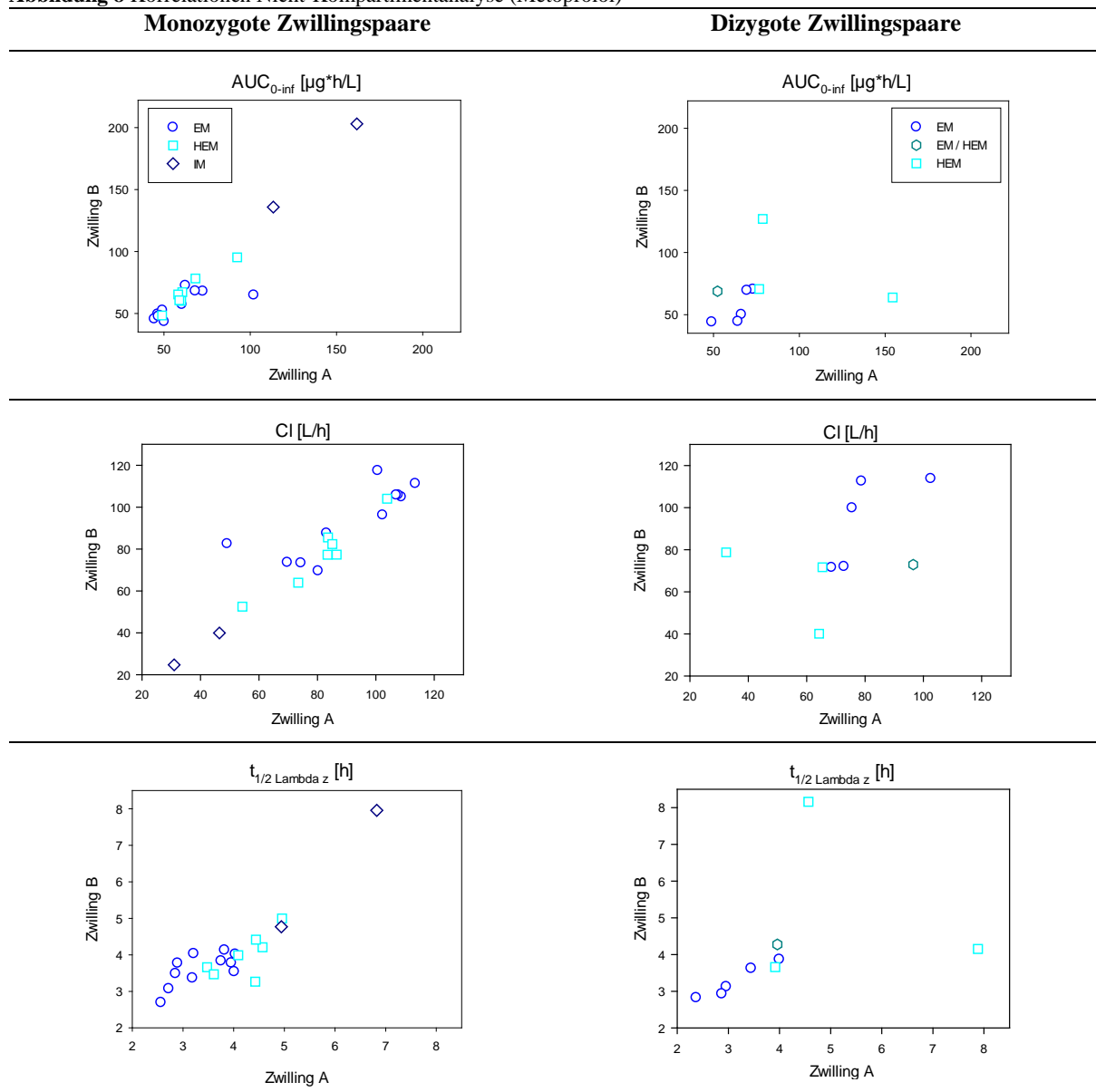
<u>dizygot</u>	Einheit	Median	25%	75%	Bereich	Variation (Max/Min)
Maximale Blutkonzentration (C_{\max})	$\mu\text{g/L}$	34,0	26,2	42,5	15,8 – 61,6	3,9
Alpha-Halbwertszeit ($t_{1/2 \alpha}$)	h	0,08	0,05	0,11	0,04 – 1,36	31,9
Beta-Halbwertszeit ($t_{1/2 \beta}$)	h	2,60	2,32	3,14	1,91 – 4,63	2,4
Verteilungsvolumen zentrales Kompartiment (V_c)	L	66,2	34,7	126	18,7 – 300	16,0

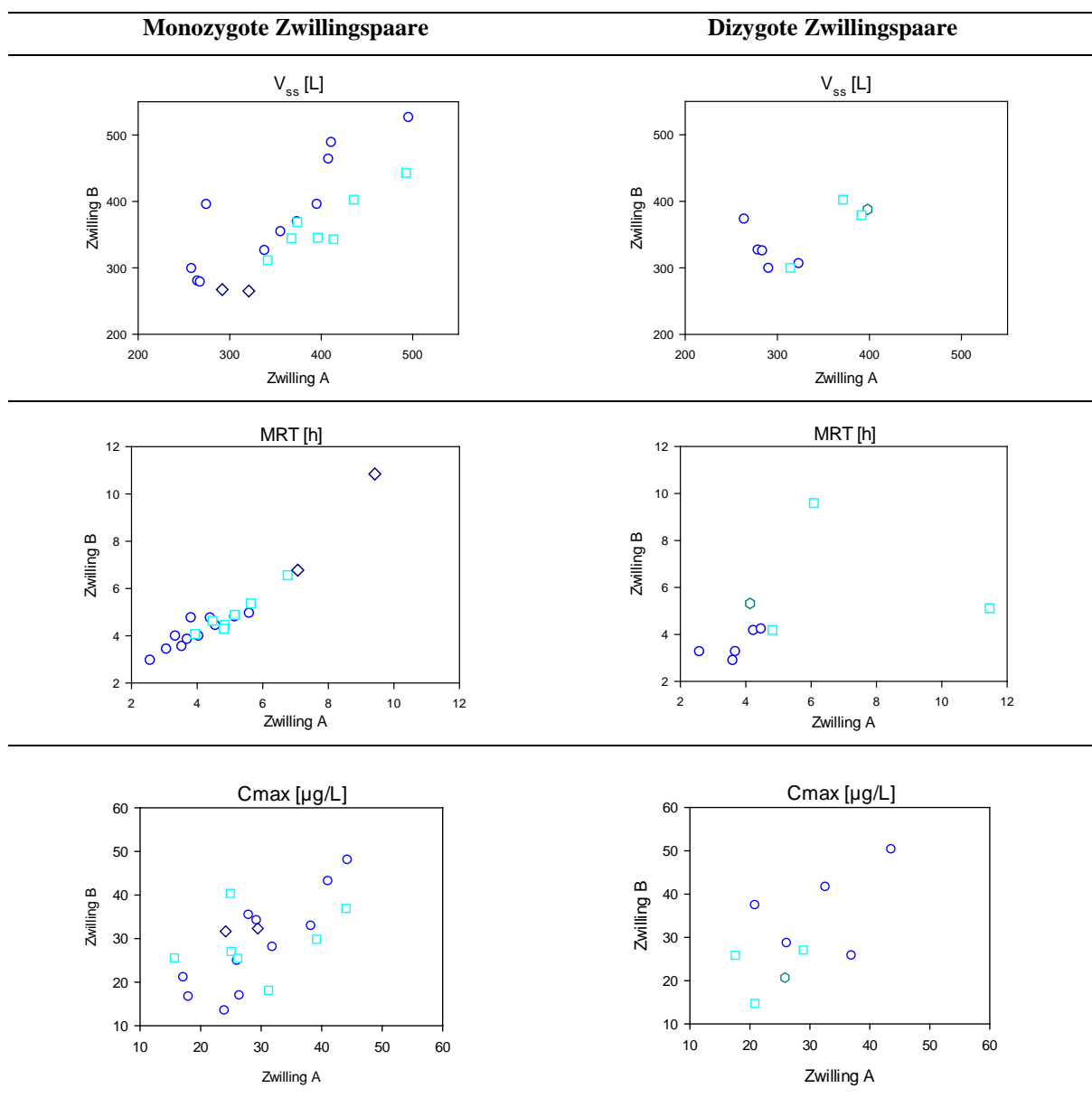
3.3.3 Erbllichkeit der Variation der Metoprolol-Pharmakokinetik

3.3.3.1 Korrelationen und Näherungsformeln für Erbllichkeit

Zur Berechnung der Erbllichkeit wurden zunächst die Pearson-Korrelationskoeffizienten zwischen den Geschwistern ermittelt. Die Korrelationsgraphiken in Abbildung 8 zeigen die Parameter AUC_{0-inf} , Cl , $t_{1/2}$ λ_z , V_{ss} , MRT und C_{max} unterteilt nach monozygoten und dizygoten Zwillingspaaren sowie unterschiedliche Symbole für die ermittelten Genotypen. Deutlich werden höhere Korrelationen zwischen monozygoten Geschwistern und die Tendenz, dass bei Personen mit niedrigerer Aktivität von CYP2D6 (intermediäre [IM] und heterozygot schnelle Metabolisierer [HEM]) höhere Werte für den primären Parameter AUC_{0-inf} ermittelt wurden.

Abbildung 8 Korrelationen Nicht-Kompartimentalanalyse (Metoprolol)





Gezeigt werden jeweils die Mittelwerte der absolvierten Studienphasen, da diese am genauesten die individuelle Disposition widerspiegeln. EM = schneller Metabolisierer, HEM = heterozygot schneller Metabolisierer, IM = intermediärer Metabolisierer

Für alle pharmakokinetischen Parameter der Nicht-Kompartimentalanalyse (arithmetische Mittelwerte aus den absolvierten Studienphasen) ist eine größere Ähnlichkeit bei den monozygoten Zwillingen im Vergleich zu den dizygoten Zwillingspaaren erkennbar (Tabelle 17). Die Korrelationskoeffizienten der monozygoten Paare sind für die Parameter AUC_{0-inf} , MRT und Clearance am größten. Die Erblichkeitsberechnung durch die Formel „ $H^{2(V)} = r_{MZ} - r_{DZ} / 1 - r_{DZ}$ “ ergibt Werte zwischen 0,09 für C_{max} und 0,93 für AUC_{0-inf} für die Parameter. Das bedeutet, dass in der Variation der Maximalkonzentration nur ein kleiner Anteil durch erbliche Faktoren erklärt ist, während 93% der Variation in der AUC_{0-inf} erblich bedingt scheint. Auch hier stellt sich für die Parameter AUC_{0-inf} , MRT und Clearance die

Erblichkeit am größten dar. Die Formel „ $H^{2(F)} = 2 * (r_{MZ} - r_{DZ})$ “ liefert noch etwas höhere Werte für das Ausmaß der Erblichkeit.

Tabelle 17 Korrelationen und Erblichkeit bei Metoprolol

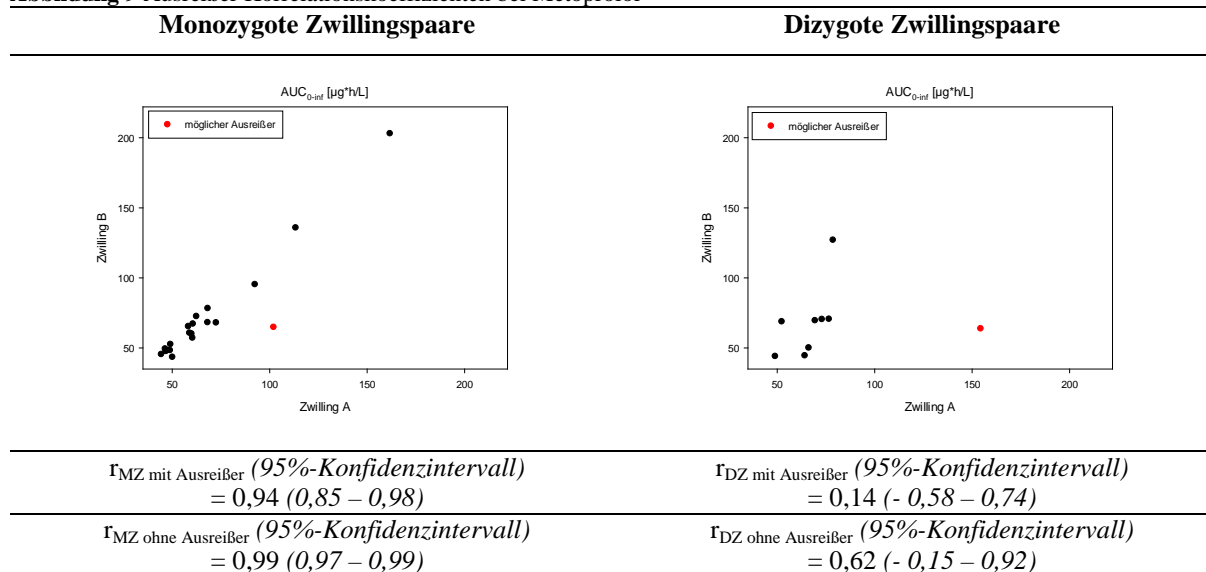
<u>Nicht-Kompartimentanalyse</u>	C_{max}	AUC _{0-inf}	Cl	Cl/kg	MRT	V_{ss}	$t_{1/2 \text{ Lambda } z}$
r_{MZ}	0,64	0,94	0,91	0,87	0,95	0,79	0,88
(95%-Konfidenzintervall)	(0,29 - 0,84)	(0,85 - 0,98)	(0,78 - 0,96)	(0,69 - 0,95)	(0,88 - 0,98)	(0,53 - 0,91)	(0,72 - 0,95)
r_{DZ}	0,56	0,14	0,41	0,51	0,38	0,61	0,35
(95%-Konfidenzintervall)	(- 0,16 - 0,89)	(- 0,58 - 0,74)	(- 0,35 - 0,85)	(- 0,23 - 0,88)	(- 0,38 - 0,83)	(- 0,10 - 0,91)	(- 0,41 - 0,82)
r_{MZ}^2	0,41	0,88	0,83	0,76	0,90	0,62	0,77
r_{DZ}^2	0,31	0,02	0,17	0,26	0,14	0,37	0,12
$H^{2(V)} = r_{MZ} - r_{DZ} / 1 - r_{DZ}$	0,09	0,93	0,85	0,73	0,92	0,46	0,82
$H^{2(F)} = 2 * (r_{MZ} - r_{DZ})$	0,16	1,60	1,00	0,72	1,14	0,36	1,06
<u>Kompartimentanalyse</u>	C_{max}	$t_{1/2 \alpha}$	$t_{1/2 \beta}$	V_c			
r_{MZ}	0,27	<0	0,61	0,40			
(95%-Konfidenzintervall)	(- 0,19 - 0,64)	(-0,52 - 0,35)	(0,23 - 0,83)	(- 0,06 - 0,71)			
r_{DZ}	0,05	0,19	<0	0,16			
(95%-Konfidenzintervall)	(- 0,73 - 0,77)	(-0,66 - 0,82)	(- 0,89 - 0,49)	(- 0,67 - 0,82)			
r_{MZ}^2	0,08	0,01	0,37	0,16			
r_{DZ}^2	<0,01	0,04	-	0,03			
$H^{2(V)} = r_{MZ} - r_{DZ} / 1 - r_{DZ}$	0,24	<0	0,73	0,27			
$H^{2(F)} = 2 * (r_{MZ} - r_{DZ})$	0,46	<0	2,05	0,45			

Erkennbar ist, dass die Vorgänge unmittelbar nach Infusion (C_{max} , $t_{1/2 \alpha}$ und V_c) kaum von erblichen Faktoren determiniert sind, während die spätere Elimination in hohem Maße erblich ist.

In der Kompartimentanalyse zeigte nur $t_{1/2 \beta}$ eine deutlich höhere Korrelation bei monozygoten als bei dizygoten Zwillingen. Die Beta Halbwertszeit $t_{1/2 \beta}$ der Kompartimentanalyse entspricht im Wesentlichen der terminalen Halbwertszeit ($t_{1/2 \text{ Lambda } z}$) der Nicht-Kompartimentanalyse. Hier zeigt sich ein ähnliches Ergebnis nach der Formel „ $H^{2(V)} = r_{MZ} - r_{DZ} / 1 - r_{DZ}$ “ (0,73 in Kompartimentanalyse, 0,83 in Nicht-Kompartimentanalyse). Mit der Formel „ $H^{2(F)} = 2 * (r_{MZ} - r_{DZ})$ “ lassen sich hier für beide Analysen ein Wert > 1 berechnen.

Exemplarisch wurde für den primären Parameter AUC_{0-inf} der Einfluss möglicher Ausreißer auf die Schätzung der Korrelationskoeffizienten und die Berechnungen der Erblichkeit untersucht (Abbildung 9 und Tabelle 18). Die Identifikation von Ausreißern erfolgte dabei rein optisch und unter Berücksichtigung der durch molekulargenetische Varianten erklärten Werte.

Abbildung 9 Ausreißer Korrelationskoeffizienten bei Metoprolol



Ersichtlich ist, dass vor allem bei den dizygoten Zwillingen der Korrelationskoeffizient deutlich größer wird, wenn der Ausreißer nicht in die Berechnung eingeht. Das 95%-Konfidenzintervall bleibt hingegen sehr breit. Erklärbar ist dies durch die geringe Anzahl an dizygoten Zwillingen.

Tabelle 18 Ausreißer Erbllichkeit bei Metoprolol

	AUC _{0-inf} - mit Ausreißer	AUC _{0-inf} - ohne Ausreißer
$H^{2(V)} = r_{MZ} - r_{DZ} / 1 - r_{DZ}$	0,93	0,98
$H^{2(F)} = 2 * (r_{MZ} - r_{DZ})$	1,60	0,74

Die Berechnung der Erbllichkeit zeigten durch unterschiedliche Wichtungen der Korrelationskoeffizienten in den verwendeten Formeln für $H^{2(V)}$ eine höhere Erbllichkeit unter Auslassung des Ausreißers, während die Erbllichkeit für $H^{2(F)}$ geringer wird, wenn der Ausreißer nicht in die Analyse eingeht.

Zur weiteren Analyse wurden auch die Korrelationskoeffizienten und Erbllichkeitsberechnungen der Nicht-Kompartimentanalyse jeweils einzeln für jede Studienphase erhoben. (Tabelle 19). Gezeigt wird hier die Erbllichkeit unter Verwendung der Formel „ $H^{2(V)} = r_{MZ} - r_{DZ} / 1 - r_{DZ}$ “.

Tabelle 19 Reproduzierbarkeit der Erbllichkeitsschätzungen an 3 Studienphasen

	Studienphase 1	Studienphase 2	Studienphase 3	Mittelwert
C_{max}	0,53	0,48	0,33	0,45
AUC _{0-inf}	0,93	0,90	0,86	0,90
Cl	0,80	0,85	0,56	0,74
MRT	0,84	0,23	0,80	0,62
V_{ss}	0,43	0,35	0,75	0,51
$t_{1/2 \text{ Lambda } z}$	0,82	-0,50	0,73	0,35

Es fällt auf, dass die errechnete Erbllichkeit an den Studienphasen teilweise sehr ähnlich (AUC_{0-inf}), teilweise sehr unterschiedlich ist ($t_{1/2 \text{ Lambda } z}$). Die Mittelwerte aus den drei Studienphasen entsprechen zudem nicht den Berechnungen aus den pharmakokinetischen Parametern in Tabelle 17. Dies ist dadurch bedingt, dass nicht alle Probanden alle drei Studienphasen absolviert haben.

3.3.3.2 Erblichkeit nach Strukturgleichungsmodellierung

Es wurden mittels einer Strukturgleichungsmodellierung Erblichkeitsberechnungen für den primären Parameter AUC_{0-inf} durchgeführt. Das am besten passende Modell (kleinstes Akaike Informationskriterium [*Akaike information criterium*, AIC] bei größtem p-Wert) für die Erblichkeitsberechnung stellt sich hierbei unter Annahme der latenten Variablen A (additive genetische Faktoren) und E (individuelle Umweltfaktoren [$E = environmental$]) dar. Nach der Berechnung lassen sich 88,5% der Variation in der AUC_{0-inf} durch additive genetische Einflüsse erklären, 11,5% durch individuelle Umweltfaktoren.

Tabelle 20 Strukturgleichungsmodellierung der Erblichkeit von Metoprolol

Modell	A	D	C	E
ACE	0,885	-	0,000	0,115
ADE	0,000	0,881	-	0,119
AE	0,885	-	-	0,115
CE	-	-	0,657	0,343

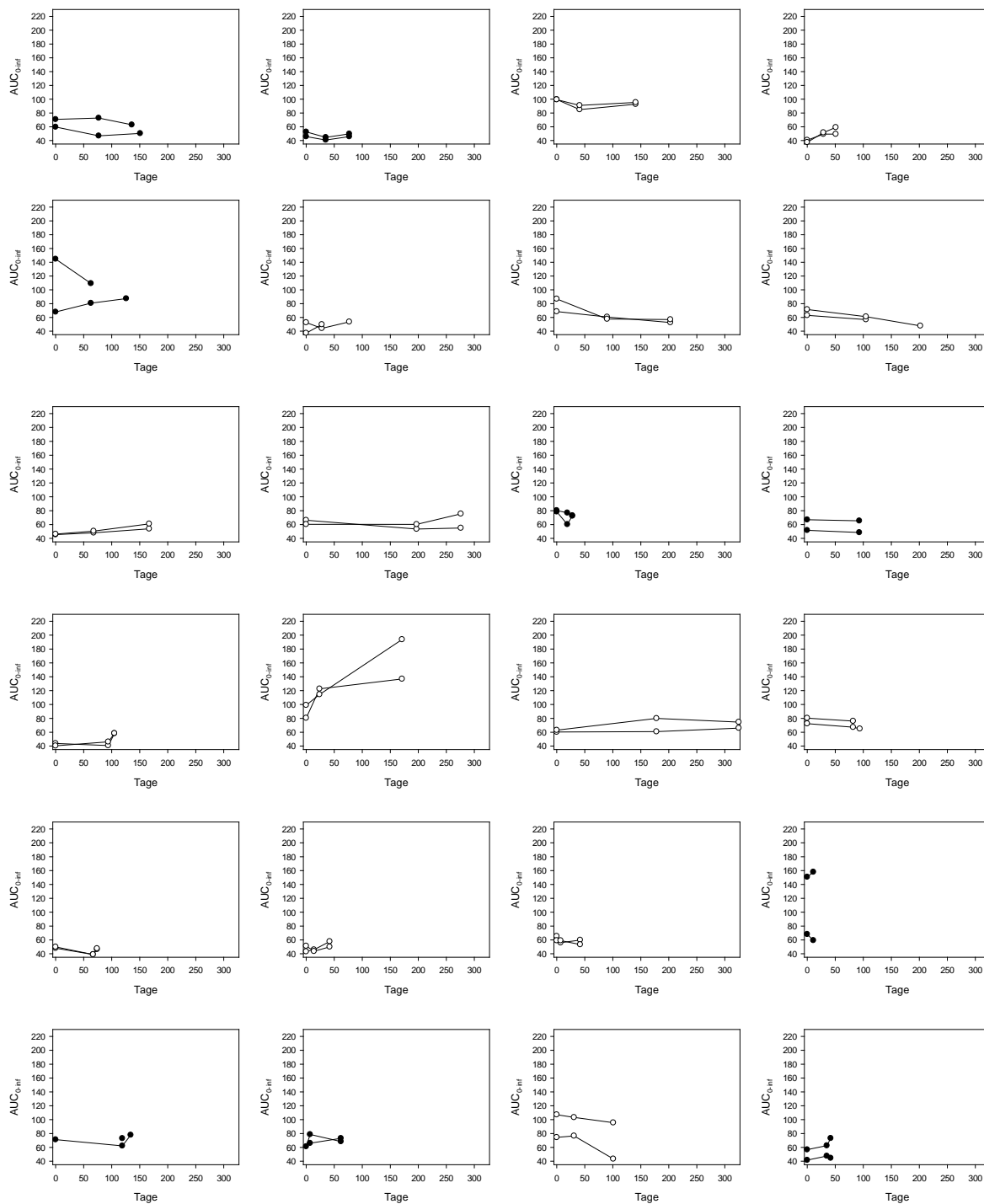
Modell	Chi ²	p-Wert	AIC
Saturiertes Modell	-	-	544,54
ACE	24,94	0,051	539,47
ADE	23,94	0,066	538,50
AE	24,94	0,071	537,47
CE	37,30	0,002	549,84

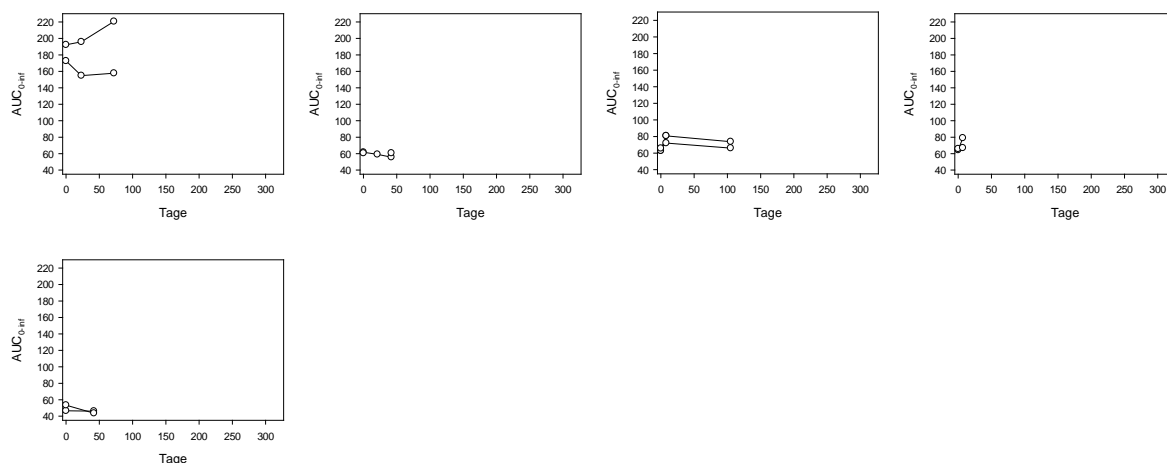
Die Modelle werden auf gute Passgenauigkeit zum saturierten Modell getestet. Das saturierte Modell besteht als Basis-Modell lediglich aus den gegebenen Werten und dient der Testung der interessierenden Modelle ACE, ADE, AE, CE. Hierbei entsprechen ein niedriges AIC und ein nicht signifikanter p-Wert einer guten Anpassung. Die beste Anpassung wurde hier für das AE-Modell berechnet.

3.3.3.3 Erblichkeitsberechnung aus intra- und interindividueller Variation

Es erfolgte eine bis zu dreimalige Applikation der Studienmedikation, um intraindividuelle Unterschiede zu erfassen. Im Protokoll wurden keine definierten maximalen Zeitabstände zwischen den Studienphasen vorgegeben. Festgelegt war lediglich ein Mindestabstand von 7 Tagen, um eine Kumulation zu vermeiden. Abbildung 10 zeigt die individuellen Verläufe der AUC_{0-inf} [$\mu g \cdot h/L$] von Metoprolol.

Abbildung 10 Individueller Verlauf der AUC_{0-inf} (Metoprolol)





In jeder Abbildung sind die Geschwister eines Zwillingspaares gemeinsam dargestellt. Weiße Punkte = monozygote Paare, schwarze Punkte = dizygoten Paare. AUC_{0-inf} in $[\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}]$.

Nach Kalow et al. (1998) sind Erblichkeitsbestimmungen in der Pharmakokinetik durch repetitive Gabe von Testsubstanzen möglich. Für die Studienpopulation in dieser Arbeit sind die Werte für die genetische Komponente (r_{GC}) der pharmakokinetischen Parameter aus der Nicht-Kompartimentanalyse dargestellt (Tabelle 21). Die Erblichkeit schwankt nach dieser Berechnung zwischen 0,13 (C_{max}) und 0,93 (AUC_{0-inf}).

Tabelle 21 Genetische Komponente (Metoprolol)

	C_{max}	AUC_{0-inf}	CI	MRT	V_{ss}	$t_{1/2}$ Lambda z
r_{GC} (genetische Komponente)	0,13	0,93	0,84	0,91	0,47	0,85

Die Berechnung von r_{GC} erfolgt durch den Vergleich der intraindividuellen Varianz (SD_w^2) mit der interindividuellen Varianz (SD_b^2) nach der Formel: $r_{GC} = (SD_b^2 - SD_w^2) / SD_b^2$. In die Analysen ist ein Proband nicht eingegangen, da er nur eine Studienphase absolviert hat.

3.3.4 Berücksichtigung bereits bekannter Genotypen und anderer Einflussfaktoren

In einer multiplen linearen Regressionsanalyse wurde die Abhängigkeit der primären Zielgröße AUC_{0-inf} (jeweils Mittelwert der absolvierten Studienphasen) von der Genaktivität von CYP2D6 sowie von den möglichen weiteren Einflussfaktoren, Geschlecht, Gewicht, Größe und Alter, analysiert. Die Genaktivität wurde, wie in der Einleitung beschrieben (Tabelle 1), mittels der Anzahl aktiver Allele und Zuordnung zu den Phänotypen bestimmt.

Signifikant ist in dieser Analyse nur die CYP2D6 Genaktivität (Tabelle 22). Die möglichen Einflussfaktoren, Geschlecht, Gewicht, Größe und Alter, haben keinen signifikanten Einfluss auf die AUC_{0-inf} , so dass Unterschiede hier lediglich durch Zufälle erklärt werden können. R-Quadrat gibt an, wie viel der Variation der abhängigen Variablen durch die

Einflussvariablen erklärbar ist. Demnach sind 38,2% der Variation in der AUC_{0-inf} durch die bekannten Genotypen in CYP2D6 bestimmt.

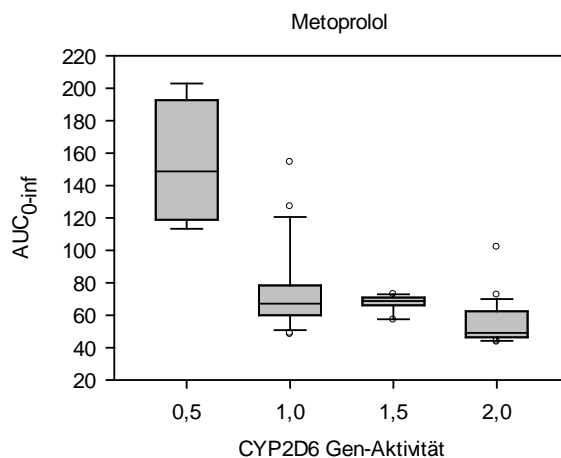
Tabelle 22 Multiple lineare Regressionsanalyse CYP2D6

Modellzusammenfassung		R	R-Quadrat	
abhängige Variable: AUC_{0-inf}		0,664	0,441	
Unabhängige Einflussvariablen	Regressionskoeffizient	Standardfehler	p-Wert	Anteil von R-Quadrat
CYP2D6-Aktivität	-39,3	6,78	0,000	0,382 $\Sigma = 0,059$
Geschlecht	-7,09	12,03	n.s.	
Gewicht	-0,57	0,44	n.s.	
Größe	29,34	71,27	n.s.	
Alter	0,35	0,44	n.s.	

unabhängige Variablen: Aktivität CYP2D6, Geschlecht, Gewicht, Größe, Alter, n.s. = nicht signifikant (Niveau 0,05)

Abbildung 11 veranschaulicht die Unterschiede in der AUC_{0-inf} je nach CYP2D6 Genaktivität. Es sind deutliche, statistische signifikante Unterschiede zwischen Personen mit einer Genaktivität von 0,5 (Intermediäre Metabolisierer) und Personen mit einer Genaktivität von 2 (Schnelle Metabolisierer) erkennbar (p-Wert = 0,002 [Mann-Whitney-U-Test]).

Abbildung 11 AUC_{0-inf} stratifiziert nach CYP2D6-Phänotyp



Dargestellt sind Median, 25 – 75%-Quartil, 10 – 90%-Bereich (Antennen) und Ausreißer im Bereich zwischen 0 – 10% und 90 – 100% (Ausnahme: bei der Genaktivität 0,5 begrenzen die Antennen den gesamten Bereich, da nur 4 Werte vorhanden sind). AUC_{0-inf} in $[\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{L}]$ und jeweils als Mittelwert der absolvierten Studienphasen eines jeden Probanden.

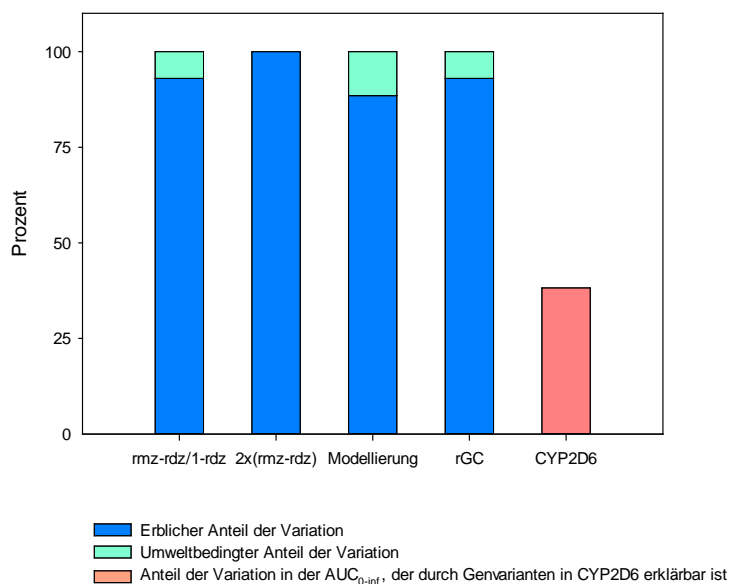
3.3.5 Zusammenfassung: Erbllichkeit der CYP2D6-Aktivität

In den verschiedenen Methoden zur quantitativen Schätzung der Erbllichkeit in der Variation der Aktivität von CYP2D6 lassen sich vergleichbare Werte zeigen. Zusammenfassend werden hier die Ergebnisse für den primären Parameter AUC_{0-inf} gezeigt (Abbildung 12).

Die Formel „ $H^{2(V)} = r_{MZ} - r_{DZ} / 1 - r_{DZ}$ “ ergibt einen Wert von 0,93 (93% Erbllichkeit), die Formel „ $H^{2(F)} = 2 * (r_{MZ} - r_{DZ})$ “ einen Wert von 1,6 (100% Erbllichkeit). Nach Strukturgleichungs-modellierung lassen sich 88,5% der Variation in der AUC_{0-inf} durch genetische Effekte (A = additive genetische Effekte) beschreiben, die Ermittlung der genetischen Komponente r_{GC} durch Vergleich der intra- und interindividuellen Variation bei repetitiver Arzneimittelgabe ergibt ebenfalls einen Wert von 0,93 (93%).

Im Gegensatz dazu lässt sich durch die multiple lineare Regressionsanalyse lediglich 38,2% der Variation in der AUC_{0-inf} durch die Genaktivität von CYP2D6 in der Studienpopulation vorhersagen.

Abbildung 12 Erbllichkeit der Aktivität von CYP2D6



Dargestellt sind die Ergebnisse für die Erbllichkeitsberechnungen in der Variation der AUC_{0-inf} und das Ergebnis der Regressionsanalyse für die Vorhersagbarkeit der AUC_{0-inf} durch die Genaktivität in CYP2D6. Deutlich ist, dass nur ein geringer Anteil durch die bekannten Genvarianten von CYP2D6 in der Studienpopulation den Gesamtanteil der Erbllichkeit beschreiben kann.

3.4 CYP2D6 - Pharmakokinetik von Alpha-Hydroxymetoprolol

3.4.1 Pharmakokinetische Parameter in der Gesamtgruppe

Für die Auswertung der pharmakokinetischen Parameter von Alpha-Hydroxymetoprolol wurde lediglich eine Nicht-Kompartimentanalyse durchgeführt. Der Median der AUC_{0-inf} lag bei 35,6 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$ und war in den Gruppen monozygote Zwillinge und dizygote Zwillinge vergleichbar (33,4 und 37,7 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$; Werte hier nicht in Tabellenform dargestellt). Die Variation betrug je nach Parameter zwischen 4,3 (MRT) und 19,0 (C_{max}).

Tabelle 23 Pharmakokinetische Parameter von Alpha-Hydroxymetoprolol

<u>Nicht-Kompartimentanalyse</u>	Einheit	Median	25%	75%	Bereich	Variation (Max/Min)
Maximale Blutkonzentration (C_{max})	$\mu\text{g}/\text{L}$	2,45	1,88	2,98	0,23 – 4,68	19,0
Area under the curve $_{0-inf}$ (AUC_{0-inf})	$\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$	35,6	29,9	41,7	6,36 – 78,6	12,4
Area under the curve $_{last}$ (AUC_{last})	$\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$	30,7	24,2	35,4	3,54 – 50,7	14,3
Mean residence time (MRT)	h	11,8	10,2	14,1	7,67 – 33,0	4,3
Terminale Halbwertszeit ($t_{1/2 \text{ Lambda } z}$)	h	7,34	6,18	8,74	4,85 – 22,4	4,6

Betrachtet wurden 153 Konzentration-Zeit-Kurven der Gesamtpopulation. Bei einem Paar mit IM-Genotyp (insgesamt 6 Studienphasen) und einem Probanden mit HEM-Genotyp (2 Studienphasen) konnte nach Metoprololgabe kein Alpha-Hydroxymetoprolol nachgewiesen werden. Vermutlich wurde Metoprolol vollständig über CYP2D6 zu dem Metaboliten H117/04 umgewandelt. An einer Studienphase wurde in den Analysen kein Abfall der Alpha-Hydroxymetoprololkonzentration beobachtet, so dass hier keine Werte für die nach unendlich extrapolierten Parameter AUC_{0-inf} , MRT und $t_{1/2 \text{ Lambda } z}$ vorliegen.

3.4.2 Erbllichkeit der pharmakokinetischen Parameter von Alpha-Hydroxymetoprolol

Bezüglich der Korrelationskoeffizienten zeigten sich die größten Unterschiede zwischen mono- und dizygoten Zwillingen bei der AUC_{0-inf} . Nach der Formel „ $H^{2(V)} = r_{MZ} - r_{DZ} / 1 - r_{DZ}$ “ konnte ein Anteil erblicher Faktoren an der Variation in der AUC_{0-inf} von 0,89 berechnet werden. Die Formel „ $H^{2(F)} = 2 * (r_{MZ} - r_{DZ})$ “ ergab einen Wert von 1,03 (Tabelle 24).

Tabelle 24 Korrelationen und Erblichkeit bei Alpha-Hydroxymetoprolol

	C_{\max}	$AUC_{0-\text{inf}}$	AUC_{last}	MRT	$t_{1/2 \text{ Lambda } z}$
r_{MZ}	0,96	0,94	0,95	0,73	0,70
(95%-Konfidenzintervall)	(0,89 – 0,98)	(0,85 – 0,98)	(0,87 – 0,98)	(0,41 – 0,89)	(0,36 – 0,88)
r_{DZ}	0,93	0,42	0,58	0,39	0,37
(95%-Konfidenzintervall)	(0,64 – 0,99)	(– 0,40 – 0,87)	(– 0,21 – 0,91)	(– 0,43 – 0,86)	(– 0,45 – 0,85)
r_{MZ}^2	0,92	0,88	0,90	0,53	0,49
r_{DZ}^2	0,86	0,18	0,34	0,39	0,37
$H^{2(V)} = r_{\text{MZ}} - r_{\text{DZ}} / 1 - r_{\text{DZ}}$	0,41	0,89	0,88	0,56	0,52
$H^{2(F)} = 2 * (r_{\text{MZ}} - r_{\text{DZ}})$	0,06	1,03	0,73	0,68	0,66

Nach Strukturgleichheitsmodellierung konnte für die $AUC_{0-\text{inf}}$ ein Wert von 0,93 für A (additive genetische Effekte) und 0,07 für E (individuelle Umweltfaktoren) bestimmt werden (niedrigstes AIC und höchster p-Wert bei Strukturgleichheitsmodellierung im Vergleich zu den weiteren betrachteten Modellen ACE, ADE und CE).

Die Berechnungen für die genetische Komponente durch die Betrachtung der intra- und interindividuellen Unterscheide lieferte ähnliche Ergebnisse (r_{GC} für $AUC_{0-\text{inf}} = 0,84$).

Tabelle 25 Genetische Komponente (Alpha-Hydroxymetoprolol)

	C_{\max}	$AUC_{0-\text{inf}}$	AUC_{last}	MRT	$t_{1/2 \text{ Lambda } z}$
r_{GC} (genetische Komponente)	0,92	0,84	0,90	0,83	0,81

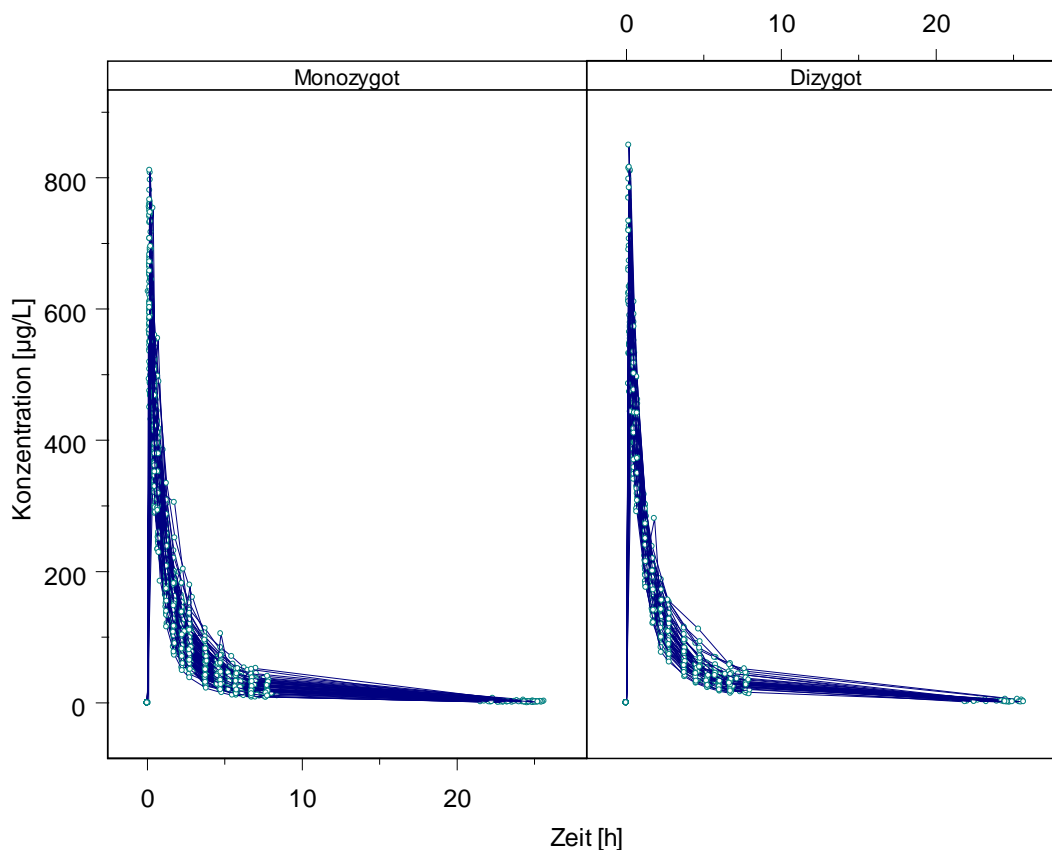
3.5 CYP2C9 und OATP1B1 - Pharmakokinetik von Torasemid

In diesem Kapitel sollen analog zu den Betrachtungen aus dem vorangegangenen Kapitel 3.3 „CYP2D6 – Pharmakokinetik von Metoprolol“ die Analysen zur Erblichkeit in der Aktivität des Enzyms CYP2C9 und des Arzneimitteltransporters OATP1B1 dargestellt werden. Hierbei wurde teilweise auf eine wiederholende detaillierte Darstellung verzichtet.

3.5.1 Pharmakokinetische Parameter in der Gesamtgruppe

Die Konzentrations-Zeit-Kurven nach Torasemidapplikation ähneln sich zwischen den ein- und dizygoten Zwillingspaaren sehr. Ersichtlich ist auch, dass die Variation in der untersuchten Studienpopulation gering war.

Abbildung 13 Konzentrations-Zeit-Kurven von Torasemid (Gesamtpopulation)



Dargestellt sind hier alle 171 im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Konzentrations-Zeit-Kurven, nach monozygoten und dizygoten Zwillingspaaren unterteilt.

Für die gesamte Studienpopulation sind die pharmakokinetischen Parameter der Nicht-Kompartiment- und der Kompartimentanalyse für Torasemid in Tabelle 26 zusammengefasst. Der Median der $AUC_{0-\infty}$ betrug für die gesamte Population $957 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$ [25 – 75% Bereich: $823 - 1156 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$]. Die aus Abbildung 13 bereits ersichtliche geringe Variation zeigt sich auch in den pharmakokinetischen Parametern. Hier variieren die Werte unter Betrachtung beider Analysen (Nicht-Kompartiment- und Kompartimentanalyse) zwischen 2,3 (C_{max}) und 4,8 ($t_{1/2 \alpha}$).

Tabelle 26 Pharmakokinetische Parameter von Torasemid (Gesamtpopulation)

<u>Nicht-Kompartimentalanalyse</u>	Einheit	Median	25%	75%	Bereich	Variation (Max/Min)
Maximale Blutkonzentration (C_{\max})	$\mu\text{g/L}$	611	557	686	375 – 849	2,3
Area under the curve 0-inf ($AUC_{0\text{-inf}}$)	$\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$	957	823	1156	563 – 1762	3,1
Clearance (Cl)	L/h	2,61	2,16	3,04	1,42 – 4,44	3,1
Mean residence time (MRT)	h	3,09	2,40	3,62	1,93 – 8,00	4,1
Verteilungsvolumen <i>steady state</i> (V_{ss})	L	7,73	6,91	8,97	4,94 – 15,2	3,1
Terminale Halbwertszeit ($t_{1/2\lambda z}$)	h	3,79	2,77	4,24	1,66 – 6,15	3,1
<u>Kompartimentalanalyse</u>	Einheit	Median	25%	75%	Bereich	Variation (Max/Min)
Maximale Blutkonzentration (C_{\max})	$\mu\text{g/L}$	745	673	825	499 – 1231	2,5
Alpha-Halbwertszeit ($t_{1/2\alpha}$)	h	0,43	0,38	0,49	0,24 – 1,13	4,8
Beta-Halbwertszeit ($t_{1/2\beta}$)	h	2,25	2,00	2,56	1,56 – 5,57	3,6
Verteilungsvolumen zentrales Kompartiment (V_c)	L	3,27	2,97	3,64	1,96 – 4,94	2,5

Betrachtet werden hier in beiden Analysemethoden jeweils insgesamt 171 Konzentrations-Zeit-Kurven.

3.5.2 Pharmakokinetische Parameter in den Gruppen der Monozygoten und Dizygoten

Die monozygoten und dizygoten Zwillingspaare sind im Wesentlichen bezüglich der pharmakokinetischen Parameter vergleichbar (Tabellen 27 und 28). Auffällig ist jedoch ein statistisch signifikanter Unterschied in dem primären Parameter $AUC_{0\text{-inf}}$ zwischen den beiden Gruppen (p-Wert < 0,05 [Mann-Whitney-U-Test]). Der Median der $AUC_{0\text{-inf}}$ betrug $905 \mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ in der Gruppe der monozygoten Zwillinge und $1079 \mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ bei den dizygoten Zwillingspaaren. Erklärt ist dies durch einen prozentual höheren Anteil von Trägern des niedrig aktiven *3 Allels in CYP2C9 bei den dizygoten Zwillingen (22% der dizygoten und 15% der monozygoten Zwillinge tragen den *1/*3-Genotyp).

Tabelle 27 Nicht-Kompartimentalanalyse von Torasemid (mono- versus dizygot)

<u>Nicht-Kompartimentalanalyse</u>						
<u>monozygot</u>	Einheit	Median	25%	75%	Bereich	Variation (Max/Min)
Maximale Blutkonzentration (C_{\max})	$\mu\text{g/L}$	608	554	677	375 – 812	2,2
Area under the curve 0-inf ($AUC_{0\text{-inf}}$)	$\mu\text{g}^*\text{h/L}$	905	746	1086	563 – 1762	3,1
Clearance (Cl)	L/h	2,76	2,30	3,35	1,42 – 4,44	3,1
Mean residence time (MRT)	h	3,04	2,33	3,53	1,93 – 7,97	4,1
Verteilungsvolumen <i>steady state</i> (V_{ss})	L	7,80	7,10	9,04	5,26 – 15,2	2,9
Terminale Halbwertszeit ($t_{1/2 \text{ Lambda } z}$)	h	3,74	2,76	4,26	1,66 – 4,96	3,0
<u>dizygot</u>	Einheit	Median	25%	75%	Bereich	Variation (Max/Min)
Maximale Blutkonzentration (C_{\max})	$\mu\text{g/L}$	616	561	713	431 – 849	2,0
Area under the curve 0-inf ($AUC_{0\text{-inf}}$)	$\mu\text{g}^*\text{h/L}$	1079	942	1282	733 – 1663	2,3
Clearance (Cl)	L/h	2,32	1,95	2,65	1,50 – 3,41	2,3
Mean residence time (MRT)	h	3,26	2,68	3,76	2,01 – 6,49	3,2
Verteilungsvolumen <i>steady state</i> (V_{ss})	L	7,09	6,78	8,39	4,94 – 10,8	2,3
Terminale Halbwertszeit ($t_{1/2 \text{ Lambda } z}$)	h	3,85	2,86	4,20	1,81 – 6,15	3,4

Tabelle 28 Kompartimentalanalyse von Torasemid (mono- versus dizygot)

<u>Kompartimentalanalyse</u>						
<u>monozygot</u>	Einheit	Median	25%	75%	Bereich	Variation (Max/Min)
Maximale Blutkonzentration (C_{\max})	$\mu\text{g/L}$	745	670	833	499 – 1019	2,0
Alpha-Halbwertszeit ($t_{1/2 \alpha}$)	h	0,42	0,38	0,48	0,29 – 1,13	3,9
Beta-Halbwertszeit ($t_{1/2 \beta}$)	h	2,18	1,98	2,49	1,56 – 5,57	3,6
Verteilungsvolumen zentrales Kompartiment (V_c)	L	3,25	2,93	3,67	2,39 – 4,94	2,1
<u>dizygot</u>	Einheit	Median	25%	75%	Bereich	Variation (Max/Min)
Maximale Blutkonzentration (C_{\max})	$\mu\text{g/L}$	755	696	845	516 – 1231	2,4
Alpha-Halbwertszeit ($t_{1/2 \alpha}$)	h	0,48	0,41	0,55	0,24 – 0,87	3,7
Beta-Halbwertszeit ($t_{1/2 \beta}$)	h	2,40	2,07	2,92	1,62 – 4,79	3,0
Verteilungsvolumen zentrales Kompartiment (V_c)	L	3,22	2,89	3,54	1,96 – 4,79	2,4

3.5.3 Erbllichkeit der Variation der Torasemid-Pharmakokinetik

3.5.3.1 Korrelationen und Näherungsformeln für Erbllichkeit

Abbildung 14 zeigt die Korrelationsgrafiken der Parametern der Nicht-Kompartimentanalyse von Torasemid (AUC_{0-inf} , Cl , $t_{1/2}$ λ_z , V_{ss} , MRT und C_{max}), Tabelle 29 die Korrelationsquotienten und Erbllichkeitsberechnungen aller Parameter der Kompartiment- und der Nicht-Kompartiment-analyse. Man kann erkennen, dass auch die Variation der Pharmakokinetik von Torasemid in hohem Maße erbllich ist. Bezüglich der AUC_{0-inf} beträgt die Erbllichkeit der Variation nach den Formeln „ $H^{2(V)} = r_{MZ} - r_{DZ} / 1 - r_{DZ}$ “ und „ $H^{2(F)} = 2 * (r_{MZ} - r_{DZ})$ “ 0,81 bzw. 1,02.

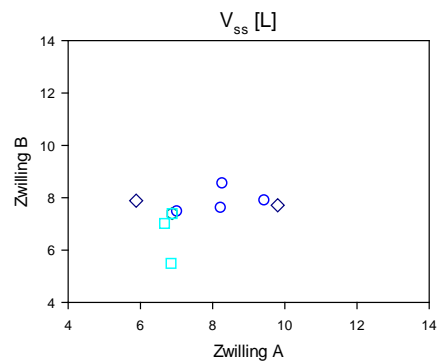
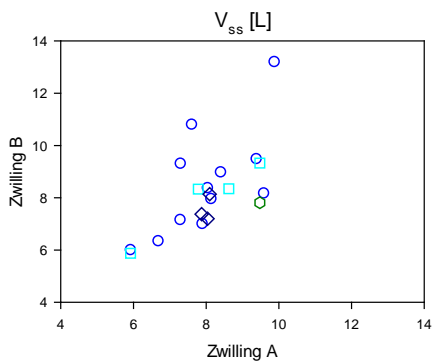
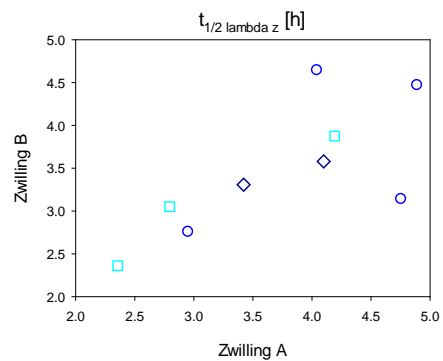
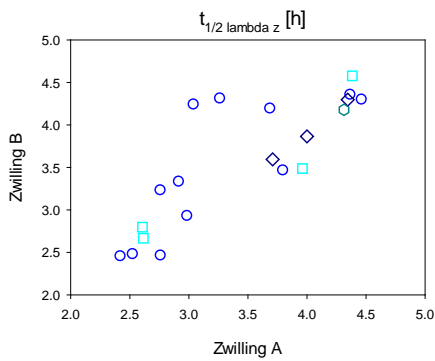
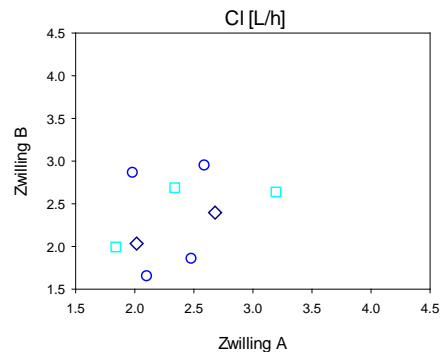
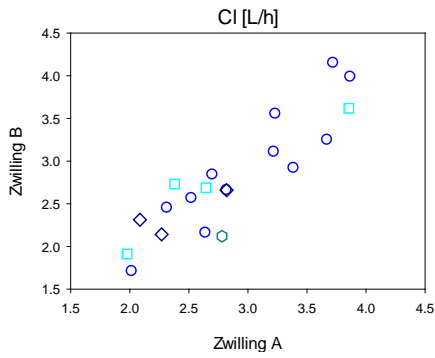
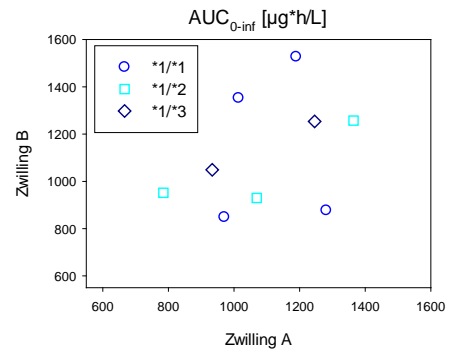
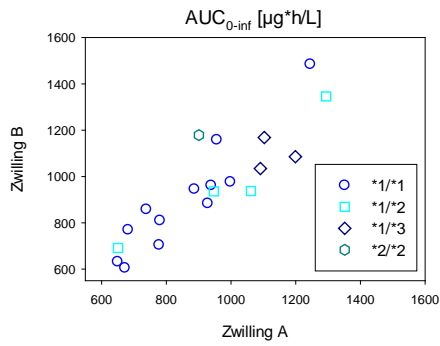
Tabelle 29 Korrelationen und Erbllichkeit bei Torasemid

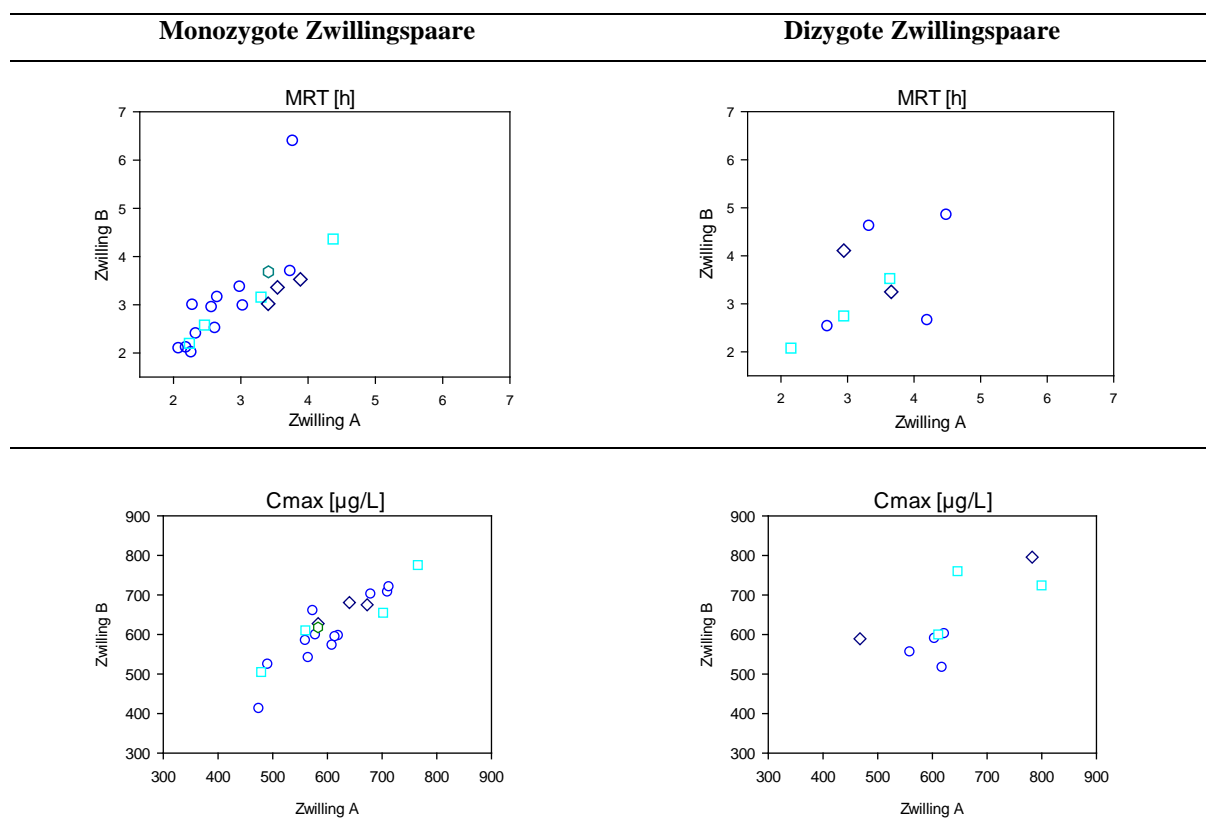
<u>Nicht-Kompartimentanalyse</u>	C_{max}	AUC_{0-inf}	Cl	Cl/kg	MRT	V_{ss}	$t_{1/2} \lambda_z$
r_{MZ}	0,90	0,88	0,89	0,95	0,76	0,64	0,83
(95%-Konfidenzintervall)	(0,76 - 0,96)	(0,71 - 0,95)	(0,75 - 0,96)	(0,88 - 0,98)	(0,49 - 0,90)	(0,28 - 0,85)	(0,61 - 0,93)
r_{DZ}	0,72	0,37	0,38	0,72	0,54	0,37	0,73
(95%-Konfidenzintervall)	(0,12 - 0,94)	(- 0,39 - 0,83)	(- 0,38 - 0,83)	(0,11 - 0,94)	(- 0,20 - 0,89)	(- 0,39 - 0,83)	(0,13 - 0,94)
r_{MZ}^2	0,81	0,77	0,80	0,90	0,58	0,41	0,77
r_{DZ}^2	0,52	0,14	0,14	0,52	0,29	0,14	0,53
$H^{2(V)} = r_{MZ} - r_{DZ} / 1 - r_{DZ}$	0,65	0,81	0,83	0,83	0,49	0,43	0,36
$H^{2(F)} = 2 * (r_{MZ} - r_{DZ})$	0,36	1,02	1,03	0,46	0,45	0,54	0,19
<u>Kompartimentanalyse</u>	C_{max}	$t_{1/2-\alpha}$	$t_{1/2-\beta}$	V_c			
r_{MZ}	0,91	0,67	0,81	0,92			
(95%-Konfidenzintervall)	(0,78 - 0,96)	(0,32 - 0,86)	(0,58 - 0,92)	(0,80 - 0,97)			
r_{DZ}	0,67	- 0,02	0,47	0,50			
(95%-Konfidenzintervall)	(0,00 - 0,92)	(- 0,67 - 0,65)	(- 0,28 - 0,86)	(- 0,25 - 0,87)			
r_{MZ}^2	0,83	0,45	0,66	0,84			
r_{DZ}^2	0,44	0,00	0,44	0,25			
$H^{2(V)} = r_{MZ} - r_{DZ} / 1 - r_{DZ}$	0,73	0,67	0,65	0,83			
$H^{2(F)} = 2 * (r_{MZ} - r_{DZ})$	0,49	1,34	0,68	0,84			

Abbildung 14 Korrelationen Nicht-Kompartimentalanalyse (Torasemid)

Monozygote Zwillingspaare

Dizygoter Zwillingspaare





Angabe jeweils auch der Genotypen von CYP2C9 entsprechend der Legenden in den Boxen der Grafiken für die AUC_{0-inf} .

3.5.3.2 Erbllichkeit nach Strukturgleichungsmodellierung

Unter Betrachtung der Strukturgleichungsmodellierung und Trennung in die Einflussfaktoren additive Gene (A), dominante Gene (D), gemeinsame Umwelteinflüsse (C) und individuelle Umwelteinflüsse (E) ist auch für die Testsubstanz Torasemid das Modell AE am besten passend (Tabelle 30). Hiernach ist die Variation der AUC_{0-inf} zu 86% durch additive Geneinflüsse (A) und zu 14% durch individuell wirkende Umweltfaktoren (E) bedingt.

Tabelle 30 Strukturgleichungsmodellierung der Erbllichkeit von Torasemid

Modell	A	D	C	E
ACE	0,860	-	0,000	0,140
ADE	0,788	0,072	-	0,140
AE	0,860	-	-	0,140
CE	-	-	0,721	0,279

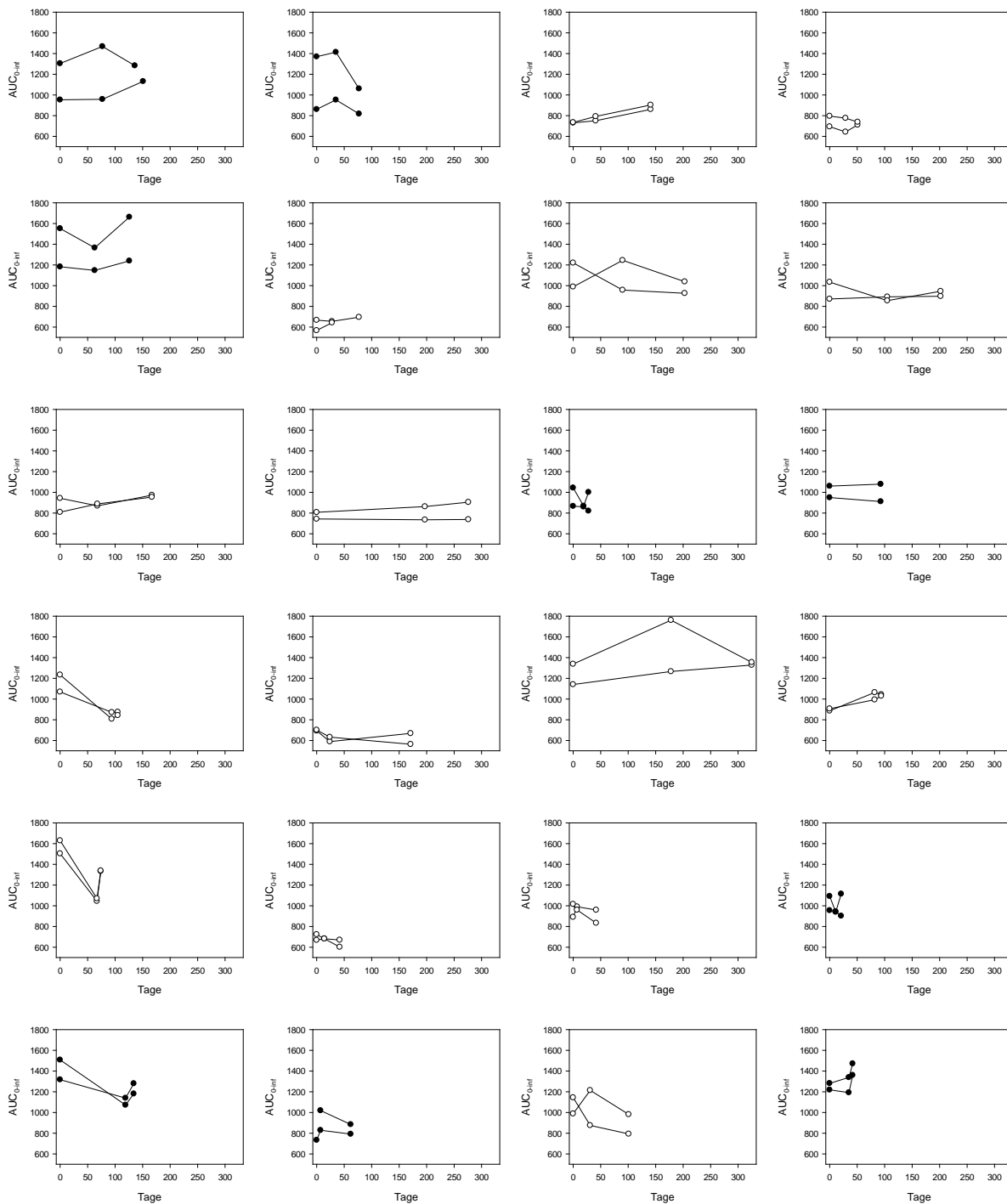
Modell	Chi ²	p-Wert	AIC
Saturiertes Modell	-	-	775,68
ACE	26,41	0,033	772,10
ADE	26,41	0,034	772,09
AE	26,41	0,048	770,10
CE	33,59	0,006	777,26

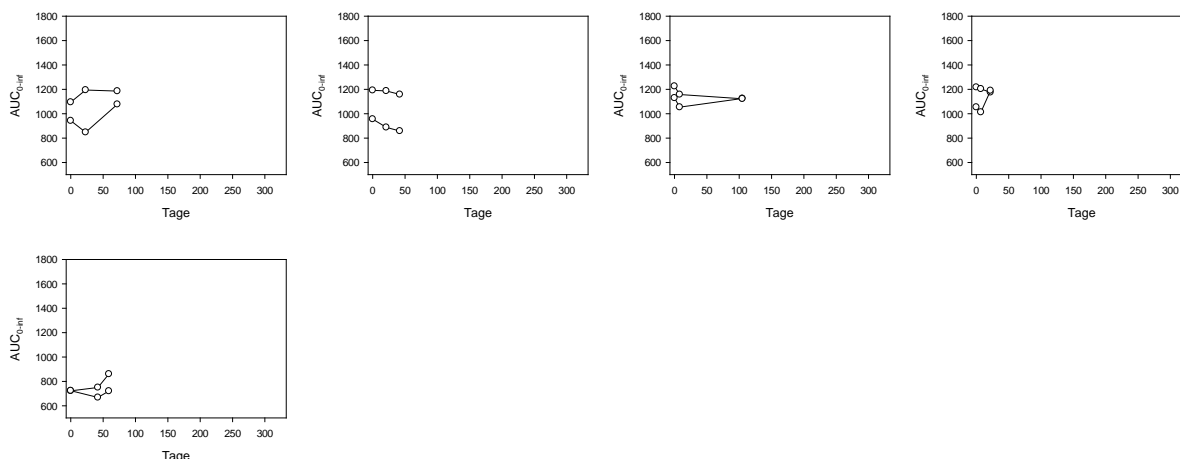
Anzumerken ist, dass das AE-Modell auf einem Niveau von 0,05 signifikante Unterschiede zum saturierten Modell zeigt. Es wurde dennoch als bestes Modell angesehen, da es den höchsten p-Wert und das kleinste AIC aller Modelle liefert.

3.5.3.3 Erblichkeitsberechnung aus intra- und interindividueller Variation

Die folgenden Grafiken zeigen die intra- und interindividuellen Unterschiede in der AUC_{0-inf} von Torasemid. Für die genetische Komponente (r_{GC}) wurde für den erblichen Anteil an der Variation der AUC_{0-inf} 0,85 berechnet (Tabelle 31).

Abbildung 15 Individueller Verlauf der AUC_{0-inf} (Torasemid)





weiße Punkte = monozygote Paare, schwarze Punkte = dizygote Paare. AUC_{0-inf} in $[\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}]$.

Tabelle 31 Genetische Komponente (Torasemid)

	C_{max}	AUC_{0-inf}	CI	MRT	V_{ss}	$t_{1/2}$ Lambda z
r_{GC} (genetische Komponente)	0,70	0,85	0,88	0,85	0,60	0,56

3.5.4 Berücksichtigung bereits bekannter Genotypen und anderer Einflussfaktoren

In einer multiplen linearen Regressionsanalyse wurde die Abhängigkeit der primären Zielgröße AUC_{0-inf} (jeweils Mittelwert der absolvierten Studienphasen) von der Genaktivität von CYP2C9 und den Polymorphismen in OATP1B1 sowie von den möglichen weiteren Einflussfaktoren, Geschlecht, Gewicht, Größe und Alter, analysiert. Die Genaktivität wurde mittels des prozentualen Unterschiedes in den Genotyp-Gruppen der Studienpopulation bestimmt. Ein signifikanter Unterschied bestand hier nur zwischen den Genotypen *1/*1 und *1/*3 ($p = 0,008$ [Mann-Whitney-U-Test]). Aus diesem Grund wurde für die Genotypen *1/*1, *1/*2 und *2/*2 jeweils ein Aktivitätswert von 1 verwendet, für den Genotyp *1/*3 eine nach der hepatischen Clearance von Torasemid prozentual angepasste Genaktivität von 0,59 (Vormfelde et al. 2004).

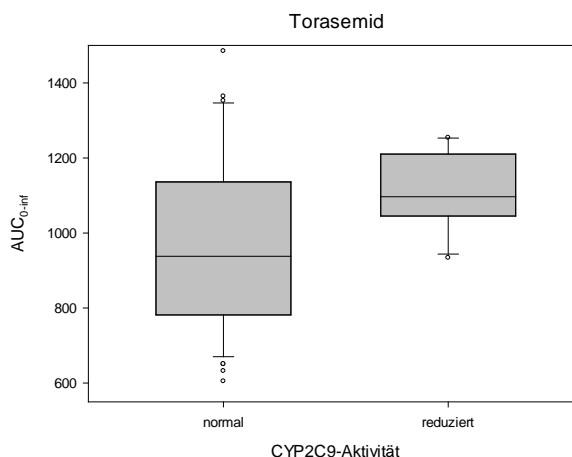
Tabelle 32 Multiple lineare Regressionsanalyse CYP2C9 und OATP1B1

Modellzusammenfassung		R	R-Quadrat	
abhängige Variable: AUC _{0-inf}		0,579	0,336	
Unabhängige Einflussvariablen	Regressionskoeffizient	Standardfehler	p-Wert	Anteil von R-Quadrat
CYP2C9 Aktivität	-383,4	182,2	0,04	Σ = 0,065
Anzahl Val174 Allele	-198,5	51,3	0,000	
Anzahl Asp130 Allele	-18,0	39,1	n.s.	
Geschlecht	2,336	94,67	n.s.	
Gewicht	-6,334	3,676	n.s.	
Größe	489,2	558,0	n.s.	
Alter	-3,556	3,530	n.s.	

n.s. = nicht signifikant (Niveau 0,05)

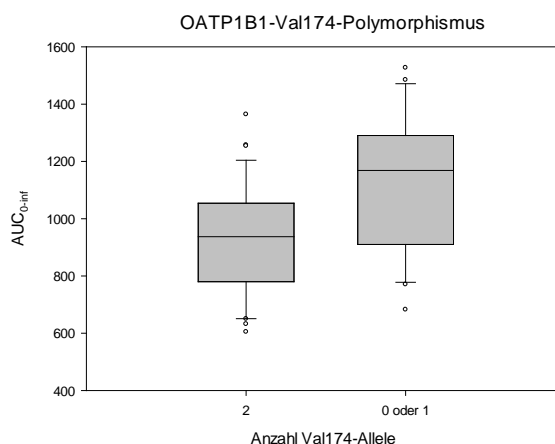
Die AUC_{0-inf} kann signifikant zu 26,9% durch die Genaktivität von CYP2C9 (6,5%) und die Anzahl von Val174 Allelen im OATP1B1-Gen (20,4%) erklärt werden. Die weiteren Einflussfaktoren sind sämtlich nicht signifikant.

Folgendes Bild veranschaulicht die Unterschiede in der AUC_{0-inf} je nach CYP2C9-Genaktivität.

Abbildung 16 Aktivität von CYP2C9

Dargestellt sind Median, 25 – 75% Quartil, 10 – 90% Bereich (Antennen) und Ausreißer im Bereich zwischen 0 – 10% und 90 – 100%. Normale Genaktivität wurde für die Genotypen *1/*1, *1/*2 und *2/*2 angenommen. Für den Genotyp *1/*3 wurde die CYP2C9-Aktivität als reduziert betrachtet. Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ($p = 0,002$ [Mann-Whitney-U Test]). AUC_{0-inf} in [$\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$] und jeweils als Mittelwert der absolvierten Studienphasen eines jeden Probanden.

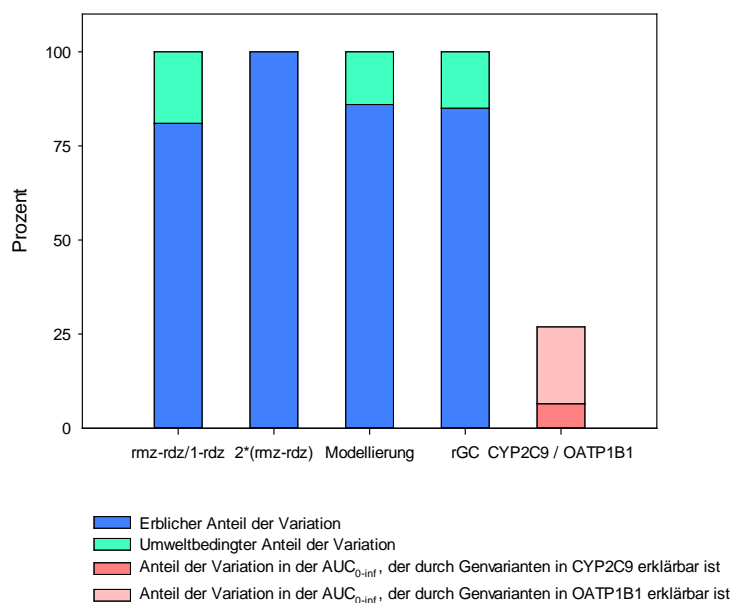
Nach dem Ergebnis der multiplen linearen Regression besteht auch ein signifikanter Einfluss auf die AUC_{0-inf} durch die Anzahl der Allele mit Val174-Polymorphismus im OATP1B1-Gen. Dies wird zusätzlich durch Abbildung 17 veranschaulicht.

Abbildung 17 Einfluss OATP1B1-Polymorphismus

Dargestellt sind Median, 25 – 75%-Quartil, 10 – 90%-Bereich (Antennen) und Ausreißer im Bereich zwischen 0 – 10% und 90 – 100%. Bei Vorliegen des Aminosäureaustausches Valin durch Alanin (Val174Ala) ist die Aktivität von OATP1B1 reduziert und die AUC_{0-inf} von Torasemid entsprechend erhöht. Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ($p = 0,002$ [Mann-Whitney-U Test]). AUC_{0-inf} in $[\mu\text{g}\cdot\text{h/L}]$ und jeweils als Mittelwert der absolvierten Studienphasen eines jeden Probanden.

3.5.5 Zusammenfassung: Erbllichkeit der CYP2C9- und OATP1B1-Aktivität

Zusammenfassend ergibt sich für die Erbllichkeit der Variation der Aktivität des Enzyms CYP2C9 und des Transporters OATP1B1 unter Betrachtung der pharmakokinetischen Parameter von Torasemid ein ähnliches Bild wie für die Aktivität von CYP2D6. Für die Variation in der AUC_{0-inf} sind je nach Methode Erbllichkeiten zwischen 0,81 (81%) und 1,02 (100%) ermittelbar. Durch die bekannten Varianten in CYP2C9 und OATP1B1 lassen sich zusammenfassend ca. 27% der Variation der AUC_{0-inf} erklären (Abbildung 18).

Abbildung 18 Erblichkeit der Aktivität von CYP2C9 und OATP1B1

Dargestellt sind die Ergebnisse für die Erblichkeitsberechnungen in der Variation der AUC_{0-inf} und das Ergebnis der Regressionsanalyse für die Vorhersagbarkeit der AUC_{0-inf} durch die Genaktivität in CYP2C9 und die Anzahl der Val174-Allele im OATP1B1-Gen. Deutlich ist, dass nur ein geringer Anteil durch die bekannten Genvarianten von CYP2C9 (6,5%) und die Anzahl der Allele Val174-Allele im OATP1B1-Gen (20,4%) in der Studienpopulation den Gesamtanteil der Erblichkeit erklären kann.

3.6 CYP2C9 und OATP1B1 - Pharmakokinetik von Hydroxytorasemid

3.6.1 Pharmakokinetische Parameter in der Gesamtgruppe

Tabelle 33 Pharmakokinetische Parameter von Hydroxytorasemid

<u>Nicht-Kompartimentanalyse</u>	Einheit	Median	25%	75%	Bereich	Variation (Max/Min)
Maximale Blutkonzentration (C_{max})	$\mu\text{g/L}$	7,88	6,68	10,2	3,67 – 13,8	3,8
Area under the curve $_{0-inf}$ (AUC_{0-inf})	$\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$	20,8	16,2	25,2	10,0 – 41,1	4,1
Area under the curve $_{last}$ (AUC_{last})	$\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$	19,3	16,0	23,0	9,87 – 31,2	3,5
Mean residence time (MRT)	h	2,74	2,39	3,27	1,77 – 5,99	3,4
Terminale Halbwertszeit ($t_{1/2 \text{ Lambda } z}$)	h	2,40	1,96	2,97	0,94 – 5,92	6,3

Angegeben sind hier die Parameter der Gesamtpopulation

Der Median der AUC_{0-inf} betrug $20,8 \mu\text{g}\cdot\text{h/L}$, die Variation lag bei 4,1. Insgesamt lässt sich wie bei Torasemid auch für den Großteil der pharmakokinetischen Parameter des Metaboliten Hydroxytorasemid eine vergleichsweise geringe Variation feststellen.

3.6.2 Erbllichkeit der pharmakokinetischen Parameter von Hydroxytorasemid

Bezüglich der AUC_{0-inf} wurden Werte für die Erbllichkeit zwischen 0,83 (Formel „ $H^{2(V)} = r_{MZ} \cdot r_{DZ} / 1 - r_{DZ}$ “) und 1,59 (Formel „ $H^{2(F)} = 2 * (r_{MZ} - r_{DZ})$ “) festgestellt. In der Strukturgleichungsmodellierung wurden nach dem AE-Modell (p-Wert > 0,05, niedrigstes AIC) ein Ausmaß von 0,80 für A und 0,20 für E ermittelt, die genetische Komponente r_{GC} betrug 0,89.

Tabelle 34 Korrelationen und Erbllichkeit bei Hydroxytorasemid

	C_{max}	AUC_{0-inf}	AUC_{last}	MRT	$t_{1/2}$ Lambda z
r_{MZ}	0,85	0,88	0,88	0,69	0,35
(95%-Konfidenzintervall)	(0,66 - 0,94)	(0,72 - 0,95)	(0,73 - 0,95)	(0,35 - 0,87)	(- 0,11 - 0,68)
r_{DZ}	0,06	0,28	0,11	0,59	0,54
(95%-Konfidenzintervall)	(-0,63 - 0,70)	(- 0,47 - 0,80)	(- 0,60 - 0,72)	(- 0,12 - 0,90)	(- 0,20 - 0,89)
r_{MZ}^2	0,73	0,78	0,78	0,47	0,12
r_{DZ}^2	0,004	0,08	0,01	0,35	0,29
$H^{2(V)} = r_{MZ} \cdot r_{DZ} / 1 - r_{DZ}$	0,85	0,83	0,86	0,24	-0,42
$H^{2(F)} = 2 * (r_{MZ} - r_{DZ})$	1,59	1,19	1,54	0,20	-0,38

Tabelle 35 Genetische Komponente (Hydroxytorasemid)

	C_{max}	AUC_{0-inf}	AUC_{last}	MRT	$t_{1/2}$ Lambda z
r_{GC} (genetische Komponente)	0,88	0,89	0,90	0,70	0,59

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde in einer Zwillingsstudie die Erbllichkeit der Variation der Aktivität der Enzyme CYP2D6 und CYP2C9 sowie des Arzneimitteltransporters OATP1B1 unter Berücksichtigung der bereits bekannten Genvarianten untersucht. Hierfür wurden die Testsubstanzen Metoprolol (CYP2D6) und Torasemid (CYP2C9 und OATP1B1) verabreicht und die Erbllichkeitsberechnungen anhand der pharmakokinetischen Parameter durchgeführt.

Es ist seit langem bekannt, dass es große interindividuelle Unterschiede im Stoffwechsel von Medikamenten gibt. Diese Variation kann auf der einen Seite durch genetische Faktoren, auf der anderen Seite durch Umweltfaktoren erklärt werden. In den Genen, die für die Arzneimittel-metabolisierenden Enzyme CYP2D6 und CYP2C9 sowie für den Transporter OATP1B1 kodieren, sind viele genetische Varianten bekannt, die Auswirkungen auf die enzymatische bzw. Transport-Aktivität besitzen. Unklar ist jedoch bisher, wie groß der erbliche Anteil in der Aktivität der Enzyme und des Transporters ist. Zusätzlich sollte untersucht werden, wie viel der Erbllichkeit durch die bereits bekannten Gen-Varianten von CYP2D6, CYP2C9 und OATP1B1 in der Population dieser Studie beschreibbar ist.

Grundlegendes methodisches Vorgehen war die klinisch-pharmakokinetische Untersuchung an mono- und dizygoten Zwillingen. Monozygote Zwillinge sind (von einer sehr geringen Rate erworbener genetischer Variation abgesehen) zu 100% genetisch gleich, dizygoten Zwillinge zu 50%. Unter der Annahme, dass auf beide Geschwister eines Paares die gleichen Umwelteinflüsse wirken, kann durch den Vergleich von mono- und dizygoten Zwillingspaaren erklärt werden, wie groß der erbliche Anteil an dem untersuchten Merkmal ist.

4.1 Erbllichkeit der CYP2D6-Aktivität anhand der Pharmakokinetik der Testsubstanz Metoprolol

4.1.1 Pharmakokinetik von Metoprolol und Alpha-Hydroxymetoprolol

Die Pharmakokinetik von Metoprolol wurde bereits in vielen Studien untersucht und war hier lediglich Mittel um die Aktivität von CYP2D6 *in vivo*, also am lebenden Menschen, zu untersuchen. Zunächst soll hier jedoch dargestellt werden, ob die in dieser Studie erhobenen Daten zur Metoprolol-Pharmakokinetik mit den in der Literatur publizierten Daten übereinstimmen. Da viele Parameter nach oraler Dosierung nicht exakt bestimmt werden

können, wurde der Vergleich nur für Studien mit ebenfalls intravenösen Medikamentengaben durchgeführt. Bezüglich der Clearance (Cl), der terminalen Halbwertszeit ($t_{1/2 \text{ Lambda z}}$), des Verteilungsvolumens im *steady state* (V_{ss}) und der *mean residence time* (MRT) von Metoprolol ergaben sich in unserer Studie Werte im Bereich von 22,7 – 134 L/h (Median 79,5 L/h), 1,94 – 9,30 h (Median 3,83 h), 175 – 666 L (Median 350 L) und 1,66 – 11,7 h (Median 4,45 h). Tabelle 36 zeigt die erhobenen Parameter in anderen Studien und zum Vergleich die Daten der vorliegenden Studie als Mittelwert \pm Standardabweichung. Sämtliche Parameter sind mit den Ergebnissen in dieser Arbeit vergleichbar.

Tabelle 36 Studien mit intravenöser Metoprololapplikation

Studienpopulation (Dosis i.v.)	Cl [L/min]	$t_{1/2 \text{ Lambda z}}$ [h]	V_{ss} [L]	MRT [h]	Referenz
Vorliegende Studie (5 mg)	1,35 \pm 0,41	3,95 \pm 1,24	355 \pm 82	4,8 \pm 1,8	
Gesunde Probanden (10 mg)	1,20 \pm 0,12	3,60 \pm 0,3	326 \pm 22	k.A.	(Regardh et al. 1980)
Gesunde ältere Probanden (0,16 mg [^3H]-Metoprolol)	0,91 \pm 0,08	3,45 \pm 0,23	k.A.	k.A.	(Regardh et al. 1983)
Gesunde junge Probanden (0,16 mg [^3H]-Metoprolol)	1,06 \pm 0,08	3,40 \pm 0,22	k.A.	k.A.	(Regardh et al. 1983)
Gesunde Probanden (20 mg)	0,80 \pm 0,11	4,20 \pm 1,1	k.A.	k.A.	(Regardh et al. 1981)
Gesunde Probanden (20 mg)	0,87 \pm 0,26	3,10 \pm 1,0	207 \pm 52	4,5 \pm 1,4	(Schaaf et al. 1987)

k.A. = keine Angabe, Angabe jeweils von Mittelwert \pm Standardabweichung. Während in der gesamten Auswertung die nichtparametrischen statistischen Kenngrößen angegeben wurden, wurden hier für den Vergleich ebenfalls aus der Stichprobe die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

Für die pharmakokinetischen Parameter von Alpha-Hydroxymetoprolol nach intravenöser Applikation ließen sich in der Literatur keine vergleichbaren Werte finden.

4.1.2 Erbllichkeit der CYP2D6-Aktivität

Bereits in den ersten Jahren nach Identifizierung des genetisch variablen Enzyms CYP2D6 ist gezeigt worden, dass ein Defekt der Aktivität dieses Enzyms (damals als Debrisoquin- oder Spartein-Hydroxylase bezeichnet) in Familien erblich ist (Mahgoub et al. 1977). Hierbei liegt ein autosomal-kodominanter Erbgang vor. An sehr großen Populationen ist dann gezeigt worden, dass die Aktivität, wie bei monogenetischen Erbgängen typisch, eine bimodale Verteilung aufwies mit einer Gruppe der langsamen Metabolisierer (*poor metabolizer*, PM) und einer Gruppe der schnellen Metabolisierer (*extensive metabolizer*, EM). 1988 ist das CYP2D6-kodierende Gen identifiziert worden (Gonzalez et al. 1988). Zudem hat sich gezeigt,

dass mit (den auch in dieser Studie bestimmten) 10 Genvarianten ein großer Teil der Variation in der Enzym-Aktivität erklärt werden konnte (Sachse et al. 1997). Bei Europäern ist das Null-Allel *4 mit einer Allelfrequenz von 0,20 bis 0,25 das häufigste funktionell inaktive Allel und für 70 – 90% aller langsamen Metabolisierer verantwortlich (Zanger et al. 2004). In der vorliegenden Studie trugen 21 der 58 Probanden jeweils ein *4-Allel, was mit einer Allelfrequenz von 0,18 vergleichbar häufig wie in früheren Studien an Europäern gefunden wurde. Das unter Asiaten sehr häufige, die Aktivität von CYP2D6 reduzierende Allel *10 (Zanger et al. 2001) ist in unserer Studie mit einer Frequenz von 0,05 aufgetreten.

Insgesamt kann man eine differenzierte Klassifikation nach Phänotypen von langsamen (PM) über intermediäre (IM), heterozygot schnelle (HEM) und schnelle (EM) zu ultraschnellen (UM) Metabolisierern vornehmen. Hierbei ist aber auffällig, dass auch innerhalb dieser Subgruppen noch eine große Variation in der Pharmakokinetik ersichtlich ist: so lag bei 13 gesunden Probanden mit EM CYP2D6 Phänotyp nach oraler Einnahme von 100 mg Metoprolol die AUC_{0-inf} in einem Bereich von 220,7 – 1261 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$ (Kirchheiner et al. 2004). Dies entspricht einer Variation, berechnet aus Division der maximalen durch die minimale AUC_{0-inf} , von 5,7. In der vorliegenden Studie liegt die Variation in der Gruppe der schnellen Metabolisierer (EM) bei 2,4. Die geringe Variation dürfte damit zusammenhängen, dass in der vorliegenden Studie i.v. dosiert wurde und somit die Variabilität im *First-Pass-Effekt* wegfällt.

Betrachtet man hingegen die Gruppe der PM, so lässt sich die Variation lediglich mit einem Faktor von 1,2 beschreiben (Kirchheiner et al. 2004). Die Beobachtung, dass innerhalb der Subgruppe der langsamen Metabolisierern (PM) eine geringere Variation vorliegt und der Phänotyp dieser Gruppe somit sehr gut durch Genotypisierungen beschrieben und vorausgesagt werden kann, zeigt sich auch in weiteren Studien unter Betrachtung der Bereichsmaxima und Bereichsminima (Griese et al. 1998; McElroy et al. 2000; Brockmoller et al. 2002). Die geringere Variation bei den langsamen Metabolisierern (PM) lässt sich dadurch erklären, dass diese Personen kein aktives CYP2D6-Enzym besitzen und somit keine Schwankungen in der Aktivität vorliegen. In diese Studie konnten leider keine Personen mit langsamer CYP2D6-Aktivität (*poor transporter*, PM) eingeschlossen werden.

Betrachtet man Studien, die zur Beschreibung der Pharmakokinetik den Mittelwert und die Standardabweichung der einzelnen Parameter angeben haben, ist die deutlich geringere Variation bei der Gruppe der langsamen Metabolisierer (PM) im Vergleich zu den schnellen Metabolisierern (EM) weniger oder nicht zu beobachten. Wichtig ist hier aber anzumerken,

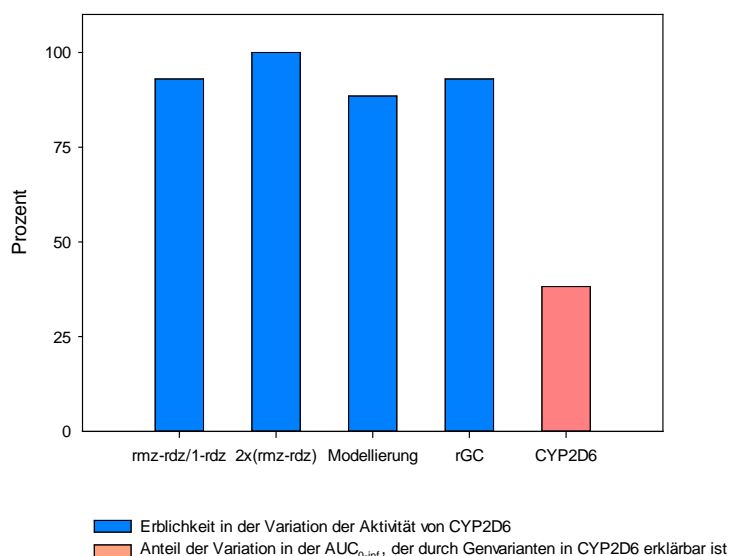
dass die Angabe von Mittelwert und Standardabweichung nur bei Vorliegen einer Normalverteilung korrekt ist. Dies trifft in vielen Studien aufgrund der geringen Studienteilnehmerzahl mit großer Wahrscheinlichkeit nicht zu.

In einer Studie zur Pharmakokinetik und -dynamik von Carvedilol unter Betrachtung der genetischen Varianten von CYP2D6 konnten 35,7 bzw. 15,3% der totalen Clearance von R- bzw. S-Carvedilol durch die untersuchten Genotypen in CYP2D6 erklärt werden (Sehrt et al. 2011). Die O-Demethylierung von Codein zu Morphin ist ebenfalls CYP2D6 abhängig. Hier konnten 63% der Variation in der AUC durch die Genotypen in CYP2D6 bestimmt werden (Kirchheiner et al. 2007). Eine aktuelle Studie zur Pharmakokinetik von Haloperidol zeigte einen erklärten Anteil von 46,6% in der AUC durch die bestimmten Genotypen in CYP2D6 und das Geschlecht der Probanden (Gasso et al. 2013). Bei den letztgenannten beiden Studien ist zu berücksichtigen, dass die erklärte Variation höher wird, wenn Personen mit extrem niedriger oder extrem hoher genetisch determinierter Enzymaktivität selektiert werden. Dies war in den Studien von Kirchheiner et al., 2007 und Gasso et al., 2013 der Fall. Offen bleibt in allen Publikation zur Aktivität von CYP2D6 bislang, wie groß der Anteil der Variation ist, der bisher unerklärt, aber erblich bedingt ist.

In dieser Studie wurde gezeigt, dass in der beobachteten Studienpopulation 38,2% der Variation in der Pharmakokinetik von Metoprolol durch die bekannten Genvarianten von CYP2D6 erklärt sind. Wie aus der Darstellung in Abbildung 19 erkennbar ist, erklären diese Genvarianten aber lediglich einen kleinen Anteil der in vorliegender Studie berechneten Erblichkeit in der Variation der Aktivität von CYP2D6.

Die Ergebnisse zeigen, dass ein großer Anteil des genetischen Hintergrundes in der Aktivität von CYP2D6 noch nicht geklärt ist. In dieser Arbeit wurde berechnet, dass zwischen 88,5 und 100% der Variation in der Aktivität von CYP2D6 erblich bedingt ist. Unter Betrachtung des Anteils von etwa 38%, der durch die bekannten Genotypen vorhergesagt werden kann, ergibt sich ein großer Teil von ca. 50 - 60%, der erblich, aber aktuell noch ungeklärt ist.

Abbildung 19 Erbllichkeit der Aktivität von CYP2D6



4.2 Erbllichkeit der CYP2C9- und OATP1B1-Aktivität anhand der Pharmakokinetik der Testsubstanz Torasemid

4.2.1 Pharmakokinetik von Torasemid und Hydroxytorasemid

Auch für Torasemid sollen die in vorliegender Studie erhobenen pharmakokinetischen Parameter denen anderer Studien aus der Literatur gegenübergestellt werden. Diese sind weitgehend mit den Angaben aus der Literatur vergleichbar (siehe Tabelle 37).

Tabelle 37 Studien mit intravenöser Torasemidapplikation

Studienpopulation (Dosis i.v.)	CI [ml/min]	$t_{1/2}$ Lambda z [h]	MRT [h]	Referenz
Teil a				
Vorliegende Studie (2,5 mg)	47 (23 – 73)	3,7 (1,7 – 5,0)	3,0 (1,9 – 8,0)	
Gesunde Probanden (20 mg)	41 (36 – 57)	3,8 (2,5 – 6,0)	2,3 (2,0 – 3,5)	(Neugebauer et al. 1988)
Gesunde Probanden (20 mg)	39,6	3,4	3,8	(Spahn et al. 1990)
Teil b				
Vorliegende Studie (2,5 mg)	39,0 ± 7,8	3,6 ± 1,0	3,4 ± 1,0	
Gesunde Probanden (20 mg)	37,4	5,1	6,6	(Knauf et al. 1991)
Gesunde Probanden (10 mg)	43,0 ± 13,8	3,6 ± 1,9	k.A.	(Schwartz et al. 1993)
Gesunde Probanden (20 mg)	37,4 ± 11,8	5,1 ± 4,2	6,6 ± 7,3	(Spahn et al. 1990)

k.A. = keine Angabe, Angabe von *Median (Bereich)* [Teil a] bzw. Mittelwert ± Standardabweichung [Teil b]

Für den Metaboliten M1 (= Hydroxytorasemid) wurde in weiteren Studien eine terminale Halbwertszeit $t_{1/2 \text{ Lambda z}}$ von 2,9 h (Median) bzw. 1,29 h (Mittelwert) ermittelt (Neugebauer et al. 1988; Knauf et al. 1991). In unserer Studie betrug der Median der terminalen Halbwertszeit von Hydroxytorasemid 2,4 h (Bereich 0,9 – 5,9 h), der Mittelwert 2,6 h (Standardabweichung 0,7 h).

4.2.2 Erbllichkeit der CYP2C9-Aktivität

Wie in der Einleitung dargestellt, haben bei vielen Medikamenten sowohl Transportproteine als auch metabolisierende Enzyme einen Einfluss auf die Pharmakokinetik, so auch bei dem CYP2C9- und OATP1B1-Substrat Torasemid. Zur erblichen Variation von CYP2C9 gibt es viele Studien, angefangen von ersten Befunden erblicher Variation im Metabolismus von Warfarin (Rettie et al. 1994) bis hin zu größeren systematischen Analysen für die CYP2C9-Substrate Torasemid und Glimpirid (Vormfelde et al. 2007; Yoo et al. 2011), die untersucht haben, wie viel der Variation durch seltenere Varianten in den Genen erklärbar ist. Hier zeigte sich, dass ein großer Teil durch das Allel *3 erklärt werden kann, das aber lediglich bei 7% der europäischen und 3% der asiatischen Bevölkerung auftritt (Kirchheiner und Brockmoller 2005). Die Mutation scheint dabei die Substrat-Erkennung des Enzyms zu beeinflussen (Gotoh 1992). Eine weitere bedeutende Mutation stellt das Allel *2 dar, das die Interaktion in CYP2C9 mit der P450-Reduktase ändert (Crespi und Miller 1997). Weitere Varianten in CYP2C9 (*4, *5, *6 - *11, *12, *13) sind in der afrikanischen und asiatischen Bevölkerung gefunden worden, aber bei Europäern extrem selten. Die funktionelle Bedeutung dieser Varianten *in vivo* ist aufgrund der extrem geringen Frequenz aktuell nicht für alle Varianten bekannt (Hirota et al. 2013). Tabelle 38 zeigt die Variation in der Pharmakokinetik von Torasemid in dieser Studie und in anderen Studien mit weiteren CYP2C9-Substraten, aufgeteilt nach Genotypen. Hier wird in allen Studien ersichtlich, dass die Variation bei Trägern des Wildtyps (*1/*1) größer als bei Personen mit den Varianten *2 und *3 ist. Insbesondere bei Trägern der *3-Variante liegt nur noch eine geringe Variation vor. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass Personen, die als Wildtyp klassifiziert worden sind, möglicherweise Träger seltenerer oder unbekannter Mutationen mit Einfluss auf die Aktivität von CYP2C9 sind.

Tabelle 38 Variation in der Aktivität von CYP2C9

Testsubstanz für Aktivitätsmessung von CYP2C9 (Referenz)	Studien- population	Parameter	Genotypen					
			*1/*1	*1/*2	*2/*2	*1/*3	*2/*3	*3/*3
Vorliegende Studie	Probanden	AUC_{0-inf}	2,5	2,1	1,3	1,3	-	-
Torasemid p.o. (Vormfelde et al. 2004)	Probanden	Cl _{total}	4	2,6	-	1,7	1,2	1
Warfarin p.o. (Herman et al. 2005)	Patienten	Tagesdosis	0,56	0,51	0,27	0,51	0,27	0,27
Celecoxib p.o. (Kirchheiner et al. 2003)	Probanden	CL _{oral}	2,7	2,9	2,6	1,6	1,3	1,4
Glimepirid p.o. (Niemi et al. 2002)	Probanden	AUC _{0-inf}	2,9	1,8	-	2,1	2,1	-

Die Variation ist jeweils angegeben durch die Berechnung „Bereichsmaximum/Bereichsminimum“ oder (erkennbar in der Tabelle durch Kursivschrift) durch den *Variationskoeffizienten* (= Standardabweichung/Mittelwert).

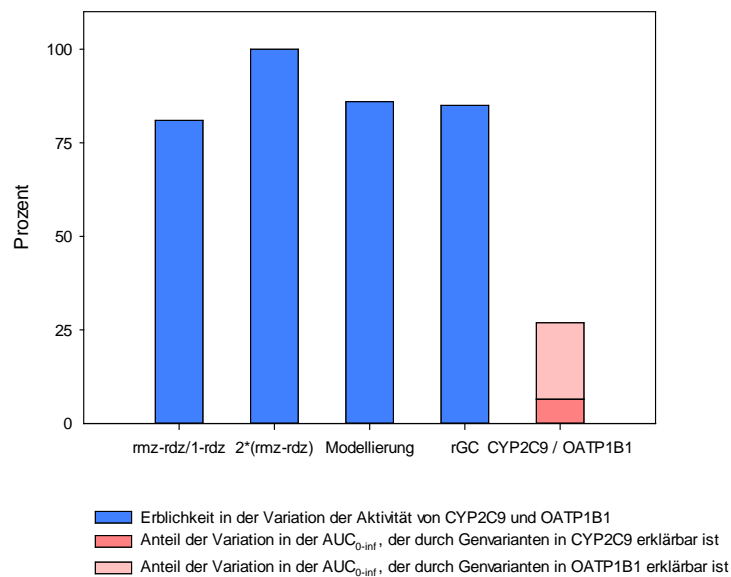
In vorliegender Studie zeigten sich signifikante pharmakokinetische Unterschiede zwischen den Trägern verschiedener Genvarianten in CYP2C9 nur bezüglich des *3-Allels. Die Variante *2 zeigte, wie bereits in einer Studie von Vormfelde (Vormfelde et al. 2004) dargestellt, in vorliegender Studie keinen signifikanten Einfluss auf die Pharmakokinetik von Torasemid. In dieser Arbeit konnte durch multiple lineare Regression lediglich 6,5% der Variation in der AUC_{0-inf} durch die bekannten Genvarianten in CYP2C9 erklärt werden. In einer Studie mit Patienten, die mit dem CYP2C9-Substrat Warfarin oral antikoaguliert wurden, konnten 10% der Variation in der erforderlichen Erhaltungsdosis mit den Genotypen *2 und *3 in CYP2C9 erklärt werden (Loebstein et al. 2001). In einer weiteren Arbeit mit Torasemid blieben 80% der Variation in der totalen Clearance auch nach CYP2C9-Genotypisierung ungeklärt (Vormfelde et al. 2007). Die Ergebnisse dieser Arbeit sind damit durchaus vergleichbar. Unter Betrachtung des in vorliegender Studie erhobenen Ausmaßes für die Erblichkeit in der Variation der Aktivität von CYP2C9 von 81 - 100% wird deutlich, dass bisher lediglich ein kleiner Teil der Erblichkeit erklärt werden kann. Eine Studie zeigte, dass das auf demselben Gencluster liegende CYP2C8 post-transkriptionell durch microRNA reguliert wird (Zhang et al. 2012). In CYP2C9 wurden ebenfalls mögliche Regulationsorte durch microRNA gefunden, so dass hierdurch eventuell weitere Faktoren für die Aktivität von CYP2C9 eine Rolle spielen.

4.2.3 Erblichkeit der OATP1B1-Aktivität

Der an der sinusoidalen Hepatozyten exprimierte und polymorphe Influxtransporter OATP1B1 ist an der Aufnahme vieler endogener und exogener Substrate beteiligt. Torasemid ist hierbei nur eines von vielen Substraten (Niemi et al. 2011). Im für OATP1B1 codierenden

SLCO1-Gen sind eine Reihe von Polymorphismen bekannt, die Einfluss auf die Transportaktivitäten haben. Relevant für die Pharmakokinetik vieler Arzneimittel ist vor allem der Austausch der Base Thymin durch Cytosin an Stelle 521 der codierenden DNA (521T>C), der einen Austausch der Aminosäure Valin durch Alanin bewirkt (Val174Ala-Polymorphismus). Die Transportaktivität wird hierdurch stark gehemmt und die Plasmakonzentration von über OATP1B1 transportierten Arzneimitteln kann sich erhöhen. Klinisch relevant ist dies vor allem in der durch Statine induzierbaren Myopathie. 18,2% der Menschen, die homozygote Träger von der Ala174-Variante sind, entwickelten in den ersten fünf Jahren unter Simvastatintherapie eine Myopathie, bei heterozygoten bzw. Personen ohne diese Variante, beträgt das Risiko lediglich 2,8% respektive 0,6% (Link et al. 2008). Eine weitere Variante (388A>G, Asn130Asp) bildet zusammen mit 521T>C (Val174Ala) vier Haplotypen: Asn130Val174 [Synonym *1a], Asp130Val174 [*1b], Asn130Ala174 [*5] und Asp130Ala174 [*15] (Nishizato et al. 2003). Die Bedeutung der Haplotypen wird dabei kontrovers diskutiert. Bei *1b zeigen einige Studien reduzierte (Michalski et al. 2002), andere Studien erhöhte (Kameyama et al. 2005) und wiederum andere keinen Einfluss auf die Aktivität (Tirona et al. 2001). Der *15-Haplotyp zeigte hingegen konsistent eine reduzierte Transportaktivität (Iwai et al. 2004). In dieser Arbeit konnte ein signifikanter Einfluss durch die Zahl der Val174-Allele nachgewiesen werden. Dies entspricht den Ergebnissen einer weiteren Studie mit Torasemid (Vormfelde et al. 2008). Eine multiple Regressionsanalyse ergab, dass durch die Anzahl von Val174-Allelen 20,4% der AUC_{0-inf} von Torasemid erklärt werden können. In der Literatur lassen sich diesbezüglich keine vergleichenden Arbeiten finden.

Da die Bestimmungen der Erbllichkeit in den pharmakokinetischen Parametern von Torasemid die Aktivität von CYP2C9 und OATP1B1 widerspiegeln, soll Abbildung 20 dies hier erneut zusammenfassend veranschaulichen. Eine Schwäche dieser Arbeit stellt möglicherweise die Auswahl von Torasemid als Testsubstanz von CYP2C9 und OATP1B1 dar. Hier ist schwierig zu differenzieren, wie viel der noch unerklärten Erbllichkeit auf genetischen Varianten in CYP2C9 bzw. in OATP1B1 beruht.

Abbildung 20 Erblichkeit der Aktivität von CYP2C9 und OATP1B1

6,5% in der Variation der AUC_{0-inf} sind durch die Aktivität von CYP2C9 erklärbar, 20,4% durch die Anzahl von Val174-Allelen in OATP1B1. Erblich ist nach Berechnungen dieser Arbeit ein Anteil von 81 – 100%.

4.3 Verfahren zur Ermittlung der Erblichkeit

Wesentliches Ziel dieser Arbeit war, das Ausmaß der Erblichkeit auf die Variation der Aktivität der Leberenzyme CYP2D6 und -2C9 sowie des Arzneimitteltransporters OATP1B1 zu bestimmen. Grundlage war die Applikation von Testsubstanzen, die möglichst spezifisch über CYP2D6 (Metoprolol) sowie CYP2C9 (Torasemid) und OATP1B1 (Torasemid) verstoffwechselt bzw. transportiert werden. Hierfür wurden monozygote und dizygoten gleichgeschlechtliche Zwillingspaare in die Studie eingeschlossen. Die Berechnungen für die Erblichkeit in der Aktivität von CYP2D6, -2C9 und OATP1B1 wurden mit Hilfe der pharmakokinetischen Parameter durchgeführt. Hauptparameter war die AUC_{0-inf} , die als Integral unter allen gemessenen Blutkonzentrationen als gutes Korrelat für die Aktivitätsbestimmungen betrachtet wird.

Das Design der Zwillingstudie ist eine vielfach verwendete Methode und bietet eine relativ einfache sowie durch die Natur gegebene Möglichkeit, um Erblichkeit in der Variation beobachteter Merkmale zu bestimmen (Martin et al. 1997; Boomsma et al. 2002). Eine größere Ähnlichkeit bezüglich eines Phänotyps unter monozygoten Geschwistern im Vergleich zu dizygoten Geschwistern beruht, unter der Annahme, dass Umweltfaktoren auf beide Geschwister dieselben Auswirkungen haben, auf genetischen Ursachen. Dabei sind im

Design der Zwillingsstudie einigen Grundannahmen elementar, um Erblichkeitsberechnungen durchzuführen und um die Ergebnisse auf die Populationsgesamtheit zu übertragen (Rijsdijk und Sham 2002). Die Grundannahmen sollen im Folgenden betrachtet und im Kontext der vorliegenden Studie geprüft werden:

1. Monozygote und dizygote Zwillingspaare teilen die auf sie wirkenden Umwelteinflüsse im gleichen Ausmaß:

Es ist allgemein anerkannt, dass Zwillinge Umwelteinflüssen in hohem Maß gleich ausgesetzt sind. Sie teilen sich gleichzeitig eine Gebärmutter, wachsen zeitgleich in derselben Familie auf und haben das gleiche Alter. Kritisch angemerkt wird, dass monozygote Zwillingspaare von ihren Eltern möglicherweise ähnlicher behandelt werden als dizygote Zwillingspaare. Hierdurch würde sich die Korrelation innerhalb monozygoter Paare erhöhen und das Ausmaß der Erblichkeit überschätzt werden. Studien mit Zwillingspaaren, die fälschlicherweise als monozygot bzw. dizygot eingeordnet worden sind und hinsichtlich der Behandlung durch die Eltern betrachtet wurden, können den Kritikpunkt entkräften (Rijsdijk und Sham 2002). Aus diesem Grund wurde dieser Aspekt in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht. Auffällig waren jedoch gelegentliche Diskrepanzen zwischen den Selbstangaben der Zwillinge nach ihrem Zwillingsstatus (sowohl bei monozygoten als auch bei dizygoten Paaren) und den Ergebnissen der genetischen Bestimmungen. Dies spricht auch dafür, dass der Aspekt der ähnlicheren Behandlung vermutlich vernachlässigbar ist. Sehr interessant in der Zwillingsforschung sind Paare, die in unterschiedlichen Familien bzw. Umständen aufgewachsen sind. Hierdurch können Umweltfaktoren genauer untersucht werden. Derartige Fälle sind allerdings relativ selten, so dass kaum ausreichende Fallzahlen für Studien wie die hier durchgeführte gefunden werden können.

2. Es liegen wenige bis keine Interaktionen zwischen Genen und Umweltfaktoren auf das beobachtete Merkmal vor:

Interaktion zwischen Genen und Umweltfaktoren bedeutet, dass genetische Varianten unterschiedlich auf die gleichen Umweltfaktoren reagieren. Ein Einfluss von Umweltfaktoren auf die Aktivität der untersuchten Enzyme und Transporter kann nicht ausgeschlossen werden. Die deutlichen Unterschiede in der Korrelation zwischen monozygoten auf der einen und dizygoten Zwillingen auf der anderen Seite lassen aber darauf schließen, dass sich mögliche Gen-Umweltfaktor-Interaktionen im Mittel ausgleichen.

3. Zwillinge unterscheiden sich nicht von der Allgemeinbevölkerung:

Das Zwillingsstudiendesign kann nur sinnvoll angewendet werden, wenn Zwillinge als repräsentativ für die Allgemeinbevölkerung gelten. Es gibt einige grundlegende Unterschiede zwischen Zwillingen und Nicht-Zwillingen. So sind Zwillinge im Mittel bei der Geburt leichter als Einzelgeborene und werden durchschnittlich 3 Wochen zu früh geboren. Beim Menschen wird die Unterentwicklung der Zwillinge gegenüber den Einzelgeborenen aber bereits in den ersten Lebensjahren aufgeholt. Bezüglich der Parameter, die in dieser Studie untersucht wurden, konnten zu großen Teilen in der Literatur vergleichbare Werte gefunden werden, die an Nicht-Zwillingen als Probanden erhoben wurden (siehe Tabelle 36 und Tabelle 37). Somit werden die Ergebnisse als repräsentativ für die Allgemeinbevölkerung eingeschätzt.

Es wurden verschiedene Methoden und Formeln entwickelt, um das Ausmaß von Erblichkeit zu berechnen (Vesell 1989; Kalow et al. 1998; Rijdsdijk und Sham 2002). Diese Methoden beruhen im Wesentlichen auf den Korrelationen zwischen den Geschwistern monozygoter Paare und den Geschwistern dizygoter Paare und sind einfache Formeln („ $H^{2(V)} = [r_{MZ} - r_{DZ}] / [1 - r_{DZ}]$ “ und „ $H^{2(F)} = 2 * [r_{MZ} - r_{DZ}]$ “), die schon seit vielen Jahren verwendet werden. Komplexere Verfahren, die auch erlauben viele andere Faktoren in die Berechnungen einzubeziehen, sind Strukturgleichungsmodellierungen mit Berechnung der latenten Variablen A (additive genetische Effekte), D (dominante genetische Effekte), C (gemeinsame (*common*) Umwelteinflüsse) und E (individuelle (*unique*) Umwelteinflüsse).

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Methode nach Kalow et al., 1998, die den intra- und interindividuellen Vergleich in der Studienpopulation bei wiederholter Arzneimittelapplikation untersucht und somit unabhängig vom Zwillingsstudiendesign ist. Nachteil dieser Methode ist jedoch zum einen, dass der Zeitraum zwischen den Arzneimittelgaben möglicherweise zu falschen Ermittlungen der erblichen Komponente führen kann. So ist es wahrscheinlich, dass bei einem Abstand von beispielsweise einer Woche geringere intraindividuelle Unterschiede in der Pharmakokinetik beobachtet werden als bei einem Zeitraum von beispielsweise einem Jahr zwischen den Arzneimittelgaben. Der berechnete erbliche Faktor wird dementsprechend unterschiedlich ausfallen. In vorliegender Studie war die Spannweite in der Absolvierung aller Studienphasen mit 21 bis 325 Tagen relativ groß. Unter Betrachtung des Mittelwerts von 107 Tagen würde man eher eine geringere erbliche Komponente für die AUC_{0-inf} erwarten als die hier berechneten Werte von 0,84 (Alpha-

Hydroxymetoprolol) bis 0,93 (Metoprolol). Es besteht weiterhin die Möglichkeit, dass zwei durch Umweltfaktoren, beispielsweise Rauchen, heterogene Kohorten verglichen werden. Durch eine Zigaretten-induzierte Enzymaktivitätsänderung würde sich diese durch Umweltfaktoren bedingte Differenz nicht von erblichen Faktoren unterscheiden lassen. Rauchen war in vorliegender Studie unter der Bedingung, dass beide Geschwister eines Paares ähnliche Rauchgewohnheiten haben, erlaubt. Interaktionen durch unterschiedliche Umwelteinflüsse auf die verschiedenen Zwillingspaare sind somit nicht auszuschließen. Die Ergebnisse in den Berechnungen nach Kalow et al. sind jedoch absolut mit den Ergebnissen der anderen Erblichkeitsberechnungen vergleichbar.

Die besprochenen Methoden wurden teilweise auch in aktuelleren Publikationen aus dem Bereich der Pharmakologie angewendet (Rasmussen et al. 2002; Birkenfeld et al. 2009). In dieser Arbeit wurden sämtliche hier angesprochenen Berechnungen durchgeführt, um Unterschiede je nach Methode nachweisen zu können. In allen vier Berechnungsmethoden (Formeln „ $H^{2(V)} = (r_{MZ} - r_{DZ}) / (1 - r_{DZ})$ “ und „ $H^{2(F)} = 2 * (r_{MZ} - r_{DZ})$ “, Strukturgleichungsmodellierung und Berechnung nach Kalow et al.) konnten vergleichbare Werte jeweils für das Ausmaß der Erblichkeit auf die Variation in der Aktivität von CYP2D6, -2C9 und OATP1B1 festgestellt werden.

Insgesamt waren die Korrelationen in der AUC_{0-inf} zwischen den monozygoten Zwillingspaaren sehr hoch (Metoprolol und Alpha-Hydroxymetoprolol 0,94; Torasemid und Hydroxytorasemid 0,88), zwischen den dizygoten Zwillingspaaren vergleichsweise niedrig (Metoprolol 0,14; Alpha-Hydroxymetoprolol 0,42; Torasemid 0,37; Hydroxytorasemid 0,28). Dies trifft ebenfalls für den Kehrwert der AUC, die Clearance (= Dosis / AUC, nur für die Ausgangssubstanzen Metoprolol und Torasemid) zu. Bezüglich der monozygoten Zwillinge kann von einer relativ hohen Präzision der Korrelationskoeffizienten bei einer Anzahl von 20 Zwillingspaaren ausgegangen werden (95%-Konfidenzintervalle der AUC_{0-inf} 0,85 – 0,98 für Metoprolol und Alpha-Hydroxymetoprolol, 0,71– 0,95 für Torasemid, 0,72 – 0,95 für Hydroxytorasemid). Hingegen ist die Anzahl von 9 dizygoten Zwillingspaaren eher noch zu gering, um die Korrelationskoeffizienten mit ausreichender Präzision zu bestimmen. Dies zeigt sich auch in den sehr breiten 95%-Konfidenzintervallen. Der Unterschied zwischen monozygoten und dizygoten Zwillingen ist allerdings sehr groß, so dass von aussagekräftigen Ergebnissen gesprochen werden kann.

Die Korrelationskoeffizienten der pharmakokinetischen Parameter maximale Konzentration (C_{max}), Volumen im *steady state* (V_{ss}), Volumen im Zentralen Kompartiment (V_c), *mean*

residence time (MRT) und die Halbwertszeiten ($t_{1/2 \text{ Lambda } z}$, $t_{1/2 \alpha}$, $t_{1/2 \beta}$) zeigten teilweise deutlich geringer ausgeprägte Unterschiede zwischen monozygoten und dizygoten Zwillingen. Deutlich werden hier auch Unterschiede zwischen den Testsubstanzen Metoprolol und Torasemid.

Bei Metoprolol fällt auf, dass die Parameter, die die initiale Verteilung des Medikamentes im Körper beschreiben (C_{\max} , $t_{1/2 \alpha}$ und V_c), kaum durch erbliche Faktoren beeinflusst zu sein scheinen, die Parameter der späteren Eliminationsphase ($t_{1/2 \text{ Lambda } z}$, $t_{1/2 \beta}$) dann allerdings in sehr hohem Maße. Dies kann möglicherweise durch das Studiendesign erklärt werden. Metoprolol wurde über einen Zeitraum von 20 Minuten infundiert, um pharmakodynamische Wirkungen abzuschwächen. Gleichzeitig erfolgte jedoch schon in einem kurz nach Infusionsbeginn relativ breiten Zeitfenster von 5 – 25 Minuten eine Blutentnahme, die häufig schon den Wert für C_{\max} definiert hat und damit nicht sehr exakt ist.

Bei Torasemid ist eher ein umgekehrter Effekt mit höherer Erblichkeit initial und niedrigerer Erblichkeit in der terminalen Eliminationsphase zu beobachten. Hier könnte das damit zusammenhängen, dass die initiale Verteilung von Torasemid auch vom genetisch polymorphen Transportprotein OATP1B1 mitbestimmt wird, während Metoprolol in der zellulären Aufnahme weniger von Transportproteinen abhängig ist. Zudem besteht eine gewisse undefinierte terminalen Halbwertszeit $t_{1/2 \text{ Lambda } z}$. Hierbei wird durch mindestens die letzten drei Konzentrationsmessungen eine Regressionsgrade gelegt, anhand derer negativer Steigung die Pharmakokinetikparameter der terminalen Eliminationsphase berechnet werden. Unklar bleibt jedoch, wieso dieser Effekt lediglich bei Torasemid zu beobachten ist. Für die Erblichkeitsberechnungen wurde aber dennoch aus diesen Gründen primär der robuste Parameter $AUC_{0-\infty}$ verwendet, der die Gesamtexposition des Körpers gegenüber dem Medikament beschreibt.

4.4 Ausblick

Das Design der Zwillingsstudie stellt sich als effektive Methode zur Evaluation erblicher Einflüsse auf den Stoffwechsel von Medikamenten dar. Es zeigte sich, dass der noch unerklärte erbliche Anteil in der Variation der Aktivität von CYP2D6, -2C9 und OATP1B1 groß ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind jedoch limitiert durch die relativ geringe Fallzahl insbesondere der dizygoten Zwillingspaare. Hier ist sicherlich eine Auswertung an einer größeren Studienpopulation notwendig, um die Ergebnisse dieser Arbeit zu bestätigen. Des

Weiteren wäre es von großem Interesse, Subanalysen innerhalb der einzelnen Genvariantengruppen und den daraus resultierenden Phänotypen durchzuführen. Also festzustellen, wie viel Erbllichkeit beispielsweise in der Variation in den verschiedenen CYP2D6-Phänotypen langsame (PM), intermediäre (IM), heterozygot schnelle (HEM), schnelle (EM) und ultraschnelle (UM) Metabolisierer von Bedeutung ist. In dieser Studie konnten leider keine Personen mit langsamem (PM) oder ultraschnellem (UM) CYP2D6 Phänotyp gefunden werden, so dass hier auf eine differenziertere Analyse nach Genvarianten verzichtet wurde.

Anzumerken ist, dass Erbllichkeitsberechnungen immer nur für die untersuchte Studienpopulation valide Ergebnisse liefern können, in dieser Studie also über in Europa geborene und aufgewachsene Menschen. Um Aussagen über andere Bevölkerungsgruppen treffen zu können sind hier weitere Studien notwendig.

Die Tatsache, dass die bekannten Varianten in den untersuchten Enzymen und in dem Transporter nur einen kleinen Anteil der erblich bedingten Variation erklären können (CYP2D6: 38,2%, CYP2C9: 6,5%, OATP1B1: 20,4%), lässt sich am ehesten dadurch begründen, dass es weitere genetische Polymorphismen gibt, die ebenfalls einen Einfluss auf die Aktivität haben. Die bei CYP2C9 bereits vermuteten Regulationsmechanismen durch microRNA sind auch für die Aktivität von CYP2D6 und OATP1B1 denkbar. Auch erbliche Variation in der Epigenetik (Histon-Acetylierung, DNA-Methylierung) und genetische Regulationen von Transkriptionsfaktoren könnten bedeutsam sein. Weiterhin ist eine differenzierte Charakterisierung von Transportmechanismen erforderlich, um interindividuelle Unterschiede im Stoffwechsel von Arzneimitteln besser erklären zu können.

5. Zusammenfassung

Es ist seit langem bekannt, dass neben Umweltfaktoren erbliche Faktoren in hohem Maße für interindividuelle Unterschiede in der Wirkweise von Arzneimitteln ursächlich sind. Die Spannweite der Arzneimittelwirkung bei gleicher Dosis kann dabei individuell von Therapieversagen bis hin zu toxischer Überdosierung reichen.

Seit der Anwendung molekulargenetischer Methoden wurde eine Vielzahl von genetischen Varianten in Arzneimittel-metabolisierenden Enzymen und Transportern entschlüsselt, die einen Teil der interindividuellen Variation der Aktivität dieser Enzyme und Transporter erklären können. Unklar blieb bisher jedoch, wie groß der Anteil in der Variation ist, der erblich bedingt ist und gegenwärtig nicht durch die bekannten Gen-Varianten erklärt werden kann.

Primäres Ziel dieser Arbeit war es, diesen unerklärten erblichen Anteil bezüglich der Variation in der Aktivität der Enzyme CYP2D6 und CYP2C9 sowie des Influxtransporters OATP1B1 zu bestimmen. Hierfür wurde eine Studie mit insgesamt 29 monozygoten und dizygoten gleichgeschlechtlichen Zwillingen durchgeführt. Monozygote Zwillinge sind zu 100% und dizygoten Zwillinge zu 50% genetisch identisch. Unter der Annahme, dass beide Geschwister eines Zwillingspaars den gleichen Umwelteinflüssen ausgesetzt sind, kann eine höhere Korrelation eines Merkmals bei monozygoten im Vergleich zu dizygoten Zwillingspaaren als erblich bedingt betrachtet werden.

In der vorliegenden Studie wurde jedem Probanden an bis zu drei Studienphasen die Arzneimittel Metoprolol (als Testsubstanz für CYP2D6) und Torasemid (als Testsubstanz für CYP2C9 und OATP1B1) verabreicht und jeweils über einen Zeitraum von ca. 24 h regelmäßig Blutproben entnommen. Als Parameter für die Aktivitätsmessung der Enzyme CYP2D6 und CYP2C9 und des Transporters OATP1B1 wurde die $AUC_{0-\infty}$ (Fläche unter der Kurve von Null bis Unendlich extrapoliert) aus den Konzentrations-Zeit-Profilen bestimmt. Angewendet wurden verschiedene Berechnungsmethoden der Erblchkeitsbestimmung: Neben Formeln mit Hilfe der Korrelationskoeffizienten monozygoter und dizygoter Zwillinge sowie unter Betrachtung intra- und interindividueller Unterschiede wurde zusätzlich eine Strukturgleichungsmodellierung durchgeführt.

Mit allen Berechnungsmethoden konnte ein sehr hoher erblicher Anteil in der Variation der Aktivität von CYP2D6, CYP2C9 und OATP1B1 bestimmt werden. Für CYP2D6 betrug die

Erblichkeit 88,5 – 100%, für CYP2C9 und OATP1B1 81 – 100%. Gleichzeitig konnte in der untersuchten Studienpopulation durch die bekannten genetischen Varianten nur ein geringer Anteil der Variation der AUC_{0-inf} erklärt werden (38,2% durch CYP2D6-Gen-Varianten, 6,5% durch CYP2C9-Gen-Varianten und 20,4% durch OATP1B1-Gen-Varianten).

Die Ergebnisse dieser Studie geben weitere Hinweise darauf, dass erbliche Faktoren von sehr großer Bedeutung für die Aktivität der untersuchten Enzyme und Transporter sind. Gleichzeitig lässt sich mit den bekannten Genvarianten hiervon nur ein kleiner Teil erklären. Um dem Ziel einer *Individualisierten Medizin* und damit einer dem einzelnen Patienten deutlich besser angepassten Arzneimitteltherapie näher zu kommen, scheint somit die weitere Erforschung genetischer Regulationsvorgänge und die Suche nach bisher unbekanntem genetischen Polymorphismen vielversprechend zu sein.

6. Literatur

- Alexanderson B, Evans DA, Sjoqvist F (1969): Steady-state plasma levels of nortriptyline in twins: influence of genetic factors and drug therapy. *Br Med J* 4(5686), 764-768.
- Alving AS, Carson PE, Flanagan CL, Ickes CE (1956): Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science* 124(3220), 484-485.
- Arayne MS, Sultana N, Bibi Z (2005): Grape fruit juice-drug interactions. *Pak J Pharm Sci* 18(4), 45-57.
- Bailey DG, Spence JD, Edgar B, Bayliff CD, Arnold JM (1989): Ethanol enhances the hemodynamic effects of felodipine. *Clin Invest Med* 12(6), 357-362.
- Birkenfeld AL, Jordan J, Hofmann U, Busjahn A, Franke G, Kruger N, Igel S, Murdter T, Drescher S, Shi S (2009): Genetic influences on the pharmacokinetics of orally and intravenously administered digoxin as exhibited by monozygotic twins. *Clin Pharmacol Ther* 86(6), 605-608.
- Blake CM, Kharasch ED, Schwab M, Nagele P (2013): A Meta-Analysis of CYP2D6 Metabolizer Phenotype and Metoprolol Pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 94(3), 394-399.
- Boomsma D, Busjahn A, Peltonen L (2002): Classical twin studies and beyond. *Nat Rev Genet* 3(11), 872-882.
- Borg KO, Carlsson E, Hoffmann KJ, Jonsson TE, Thorin H, Wallin B (1975): Metabolism of metoprolol-(3-h) in man, the dog and the rat. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 36(Suppl 5), 125-135.
- Bradford LD (2002): CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics* 3(2), 229-243.
- Brockmoller J, Tzvetkov MV (2008): Pharmacogenetics: data, concepts and tools to improve drug discovery and drug treatment. *Eur J Clin Pharmacol* 64(2), 133-157.
- Brockmoller J, Kirchheiner J, Schmider J, Walter S, Sachse C, Muller-Oerlinghausen B, Roots I (2002): The impact of the CYP2D6 polymorphism on haloperidol pharmacokinetics and on the outcome of haloperidol treatment. *Clin Pharmacol Ther* 72(4), 438-452.
- Burbridge D (2001): Francis Galton on twins, heredity and social class. *Br J Hist Sci* 34(122 Pt 3), 323-340.
- Cascorbi I (2012): Drug interactions--principles, examples and clinical consequences. *Dtsch Arztebl Int* 109(33-34), 546-555.

- Crespi CL, Miller VP (1997): The R144C change in the CYP2C9*2 allele alters interaction of the cytochrome P450 with NADPH:cytochrome P450 oxidoreductase. *Pharmacogenetics* 7(3), 203-210.
- Dubois L, Ohm Kyvik K, Girard M, Tatone-Tokuda F, Perusse D, Hjelmberg J, Skytthe A, Rasmussen F, Wright MJ, Lichtenstein P (2012): Genetic and environmental contributions to weight, height, and BMI from birth to 19 years of age: an international study of over 12,000 twin pairs. *PLoS One* 7(2), e30153.
- Eichelbaum M, Spannbrucker N, Steincke B, Dengler HJ (1979): Defective N-oxidation of sparteine in man: a new pharmacogenetic defect. *Eur J Clin Pharmacol* 16(3), 183-187.
- Eichelbaum M, Schwab M, Marx C, Zanger U, Fischer-Bosch M (2002): Pharmakogenetik der Zytochrom-P-450-Enzyme: Bedeutung für Wirkungen und Nebenwirkungen von Medikamenten. *Deutsches Ärzteblatt* 99(8), 497-504.
- Europäische-Union (2001): Richtlinie 2001/20/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 04. April 2001 zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedsstaaten über die Anwendung der guten klinischen Praxis bei der Durchführung von klinischen Prüfungen mit Humanarzneimitteln.
- Evans DA, Manley KA, Mc KV (1960): Genetic control of isoniazid metabolism in man. *Br Med J* 2(5197), 485-491.
- Evans WE, Relling MV (1999): Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 286(5439), 487-491.
- Evans WE, McLeod HL (2003): Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med* 348(6), 538-549.
- Fachinfo-Beloc (2008): Beloc i.v. AstraZeneca GmbH, Deutschland.
- Fachinfo-Torasemid (2006): Torem 200/200 Infusionslösung. Berlin-Chemie Menarini, Deutschland.
- Falconer DS, MacKay TFC: *Introduction to quantitative genetics*, 4ed., Longman, Essex 1996.
- Garrod AE: *The inborn factors in disease*, Oxford University Press, London 1931
- Gasso P, Papagianni K, Mas S, de Bobadilla RF, Arnaiz JA, Bernardo M, Lafuente A (2013): Relationship between CYP2D6 genotype and haloperidol pharmacokinetics and extrapyramidal symptoms in healthy volunteers. *Pharmacogenomics* 14(13), 1551-1563.
- Goldstein JA (2001): Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. *Br J Clin Pharmacol* 52(4), 349-355.
- Goldstein JA, de Morais SM (1994): Biochemistry and molecular biology of the human CYP2C subfamily. *Pharmacogenetics* 4(6), 285-299.

- Gonzalez FJ, Skoda RC, Kimura S, Umeno M, Zanger UM, Nebert DW, Gelboin HV, Hardwick JP, Meyer UA (1988): Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature* 331(6155), 442-446.
- Gotoh O (1992): Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *J Biol Chem* 267(1), 83-90.
- Griese EU, Zanger UM, Brudermanns U, Gaedigk A, Mikus G, Morike K, Stuvén T, Eichelbaum M (1998): Assessment of the predictive power of genotypes for the in-vivo catalytic function of CYP2D6 in a German population. *Pharmacogenetics* 8(1), 15-26.
- Hammer W, Sjöqvist F (1967): Plasma levels of monomethylated tricyclic antidepressants during treatment with imipramine-like compounds. *Life Sci* 6(17), 1895-1903.
- Herman D, Locatelli I, Grabnar I, Peternel P, Stegnar M, Mrhar A, Breskvar K, Dolzan V (2005): Influence of CYP2C9 polymorphisms, demographic factors and concomitant drug therapy on warfarin metabolism and maintenance dose. *Pharmacogenomics J* 5(3), 193-202.
- Hirota T, Eguchi S, Ieiri I (2013): Impact of genetic polymorphisms in CYP2C9 and CYP2C19 on the pharmacokinetics of clinically used drugs. *Drug Metab Pharmacokinet* 28(1), 28-37.
- Ho PC, Saville DJ, Wanwimolruk S (2001): Inhibition of human CYP3A4 activity by grapefruit flavonoids, furanocoumarins and related compounds. *J Pharm Pharm Sci* 4(3), 217-227.
- Ho RH, Kim RB (2005): Transporters and drug therapy: implications for drug disposition and disease. *Clin Pharmacol Ther* 78(3), 260-277.
- Ho RH, Choi L, Lee W, Mayo G, Schwarz UI, Tirona RG, Bailey DG, Michael Stein C, Kim RB (2007): Effect of drug transporter genotypes on pravastatin disposition in European- and African-American participants. *Pharmacogenet Genomics* 17(8), 647-656.
- Holstein A, Hahn M, Patzer O, Seeringer A, Kovacs P, Stingl J (2011): Impact of clinical factors and CYP2C9 variants for the risk of severe sulfonylurea-induced hypoglycemia. *Eur J Clin Pharmacol* 67(5), 471-476.
- Ingelman-Sundberg M (2005): Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J* 5(1), 6-13.
- Iwai M, Suzuki H, Ieiri I, Otsubo K, Sugiyama Y (2004): Functional analysis of single nucleotide polymorphisms of hepatic organic anion transporter OATP1B1 (OATP-C). *Pharmacogenetics* 14(11), 749-757.
- Kalliokoski A, Niemi M (2009): Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol* 158(3), 693-705.

- Kalow W, Gunn DR (1957): The relation between dose of succinylcholine and duration of apnea in man. *J Pharmacol Exp Ther* 120(2), 203-214.
- Kalow W, Tang BK, Endrenyi L (1998): Hypothesis: comparisons of inter- and intra-individual variations can substitute for twin studies in drug research. *Pharmacogenetics* 8(4), 283-289.
- Kameyama Y, Yamashita K, Kobayashi K, Hosokawa M, Chiba K (2005): 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* 15(7), 513-522.
- Kearns GL, Abdel-Rahman SM, Alander SW, Blowey DL, Leeder JS, Kauffman RE (2003): Developmental pharmacology--drug disposition, action, and therapy in infants and children. *The New England journal of medicine* 349(12), 1157-1167.
- Kidd RS, Curry TB, Gallagher S, Edeki T, Blaisdell J, Goldstein JA (2001): Identification of a null allele of CYP2C9 in an African-American exhibiting toxicity to phenytoin. *Pharmacogenetics* 11(9), 803-808.
- Kirchheiner J, Brockmoller J (2005): Clinical consequences of cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther* 77(1), 1-16.
- Kirchheiner J, Stormer E, Meisel C, Steinbach N, Roots I, Brockmoller J (2003): Influence of CYP2C9 genetic polymorphisms on pharmacokinetics of celecoxib and its metabolites. *Pharmacogenetics* 13(8), 473-480.
- Kirchheiner J, Heesch C, Bauer S, Meisel C, Seringer A, Goldammer M, Tzvetkov M, Meineke I, Roots I, Brockmoller J (2004): Impact of the ultrarapid metabolizer genotype of cytochrome P450 2D6 on metoprolol pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther* 76(4), 302-312.
- Kirchheiner J, Seeringer A, Brockmoller J (2006): [State of the art of pharmacogenetic diagnostics in drug therapy]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 49(10), 995-1003.
- Kirchheiner J, Schmidt H, Tzvetkov M, Keulen JT, Lotsch J, Roots I, Brockmoller J (2007): Pharmacokinetics of codeine and its metabolite morphine in ultra-rapid metabolizers due to CYP2D6 duplication. *Pharmacogenomics J* 7(4), 257-265.
- Knauf H, Spahn H, Mutschler E (1991): The loop diuretic torasemide in chronic renal failure. Pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Drugs* 41 Suppl 3, 23-34.
- Kongkaew C, Noyce PR, Ashcroft DM (2008): Hospital admissions associated with adverse drug reactions: a systematic review of prospective observational studies. *Ann Pharmacother* 42(7), 1017-1025.
- Lennard MS, Silas JH, Freestone S, Ramsay LE, Tucker GT, Woods HF (1982): Oxidation phenotype--a major determinant of metoprolol metabolism and response. *N Engl J Med* 307(25), 1558-1560.

- Link E, Parish S, Armitage J, Bowman L, Heath S, Matsuda F, Gut I, Lathrop M, Collins R (2008): SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy--a genomewide study. *N Engl J Med* 359(8), 789-799.
- Loebstein R, Yonath H, Peleg D, Almog S, Rotenberg M, Lubetsky A, Roitelman J, Harats D, Halkin H, Ezra D (2001): Interindividual variability in sensitivity to warfarin--Nature or nurture? *Clin Pharmacol Ther* 70(2), 159-164.
- Mahgoub A, Idle JR, Dring LG, Lancaster R, Smith RL (1977): Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man. *Lancet* 2(8038), 584-586.
- Martin N, Boomsma D, Machin G (1997): A twin-pronged attack on complex traits. *Nat Genet* 17(4), 387-392.
- McDonald HP, Garg AX, Haynes RB (2002): Interventions to enhance patient adherence to medication prescriptions: scientific review. *Jama* 288(22), 2868-2879.
- McElroy S, Sachse C, Brockmoller J, Richmond J, Lira M, Friedman D, Roots I, Silber BM, Milos PM (2000): CYP2D6 genotyping as an alternative to phenotyping for determination of metabolic status in a clinical trial setting. *AAPS PharmSci* 2(4), E33.
- McGourty JC, Silas JH, Lennard MS, Tucker GT, Woods HF (1985): Metoprolol metabolism and debrisoquine oxidation polymorphism--population and family studies. *Br J Clin Pharmacol* 20(6), 555-566.
- McLeod HL, Siva C (2002): The thiopurine S-methyltransferase gene locus -- implications for clinical pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* 3(1), 89-98.
- Michalski C, Cui Y, Nies AT, Nuessler AK, Neuhaus P, Zanger UM, Klein K, Eichelbaum M, Keppler D, Konig J (2002): A naturally occurring mutation in the SLC21A6 gene causing impaired membrane localization of the hepatocyte uptake transporter. *J Biol Chem* 277(45), 43058-43063.
- Mikkaichi T, Suzuki T, Tanemoto M, Ito S, Abe T (2004): The organic anion transporter (OATP) family. *Drug Metab Pharmacokinet* 19(3), 171-179.
- Miners JO, Rees DL, Valente L, Veronese ME, Birkett DJ (1995): Human hepatic cytochrome P450 2C9 catalyzes the rate-limiting pathway of torsemide metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 272(3), 1076-1081.
- Miners JO, Coulter S, Birkett DJ, Goldstein JA (2000): Torsemide metabolism by CYP2C9 variants and other human CYP2C subfamily enzymes. *Pharmacogenetics* 10(3), 267-270.
- Motulsky AG (1957): Drug reactions enzymes, and biochemical genetics. *J Am Med Assoc* 165(7), 835-837.
- Mwinyi J, Johne A, Bauer S, Roots I, Gerloff T (2004): Evidence for inverse effects of OATP-C (SLC21A6) 5 and 1b haplotypes on pravastatin kinetics. *Clin Pharmacol Ther* 75(5), 415-421.

- Nebert DW (1999): Pharmacogenetics and pharmacogenomics: why is this relevant to the clinical geneticist? *Clin Genet* 56(4), 247-258.
- Nelson DR (2009): The cytochrome p450 homepage. *Hum Genomics* 4(1), 59-65.
- Neugebauer G, Besenfelder E, von Mollendorff E (1988): Pharmacokinetics and metabolism of torasemide in man. *Arzneimittelforschung* 38(1A), 164-166.
- Neuvonen PJ, Niemi M, Backman JT (2006): Drug interactions with lipid-lowering drugs: mechanisms and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 80(6), 565-581.
- Niemi M, Cascorbi I, Timm R, Kroemer HK, Neuvonen PJ, Kivisto KT (2002): Glyburide and glimepiride pharmacokinetics in subjects with different CYP2C9 genotypes. *Clin Pharmacol Ther* 72(3), 326-332.
- Niemi M, Schaeffeler E, Lang T, Fromm MF, Neuvonen M, Kyrklund C, Backman JT, Kerb R, Schwab M, Neuvonen PJ (2004): High plasma pravastatin concentrations are associated with single nucleotide polymorphisms and haplotypes of organic anion transporting polypeptide-C (OATP-C, SLCO1B1). *Pharmacogenetics* 14(7), 429-440.
- Niemi M, Pasanen MK, Neuvonen PJ (2011): Organic anion transporting polypeptide 1B1: a genetically polymorphic transporter of major importance for hepatic drug uptake. *Pharmacol Rev* 63(1), 157-181.
- Nishizato Y, Ieiri I, Suzuki H, Kimura M, Kawabata K, Hirota T, Takane H, Irie S, Kusuhara H, Urasaki Y (2003): Polymorphisms of OATP-C (SLC21A6) and OAT3 (SLC22A8) genes: consequences for pravastatin pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 73(6), 554-565.
- Ordonana JR, Rebollo-Mesa I, Gonzalez-Javier F, Perez-Riquelme F, Martinez-Selva JM, Willemsen G, Boomsma DI (2007): Heritability of body mass index: a comparison between the Netherlands and Spain. *Twin Res Hum Genet* 10(5), 749-756.
- Pasanen MK, Neuvonen PJ, Niemi M (2008): Global analysis of genetic variation in SLCO1B1. *Pharmacogenomics* 9(1), 19-33.
- Pfunder H (2013): Personalisierte Medizin als Herausforderung für die Pharmaindustrie. Deutscher Ethikrat (Hrsg.) *Personalisierte Medizin-der Patient als Nutznießer oder Opfer?*, 71-77.
- Rahmioglu N, Ahmadi KR (2010): Classical twin design in modern pharmacogenomics studies. *Pharmacogenomics* 11(2), 215-226.
- Rasmussen BB, Brix TH, Kyvik KO, Brosen K (2002): The interindividual differences in the 3-demethylation of caffeine alias CYP1A2 is determined by both genetic and environmental factors. *Pharmacogenetics* 12(6), 473-478.
- Rau T, Heide R, Bergmann K, Wuttke H, Werner U, Feifel N, Eschenhagen T (2002): Effect of the CYP2D6 genotype on metoprolol metabolism persists during long-term treatment. *Pharmacogenetics* 12(6), 465-472.

- Regardh CG, Borg KO, Johansson R, Johnsson G, Palmer L (1974): Pharmacokinetic studies on the selective beta₁-receptor antagonist metoprolol in man. *J Pharmacokinet Biopharm* 2(4), 347-364.
- Regardh CG, Johnsson G, Jordo L, Lungborg P, Persson BA, Ronn O (1980): Plasma concentrations and beta-blocking effects in normal volunteers after intravenous doses of metoprolol and propranolol. *J Cardiovasc Pharmacol* 2(6), 715-723.
- Regardh CG, Jordo L, Ervik M, Lundborg P, Olsson R, Ronn O (1981): Pharmacokinetics of metoprolol in patients with hepatic cirrhosis. *Clin Pharmacokinet* 6(5), 375-388.
- Regardh CG, Landahl S, Larsson M, Lundborg P, Steen B, Hoffmann KJ, Lagerstrom PO (1983): Pharmacokinetics of metoprolol and its metabolite alpha-OH-metoprolol in healthy, non-smoking, elderly individuals. *Eur J Clin Pharmacol* 24(2), 221-226.
- Rendic S (2002): Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metab Rev* 34(1-2), 83-448.
- Rettie AE, Wienkers LC, Gonzalez FJ, Trager WF, Korzekwa KR (1994): Impaired (S)-warfarin metabolism catalysed by the R144C allelic variant of CYP2C9. *Pharmacogenetics* 4(1), 39-42.
- Rijsdijk FV, Sham PC (2002): Analytic approaches to twin data using structural equation models. *Brief Bioinform* 3(2), 119-133.
- Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, Roots I (1997): Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet* 60(2), 284-295.
- Sachse C, Brockmoller J, Hildebrand M, Muller K, Roots I (1998): Correctness of prediction of the CYP2D6 phenotype confirmed by genotyping 47 intermediate and poor metabolizers of debrisoquine. *Pharmacogenetics* 8(2), 181-185.
- Sahasranaman S, Howard D, Roy S (2008): Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines. *Eur J Clin Pharmacol* 64(8), 753-767.
- Schaaf LJ, Campbell SC, Mayersohn MB, Vagedes T, Perrier DG (1987): Influence of smoking and gender on the disposition kinetics of metoprolol. *Eur J Clin Pharmacol* 33(4), 355-361.
- Schneeweiss S, Hasford J, Gottler M, Hoffmann A, Riethling AK, Avorn J (2002): Admissions caused by adverse drug events to internal medicine and emergency departments in hospitals: a longitudinal population-based study. *Eur J Clin Pharmacol* 58(4), 285-291.
- Schwartz S, Brater DC, Pound D, Green PK, Kramer WG, Rudy D (1993): Bioavailability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of toseamide in patients with cirrhosis. *Clin Pharmacol Ther* 54(1), 90-97.

- Sehrt D, Meineke I, Tzvetkov M, Gultepe S, Brockmoller J (2011): Carvedilol pharmacokinetics and pharmacodynamics in relation to CYP2D6 and ADRB pharmacogenetics. *Pharmacogenomics* 12(6), 783-795.
- Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP (1994): Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* 270(1), 414-423.
- Skoda RC, Gonzalez FJ, Demierre A, Meyer UA (1988): Two mutant alleles of the human cytochrome P-450db1 gene (P450C2D1) associated with genetically deficient metabolism of debrisoquine and other drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(14), 5240-5243.
- Smith RG (2009): An appraisal of potential drug interactions in cigarette smokers and alcohol drinkers. *J Am Podiatr Med Assoc* 99(1), 81-88.
- Somogy A (2008): Evolution of pharmacogenomics. *Proc West Pharmacol Soc* 51, 1-4.
- Spahn H, Knauf H, Mutschler E (1990): Pharmacokinetics of torasemide and its metabolites in healthy controls and in chronic renal failure. *Eur J Clin Pharmacol* 39(4), 345-348.
- Steimer W, Zopf K, von Amelunxen S, Pfeiffer H, Bachofer J, Popp J, Messner B, Kissling W, Leucht S (2004): Allele-specific change of concentration and functional gene dose for the prediction of steady-state serum concentrations of amitriptyline and nortriptyline in CYP2C19 and CYP2D6 extensive and intermediate metabolizers. *Clin Chem* 50(9), 1623-1633.
- Stubbins MJ, Harries LW, Smith G, Tarbit MH, Wolf CR (1996): Genetic analysis of the human cytochrome P450 CYP2C9 locus. *Pharmacogenetics* 6(5), 429-439.
- Tirona RG, Leake BF, Merino G, Kim RB (2001): Polymorphisms in OATP-C: identification of multiple allelic variants associated with altered transport activity among European- and African-Americans. *J Biol Chem* 276(38), 35669-35675.
- Tucker GT (2000): Advances in understanding drug metabolism and its contribution to variability in patient response. *Ther Drug Monit* 22(1), 110-113.
- Vesell ES (1978): Twin studies in pharmacogenetics. *Hum Genet Suppl* (1), 19-30.
- Vesell ES (1989): Pharmacogenetic perspectives gained from twin and family studies. *Pharmacol Ther* 41(3), 535-552.
- Vesell ES (1991): Genetic and environmental factors causing variation in drug response. *Mutat Res* 247(2), 241-257.
- Vesell ES, Page JG (1968a): Genetic control of drug levels in man: phenylbutazone. *Science* 159(3822), 1479-1480.
- Vesell ES, Page JG (1968b): Genetic control of drug levels in man: antipyrine. *Science* 161(836), 72-73.

- Vesell ES, Page JG (1968c): Genetic control of dicumarol levels in man. *J Clin Invest* 47(12), 2657-2663.
- Vormfelde SV, Engelhardt S, Zirk A, Meineke I, Tuchen F, Kirchheiner J, Brockmoller J (2004): CYP2C9 polymorphisms and the interindividual variability in pharmacokinetics and pharmacodynamics of the loop diuretic drug torsemide. *Clin Pharmacol Ther* 76(6), 557-566.
- Vormfelde SV, Schirmer M, Toliat MR, Meineke I, Kirchheiner J, Nurnberg P, Brockmoller J (2007): Genetic variation at the CYP2C locus and its association with torsemide biotransformation. *Pharmacogenomics J* 7(3), 200-211.
- Vormfelde SV, Toliat MR, Schirmer M, Meineke I, Nurnberg P, Brockmoller J (2008): The polymorphisms Asn130Asp and Val174Ala in OATP1B1 and the CYP2C9 allele *3 independently affect torsemide pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther* 83(6), 815-817.
- Weinshilboum RM, Sladek SL (1980): Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet* 32(5), 651-662.
- Yoo HD, Kim MS, Cho HY, Lee YB (2011): Population pharmacokinetic analysis of glimepiride with CYP2C9 genetic polymorphism in healthy Korean subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 67(9), 889-898.
- Zanger UM, Fischer J, Raimundo S, Stuvén T, Evert BO, Schwab M, Eichelbaum M (2001): Comprehensive analysis of the genetic factors determining expression and function of hepatic CYP2D6. *Pharmacogenetics* 11(7), 573-585.
- Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M (2004): Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 369(1), 23-37.
- Zhang SY, Surapureddi S, Coulter S, Ferguson SS, Goldstein JA (2012): Human CYP2C8 is post-transcriptionally regulated by microRNAs 103 and 107 in human liver. *Mol Pharmacol* 82(3), 529-540.

7. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Brockmüller für die Überlassung des spannenden Themas und für seine umfassende, stets geduldige und immer äußerst freundliche Betreuung bei dem Verfassen dieser Arbeit.

Ich danke Frau Dr. med. Cordula Sachse-Seeboth und Herrn Daniel Seht für die Unterstützung der Studiendurchführung und die sehr angenehme und herzliche Atmosphäre während der Arbeit auf der Probandenstation des Instituts für Klinische Pharmakologie.

Mein Dank gilt auch den mir nachfolgenden Doktoranden Jakob Strube, Valerie Gal und Stefanie Brunke sowie unserer Study Nurse Ulrike Schöning für die kontinuierliche und engagierte Fortführung der Studie. Zudem Herrn Sven Müller für die hervorragende Unterstützung bei der elektronischen Erfassung der erhobenen Daten.

Den zuständigen Mitarbeitern in den Laboren am Institut für Klinische Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen sowie am Dr. Margarete-Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie Stuttgart danke ich für die Durchführung der bioanalytischen Untersuchungen.

Zuletzt möchte ich allen Zwillingspaaren für die Teilnahme an dieser Studie danken.