

# **1. Einleitung**

## **1.1 Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL)**

Ein Drittel aller malignen Erkrankungen im Kindesalter sind Leukämien. Diese entstehen durch die klonale Expansion hämatopoetischer Zellen mit Akkumulation leukämischer Zellen in Knochenmark, Blut und lymphatischen Geweben. Bei der akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) findet eine maligne Entartung von Lymphozyten der B- oder T-Zellreihe statt.

### **1.1.1 Inzidenz und Heilungsrate**

Unter leukämieerkrankten Kindern haben 75% eine ALL, die damit die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter darstellt (30%). Der erste Erkrankungsgipfel liegt im vierten Lebensjahr. Die besten derzeit publizierten langzeitereignisfreien Überlebensraten waren nach 5 Jahren in nicht selektierten Patientenkollektiven zwischen 63 und 83%, nach 8 Jahren zwischen 60<sup>1</sup> und 76%<sup>2</sup>. Die Wahrscheinlichkeiten des Langzeitüberlebens nach 8 Jahren betragen zwischen 77 und 84%. Obwohl die Heilungsrate für Kinder durch Protokolle, die dem Rezidivrisiko angepasst sind, erheblich verbessert wurde und wesentliche Erkenntnisse über die molekularen Zusammenhänge gewonnen wurden, sind weitere Untersuchungen zur Klärung von Ätiologie, Pathogenese und individuellem Therapieerfolg wichtig<sup>3, 4, 5</sup>. Voraussetzung für die risikoadaptierte Behandlung von Kindern mit ALL ist eine optimale individuelle Therapie. Hierzu werden prognostische Faktoren zur Abschätzung des Rezidivrisikos bei ALL-Ersterkrankungen erhoben. Dies ist aufgrund des technischen und molekularbiologischen Fortschrittes umfangreicher und aufwändiger geworden, dennoch lassen sich Kinder mit ALL anhand klinisch-laborchemischer Eigenschaften zum Zeitpunkt der Diagnose bestimmten Risikogruppen zuteilen.

### **1.1.2 Prädiktive Faktoren der ALL**

Die aufgrund morphologischer und immunologischer Typisierung einem Therapieprotokoll und unterschiedlichen Strategiegruppen zugeordneten Patienten mit ALL-Neudiagnosen werden anhand verschiedener prädiktiver Faktoren beurteilt. Diese haben je nach Immunphänotyp

unterschiedliches Gewicht, erlauben jedoch eine genauere Einschätzung des Therapieerfolges und eignen sich dazu, die Intensität der Therapie festzulegen. Ziel ist es, bei geringstmöglicher Toxizität die größtmögliche Heilungsrate zu erreichen.

Während früher vor allem klinische Parameter wie Leukozytenzahl, Organgröße, Alter bei Erkrankung sowie der Immunphänotyp der Leukämiezellen wichtige Merkmale für die Therapieplanung waren, wird heutzutage dem Ansprechen auf die Therapie die größte Bedeutung beigemessen. Dieses wird u.a. durch den molekularbiologischen Nachweis von Leukämiezellen unterhalb der morphologischen Nachweisgrenze überprüft (*minimal residual disease*, MRD). Hierbei werden Leukämiezellen mit molekulargenetischen Methoden detektiert und quantifiziert und so die Dynamik des Ansprechens auf die Therapie während der Induktionstherapie verfolgt <sup>6</sup>. Der Nachweis von  $\geq 10^{-3}$  Leukämiezellen gilt als MRD-positives Ergebnis, ein negativer MRD-Befund liegt bei  $< 10^{-3}$  Leukämiezellen vor. Dieses Kriterium dient zur zuverlässigeren Erfassung des Rezidivrisikos und wird zur Therapiestratifizierung angewandt. Weiter sind genetische Merkmale wie die BCR/ABL-, TEL/AML1- und die MLL-Translokation aussagekräftige Marker für die Beurteilung des Therapieverlaufs.

### **1.1.2.1 Prognostisch günstige Faktoren der ALL**

Ein Erkrankungsalter zwischen 1 und 9 Jahren, weibliches Geschlecht und kaukasische oder asiatische Rasse sind als prognostisch günstige Faktoren beschrieben. In gleicher Weise sind eine Leukozytenzahl  $< 50\,000/\text{mm}^3$  und eine geringe periphere Blastenzahl, ein DNA-Index  $> 1,16$  und eine Chromosomenzahl  $> 50$  pro leukämischer Zelle zum Zeitpunkt der Diagnose als günstige Merkmale bekannt. Als einer der wichtigsten Parameter zur Beurteilung des Ansprechens auf die Therapie wird in der Induktionsphase des Therapieprotokolls die Anzahl peripherer Blasten bestimmt. Sind diese am 8. Tag nach Beginn der Prednisongabe geringer als  $< 10^3/\mu\text{l}$ , gilt dies als positiver Prädiktor (*prednisone good response*, gute Prednison-Antwort); als ebenso wichtig für einen günstigen Krankheitsverlauf gilt der blastenfreie Liquor.

Von den genetischen Merkmalen ist bei Kindern mit ALL-Ersterkrankung die Trisomie 4 bzw. 10 und die TEL-AML1-Fusion mit einer sehr guten Prognose assoziiert. Von den verschiedenen Immunphänotypen der ALL ist die B-Zell-*precursor*-ALL/prä-B-ALL mit der besten Prognose verbunden. Zusätzlich ist eine exzellente molekulare *response* (MRD negativ, wie in Abschnitt 1.1.2 beschrieben) ein begünstigender Faktor.

### **1.1.2.2 Prognostisch ungünstige Faktoren der ALL**

Als prognostisch ungünstige Faktoren gelten vor allem ein schlechtes Ansprechen auf die Therapie (*prednisone poor response*, MRD positiv) sowie zwei zytogenetische Merkmale: Translokation t(4;11) mit einer Rekombination des MLL-Gens auf Chromosom 11q23 und das Philadelphia Chromosom t(9;22). Weitere Kriterien einer schlechteren Prognose sind der extramedulläre Befall, besonders in ZNS oder/und Hoden und von den Immunphänotypen der ALL besonders die T-Zell-ALL.

### **1.1.2.3 Prognostische Faktoren bei ALL-Rezidiven**

Von den Kindern mit ALL erleiden trotz risikoadaptierter Therapie ungefähr 25-30% ein Rezidiv. Auch für die Behandlung dieser Patienten muss eine optimale Therapie durchgeführt werden, die sich nach eindeutigen Kriterien richtet. Da es sich bei Rezidiverkrankungen möglicherweise um einen Leukämiezellklon mit höherer Zytostatikaresistenz handelt, muss die Behandlungsintensität höher sein und erfordert häufiger eine Stammzelltransplantation. Die Stammzelltransplantation von HLA-passenden Spendern ist mit einem noch höheren therapieassoziierten Mortalitäts- und Morbiditätsrisiko behaftet, als die konventionelle Chemotherapie. Die Indikation für eine derartige Therapieform ist demzufolge nach präzisen Kriterien sehr eng zu stellen.

Die Therapieoptimierungsprotokolle der BFM-Studiengruppe (Berlin-Frankfurt-Münster-Studiengruppe) haben ergeben, dass der Zeitpunkt (früh vs. spät), der Ort des Rezidivs (isoliert Knochenmark vs. Knochenmark kombiniert und isoliert extramedullär) sowie der ALL-Immunphänotyp (T- vs. non-T-ALL) die wichtigsten klinisch prognostischen Marker sind<sup>7</sup>. Aus der Kombination dieser drei prognostischen Merkmale konnten vier Strategieguppen (S1-S4) definiert werden. Die Strategieguppe 1 (S1) gilt als Gruppe mit niedrigem Risiko, die Strategieguppe S2 als Gruppe mit intermediärem Risiko und die Strategieguppen 3 und 4 (S3, S4) gelten als Hochrisikogruppe.

Tab.1: Einteilung der Strategiegruppen S1 bis S4 in der Studie ALL-REZ BFM (KM=Knochenmark).

Ort	Immunphänotyp: non-T			Immunphänotyp: (prä-)T		
	extramedullär isoliert	KM kombiniert	KM isoliert	extramedullär isoliert	KM kombiniert	KM isoliert
<b>Zeitpunkt</b>						
sehr früh	S2	S4	S4	S2	S4	S4
früh	S2	S3	S3	S2	S4	S4
spät	S1	S2	S2	S1	S4	S4

Die entsprechende Therapie führt bei den meisten Kindern mit ALL-Erstrezidiv zu einer hämatologischen Remission, die Langzeitherheilungschance liegt jedoch nur bei 40%. Hierbei zeigen sich große Unterschiede nicht nur zwischen den Strategiegruppen, sondern auch innerhalb der einzelnen Gruppen, v.a. der Strategiegruppe S2.

Unter Berücksichtigung der gegenwärtig angewandten Risikofaktoren für die Therapiestratifizierung liegt das ereignisfreie Überleben (pEFS, *probability of event-free survival*) der Patienten der Standardrisikogruppe S1 bei  $pEFS = .75 \pm .06$ , bei Patienten der mittleren Risikogruppe S2 bei  $pEFS = .38 \pm .02$  und bei Patienten Hochrisikogruppe S3 und S4 jeweils  $pEFS (S3) = .02 \pm .02$  und  $pEFS (S4) = .04 \pm .02$  (Ereignisfreies Überleben in Abhängigkeit von der Strategiegruppe, Studien ALL-REZ BFM 83-90, Stammzelltransplantation zensiert; Stand 09/01).

Die Strategiegruppe S2 wird, wie schon erwähnt, als intermediäre Risikogruppe bezeichnet und stellt die größte Gruppe bei Kindern mit ALL-Rezidiv dar. Eine weitere Unterteilung der Patienten erfolgt durch den Zeitpunkt des extramedullären Rezidivs, die initiale Blastenzahl, die BCR-ABL-Expression und die molekulare *response* (MRD), so dass sie einer Intensivierung der Chemotherapie mit oder ohne Stammzelltransplantation zugeführt werden können. So ist ein positiver MRD-Befund, d.h. der molekularbiologische Nachweis von Tumorzellen (siehe auch Abschnitt 1.1.2) vor dem 3. Therapieelement der S2-Risikogruppe ein positiver Prädiktor für ein Folgerezidiv und führt zur Stratifizierung in einen Behandlungszweig mit obligater Stammzelltransplantation.

Neben diesen klinischen Parametern sind auch biologische Merkmale der Leukämiezellen beim ALL-Rezidiv für die Prognose entscheidend. So ist der Nachweis des BCR-ABL Fusionstranskripts (Translokation t(9;22)) oder der 11q23-Aberration (MLL-AF4, MLL-AF9, MLL-ENL) mit einer schlechten Prognose verbunden <sup>8</sup>, während das TEL-AML1

Fusionstranskript (Translokation t(12;21)) für die Rezidivbehandlung als prognostisch günstig beurteilt wird<sup>9</sup>. Kinder mit TEL-AML1 positiver ALL rezidivieren spät und die Leukämiezellen sind auffallend sensitiv gegenüber einer erneuten Chemotherapie<sup>10</sup>. Sie haben deshalb eine signifikant bessere Überlebenswahrscheinlichkeit, als solche mit TEL-AML1 negativen ALL-Rezidiven<sup>11</sup>.

Im Falle eines Rezidivs haben hingegen Kinder mit BCR-ABL positiver ALL nur eine Heilungschance mit intensiver Polychemotherapie zur Induktion einer Remission und nachfolgender allogener Stammzelltransplantation<sup>12</sup>.

## 1.2 Zytostatika in der Leukämiebehandlung

Heutige Therapieprotokolle berücksichtigen im Wesentlichen das Ansprechen auf die Therapie zur Stratifizierung der Patienten in unterschiedliche Risikogruppen. Danach schließt sich eine risikoadaptierte Polychemotherapie an, die über einen langen Zeitraum nach festgelegten Protokollen in Behandlungszyklen durchgeführt wird. Hierfür steht eine äußerst heterogene Gruppe von Arzneien zur Verfügung, die vorwiegend zytostatisch wirken. Zu den für die ALL-Behandlung wichtigen Medikamenten gehören unter anderen Prednison/Dexamethason (Steroide), Etoposid (Epipodophyllotoxin), Mercaptopurin/Cytarabin/Thioguanin (Purin-/Pyrimidin-Analoga), Vincristin/Vindesin (Vinca-Alkaloide), Cyclophosphamid/Ifosfamid (Oxazaphosphorine), Methotrexat (Folsäureantagonisten) und Daunorubicin/Idarubicin (Anthracycline).

Bei der risikoadaptierten Polychemotherapie von Patienten mit Leukämien wird die protokollgerechte Behandlung durch interindividuell unterschiedlich starkes Auftreten von unerwünschten Arzneimittelnebenwirkungen teilweise stark eingeschränkt. Jedoch bedeutet die toxisitätsbedingte Dosisanpassung und die damit einhergehende Abweichung vom Protokoll möglicherweise ein Nichterreichen des therapeutisch wirksamen Bereiches und vermindert so die Effektivität der Behandlung. Klinische Studien und Statistiken zeigen eine große interindividuelle Variabilität des Heilungserfolgs mit den gängigen Xenobiotika<sup>13, 14, 15, 16</sup>.

Eine Erklärung hierfür ist die individuell unterschiedliche metabolische Aktivierung und Entgiftung von potentiellen Karzinogenen und Medikamenten durch Arzneimittel-verstoffwechselnde Enzymsysteme (*drug-metabolizing-systems*, DMS), die sich auch während der pränatalen Periode schon erkennen läßt<sup>17, 18, 19, 20</sup>. Zu diesen Enzymsystemen gehören vor allem die Cytochrom P450-Enzyme, die z.B. bei der Aktivierung von Epipodophyllotoxinen und

Oxazaphosphorinen eine Rolle spielen bzw. Glucocorticoide und Vincristin inaktivieren. Daneben spielen auch die NAD(P)H:Quinon Oxidoreduktase (NQO1), die N-Acetyltransferase (NAT) und die Gluthation-S-Transferasen (GST) eine wichtige Rolle. Die individuell unterschiedliche metabolische Aktivität der genannten DMS beruht auf ihrer genetischen Variabilität und wird als genetischer Polymorphismus eines funktionstragenden Genabschnittes bezeichnet. Es folgen genauere Ausführungen Abschnitt 1.3.2.

Evans et al. zeigte schon früh einen Weg in die Zukunft der individualisierten Chemotherapie<sup>21, 22</sup>. Er thematisiert unter der Bezeichnung Pharmakogenetik die reguläre Bestimmung ganzer Gruppen von Polymorphismen. So soll zusätzlich zu den gängigen Therapierichtlinien die genetische Information zu Arzneimittel-verstoffwechselnden Enzymssystemen, Transportproteinen und Arzneimittelrezeptoren dem Kliniker helfen, eine individuell abgestimmte Therapie durchzuführen.

## **1.3 Polymorphismen Arzneimittel-verstoffwechselnder Enzymssysteme**

### **1.3.1 Pharmakologie**

Die Leber als bedeutendstes Stoffwechselorgan des Menschen ist für den Umsatz körpereigener wie auch zugeführter Stoffe verantwortlich. Dafür ist sie mit vielen verschiedenen Enzymssystemen ausgestattet, die unter anderem in ihrer Rolle als Arzneimittel-Verstoffwechsler von klinischem Interesse sind. Insbesondere der Einfluss des Arzneimittels auf die Funktion des Enzyms im Sinne einer Induktion oder Inhibition ist zu beachten. Beispiele sind die Enzyminduktion durch Barbiturate oder Rifampicin mit schnellerer Biotransformation zahlreicher Pharmaka und umgekehrt die Inhibition durch Azole und Erythromycin mit verlangsamtem Abbau vieler Wirkstoffe. Die Änderung der Enzymaktivität ist also entweder für die Akkumulation von Pharmaka und dadurch verstärkte Wirkung und Nebenwirkung verantwortlich, oder führt zu einer schnelleren Elimination der Wirkstoffe und somit zu verminderter Wirksamkeit der Medikamente. Neben den reversiblen funktionellen Unterschieden der Enzyme existieren jedoch auch genetisch bedingte strukturelle Unterschiede, die zu veränderter Medikamentenwirkung führen können.

### 1.3.2 Polymorphismen

Im Rahmen der Sequenzierung des menschlichen Genoms werden nicht nur krankheitsrelevante Gene identifiziert, sondern auch Genloci, die für die interindividuellen Unterschiede von Arzneimittelwirkungen und -nebenwirkungen verantwortlich sind.

Ein genetischer Polymorphismus oder *single nucleotide polymorphism* (SNP) bezeichnet die natürliche genetische Variabilität durch einen Basenaustausch im Genom. Ein Polymorphismus manifestiert sich als monogen vererbtes Merkmal, das in der Bevölkerung in einer Allelhäufigkeit von mehr als einem Prozent vorkommt. Bei einer Allelfrequenz von weniger als einem Prozent wird von seltenen genetischen Varianten ausgegangen<sup>23</sup>. Polymorphismen werden in allen Abschnitten des menschlichen Genoms gefunden. So sind sie sowohl in regulatorischen Gensequenzen wie den *5'-untranslated regions* (5'-UTR) beschrieben, wo sie Genregulation und Genexpression beeinflussen können, als auch in den kodierenden Sequenzen des Genoms. Hier können sie funktionsverändernd wirken, indem Transportvorgänge, Bindungsfähigkeit an Zellstrukturen oder Substratstoffwechsel alteriert werden<sup>24</sup>.

In Abhängigkeit vom Genotyp bestimmter Transportproteine kann z.B. der Transfer von Arzneimitteln aus der Blutbahn an den Wirkort erheblich variieren und Wirkung und Nebenwirkung bei vergleichbarer Plasmakonzentration interindividuell sehr unterschiedlich sein. Polymorphismen von Rezeptoren und Ionenkanälen als vermittelnde Zellstrukturen der Arzneimittelwirkung können dazu führen, dass trotz vergleichbarer Arzneimittelkonzentration am Wirkort keine oder nur eine abgeschwächte Arzneimittelwirkung resultiert. Polymorphismen Arzneimittel-verstoffwechelnder Enzymsysteme (*drug-metabolizing systems*, DMS) beeinflussen den Substratstoffwechsel. Polymorphismen, die zum Funktionsverlust dieser Enzyme führen, haben zur Folge, dass Medikamente nur sehr langsam aus dem Organismus eliminiert werden können. Dies führt zu ihrer Akkumulation und damit entweder zu verlängerter Wirksamkeit oder verstärkten Nebenwirkungen<sup>25</sup>. Im Fall jener Arzneimittel, die ihre Wirkung erst als Metabolit entfalten (sogenannte *prodrugs*) kommt es zum Wirkverlust dieser Substanz. Individuen, die homozygote Träger solcher Polymorphismen sind, werden phänotypisch als sogenannte langsame Metabolisierer (*poor metabolizer*, PM) bezeichnet, während eine Gen-Duplikation zu ultra-schnellem Metabolismus führen kann (*ultra-rapid metabolizer*, UM)<sup>26</sup>. Diese Unterschiede in Pharmakodynamik und Pharmakokinetik spielen vor allem bei Medikamenten mit geringer therapeutischer Breite eine große Rolle.

Tab.2: Überblick über Wechselwirkung zwischen Zytostatika und DMS

	<i>Cyp 3A4</i>	<i>Cyp 3A4-mut</i>	<i>Cyp 2D6</i>	<i>Cyp 2D6-mut</i>	<i>NQO1</i>	<i>NQO1-mut</i>
<b>Dexamethason</b>	Substrat/ Induktor	verminderte Induktion	Induktor	fehlende Aktivität		
<b>Idarubicin</b>			Inhibitor	fehlende Aktivität		
<b>Doxorubicin</b>	Substrat		Inhibitor	fehlende Aktivität		
<b>Vinblastin</b>	Substrat	verlangsamte Elimination	Inhibitor	fehlende Aktivität		
<b>Vincristin</b>	Substrat	verlangsamte Elimination				
<b>Cyclophosphamid</b>	Substrat/ Induktor	verlangsamte Aktivierung				
<b>Ifosphamid</b>	Substrat/ Induktor	verlangsamte Aktivierung				
<b>Methotrexat</b>	Substrat	verlangsamte Elimination				
<b>Docetaxel</b>	Substrat	verlangsamte Elimination				
<b>Antitumor Quinone (experimentell)</b>					aktiviert <i>prodrugs</i>	verlangsamte Aktivierung

### 1.3.3 Assoziation von genetischen Polymorphismen und Krebsrisiko

Zusätzlich werden für einige Genloci aber auch Polymorphismen der Arzneimittel-verstoffwechselnden Enzymsysteme mit Erkrankungswahrscheinlichkeiten für Neoplasien in bestimmten Populationen assoziiert. Die wichtigsten dieser Enzyme sind die Isoenzyme der Cytochrom P450-Familie (Cyp), der NAD(P)H-Quinon-Oxidoreduktase 1 (NQO1), der N-Acetyltransferase (NAT), der Thiopurin-Methyltransferase (TPMT), der Glutathion-S-Transferase (GST) sowie der Epoxidhydrolase. Davon gehören die Cyp P450-Enzyme zu den Phase-I-Enzymen, die durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse eine funktionelle Gruppe am Substrat einführen, wodurch die Phase-II-Reaktion vorbereitet wird. In dieser erfolgt die Glucuronidierung, Acetylierung, Sulfatierung oder Konjugation von Glutathion, um wasserlösliche Verbindungen herzustellen, die renal eliminiert werden können. Zu den Phase-II-Enzymen gehören NQO1, NAT, TPMT, GST und die Epoxidhydrolase<sup>27, 28, 29, 30</sup>.

Die Untersuchung einzelner Polymorphismen und ihre Korrelation mit Erkrankungswahrscheinlichkeiten hat sehr unterschiedliche Erkenntnisse geliefert<sup>31, 32</sup>. So ergaben beispielsweise Studien zur Assoziation zwischen dem GST-Genotyp, Ätiologie und

Heilungschancen bei Kinder mit ALL-Ersterkrankungen ein erhöhtes Risiko für ALL bei bestimmten Genotypen von GSTM1 und Cyp 1A1<sup>33</sup>, während ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines myelodysplastischen Syndroms nicht mit GSTT1 in Verbindung gebracht werden konnte<sup>31</sup>. Jedoch wurde beispielsweise eine Null-Variante im GSTT1-Gen (GSTT1\*0/0) als Risikofaktor für Lungenkrebs bei hohem Tabakkonsum beschrieben<sup>34</sup>. Ebenso wurde sie mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für Harnblasenkrebs in Verbindung gebracht<sup>35</sup>.

Für die Entwicklung von Leukämien konnten mehrere Risikofaktoren identifiziert werden, von denen besonders die Polymorphismen einiger Cytochrom P450-Enzyme, der NAT und GST eine Rolle spielen. Aber auch die additive Wirkung von Genvarianten und expositionellen Risiken ist für die Erkrankungswahrscheinlichkeit entscheidend und konnte bereits belegt werden<sup>36</sup>. In den vorliegenden Untersuchungen werden Polymorphismen von Cytochrom P450 3A4 (Cyp 3A4), Cyp 2D6 und NAD(P)H-Quinon-Oxidoreduktase untersucht. Die von diesen Genorten kodierten Enzyme sind für die Metabolisierung vieler Zytostatika in der Therapie der akuten lymphoblastischen Leukämie im Kindesalter wichtig.

## **1.4 Cytochrom P450 3A4**

### **1.4.1 Gen, Polymorphismus und Inzidenz**

In der menschlichen Leber ist die Cytochrom P450 3A-Subfamilie (Cyp 3A) mit einem Anteil von 30% das häufigste der Cytochrom P450-Enzyme. Durch sie werden mehr als 50% der gebräuchlichsten Medikamente wie Glucocorticoide, Makrolide, Antiarrhythmika und Zytostatika (Epipodophyllotoxine, Vinca-Alkaloide, Oxazaphosphorine) metabolisiert<sup>37, 38, 39</sup>. Die häufigsten Mitglieder dieser Subfamilie sind Cyp 3A4, Cyp 3A5, Cyp 3A7 und Cyp 3A43, der überwiegende Teil der Arzneimittel-Verstoffwechslung erfolgt durch Cyp 3A4. Dieses Isoenzym der Cyp 3A-Familie aktiviert auch Karzinogene wie Aflatoxin B1 und wird für die individuell unterschiedliche Erkrankungswahrscheinlichkeit an Malignomen mitverantwortlich gemacht<sup>40</sup>.

Cyp 3A5 wird v.a. in der Niere exprimiert und ist zu 85% homolog mit Cyp 3A4, welches auch in den Enterozyten des Duodenums vorkommt. Cyp 3A7 ist die häufigste Isoform in der fetalen und neonatalen Leber und Cyp 3A4 fehlt, bis etwa ab dem zweiten Lebensjahr Cyp 3A4 überwiegt. Während der Kindheit scheint die Cyp 3A4-Aktivität sogar höher zu sein, als im Erwachsenenalter, diese Tatsache konnte bislang allerdings nicht schlüssig begründet werden<sup>19</sup>.

Die Cyp 3A4-Expression in der Leber hat eine über 50-fache Variabilität, was eine bis zu 20-fach unterschiedliche Arzneimittel-Clearance für Cyp 3A4-Substrate bedeutet <sup>41</sup>.

Die intra- und interindividuell stark variable Reaktion von Cyp 3A4 auf sog. *inducers*, also Verstärker und *inhibitors*, d.h. Abschwächer der Enzymaktivität, ist charakteristisch für polymorphe Isoenzyme und erklärt die große Vielfalt von möglichen und klinisch entscheidenden Arzneimittel-Wechselwirkungen. In den letzten Jahren wurden einige Polymorphismen im Cyp 3A4-Gen beschrieben. Die häufigste Variante Cyp 3A4-v in der Promoter-Region des Gens im *Nifedipin-specific-response element* hat eine Inzidenz bei Kaukasiern von nur 4-10%, jedoch bei Afro-Amerikanern 35-67% <sup>42</sup>.

Der Einfluß der Polymorphismus auf die Cyp 3A4-Aktivität ist bisher nicht gut untersucht und die veröffentlichten Ergebnisse sind kontrovers. Dies mag durch methodische Unterschiede und nicht optimale Substrate zu erklären sein <sup>43, 44</sup>. Wahrscheinlichste Folge des Polymorphismus im Cyp 3A4-Gen ist die Verlangsamung des Stoffwechsels durch verminderte Enzymquantität <sup>45</sup>.

#### **1.4.2 Genstruktur**

Das Gen für Cyp 3A4, das eine Glucocorticoid-induzierbare Nifedipin-Oxidase (Cyp 3) kodiert, liegt auf Chromosom 7 (7q22.1). Die Allelvariante Cyp 3A4-v entsteht durch eine A→G Transition in der Promoter-Region des Gens im *Nifedipin-specific-response element* (NSRE) an Position 290 nach der Transkriptionsinitiationssequenz und hat eine Länge von 27 kb mit 13 Exons <sup>46, 47</sup>.

#### **1.4.3 Medikamentenmetabolisierung und Assoziation zu Erkrankungen**

Die für die Behandlung von Leukämien wichtigen Zytostatika der Oxazaphosphorinklasse, Cyclophosphamid (CPA) und Ifosfamid (IFO), werden durch Cyp 3A4 in wirksame Metabolite überführt <sup>48</sup> und sie verursachen eine Autoinduktion des Cyp 3A4-Metabolismus <sup>49</sup>. Diese Aktivierung wird durch Cyp 3A4-v verlangsamt, so dass ein therapeutischer Wirkspiegel nur sehr langsam erreicht wird. Auch die zusätzliche Metabolisierung der Medikamente durch Cyp 2B6 und Cyp 2C kann diese Inhibition offenbar nicht ausgleichen <sup>50</sup>.

Es läßt sich zeigen, dass die 4-Hydroxylierung von CPA und IFO als erster Schritt der Aktivierung zu *Phosphoramid mustard* vor allem durch Cyp 3A4 erfolgt, so dass ein



Transkription induzieren. Das Vorliegen hoher Wirkstoffspiegel (im supramikromolaren Bereich) induziert durch Dexamethason eine PXR-Aktivierung. In der Leber kontrollieren Glucocorticoide die Expression von PXR und CAR, die für die basale Expression von Cyp 3A4 verantwortlich sind. In Gegenwart von Induktoren von Cyp 3A4 werden beide Rezeptoren zusätzlich aktiviert und steigern so die Cyp 3A4-Expression<sup>56</sup>.

Für die Behandlung der ALL bedeutet dieser Mechanismus, dass entscheidende Medikamente eine verringerte Wirksamkeit durch Induktion von Cyp 3A4 haben<sup>57</sup>. Durch den Polymorphismus in der Promoter-Region des Gens wird jedoch eine verminderte Induktion gefunden. Vincristin, ein Chemotherapeutikum der Gruppe der Vinca-Alkaloide, wird durch Cyp 3A4 O-demethyliert<sup>58</sup>. Vermutlich wird durch den Polymorphismus und die daraus resultierende Strukturänderung im Enzym die Elimination verlangsamt, so dass sich die Nebenwirkungen verstärken. Diese Annahme wurde allerdings bisher nicht durch Studien bestätigt.

In diesem Zusammenhang ist die steigende Toxizität durch eine verminderte *clearance* von Docetaxel, einem Chemotherapeutikum in der Behandlung von fortgeschrittenem Brust- und Lungenkrebs, durch eine verminderte Cyp3A4-Aktivität zu erwähnen, die durch den [<sup>14</sup>C-N-Methyl]erythromycin-Atemtest gemessen werden kann. Die Cyp 3A4-Aktivität ist hierbei die signifikanteste unabhängige Variable zur Vorhersage der Docetaxel-*clearance*<sup>59</sup>.

Epidemiologische Studien ließen zum Einen vermuten, dass Cyp 3A4-v mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Prostata-Karzinomen bei Afro-Amerikanern assoziiert ist<sup>60</sup>. Zum Anderen wird der Polymorphismus mit der Entwicklung von Therapie-assoziierten Leukämien in Verbindung gebracht, die nach Behandlung mit Cyp 3A4-metabolisierten Chemotherapeutika entstanden<sup>61</sup>. In beiden Fällen wird angenommen, dass das variante Allel die Cyp 3A-Expression verringert und dadurch den Stoffwechsel von Testosteron, bzw. den der Chemotherapeutika vermindert oder stört. Allerdings wurde die Assoziation zwischen Cyp 3A4-v und Therapie-assoziiertes Leukämie in einer anderen Studie widerlegt<sup>62</sup>, und auch die funktionelle Bedeutung des Polymorphismus zur Entwicklung von Brust- oder Eierstockkrebs konnte nicht reproduziert werden<sup>63</sup>. Mit letzter Sicherheit läßt sich also ein direkter Einfluss des Polymorphismus auf die Stoffwechselaktivität bisher nicht belegen.

Zusätzlich identifizierte Mutationen in der Promoterregion konnten nicht mit einem Einfluss auf den Stoffwechsel assoziiert werden<sup>64</sup>.

## 1.5 Cytochrom P450 2D6

### 1.5.1 Gen, Polymorphismus und Inzidenz

Ein weiteres Beispiel eines polymorphen Enzyms ist das Cytochrom P450 2D6, bei dem mehr als 50 Polymorphismen bekannt sind. Davon sind mindestens 15 dafür verantwortlich, dass Cyp 2D6 nicht exprimiert wird. Polymorphismen, die veränderte Proteinprodukte erzeugen, resultieren in verlangsamter oder abwesender Stoffwechselaktivität, die heterogen in den Populationen verteilt ist<sup>65, 66, 67, 68, 69</sup>. So zeigen zum Beispiel 1% Araber, 5-8% Kaukasier und bis zu 30% Orientalen den Phänotyp langsamer Metabolisierer (*poor metabolizer*, PM), der die Homozygotie für ein Defektallel oder *compound*-Heterozygotie mit zwei unterschiedlichen Nullallelen reflektiert.

Andererseits haben bis zu 29% Äthiopier durch Genamplifikation einen ultraschnellen Verstoffwechslungsphänotyp (*extensive metabolizers*, EM oder *ultrarapid metabolizers*, UM). Heterozygote Allelträger weisen einen intermediären Metabolismus (*intermediate-metabolism*, IM) auf. Die Häufigkeit der einzelnen Polymorphismen kann sehr unterschiedlich sein. So sind die Polymorphismen Cyp 2D6\*3 und Cyp 2D6\*4 die häufigsten Allele bei Kaukasiern, aber sehr selten bei Afrikanern und Chinesen, bei denen Cyp 2D6\*17, respektive Cyp 2D6\*10 den größten Stellenwert haben. Es ist bemerkenswert, dass es ein Nord-Süd-Gefälle mit abnehmender Häufigkeit von PM in Europa gibt<sup>70</sup>.

### 1.5.2 Genstruktur

Das kodierende Gen für Cyp 2D6 ist auf dem Chromosom 22q13.1 gelegen, besteht aus 8 Exons mit einer Gesamtlänge von 9432 bp und wird auch als humaner Debrisoquin 4-Hydroxylase (CYP2D) locus bezeichnet<sup>71</sup>. Zwei der vielen bekannten Isoformen von Cyp 2D6 werden im Folgenden charakterisiert und im Rahmen der Arbeit untersucht.

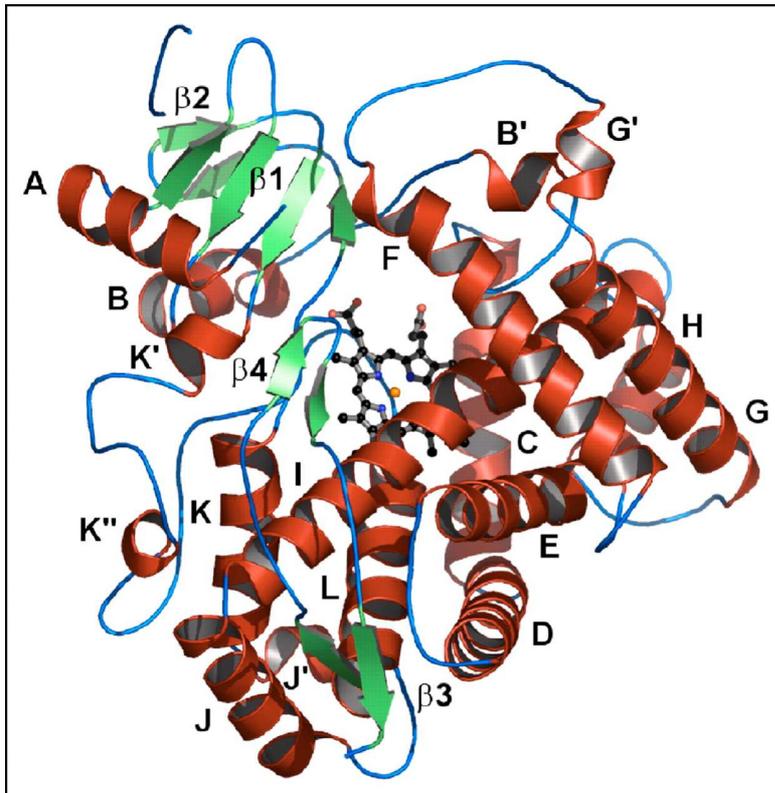


Abb.2: Schematische Darstellung der Proteinstruktur von Cyp 2D6.  
(Nach Rowland, P., Blaney F.E., Smyth M.G. et al. <sup>72</sup>)

### 1.5.3 Cyp 2D6\*4

Der Polymorphismus Cyp 2D6\*4 repräsentiert einen G1934A-Austausch an der 5'/3'-*splicing site* zwischen drittem Intron und viertem Exon. Dieser *splicing*-Defekt führt zu einem *Exon-skipping* (Auslassen von Exon 4) mit konsekutiver Leserasterverschiebung und Transkription eines verkürzten und inaktiven Proteins. Heterozygote Allelträger haben eine reduzierte Enzymaktivität und Homozygote oder *compound*-Heterozygote keine Aktivität des Enzyms. Die Allelfrequenz dieses Polymorphismus liegt insgesamt bei etwa 20% der Kaukasier, unter den PM beträgt sie 65%.

#### 1.5.4 Cyp 2D6\*3

Der Polymorphismus Cyp 2D6\*3 entsteht durch eine Basendeletion von A an Position 2637 in Exon 5, die zu einer Leserasterverschiebung führt, die die Expression verhindert und zu reduzierter, bzw. in homozygoter Form, zu fehlender Enzymfunktion führt. Die Allelfrequenz dieses Polymorphismus beträgt bei Kaukasiern nur 1%, von allen PM etwa 4%.

#### 1.5.5 Medikamentenmetabolisierung und Assoziation zu Erkrankungen

Das Cytochrom Cyp 2D6, das etwa 2% aller Cytochrom P450-Enzyme ausmacht, verstoffwechselt mehr als 20% der gebräuchlichsten Medikamente wie Antidepressiva (Amitriptylin), Antiarrhythmika (Metoprolol, Flecainid), selektive-Serotonin-*Reuptake*-Inhibitoren (Fluoxetin), Neuroleptika (Perazin, Haloperidol) sowie Tamoxifen und Cumarinderivate. Bei langsamen Metabolisierern ist die Elimination der betroffenen Arzneistoffe erheblich eingeschränkt und es kommt zur Kumulation des Wirkstoffes und daraus resultierend zu Nebenwirkungen.

Besonders die für die Chemotherapie bei ALL verwendeten Zytostatika Doxorubicin, Idarubicin und Vinblastin sind als Inhibitoren von Cyp 2D6 bekannt <sup>73</sup>. Hingegen gilt Dexamethason als Enzyminduktor von Cyp 2D6.

Es existieren Hinweise dafür, dass das Enzym sowohl an der Aktivierung, als auch der Entgiftung von Karzinogenen beteiligt ist. Der Einfluss der genetischen Polymorphismen von Cyp 2D6 auf die Entwicklung von Neoplasien verschiedener Art ist noch nicht vollständig geklärt. So konnte beispielsweise kein Zusammenhang zwischen der Erkrankungswahrscheinlichkeit für Bronchialkrebs und veränderter Cyp 2D6-Aktivität hergestellt werden <sup>74</sup>. Andererseits zeigte eine Untersuchung von Silvestri et al. die protektive Rolle des PM-Phänotyp von Cyp 2D6 in der Entwicklung von hepatocellulärem Karzinom bei Hepatitis C-Patienten <sup>75</sup> und in einer tierexperimentellen Untersuchung wurde eine reduzierte Cyp 2D6-Aktivität bei Tieren mit Nitrosamin-induzierten Tumoren des Ösophagus festgestellt <sup>76</sup>. Beides scheint ein Hinweis auf die Rolle des Cytochroms bei der Aktivierung von Karzinogenen verschiedener Art zu sein.

## 1.6 NAD(P)H-Quinon-Oxidoreduktase 1

### 1.6.1 Gen, Polymorphismus und Inzidenz

Die NAD(P)H-Quinon-Oxidoreduktase 1 (NQO1) wurde früher auch DT-Diaphorase (DTD) genannt. Sie ist ein Protein, das ein dimeres Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) enthält und als 2-Elektronen-Reduktase Quinone, Azofarbstoffe und Nitrogruppen reduziert. Dabei fungieren entweder NADH oder NADPH als Elektronen-Donor. NQO1 konvertiert Quinone zu relativ stabilen Hydroquinonen, die dann konjugiert und ausgeschieden werden können. Auf diese Weise wird die Bildung reaktiver freier Radikale verhindert und die Zelle vor oxidativem Schaden geschützt <sup>77</sup>. Zudem ist die NQO1-Expression durch oxidativen Stress induzierbar. Dennoch fungiert NQO1 nicht nur als Schutzmechanismus der Zelle, sondern reduziert auch präkarzinogene Verbindungen, wie zum Beispiel heterozyklische Amine, und ist von Bedeutung bei der Karzinogenese <sup>78</sup>.

NQO1 wird vor allem in menschlichen Epithelien und Endothelien exprimiert, kommt jedoch auch in vielen soliden Tumoren vor. NQO1 *knock-out*-Mäuse zeigten eine erhöhte Anfälligkeit für Benzopyren- und 7,12-Dimethylbenzanthrazen-induzierten Hautkrebs <sup>79</sup>. Außerdem scheint NQO1 das Tumorsuppressorgen p53 zu stabilisieren. Die hohe NQO1-Expression in einigen Tumoren ist für die Neuentwicklung spezieller Chemotherapeutika, die als *prodrug* vom NQO1-Enzym aktiviert werden, von Bedeutung. Hierzu zählt Dinitrobenzamin CB1954, das insbesondere bei *Walker-knock-out*-Ratten, aber auch in humanen Zelllinien eine hohe Anti-Tumor-Selektivität zeigt <sup>80</sup>. Für einige Zytostatika, sogenannte *antitumor quinones*, erfolgt die Bioaktivierung durch eine zwei-Elektronen-Reduktion mit NQO1 als aktivierendem Enzym. Ein Beispiel hierfür ist die Bioaktivierung von RH1 (2,5-diaziridinyl-3-(hydroxymethyl)-6-methyl-1,4-benzoquinone), einer Substanz, die derzeit in Phase-I-Studien untersucht wird <sup>81</sup>.

Es findet sich auch hier eine unterschiedliche Allelfrequenz in verschiedenen Populationen. So haben 16% der Kaukasier das Allel für NQO1 609 und 5% das Allel für NQO1 464, wohingegen Chinesen 49% und 4 % der jeweiligen Allele aufweisen <sup>82, 83</sup>.

## 1.6.2 Genstruktur

Wie Cyp 2D6 ist NQO1 ebenfalls ein polymorphes Enzym, liegt auf Chromosom 16 (16q22.1) und besteht aus etwa 20 kb mit sechs Exons. Bisher wurden zwei Punktmutationen charakterisiert: das NQO1\*2-Allel (NQO1\*2/NQO1 609) repräsentiert einen C609T Austausch in der cDNA, wodurch eine Pro187Ser Substitution kodiert wird; das NQO1\*3-Allel (NQO1\*3/NQO1 464) ist eine T464C Transition, die für einen Arg139Trp Austausch kodiert. NQO1 609 ist viel häufiger (zwischen 2 und 20% Homozygote) als NQO1 464 (5% der Kaukasier<sup>82</sup>) und hat großen Einfluss auf den Phänotyp, d.h. die Proteinexpression. Das durch NQO1 609 kodierte Protein hat eine reduzierte katalytische Aktivität und wird rasch durch das Ubiquitin-Proteasomensystem abgebaut. Dadurch zeigen Zellen, die für NQO1 609 homozygote Allele tragen, keine nachweisbare NQO1-Aktivität<sup>84</sup>.

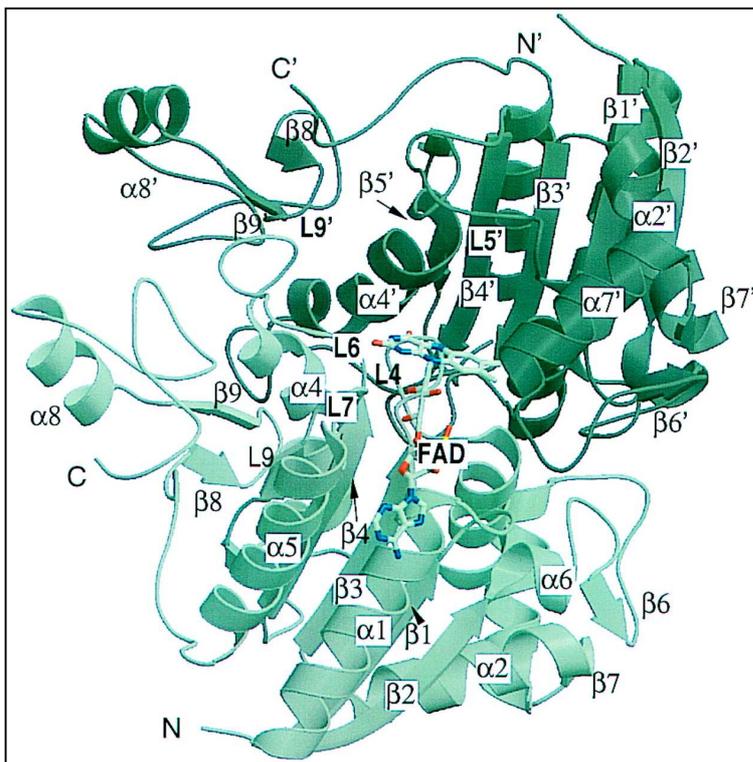


Abb.3: Schematische Repräsentation der Proteinstruktur des NQO1-Dimers. Das gebundene FAD wird an einer der beiden Bindungsstellen gezeigt. (Nach Faig M., Bianchet M.A., Talalay P. et al.<sup>85</sup>)

### 1.6.3 Medikamentenmetabolisierung und Assoziation zu Erkrankungen

Dexamethason supprimiert zusammen mit dem Corticoidrezeptor die Genexpression von NQO1 in vitro und in vivo <sup>86</sup>. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Tatsache, dass das Enzym Medikamentenvorstufen, sogenannte *prodrugs*, aktivieren kann, wie schon in Abschnitt 1.6.1 ausgeführt. Hierzu modifiziert das Enzym die Bindungsstelle und erlaubt so die Bindung chemisch unterschiedlich strukturierter Moleküle <sup>87</sup>.

Polymorphismen von NQO1 wurden besonders bei Rauchern mit Krebserkrankungen assoziiert. Wildtypgenotyp und mutiertes Allel können entweder protektiv wirken <sup>88</sup>, oder ein Risikofaktor für die Entwicklung einer Neoplasie sein <sup>89</sup>. Dies reflektiert die physiologisch sehr unterschiedliche Funktion des Enzyms. NQO1 ist u.a. essentiell für die Detoxifizierung von Benzol-Verbindungen. Menschen mit niedrigem oder fehlendem Metabolismus haben ein hohes Risiko für hämatologische Erkrankungen wie aplastische Anämie oder Leukämie nach Benzol-Vergiftung <sup>77, 90</sup>. Dieses Risiko wurde auch für Kinder mit reduzierter Enzymaktivität beschrieben. So haben insbesondere Kinder mit einer NQO1 C465T Transition und MLL-AF4-Fusionsgen ein hohes Risiko für die Entwicklung einer ALL <sup>91</sup>. Aber NQO1 609 ist auch assoziiert mit einem erhöhten Risiko für de novo-Leukämien mit MLL-Translokation bei Neugeborenen und Kindern <sup>92, 93</sup>. Ein ähnliches Risiko durch eine verminderte NQO1-Enzym-Aktivität wurde für Kinder ohne MLL-Translokation <sup>94</sup>, Patienten mit Therapie-assoziiierter Leukämie <sup>95</sup> und akuter Leukämie bei Erwachsenen nachgewiesen <sup>96</sup>.

## 2. Fragestellung der Arbeit

Die Arzneimittel-verstoffwechselnden Enzyme (DMS) Cyp 3A4, Cyp 2D6, und NQO1 spielen eine entscheidende Rolle in der Metabolisierung wichtiger Medikamente, die in der Therapie von Kindern mit ALL, bzw. ALL-Rezidiv verwendet werden. Zu diesen zählen die Oxazaphosphorine (Cyclophosphamid, Ifosfamid), die Vinca-Alkaloide (Vincristin, Vindesin) und die Epipodophyllotoxine (Etoposid).

Genetische Polymorphismen dieser DMS beeinflussen den Stoffwechsel und die Wirksamkeit der Medikamente. Dies betrifft sowohl die für einige Medikamente benötigten Aktivierungs-, als auch Detoxifizierungsprozesse. In der Summe können sie so den Therapieerfolg und die Toxizität der Behandlung beeinflussen.

Trotzdem ist der Schritt zur individualisierten Therapie noch nicht vollzogen, was unter anderem an der noch sehr aufwändigen Untersuchung der prognostisch relevanten Faktoren, der noch nicht eindeutigen Zuordnung vieler Ergebnisse, wie auch an der ethisch nicht einwandfrei geklärten Einstellung zur Aufschlüsselung genetischer Informationen am Patienten liegt. Trotzdem ist gerade wegen der schwierigen Balance zwischen geringstmöglicher Toxizität und maximaler Wirksamkeit der Therapie neoplastischer Erkrankungen die Individualisierung zur Optimierung von Heilungschance und Langzeitüberleben unbestritten.

Auf dieser Grundlage wurden die folgenden Ziele und Fragestellungen für die vorliegende Arbeit formuliert:

- 1) Lässt sich die Untersuchung der Polymorphismen Cyp 3A4-v, Cyp 2D6\*3, Cyp 2D6\*4, NQO1\*2 und NQO1\*3 durch den LightCycler etablieren und damit ökonomisieren?
- 2) Unterscheidet sich die Inzidenz von Polymorphismen der DMS bei Kindern mit ALL signifikant von denen der Normalpopulation?
- 3) Differiert die Prävalenz der Polymorphismen zu verschiedenen ALL-Erkrankungszeitpunkten (Rezidiv und Ersterkrankung)?
- 4) Korreliert das Auftreten der Polymorphismen mit klinischen und molekulargenetischen Daten?

5) Korreliert das Auftreten der Polymorphismen mit der Langzeitheilung der Kinder mit ALL-Rezidiv?

6) Können die Ergebnisse zu einer Individualisierung der Therapie beitragen?