

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Hämatologie/Onkologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Polymorphismen im *MDR1* und im *Cytochrom P450 2C18* Gen
bei Kindern mit Erstrezidiv einer
akuten lymphoblastischen Leukämie**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Andrea Christine Nestler

aus Bukarest

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. Dr. rer. nat. K. Seeger
2. Prof. Dr. med. U. Kontny
3. Priv.-Doz. Dr. med. D. Reinhardt

Datum der Promotion:

Abstract

In retrospektiven Fall-Kontroll-Studien wurde der Einfluss zweier Polymorphismen – C3435T im Multidrug Resistenz-Gen *MDR1* und T1154C im Cytochrom P450 *2C18*-Gen auf das Gesamtüberleben, das ereignisfreie Überleben sowie auf die Therapietoxizität bei Kindern mit Erstrezidiv einer akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) geprüft. Es wurden 49 Fall-Kontroll-Paare gebildet, die sich hinsichtlich der Folgeereignisse unterschieden (Zweitrezidiv vs. komplette Remission) sowie 24 Fall-Kontroll-Paare, die sich hinsichtlich des Ansprechens auf die Therapie unterschieden (Non-Responder vs. Responder). Exakte Matchkriterien waren dabei die signifikantesten unabhängigen Prognosefaktoren - der Zeitpunkt und die Lokalisation des Erstrezidivs sowie die periphere Leukozytenzahl bei Diagnose des ALL-Erstrezidivs. Alle Patienten wurden gemäß den Therapieprotokollen zur Behandlung von Kindern mit Rezidiv einer ALL der Studiengruppe Berlin Frankfurt Münster (ALL-REZ BFM) behandelt.

Zur Genotypisierung der Studienpatienten bezüglich der genannten Polymorphismen wurde eine LightCycler PCR mit Schmelzpunktanalyse etabliert. Insgesamt wurden Proben von 112 Kindern hinsichtlich des *MDR1*-Genotyps und von 108 Kindern hinsichtlich des *CYP2C18*-Genotyps untersucht. Anschließend wurde die Genotypverteilung mit dem Gesamtüberleben, dem ereignisfreien Überleben (EFS, event-free survival), den Intervallen zwischen den Chemotherapieblöcken sowie der Therapietoxizität gemäß den Toxizitätsparametern der Studie ALL-REZ BFM 95/96 verglichen. Weder bei den Kindern mit zweitem ALL-Rezidiv im Vergleich zu kompletter Zweitremission (Fall-Kontroll-Studie I) noch bei Respondern versus Non-Respondern (Fall-Kontroll-Studie II) konnte ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der *MDR1*- und *CYP2C18*-Genotypen festgestellt werden. Die Wahrscheinlichkeit für das EFS und die initialen Therapieblockintervalle unterschieden sich nicht in Abhängigkeit von den beiden Polymorphismen.

Vor Therapiebeginn ergab sich keine Korrelation zwischen den Toxizitätsinitialwerten und dem *MDR1* C3435T-Polymorphismus. Im Therapieverlauf zeigte sich jedoch ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem *MDR1*-Genotyp und folgenden Toxizitätsparametern: Allgemeinbefinden, Granulozytenzahl, Infektionsinzidenz, Fieber, Übelkeit, Diarrhoe, Hautveränderungen, Transaminasen und periphere Neurotoxizität, wobei der 3435T/T-Genotyp mit einer höheren Toxizität korrelierte. Bei der Analyse der Toxizitätswerte vor Therapiebeginn in Abhängigkeit vom *CYP2C18*-Polymorphismus ergab sich ein Zusammenhang zwischen den 1154T/T und C/T-Genotypen und den Toxizitätsparametern Infektion und Diarrhoe. Im Therapieverlauf zeigte sich eine Korrelation

zwischen *CYP2C18* und den Parametern: Allgemeinbefinden, Hämoglobin, Leukozytenzahl, Granulozytenzahl, Thrombozytenzahl, Fieber, Übelkeit, Erbrechen, Creatinin, Proteinurie, Hämaturie, Creatinin-Clearance, Bilirubin und Transaminasen. Zur Ermittlung der Genotypfrequenzen in einer gesunden Population und einer Population von pädiatrischen Patienten mit ALL-Ersterkrankung wurden 78 gesunde freiwillige Erwachsene und 98 Kinder mit ALL-Ersterkrankung hinsichtlich des *MDR1*-Polymorphismus untersucht. Dabei ergaben sich folgende Frequenzen: Gesunde Erwachsene 29.5% homozygot T; 47.4% heterozygot und 23.1% homozygot C; Kinder mit ALL-Ersterkrankung 25.5% homozygot T, 53.1% heterozygot und 21.4% homozygot C ($p = n.s.$).

Die Prävalenz des *CYP2C18*-Polymorphismus wurde bei 80 gesunden freiwilligen Erwachsenen und 102 Kindern mit ALL-Ersterkrankung untersucht. Die Frequenzen waren: Gesunde Erwachsene 80% Wildtyp homozygot C und 20% heterozygot C/T; Kinder mit ALL-Ersterkrankung 73.5% Wildtyp homozygot C und 26.5% heterozygot C/T ($p = n.s.$). Homozygot mutierte T/T-Genotypen waren in keinem der beiden Kollektive nachweisbar, in der Gruppe der Patienten der Fall-Kontroll-Studie wurden jedoch zwei Kinder mit diesem Genotyp identifiziert.

SCHLAGWÖRTER:

Akute lymphatische Leukämie (ALL) im Kindesalter

ALL-Rezidiv

MDR1- C3435T- Polymorphismus

Cytochrom P450

CYP2C18-T1154C-Polymorphismus

ALL-REZ BFM Studie

Abstract

P-glycoprotein (P-gp) encoded by the multidrug resistance gene *MDR1* is an important transporter for many drugs and xenobiotics. The activity of P-gp is genetically determined. Naturally occurring *MDR1* polymorphisms have been described and correlated with potential clinical effects. Several mutations in the *MDR1* gene have been recognized, but only some of them are associated with P-gp expression. The C3435T polymorphism was found to correlate with P-gp activity. CYP2C18, a member of the cytochrome P450 family, is an enzyme involved in the metabolism of DNA alkylating agents. The T1154C polymorphism of the *CYP2C18* gene was described to have an impact on the bioactivation of ifosfamide, a cytotoxic drug used in therapy protocols for childhood relapsed acute lymphoblastic leukemia (ALL). The aim of this study was to evaluate the importance of the single nucleotide polymorphisms (SNP) C3435T in *MDR1* and T1154C in *CYP2C18* in children with relapsed ALL and to investigate a possible correlation with overall survival, event-free survival (EFS) and therapy toxicity in these patients. A retrospective case-control study was carried out.

Patients with ALL second relapse were included as cases into the study group if they could be matched to a successfully treated patient with ALL first relapse (case-control study I). Also, patients with first relapse who responded to the therapy were matched to non-responders (case control study II). Matching criteria were significant independent prognostic factors: time point and site of ALL relapse and WBC at diagnosis of relapse. All patients were treated according to the ALL treatment protocols of the Berlin Frankfurt Münster Study Group (ALL-REZ BFM).

The C3435T *MDR1* and T1154C *CYP2C18* genotypes were determined by using the LightCycler technology with melting curve analysis. Both for the *MDR1* SNP and for the *CYP2C18* SNP the case and control groups I and II showed equal distributions of the genotypes. The probability for overall survival, EFS and the initial therapy block intervals did not differ significantly. For *MDR1* C3435T initial toxicity parameters collected before therapy did not show any correlation with the respective genotypes. During the course of therapy though, *MDR1* genotypes showed a statistically significant correlation with the following toxicity parameters: general condition, granulocyte count, infection, fever, nausea, diarrhea, skin lesions, transaminases and peripheral neurotoxicity, the 3435T/T genotype showing higher toxicity than the 3435C/T and C/C genotypes.

For the *CYP2C18* SNP a correlation was noted between the 1154T/T and C/T genotypes and initial toxicity parameters for infection and diarrhea. Toxicity data collected during the course of therapy showed a statistically significant correlation between 1154 T/T and C/T genotypes

and following parameters: general condition, hemoglobin, WBC, granulocyte count, platelets, fever, nausea, emesis, creatinine, proteinuria, hematuria, creatinine clearance, bilirubine and transaminases.

In addition, we genotyped 80 healthy adult volunteers and 102 children with de novo ALL. Genotype prevalences for the C3435T *MDR1* polymorphism were in the group of healthy individuals: 29.5% T/T, 47.4% C/T and 23.1% C/C. In children with de novo ALL (n=98) the prevalences were: 25.5% T/T, 53.1% C/T and 21.4% C/C. The differences in the distribution of the genotypes were statistically not significant ($p = n.s.$). For the *CYP2C18* T1154C SNP the prevalences were for healthy individuals: 80.0% C/C and 20.0% C/T; in children with de novo ALL they were: 73.5% C/C and 26.5% C/T. In none of these two groups could we identify homozygous T/T genotypes. The only individuals found to have a *CYP2C18* 1154 T/T genotype were two case control study patients with relapsed ALL.

KEYWORDS:

Childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL)

Relapsed ALL

C3435T *MDR1* polymorphism

T1154C *CYP2C18* polymorphism

Cytochrome P450

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	9
1.1. Einführung.....	9
1.2. Akute lymphoblastische Leukämie (ALL).....	9
1.2.1. Epidemiologie und Ätiologie	9
1.2.2. Klassifikation der ALL	10
1.2.2.1. Morphologie.....	10
1.2.2.2. Immunophänotypisierung.....	10
1.2.2.3. Zyto- und molekulargenetische Veränderungen.....	11
1.2.3. Diagnostik, Parameter für Prognose	11
1.2.4. ALL-Rezidive.....	12
1.2.5. Medikamente in der ALL-Therapie	14
1.2.5.1. Glukokortikoide.....	16
1.2.5.2. Zytostatika.....	16
1.2.5.2.1. Vinca-Alkaloide.....	16
1.2.5.2.2. Methotrexat (MTX).....	16
1.2.5.2.3. Anthrazykline.....	17
1.2.5.2.4. Alkylanzien.....	17
1.3. MDR1.....	18
1.3.1. Das P-Glykoprotein.....	18
1.3.2. Das <i>MDR1</i> -Gen.....	19
1.4. Das Cytochrom P 450 2C18.....	19
1.4.1. Die Familie der Cytochrome P 450.....	19
1.4.2. Das Protein Cytochrom 2C18.....	20
1.4.3. Das <i>CYP2C18</i> -Gen.....	21
2. Fragestellungen und Ziele dieser Arbeit	22
3. Material und Methoden	24
3.1. Die Fall-Kontroll-Studie ALL-Rezidive.....	24
3.2. Patienten.....	26
3.3. Material.....	27
3.4. Methoden.....	28
3.4.1. DNA-Isolierung	28
3.4.2. Konventionelle PCR und Agarosegelelektrophorese	28
3.4.3. Der LightCycler	31
3.4.3.1. Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET).....	32
3.4.3.2. Schmelzpunktanalyse.....	33
3.4.4. Statistische Methoden	37
4. Ergebnisse	38
4.1. Die <i>MDR1/CYP2C18</i> -Polymorphismen bei Gesunden und Kindern mit ALL-Ersterkrankung.....	38
4.1.1. Der <i>MDR1</i> -Polymorphismus bei Gesunden und Kindern mit ALL-Ersterkrankung	38
4.1.2. Der <i>CYP2C18</i> -Polymorphismus bei Gesunden und Kindern mit ALL-Ersterkrankung	39
4.2. Die <i>MDR1/CYP2C18</i> -Polymorphismen bei Patienten der Fall-Kontroll-Studien.....	40
4.2.1. Der <i>MDR1</i> -Polymorphismus bei Patienten der Fall-Kontroll-Studien	40
4.2.2. Der <i>CYP2C18</i> -Polymorphismus bei Patienten der Fall-Kontroll-Studien	42
4.3. Assoziation der <i>MDR1/CYP2C18</i> -Polymorphismen mit klinischen Merkmalen.....	43
4.3.1. Das ereignisfreie Überleben	43
4.3.2. Therapietoxizität und Therapiedichte	44
4.3.3. Die WHO-Toxizitätsparameter	46
4.3.4. Toxizitätsparameter abhängig vom <i>MDR1</i>-Genotyp	48
4.3.4.1. Initialwerte vor Therapiebeginn.....	48
4.3.4.2. Toxizitätswerte im Therapieverlauf.....	48
4.3.5. Toxizitätsparameter abhängig vom <i>CYP2C18</i>-Genotyp	54
4.3.5.1. Initialwerte vor Therapiebeginn.....	54
4.3.5.2. Toxizitätswerte im Therapieverlauf.....	55

5. Diskussion	64
5.1. Methoden.....	64
5.1.1. Die Fall-Kontroll-Paare	64
5.1.2. Methodik der PCR	65
5.2. MDR1	67
5.2.1. P-Glykoprotein	67
5.2.2. MDR1-Gen	71
5.2.3. Bedeutung des C3435T-Polymorphismus	73
5.3. Cytochrom P 450 2C18	78
5.3.1. Familie der Cytochrome P450	78
5.3.2. Die Cytochrome P450 und maligne Erkrankungen	80
5.3.3. Das Cytochrom 2C18	83
5.3.4. Das CYP2C18-Gen	84
5.3.5. Der T1154C Polymorphismus	85
5.4. Ergebnisse	88
5.4.1. Der MDR1 C3435T Polymorphismus bei Gesunden und ALL-Ersterkrankungen	88
5.4.2. Der MDR1 C3435T Polymorphismus bei ALL-Rezidiven	89
5.4.3. Der CYP2C18 T1154C Polymorphismus bei Gesunden und ALL-Ersterkrankungen	91
5.4.4. Der CYP2C18 T1154C Polymorphismus bei ALL-Rezidiven	92
5.4.5. Zusammenfassung	93
Literaturverzeichnis.....	95
Anhang	113
Lebenslauf	115
Erklärung an Eides Statt.....	116

Anhang

F1-Block

Medikament		Applikation	Dosierung	Tag					
Dexamethason	DEXA	oral	20 mg/m ² /d	1	2	3	4	5	
Vincristin	VCR	intravenös	1.5 mg/m ² /d	1					6
Methotrexat	MTX	36 h Infusion	1 g/m ²	1					
PEG-Asparaginase	PEG-ASP	>6 h Infusion	1000 U/m ²				4		
Methotrexat	MTX	intrathekal	altersabhängig	1					
Cytarabin	ARA-C	intrathekal	altersabhängig	1					
Prednison	PRED	intrathekal	altersabhängig	1					

F2-Block

Medikament		Applikation	Dosierung	Tag				
Dexamethason	DEXA	oral	20 mg/m ² /d	1	2	3	4	5
Vincristin	VCR	intravenös	1.5 mg/m ² /d	1				
Cytarabin	ARA-C	3 h Infusion	2 x 3 g/m ² /d	1	2			
PEG-Asparaginase	PEG-ASP	>6 h Infusion	1000 U/m ²				4	
Methotrexat	MTX	intrathekal	altersabhängig					5
Cytarabin	ARA-C	intrathekal	altersabhängig					5
Prednison	PRED	intrathekal	altersabhängig					5

R1-Block

Medikament		Applikation	Dosierung	Tag					
Dexamethason	DEXA	oral	20 mg/m ² /d	1	2	3	4	5	
Mercaptopurin	6-MP	oral	100 mg/m ² /d	1	2	3	4	5	
Vincristin	VCR	intravenös	1.5 mg/m ² /d	1					6
Methotrexat	MTX	36 h Infusion	1 g/m ²	1					
Cytarabin	ARA-C	3 h Infusion	2 x 2 g/m ²					5	
PEG-Asparaginase	PEG-ASP	>6 h Infusion	1000 U/m ²						6
Methotrexat	MTX	intrathekal	altersabhängig	1					
Cytarabin	ARA-C	intrathekal	altersabhängig	1					
Prednison	PRED	intrathekal	altersabhängig	1					

R2-Block

Medikament		Applikation	Dosierung	Tag					
Dexamethason	DEXA	oral	20 mg/m ² /d	1	2	3	4	5	
Thioguanin	6-TG	oral	100 mg/m ² /d	1	2	3	4	5	
Vindesin	VDS	intravenös	3 mg/m ² /d	1					
Methotrexat	MTX	36 h Infusion	1 g/m ²	1					
Ifosfamid	IFO	1 h Infusion	400 mg/m ² /d	1	2	3	4	5	
Daunorubicin	DNR	24 h Infusion	35 mg/m ²					5	
PEG-Asparaginase	PEG-ASP	>6 h Infusion	1000 U/m ²						6
Methotrexat	MTX	intrathekal	altersabhängig	1					
Cytarabin	ARA-C	intrathekal	altersabhängig	1					
Prednison	PRED	intrathekal	altersabhängig	1					

Lebenslauf

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

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.