

5. Diskussion

5.1. Methoden

5.1.1. Die Fall-Kontroll-Paare

In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen Einzelnukleotidpolymorphismen im *MDR1*- sowie im *CYP2C18*-Gen und dem ereignisfreien Überleben, der Therapieblocktypverteilung, den initialen Blockintervallen sowie der Toxizität vor und während der Chemotherapie bei Kindern mit ALL-Rezidiv untersucht. Dazu wurden zwei Fall-Kontroll-Studien durchgeführt, deren Charakteristika in Abschnitt 3.1 näher beschrieben wurden. Die Selektionskriterien der Fall-Kontroll-Paare (Zeitpunkt und Ort des Rezidivs, Knochenmarktransplantation, periphere Leukozytenzahl, Strategieguppe) wurden berücksichtigt, da es sich um prognostisch unabhängige Parameter für diese Patientengruppe handelt, die per se einen Einfluss auf das ereignisfreie Überleben haben. Ein Paaren von Alter und Geschlecht ist nicht notwendig, da eine prognostische Bedeutung dieser Parameter allein für Kinder mit isoliertem ZNS-Rezidiv berichtet wurde – für diese Patientengruppe konnten das männliche Geschlecht und ein höheres Alter bei ALL-Erstdiagnose als prognostisch ungünstige Parameter determiniert werden (Stackelberg et al., 1999).

Hingegen wäre das Vorhandensein der Fusionsgene *BCR-ABL* und *TEL-AML1* als Kriterien sicherlich sinnvoll gewesen, da einerseits die Expression von *BCR-ABL* eine ungünstige unabhängige prognostische Relevanz aufweist (Beyermann et al., 1997), andererseits *TEL-AML1* mit prognostisch günstigen Faktoren wie langer erster Remission und niedriger Blastenzahl im Blutbild bei Rezidiv-Diagnose assoziiert ist. Während *TEL-AML1* in der univariaten Analyse ein prognostisch günstiger Parameter ist (Seeger et al., 1998), ergibt sich in einer matched-pair Analyse nur eine geringgradig signifikante unabhängige prognostische Relevanz (Seeger et al., 2001). In diesem Zusammenhang ist also ein Nicht-Paaren von *TEL-AML1* als Kriterium zu verantworten.

Ein großes Problem bei der Auswertung der Ergebnisse waren die Kinder, die ursprünglich für die Fall-Kontroll-Studie ausgewählt worden waren, von denen jedoch nur ungenügend Material bzw. DNA von nur unzureichender Qualität vorhanden war. Da jedoch jedes dieser Kinder auch einen nach Studienkriterien passenden Partner hatte, kam es durch Fehlen eines Wertes zu einer unterschiedlichen Größe der Fall-Kontroll-Gruppen. Somit war die Zahl der auswertbaren Patientenpaare niedriger als ursprünglich geplant, was die Aussagekraft der Ergebnisse einschränkt. Dennoch ist die Zahl von 112 genotypisierten ALL-Rezidiv-Patienten für *MDR1* bzw. 108 Patienten für *CYP2C18* für eine eindeutige Aussage hinsichtlich der zu

klärenden Fragestellung dieser Arbeit, d.h. des Zusammenhangs zwischen den SNP in den *MDR1* und *CYP2C18*-Genen und der Prognose, dem Intervall zwischen Ersterkrankung und Erstrezidiv und der Therapietoxizität bei Kindern mit ALL-Erstrezidiv ausreichend. Die Ergebnisse der Fall-Kontroll Studien wurden zunächst für das größere, jedoch aufgrund des Fehlens von einzelnen Patientenwerten nicht exakt gepaarte Patientenkollektiv ausgewertet (Tab. 15, 17, 19 und 21). Anschließend wurde eine kleinere Patientengruppe unter Einschluss ausschließlich vollständiger Fall-Kontroll-Paare ausgewertet (Tab. 16, 18, 20 und 22). Die beiden Auswertungen kamen zu den gleichen Ergebnissen, nämlich nicht signifikanten Unterschieden der Genotypverteilung von *MDR1* und *CYP2C18* unter den Patienten der Fall-Kontroll-Studien.

Zur Beurteilung der Therapietoxizität wurden objektive, genau definierte Parameter wie Blutbild, laborchemische Werte sowie gut dokumentierte klinische Manifestationen der Patienten, wie zentrale und periphere Neurotoxizität, Übelkeit, Erbrechen und Hautveränderungen gewählt. Dabei spielen die Blutbildparameter (Hämoglobin, Leukozyten, Thrombozyten) eine besonders wichtige Rolle, da die Depression der Knochenmarkfunktion für den größten Anteil therapieassoziiierter Morbidität und Mortalität durch Infektionen während der Aplasie verantwortlich ist (Wheeler et al., 1994). Die laborchemischen Parameter zur Beurteilung der Leber- und Nierentoxizität (Transaminasen im Serum, Creatinin, Creatinin-clearance) können als hinweisend für die Organtoxizität der Therapie betrachtet werden.

Für die Auswertung der Therapietoxizität konnten nur ein Teil der Patienten der Fall-Kontroll-Studien, nämlich diejenigen, die nach Protokoll ALL-REZ BFM 95/96, bei dem die Toxizitätsparameter erhoben wurden, therapiert worden waren. Dies waren für den *MDR1* SNP 62 Patienten, für *CYP2C18* waren es 59 Patienten. Dabei wurden für jeden einzelnen Patienten die erhaltenen Chemotherapieblöcke einzeln berücksichtigt. Diese Vorgehensweise ist sinnvoll, da die Angaben über die Therapietoxizität im Laufe einer doch sehr langwierigen Therapie stark schwanken. Durch das Betrachten des einzelnen Blocks als Fall wird eine genauere Erfassung des Zeitpunktes des Auftretens und der Dauer der Therapienebenwirkungen ermöglicht.

5.1.2. Methodik der PCR

Zur Genotypisierung der Patienten wurde ein Assay mit einer kombinierten LightCycler Polymerasekettenreaktion und Schmelzpunktanalyse verwendet. Bei der Etablierung der Methode wurden die PCR-Produkte nach der Elektrophorese auf Agarosegel zunächst auf einem UV-Transilluminator untersucht. Damit wurde sichergestellt, dass es sich bei den

entstandenen Nukleotidsequenzen um Produkte der erwarteten Länge handelte, und nicht etwa um PCR-Nebenprodukte oder Primer-Dimeren. Durch die anschließende direkte Sequenzierung von ausgewählten PCR-Produkten wurde kontrolliert, dass die entstandene Sequenz der Basenabfolge des zu untersuchenden DNA-Abschnitts entsprach. Von den sequenzierten PCR-Produkten wurde die ausgemessene Schmelztemperatur als charakteristisch für den jeweiligen Genotyp angesehen. Sowohl bei *CYP2C18* als auch bei *MDR1* kamen Unterschiede von maximal 0.5 °C zwischen den Schmelztemperaturen in den verschiedenen LightCycler-Läufen vor, die wahrscheinlich auf Variationen in dem vom LightCycler aufgebauten Temperaturprofil zurückzuführen sind. Bei jedem LightCycler-Lauf wurde deshalb je eine sequenzierte Zelllinie des jeweiligen Genotyps mitgeführt, deren Schmelzkurve mit der Schmelzkurve der zu genotypisierenden Probe verglichen wurde. Auf diese Weise fielen Schwankungen der Schmelztemperaturkurven zwischen den einzelnen LightCycler-Läufen bei der Auswertung nicht ins Gewicht.

Die Verwendung sequenzspezifischer Oligonukleotide, die an Fluoreszenzfarbstoffen wie Fluorescein und Red 640 gekoppelt sind, dadurch bestimmte PCR Produkte erkennen und nur mit diesen reagieren, ermöglicht die real-time Analyse amplifizierter Zielsequenzen mit einer hohen Spezifität. Durch diese Methode können sogar einzelne Kopien einer Sequenz in komplexen Nukleinsäureansammlungen, wie zum Beispiel der genomischen DNA, aufgefunden werden. Das mit Hilfe von Sonden durch Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) entstehende messbare fluoreszierende Signal hat bei der hier verwendeten Methode stets die erwünschte DNA-Sequenz als Ursprung. Der *MDR1*-Sensor hat an Position 3435 im *MDR1*-Gen ein Adenosin und ist damit sequenzkomplementär zu der 3435T-Variante. Wie erwartet hatte ein Mismatch zwischen der DNA-Sequenz des PCR-Produktes und dem an Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Oligonukleotiden, d.h. bei den Varianten C/T und C/C, eine niedrigere Schmelztemperatur T_m zur Folge. Die Schmelztemperatur des C/C Genotyps war mit $T_m = 62.2^\circ\text{C}$ niedriger als die des Genotyps C/T mit $T_m = 64.0^\circ\text{C}$, während die T_m der homozygoten T/T Form 66.2°C betrug.

Der *CYP2C18*-Sensor hat an der SNP-Position 1154 eine Cytosin-Base, so dass die Sonde sequenzkomplementär zum Gegenstrang der Wildtypform ist. Durch den Mismatch zwischen Sonde und mutierter Form 1154T/T ergab sich eine Schmelztemperatur von 61.5°C , die niedriger war als die Schmelztemperatur der Wildtypform 1154C/C, die 67.5°C entsprach. Bei heterozygoten Proben C/T zeigte die Schmelzkurve einen zweigipfeligen Verlauf mit 61.5°C und 67.5°C als die beiden Maxima (siehe Abschnitt 3.4.3). Aufgrund der hohen Spezifität der Methode wurde auf eine Kontroll-Genotypisierung aller Proben durch eine

andere Methode wie etwa PCR-RFLP oder direkte Sequenzierung verzichtet. Es wurden jedoch einzelne PCR-Produkte sequenziert, darunter auch die Proben der zwei Kinder mit ALL-Rezidiv, die in der Schmelzpunktanalyse bezüglich des *CYP2C18* T1154C Polymorphismus als homozygot mutiert identifiziert wurden. Von den insgesamt 25 sequenzierten Proben – sowohl für *MDR1* als auch für *CYP2C18* – entsprachen die Ergebnisse der Sequenzierung zu 100% den Ergebnissen der Schmelzpunktanalyse.

In der Literatur ist die LightCycler PCR mit anschließender Schmelzpunktanalyse von mehreren Autoren als ähnlich erfolgreich beschrieben. Burian et al. verglichen die LightCycler PCR und Schmelzpunktanalyse mit der Methode der PCR-RFLP bei der Untersuchung von *CYP2C9* Polymorphismen und stellten eine Konkordanz von 100% zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden fest (Burian et al., 2002). Schalasta et al. berichteten ebenfalls über eine Übereinstimmung von 100% der Ergebnisse von LightCycler PCR mit Schmelzpunktanalyse und Sequenzierung bei der Genotypisierung von 46 Gesunden hinsichtlich eines Polymorphismus im humanen Prionenproteingen (Schalasta et al., 2002).

5.2. MDR1

5.2.1. P-Glykoprotein

Die Induktionstherapie der ALL-Ersterkrankung bewirkt, wie in den vorhergegangenen Abschnitten erwähnt, bei der Mehrzahl der Patienten eine Remission. Bei manchen Patienten ist die Remission jedoch nicht von Dauer und kann von einem Rezidiv von chemotherapeutikaresistenten Zellen gefolgt werden, das mit einem klinisch therapierefraktären Verlauf assoziiert ist. Diese resistenten Zellen könnten bei Diagnosestellung schon vorhanden sein, oder sich durch spontane Mutationen aus nicht-resistenten Leukämiezellen entwickeln. Sie expandieren während der Chemotherapeutikatherapie aufgrund eines Selektionsvorteils und übertreffen zahlenmäßig die sensiblen Zellen (Goldie et al., 1983). Bei einigen Subpopulationen resistenter Zellen ist eine Kreuzresistenz gegenüber mehreren Zytostatika festgestellt worden, die strukturell und funktionell keinerlei Ähnlichkeit untereinander aufweisen, außer dass sie aus kleinen, hydrophoben Molekülen bestehen. Die phänotypischen Charakteristika von so genannten multiresistenten Zellen sind, unabhängig von den Ursprungsgeweben, aus denen sie stammen, und von den zu ihrer Selektion verwendeten Chemotherapeutika auffallend ähnlich (Lemontt et al., 1988).

Verschiedene Modelle für den Funktionsmechanismus des Multidrug-Transporters P-gp werden diskutiert. Am Anfang wurde die Therapeutika-Resistenz als Folge einer Reduktion der Permeabilität der Plasmamembran für verschiedene Therapeutika gedeutet (Kasahara et

al., 1991). Später wurde allein die Aktivität des P-gp als eine Ausstrom-Pumpe als Ursache für eine verringerte intrazelluläre Anreicherung von Medikamenten gesehen (Gottesman und Pastan, 1988a; Gottesman und Pastan, 1988b). Heute wird diskutiert, dass der Multidrug-Transporter sowohl den Einstrom der Medikamente in das Zytosol reduzieren als auch deren Ausstrom steigern kann (Hamada et al., 1995; Hamada et al., 1994). Das derzeitige Modell besitzt zwei Grundzüge. Die Medikamente werden erkannt, wenn sie in die Plasmamembran eindringen und im Sinne eines „hydrophoben Staubsaugers“ ausgestoßen. Dieser Effekt ist die Ursache für den niedrigen Wirkstoffspiegel im Zytosol. Hydrophobe Bestandteile von Substanzen, die P-gp Substrate sind, penetrieren erst gar nicht in das Zytoplasma von Zellen, die P-gp exprimieren (Homolya et al., 1993). Die Interaktion zwischen P-gp und seinem Substrat findet in der Membran statt (Raviv et al., 1990). Xenobiotika werden aktiv unter ATP-Verbrauch von der inneren zur äußeren Lipidschicht transportiert und verlassen dann die Plasmamembran durch Diffusion (Sonneveld et al., 2000).

Als wichtigster phänotypischer Marker der MDR-positiven Zellen ist die Überexpression von P-Glykoprotein (P-gp), einem glykosylierten Plasmamembranprotein, identifiziert worden. Die klassische Definition der MDR entstand, als eine Überexpression von P-gp in vielen verschiedenen Zelllinien nachgewiesen wurde, denen durch die Behandlung mit unterschiedlichen Zytostatika ein Selektionsvorteil geschaffen worden war (Kartner et al., 1983). Beim Menschen gibt es zwei verschiedene Gene, die für P-Glykoproteine kodieren – *MDR1* und *MDR3*. Trotz ihrer Homologie ist nur das Genprodukt von *MDR1* ein Protein, das mit der Ausbildung einer Zytostatikaresistenz in Zusammenhang gebracht wird.

Das P-Glykoprotein gehört zur Superfamilie der ABC-Transporter (ATP-binding cassette transporter), einer Familie von ATP-abhängigen Transportproteinen. Das 170 kDa große P-Glykoprotein besteht aus 1280 Aminosäuren, lässt sich in zwei homologe Hälften aufteilen. Jede Hälfte hat je sechs transmembrane Domänen und eine ATP-Bindungsregion. Die homologen Hälften sind wahrscheinlich Folge einer internen Genduplikation (Chen et al., 1986). P-gp transportiert jedoch nicht alle Chemotherapeutika. Eine Voraussetzung für den Transport von Medikamenten durch P-gp ist deren relative Hydrophobie (Zamora et al., 1988; Nogue et al., 1989). Das P-Glykoprotein arbeitet ATP-abhängig. Es ist bekannt, dass beide ATP-bindende Kassetten zur Entfaltung der vollen Effizienz der Transporteraktivität benötigt werden (Azzaria et al., 1989), und dass die Medikamente selbst die ATPase-Aktivität stimulieren (Sarkadi et al., 1992; Ambudkar et al., 1992).

Das P-Glykoprotein hat eine sehr breite Substratspezifität, die meisten dieser Substanzen sind strukturell nicht verwandt, sind jedoch allesamt hydrophob und amphipatisch. Außer

Chemotherapeutika „transportiert“ das P-gp viele weitere Substanzen. Folgende Übersicht fasst alle zurzeit bekannten P-gp Substrate zusammen:

- A) Chemotherapeutika: Anthrazykline (Doxorubicin, Daunorubicin, Idarubicin) (Bart et al., 2000); Aktinomyzine (Dactinomycin) (Jette et al., 1995), Mitomycin C (Relling et al., 1996) ; Pflanzenalkaloide (Vincristin, Vindesin, Vinblastin) (Schinkel et al., 1994; Hoki et al., 1997) ; DNA-Topoisomeraseinhibitoren (Etoposid, Teniposid) (Kishi et al., 2004; Schinkel et al., 1996; Relling et al., 1996) ; Taxane (Paclitaxel, Docetaxel) (Wils et al., 1994; Spareboom et al., 1997); Topoisomerase I – Inhibitoren (Topotecan, Irinotecan) (Sugiyama et al., 1998 ; Relling et al., 1996)
- B) Steroide : Dexamethason (Schinkel et al., 1995); Cortisol (van Kalken et al., 1993)
- C) Hormonantagonisten: Antiöstrogene (Tamoxifen) (Pinedo et al., 1995)
- D) Digitalisglykoside (Pauli-Magnus et al., 2001; Schinkel et al., 1995, Verstuyft et al., 2003)
- E) Immunsuppressiva: Ciclosporin A (Saeki et al., 1993); Tacrolimus (Saeki et al., 1993)
- F) Kalziumkanalblocker (Pauli-Magnus et al., 2000; Saeki et al., 1993)
- G) Antiemetika : Domperidon (Schinkel et al., 1996); Ondansetron (Schinkel et al., 1996)
- H) Beta-Blocker (Matsuzaki et al., 1999 ; Kakumoto et al., 2003)
- I) H₁-Antihistaminika (Kim et al., 1999 ; Cvetkovic et al., 1999)
- J) H₂-Antihistaminika (Collett et al., 1999)
- K) Fettsenker/ Statine (Kim et al., 1999)
- L) Antibiotika: Erythromycin (Schuetz et al., 1998); Levofloxacin (Ito et al., 1997); Sparfloxacin (de Lange et al., 2000); Rifampicin (Schuetz et al., 1996)
- M) Anti-Diarrhoetika: Loperamid (Schinkel et al., 1996)
- N) HIV- Proteaseinhibitoren (Kim et al., 1998; Alsenz et al., 1998)
- O) Sonstige : Phenytoin (Schinkel et al., 1996); Morphin (Schinkel et al., 1995); Losartan (Soldner et al., 2000).

P-gp wird vor allem in Tumorzellen exprimiert, sowohl vor als auch nach einer Zytostatikatherapie, ist aber auch in vielen normalen Geweben vorhanden. So lässt seine Lokalisation in Hirn-, Hoden- und Plazentagewebe auf eine mögliche Barriere-Funktion von P-Glykoprotein schließen, die verhindern soll, dass sich toxische Stoffe in diesen Geweben anreichern. Tabelle 50 gibt eine Übersicht über wichtige Lokalisationen des P-Glykoproteins beim Menschen und deren Funktion:

Tabelle 54: P-Glykoprotein-Gewebsexpression beim Menschen (Thiebaut et al., 1987; Cordon-Cardo et al., 1989; Lankas et al., 1998; Jette et al., 1995 ; MacFarland et al., 1994)

Gewebe	Lokalisation	Funktion
Dünndarm und Colon	Luminale Membran der Epithelzellen	Sekretion von Medikamenten ins Darmlumen
Leber	Kanalikuläre Membran der Hepatozyten	Sekretion von Medikamenten in die Galle
Niere	Apikale Membran der epithelialen Zellen der proximalen Tubuli	Sekretion von Medikamenten ins Lumen der Nierentubuli
ZNS	Luminale Membran der Endothelzellen, die die Blut-Hirn-Schranke bilden	ZNS-Schutz vor Xenobiotika
Hoden	Endotheliale Zellen der Kapillaren	Blut-Hoden-Schranke
Plazenta	Synzytiotrophoblasten	Schutz des Feten vor Xenobiotika
Knochenmark	Hämatopoetische Stammzellen	Schutz der Stammzellen vor Xenobiotika

In anderen Organen, wie Nebenniere oder Uterus während der Schwangerschaft, wird eine Funktion als Steroidhormontransporter beschrieben (van Kalken et al., 1993; Rao et al., 1994; Pinedo et al., 1995). *MDR1*-mRNA wurde auch in mehreren Leukozytenpopulationen nachgewiesen mit der höchsten Expression bei $CD56^+$ -Zellen, gefolgt von niedrigerer Expression in $CD8^+$, $CD4^+$, $CD15^+$, $CD34^+$, $CD19^+$ und $CD14^+$ -Zellen (Klimecki et al., 1994). Verschiedene Mechanismen bewirken eine Induktion von P-gp mit resultierender Resistenzentwicklung und Therapierefraktärität der Tumorzellen. Der wohl wichtigste Induktionsstimulus sind Chemotherapeutika selbst, besonders Kombinationsregime (Sanfilippo et al. 1991). Entsprechende Beobachtungen wurden bei Mammakarzinomen gemacht, sowie bei Osteosarkomen, kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Leberkarzinomen, Adenokarzinomen des Magen-Darm-Traktes, aber auch bei AML und ALL. Die erhöhte P-gp-Expression korreliert bei mehreren Tumoren mit einem geringen Ansprechen auf Chemotherapie, einem kürzeren ereignisfreien Überleben (EFS) sowie Gesamtüberleben (van Kalken et al.; 1991). Für AML-Ersterkrankungen wurde eine hochgradige Korrelation zwischen der *MDR1*-Expression und einem ungünstigen Therapieerfolg festgestellt (Marie, 1995; Van den Heuvel-Eibrinck et al., 2001; Del Poeta et al., 1996; Leith et al., 1997).

Eine *MDR1*-Überexpression aufgrund von Genamplifikationen wird angenommen (Chen et al., 1986; Schönlein et al., 1992; Knutsen et al., 1998), jedoch wird davon ausgegangen, dass auch andere Faktoren eine Rolle spielen müssen. Beispielsweise induziert das Antituberculostatikum Rifampicin über einen bislang unzureichend verstandenen Mechanismus die Überexpression von *MDR1* (Greiner et al., 1999; Geick et al., 2001). Die

MDR1-Überexpression ist außerdem stress-induzierbar. Auch können bestimmte Stimuli als P-gp Induktoren wirken, wie z. B. ein erniedrigter extrazellulärer pH-Wert, ein Hitzeschock, eine akute oder chronische Arsenvergiftung, die Infektion mit HIV Typ I, eine UV-Strahlenbelastung (Szabo et al., 2000; Liu et al., 2002) sowie Schwermetalle (Chin et al., 1989) und Wachstumsfaktoren (Yang et al., 2001). Das P-gp wird ebenfalls von Onkogenen sowie Tumor-Suppressor-Genen (Chin et al., 1992) und Defekten in der regulierenden Untereinheit von cAMP-abhängigen Proteinkinasen (Abraham et al., 1990) reguliert. Der Expressionsgrad wird durch strukturelle Unterschiede im Genom bestimmt, wie zum Beispiel Veränderungen des Chromatins, Methylierung oder Acetylierung, die nicht nur direkt das *MDR1*-Gen betreffen, sondern auch die DNA-Sequenzen in der Umgebung des Gens (Hoffmeyer et al., 2000). Andererseits kann P-gp auch inhibiert werden. Substanzen wie Ciclosporin A, das Ciclosporinanalogen Valspodar (PSC 833), Kalziumkanalblocker (Verapamil, Nifedipin), Ketokonazol und Atovaquone (Mittel zur Bekämpfung der *Pneumocystis carinii* Pneumonie) steigern die intrazelluläre Chemotherapeutikakonzentration in den zu behandelnden Zellen durch eine Reduktion der Substanzclearance aus der Zelle (List et al., 1993; Sonneveld et al., 1992, 1999, 2000; Pinedo et al. 1995).

Die Messung der P-gp-Aktivität wird dadurch erschwert, dass die Mehrheit der P-gp-Substrate und Inhibitoren auch mit dem Enzym Cytochrom CYP3A4 interagieren (Wacher et al., 1995). Durch diese Überlappung ist es schwierig, Substanzen zu finden, die sich für die Bestimmung der P-gp Funktion im menschlichen Organismus eignen, ohne dass es zu Messfehlern durch eine CYP3A4-Metabolisierung käme.

5.2.2. *MDR1*-Gen

In dem aus 28 Exons und 3843 Basenpaaren bestehenden *MDR1*-Gen wurden bisher mehr als 20 Einzelnukleotidpolymorphismen identifiziert. Die ersten Mutationen in gesunden Zellen wurden von Mickley et al. beschrieben, siehe Tabelle 52 (Mickley et al., 1998). Hoffmeyer et al. führten ein erstes systematisches Screening aller 28 Exons des *MDR1*-Gens sowie der Kernpromoterregion und der Intron-Exon-Grenzen bei gesunden Kaukasiern durch (Hoffmeyer et al., 2000). Cascorbi et al. untersuchten bei 461 deutschen Freiwilligen die Frequenzen der bereits beschriebenen Mutationen (Cascorbi et al., 2001). Kim et al. fanden mehrere *MDR1*-Varianten bei Kaukasiern und Schwarzafrikanern (Kim et al., 2001). Tabelle 55 gibt eine Übersicht über die zurzeit bekannten Mutationen und ihre Lokalisation innerhalb des *MDR1*-Gens.

Tabelle 55: Derzeit bekannte Mutationen im *MDR1*-Gen Hoffmeyer et al., 2000 = a; Cascorbi et al., 2001 = b; Kim et al., 2001 = c; Mickley et al., 1998 = d; Schaeffeler et al., 2001 = e; Declèves et al., 2000 = f.

Nr.	Lokalisation	Position	Genotyp	Genotypfrequenz (%)	Effekt	Referenz
1.	Exon 1b	cDNA 12	T / T T / C	88,2 11,8		a
2.	Intron 1	Exon 2 - 1	G / G G / A	82,0 18,0	Behinderung der Translation	a , b, c
3.	Exon 2	cDNA 61	A / A A / G G / G	78,5 20,6 0,9	21 Asn 21 Asp	a, b, c, f
4.	Intron 4	Exon 5 - 35	G / G G / C	98,8 1,2		a
5.	Intron 4	Exon 5 - 25	G / G G / T T / T	70,5 26,0 3,5		a
6.	Exon 5	cDNA 307	T/T C/T C/C	keine Daten vorhanden	103 Phe 103 Leu	a
7.	Intron 6	Exon 6 + 139	C / C C / T T / T	39,0 47,5 13,4		a, b
8.	Intron 6	Exon 6 + 145	C / C C / T	97,6 2,4		a
9.	Exon 7	cDNA 548	A / A A / G G / G	keine Daten vorhanden	183 Asn 183 Ser	c
10.	Exon 11	cDNA 1199	G / G G / A	88,9 11,1	400 Ser 400 Asn	a, b, c
11.	Exon 12	cDNA 1236	C / C C / T T / T	34,4 49,2 16,4	Wobble	a, b, c
12.	Intron 12	Exon 11 + 44	C / C C / T	90,2 9,8		a, b
13.	Exon 13	cDNA 1474	C / C C / T T / T	keine Daten vorhanden	492 Arg 492 Cys	c
14.	Intron 16	Exon 17 – 76	T / T T / A A / A	28,4 50,8 20,8		a, b
15.	Intron 17	Exon 17 + 137	A / A A / G	98,8 1,2		a
16.	Exon 21	cDNA 2650	C / C C / T T / T	keine Daten vorhanden	Wobble	c

17.	Exon 21	cDNA 2677	G / G	30,9	893 Ala (G- Allel)	b, c
			G / T	49,2		
			T / T	16,1		
			G / A	2,0		
			T / A	1,8		
18.	Exon 24	cDNA 2995	A / A	0,0	893 Thr (A- Allel)	
			G / G	89,0		
19.	Exon 26	cDNA 3320	G / A	11,0	999 Ala	d
			A / A	99,6	999 Thr	
20.	Exon 26	cDNA 3396	A / C	0,4	1107 Gln	b
			C / C	99,5	1107 Pro	
21.	Exon 26	cDNA 3421	C / T	0,5	Wobble	a
			T / T	keine Daten vorhanden	1141 Ser	
22.	Exon 26	cDNA 3435	T / A		1141 Thr	c, e
			A / A		Wobble	
			C / C	20,8		
			C / T	50,5		
			T / T	28,6		a, b, c

Es wurde eine Korrelation zwischen zwei SNP an Wobble-Positionen (C1236T im Exon 12 und C3435T im Exon 26) und einem die Aminosäuresequenz verändernden Einzelnukleotidpolymorphismus (G2677T, Ala 893 Ser im Exon 21) beschrieben (Kim et al., 2001).

5.2.3. Bedeutung des C3435T-Polymorphismus

Hoffmeyer et al. beschrieben in einer 2000 publizierten Arbeit eine überraschend signifikante Korrelation zwischen einem stillen, die Aminosäuresequenz nicht verändernden, Polymorphismus im Exon 26 des *MDR1*-Gens, der Expression und Funktion von P-gp sowie der oralen Bioverfügbarkeit von Digoxin (Hoffmeyer et al., 2000). Die Arbeitsgruppe hatte bei 21 Freiwilligen die *MDR1*-Expression und Aktivität von P-gp in Biopsien aus dem Dünndarm und im Blut gemessen. Gleichzeitig wurde der *MDR1*-Genotyp von 188 Freiwilligen bestimmt, wobei 15 SNP beobachtet wurden (siehe Tabelle 55). Es ergab sich eine Frequenz von 48,3% für das heterozygote Allel C/T, 23,9% für das homozygote Allel T/T sowie 27,8% für das homozygote Allel C/C. Ein Vergleich der Ergebnisse der *MDR1*-Genotypisierung mit den entsprechenden P-gp Expressionsniveaus im Duodenum ergab eine Korrelation der P-gp Expression mit dem Polymorphismus C3435T im Exon 26. Das T-homozygote Allel wurde mit einer 2-fach niedrigeren P-gp-Expression und mit höheren Digoxin-Plasmaspiegeln nach oraler Gabe des Digitalisglykosids assoziiert, verglichen mit Proben von C-homozygoten Individuen (Wildtyp). Der heterozygote C/T-Genotyp führte zu einer P-gp Expression, die quantitativ zwischen der der beiden homozygoten Allele einzuordnen war. Die Korrelation des *MDR1*-Genotyps und der P-gp Aktivität hatte laut Hoffmeyer et al. eine Signifikanz von $p=0.056$.

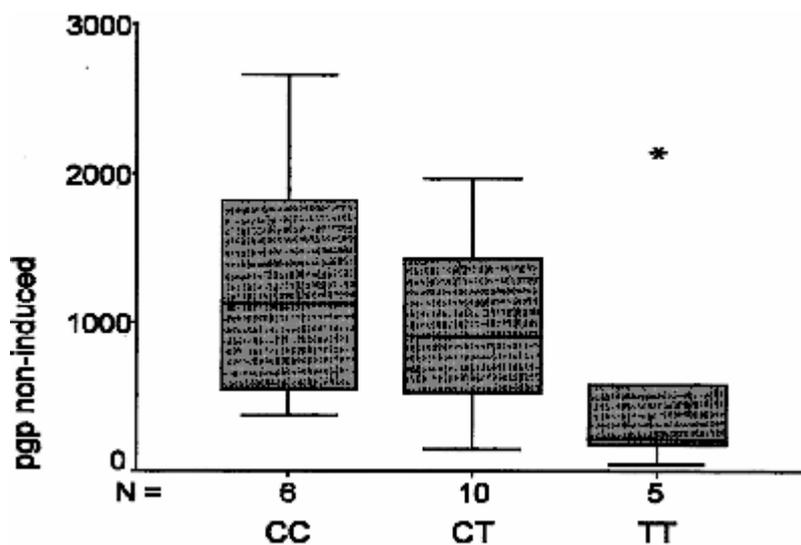


Abbildung 14: Korrelation des C3435T-Polymorphismus in Exon 26 des *MDR1*-Gens mit der P-gp Expression im menschlichen Dünndarm. Der *MDR1*-Phänotyp der 21 Freiwilligen wurde durch Western Blot Analysen ermittelt. (Hoffmeyer et al., 2000)

Im Gegensatz dazu berichteten Nakamura et al. über eine nach ihren Untersuchungen nicht-signifikant erhöhte *MDR1*-mRNA in Dünndarmbiopsien japanischer gesunder Probanden mit dem Genotyp T/T an Position 3435 im Vergleich zu den Untergruppen mit C/T oder C/C-Genotypen (Nakamura et al., 2002). Die bisher publizierten Arbeiten und ihre Ergebnisse über den Zusammenhang zwischen dem C3435T SNP und der Expression bzw. Funktion von P-gp im gesunden Gewebe sollen im Folgenden übersichtlich dargestellt werden.

Tabelle 56: Zusammenhang zwischen dem C3435T Polymorphismus und der P-gp-Funktion im gesunden Gewebe

Herkunft des Materials	Ergebnis	Methode	Referenz
Dünndarm	CC>CT>TT (n = 21, p = 0.056)	Western Blot Kaukasische Population	Hoffmeyer et al., 2000
Dünndarm	CC<CT<TT (n = 13 Individuen, insges. 51 Biopsien; nicht signifikant)	Taqman RT-PCR, Japanische Population	Nakamura et al., 2002
Dünndarm	CT>CC>TT (n = 32, nicht signifikant)	RT-PCR, Kaukasische Population	Siegmund et al., 2002
Dünndarm	CC<CT<TT (n = 13, nicht signi- fikant, p = 0.154)	RT-PCR, Japanische Population	Moriya et al., 2002

Plazenta	CC>CT>TT (n = 100, nicht signifikant)	Western Blot	Tanabe et al., 2001
Mononukleäre Zellen im peripheren Blut	CC>CT>TT (n = 31, signifikant, p<0.05)	Taqman RT-PCR /Rhodamin 123 Ausstrom	Hitzl et al., 2001
Mononukleäre Zellen im peripheren Blut	CC>CT>TT (n = 59, p = 0.02)	RT-PCR und FACS bei HIV1 -Infizierten	Fellay et al., 2002

Die Frequenz des C3435T Polymorphismus hängt in einem signifikanten Ausmaß von der ethnischen Zugehörigkeit der untersuchten Population ab. Unterschiede von Genotyp- und Allelfrequenz sind vor allem zwischen afrikanischen und kaukasischen/asiatischen Populationen zu verzeichnen, wobei unter Schwarzafrikanern die Frequenz des C-Allels höher als unter Europäern und Asiaten ist ($P < 0,0001$) (Ameyaw et al., 2001). Tabelle 53 fasst die zurzeit publizierten Daten zusammen.

Tabelle 57: Der *MDRI* C3435T-Polymorphismus in Abhängigkeit von der ethnischen Zugehörigkeit in %

Population	n	Frequenz C-Allel	Frequenz T-Allel	Genotyp CC	Genotyp CT	Genotyp TT	Referenz
Kaukasier, Deutschland	188	52	48	28	48	24	Hoffmeyer et al., 2000
Kaukasier, Deutschland	461	46	54	21	51	29	Cascorbi et al., 2001
Kaukasier, Deutschland	67	49	51	23,9	50,7	25,4	Siegmund et al., 2002
Kaukasier, Briten	190	48	52	keine Daten	keine Daten	keine Daten	Ameyaw et al., 2001
Kaukasier, USA	37	46	54	22	42	36	Kim et al., 2001
Portugiesen	100	43	57	22	42	36	Ameyaw et al., 2001
Spanier	408	52	48	26	22	52	Bernal et al., 2003
Polen	122	62	38	42	41	17	Jamroziak et al., 2002
Polen	175	60	40	40	41	19	Jamroziak et al., 2004
Russen	290	45,7	54,3	21,4	48,6	30	Gaikovitch et al., 2003
Japaner	50	57	43	34	46	20	Schaeffeler et al., 2001
Südwest- Asiaten	89	34	66	15	38	47	Ameyaw et al., 2001
Chinesen	132	53	47	32	42	26	Ameyaw et al., 2001
Chinesen	98	46	54	25	43	32	Balram et al., 2003

Filipinos	60	59	41	38	42	20	Ameyaw et al., 2001
Malaysier	99	48	52	25	47	28	Balram et al., 2003
Inder	93	38	62	18	39	43	Balram et al., 2003
Ägypter	200	60	40	keine Daten	keine Daten	keine Daten	Hamdy et al., 2003
Saudi-Araber	96	55	45	37	38	26	Ameyaw et al., 2001
Ghanesen	203	83	17	67	34	0	Ameyaw et al., 2001
Ghanesen	172	90	10	83	16	2	Schaeffeler et al., 2001
Kenyaner	80	83	17	70	26	4	Ameyaw et al.,
Sudanesen	51	73	27	52	43	6	Ameyaw et al., 2001
Schwarze Amerikaner	88	84	16	68	31	1	Ameyaw et al., 2001
Schwarze Amerikaner	41	78	22	61	34	5	Schaeffeler et al., 2001
Schwarze Amerikaner	23	74	26	keine Daten	keine Daten	keine Daten	Kim et al., 2001

Cascorbi et al. untersuchten in ihrer 2001 publizierte Studie 461 deutsche weiße Freiwillige mit Hilfe von PCR und RFLP auf Polymorphismen im *MDR1*-Gen. Von den 11 untersuchten Polymorphismen beobachteten die Autoren bei dem C3435T Polymorphismus die höchsten Frequenzen mit 53.9% für T- Allel und 46.1% für das C-Allel. Die Genotyp-Frequenzen des Polymorphismus betragen 20.8% für C/C, 50.5% für C/T sowie 28.6% für T/T (Cascorbi et al., 2001).

Es ist wenig über die Bedeutung des C3435T Polymorphismus für das Ergebnis einer Therapie mit P-gp Substraten bekannt. Fellay et al. beschrieben ein signifikant besseres Ansprechen der antiretroviralen Therapie bei HIV-Infizierten mit T/T-Genotyp im Vergleich zu Patienten mit C/T oder C/C-Genotyp. Dabei wies die CD4⁺- Zellzahl bei Individuen mit dem T/T-Genotyp 6 Monate nach Beginn einer antiretroviralen Therapie einen deutlich höheren Anstieg auf als bei vergleichbaren Patienten mit dem C-Allel (Fellay et al., 2002). Eine mögliche Erklärung für diesen Vorteil ist der verstärkte Eintritt von Proteaseinhibitoren in Leukozytenpopulationen, die für eine Infektion mit HIV empfindlich sind, d.h. in Lymphozyten sowie ins ZNS und Hodengewebe (Choo et al., 2000). Jamroziak et al. publizierten 2004 die Ergebnisse einer Untersuchung von 113 Kindern mit ALL sowie von 175 gesunden Polen kaukasischer Herkunft hinsichtlich ihres C3435T-Genotyps. Die Arbeitsgruppe fand eine signifikante Assoziation des Genotyps T/T mit dem Vorkommen von ALL (P=0.037). Individuen mit T/T Genotyp haben laut Jamroziak et al. ein höheres Risiko

an ALL zu erkranken. Unter den ALL-Patienten hatten diejenigen mit C/C Genotyp eine geringere Wahrscheinlichkeit für ein ereignisfreies Überleben ($P=0.007$) und für ein Gesamtüberleben ($P=0.006$) (Jamroziak et al., 2004).

Dhooge et al. fanden in einer 1999 publizierten 6-jährigen prospektiven Studie einen signifikanten Unterschied in der P-gp-Expressionsrate bei Kindern mit ALL-Ersterkrankungen (14%) im Vergleich zum ALL-Rezidiv (34%). Die Studie enthielt 102 Patienten mit neu diagnostizierter ALL sowie 35 Patienten mit ALL-Rezidiv und zeigte ein deutlich höheres Rezidivrisiko für Patienten mit P-gp positiver ALL-Ersterkrankung im Vergleich zu Patienten mit P-gp-negativer ALL. Dieser Zusammenhang war unabhängig von Alter, Leukozytenzahl und Karyotyp der Patienten zu beobachten, so dass das P-gp als unabhängiger prognostischer Faktor für das Rezidivrisiko bei ALL-Ersterkrankungen interpretiert wurde (Dhooge et al, 1999).

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Goasguen et al. bei der Untersuchung der P-gp-Expression von 59 ALL-Ersterkrankungen, davon 36 Kinder und 23 Erwachsene. In der pädiatrischen Gruppe fand sich eine Rezidivrate von 73% bei den P-gp-positiven Patienten im Vergleich zu 32% bei den P-gp-negativen Patienten. Die Überlebensraten (Berechnung nach Kaplan-Meier Methode) waren bezogen auf die Gesamtgruppe der untersuchten Patienten ($n=59$) signifikant höher für die MDR-negativen Individuen im Vergleich zu der MDR-positiven Personen ($p=0.002$). In der Gruppe der pädiatrischen Patienten ($n=36$) waren die Überlebensraten ebenfalls signifikant höher in der Gruppe der MDR-negativen im Vergleich zu MDR-positiven Kinder ($p=0.05$). Die EFS-Kurven sahen für Patienten ohne P-gp Expression entsprechend günstiger aus als für P-gp positive Patienten (Goasguen et al., 1993). Eine 1996 publizierte Studie von Ivy et al. fand ebenfalls einen statistisch signifikanten Anstieg der P-gp Funktion in Knochenmarkproben einer Gruppe von Kindern mit ALL- oder AML-Rezidiv im Vergleich zu der jeweiligen Ersterkrankung ($P=0.004$). Die P-gp Funktion war mit Hilfe des Rhodamin123-Ausstroms in Gegenwart von Verapamil als P-gp Modulator gemessen worden. Die Studie zeigte auch einen trendmäßigen Anstieg der P-gp-Expression beim Rezidiv im Vergleich zur Ersterkrankung ($P= 0.097$) (Ivy et al., 1996). Stanulla et al. zeigten in einer Fall-Kontroll-Studie, dass das Risiko, ein ZNS-Rezidiv zu bekommen bei Kindern mit ALL, die den *MDR1*-Genotyp 3435 T/T oder C/T besitzen, im Vergleich zu Patienten mit dem Genotyp C/C signifikant erniedrigt war (OR 0.14; $P<0.05$) (Stanulla et al., 2001). Wie schon im Falle der oben beschriebenen besseren Prognose bei HIV-Patienten mit T/T-Genotyp, liegt die Erklärung wahrscheinlich darin, dass die T/T und C/T-Genotypen mit einer geringeren P-gp Expression in den Endothelzellen, die die Blut-Hirn-Schranke bilden,

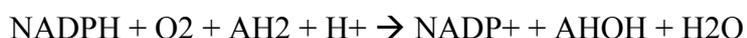
assoziiert sind. Bei diesen Patienten kommt es zu einer erhöhten Permeabilität der Chemotherapeutika ins ZNS und damit zu einem geringeren ZNS-Rezidivrisiko der ALL.

Bei der AML ist der *MDR1* 3435 C/C-Genotyp mit einer signifikant niedrigeren *MDR1*-Expression in den Myeloblasten assoziiert. Illmer et al. untersuchten 405 Patienten mit neu diagnostizierter AML. Dabei hatten Patienten mit 3435 C/C- Genotyp eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit, zytogenetisch eine Hochrisikokonstellation vorzuweisen. ($p < 0.05$). Der Genotyp 3435 C/C, nicht jedoch die *MDR1*-Expressionsrate, war in einem signifikanten Maße mit einem verminderten Langzeitüberleben assoziiert ($p < 0.01$). Bei diesen Patienten sei, nach Meinung der Autoren, die schlechtere Langzeitprognose durch das signifikant höhere Rezidivrisiko ($p < 0.001$) zu erklären (Illmer et al., 2002).

5.3. Cytochrom P 450 2C18

5.3.1. Familie der Cytochrome P450

Die Cytochrome P450 bilden eine Gen-Superfamilie, die CYPs, die beim Menschen mehr als 40 verschiedene Proteine enthält. Es handelt sich um intrazelluläre, beim Eukaryoten membrangebundene Hämproteine, die je 500 Aminosäuren mit einem Eisen-Protoporphyrin IX als prosthetische Gruppe enthalten. Der Name P 450 kommt von der unter Hämproteinen einzigartigen Eigenschaft dieser Pigmente, bei der Spektrophotometrie ein Absorptionsband auszubilden, dessen Maximum bei 450 nm erscheint (Klingenberg, 1958). Im Gegensatz zu anderen Hämproteinen besitzen die CYPs eine Thiolgruppe, die als Ligand für das Häm-Eisen dient. Die Rolle der Thiolgruppe als Ligand verändert die Elektronendichte im Porphyrinring des Häms und bildet ein Zentrum für die Aktivierung von molekularem Sauerstoff. Das Aminoende des jeweiligen Cytochroms ist reich an hydrophoben Aminosäuren und dient dazu, das Protein an Biomembranen zu binden. Diese Oxygenasen katalysieren biochemische Reaktionen vom Typ:



Als Katalysatoren wirken sie unter anderem bei der:

- a) Bildung von Gluko-, Mineralokortikoiden, Androgenen und Östrogenen aus Cholesterin,
- b) Metabolisierung von Cholesterin zu Gallensäuren,
- c) Synthese von Prostaglandinen und ungesättigten Fettsäuren, Oxidierung von ungesättigten Fettsäuren zu intrazellulären Botenstoffen,
- d) Konversion von fettlöslichen Vitaminen in ihre aktive Form,

e) Metabolisierung von Xenobiotika/ Medikamenten mit.

Im Jahr 1987 schlugen Nebert et al. eine Nomenklatur für die Superfamilie der CYP-Gene vor. Die CYPs werden in Familien und Subfamilien eingeteilt, wobei Mitglieder einer Subfamilie maximal 60% Sequenzähnlichkeit mit Mitgliedern anderer Subfamilien haben dürfen (Nebert et al., 1987). Auf diese Weise wurden 16 CYP-Familien definiert, wobei jede Familie durch die jeweilige Zahl nach der Bezeichnung CYP P450 gekennzeichnet ist. Jede Familie umfasst eine unterschiedliche Anzahl an Subfamilien, die jeweils mit Großbuchstaben gekennzeichnet werden (s. Tabelle 58).

Tabelle 58: Familien der Cytochrome P450

Familie	Subfamilien	Wichtigste Funktionen/ Substrate
CYP 1	A, B	Polyzyklische Kohlenwasserstoffe, Nitrosamine
CYP 2	A-H	Steroide, Xenobiotika, Alkohol
CYP 3	A	Medikamente, Antibiotika, Flavonoide
CYP 4		Oxidation von Fettsäuren
CYP 5		Synthese der Thromboxane
CYP 7	A	7-Alpha-Hydroxylierung, Gallensäuren
CYP 8	A, B	Prostazyklin-Synthese, Gallensäuren
CYP 11	A, B	Spaltung von Cholesterin-Seitenketten, Aldosteronsynthese
CYP 17		Steroid 17-Alpha-Hydroxylase, Steroid C17/21 Lyase
CYP 19		Östrogenbiosynthese, Aromatase
CYP 21		Progesteron 21-Hydroxylase
CYP 24		Vitamin D Metabolismus
CYP 26		Hydroxylase im Vitamin A-Metabolismus
CYP 27		Gallensäurensynthese
CYP 40		Vitamin D3- 1-Alpha- Hydroxylase
CYP 51		Cholesterinbiosynthese, 14- Demethylase

Die meisten CYP P450 des Menschen gehören zu den Familien CYP 1-4, wobei die Familie CYP2 acht Subfamilien enthält. CYP P450 sind in allen Organen enthalten, der P450-Typ ist jedoch oft organspezifisch. Besondere Bedeutung für die Biotransformation haben die hepatischen CYPs, die zu den Familien CYP 1-3 gehören. Die Cytochrome der 2C-Gruppe haben in der Leber einen Anteil von 20% der gesamten CYP-Enzyme (Shimada et al., 1994). In den meisten Fällen wird ein bestimmtes Medikament von mehreren CYPs metabolisiert. Wird ein Xenobiotikum in besonders hohem Maße von einem einzigen Cytochrom bioaktiviert, hat die Induktion oder Inhibition dieses Enzyms einen großen Einfluss auf die

Therapie. Die Induktion der meisten CYPs findet auf der Ebene der Gentranskription statt (Ibeanu und Goldstein, 1995).

Wie bereits in Abschnitt 1.4.1. erwähnt, unterscheidet man Schnellmetabolisierer (rapid metabolizers = RM) und Langsammetabolisierer (slow metabolizers = SM) (Meyer, 1994). Diese unterschiedliche Metabolisierungsleistung der Organismen wird häufig auf die Höhe der CYP-Expression in Darm und Leber zurückgeführt. Der Einfluss von Ernährungsgewohnheiten, die Einnahme von bestimmten Medikamenten, die als Induktoren oder Inhibitoren wirken, sowie Rauchen und Alkoholkonsum können zu einem veränderten Expressionsniveau der Cytochrome führen. Die CYP-Expression wird von Transkriptionsfaktoren reguliert, die unter anderem durch die Exposition von verschiedenen Chemikalien aktiviert werden. Das Vorhandensein von Polymorphismen einzelner CYPs mit veränderter Katalysatoraktivität wurde als Grundlage für interindividuelle Unterschiede in der Metabolisierung von Medikamenten identifiziert. In diesem Zusammenhang sind besonders die Isoformen, die mögliche Resistenzmechanismen darstellen, von Interesse. Solche Polymorphismen wurden beispielsweise für CYP2D6 (Evans et al., 1993; Jurima-Romet et al., 1998) und CYP2C19 (Kupfer und Preisig, 1984; Wilkinson et al., 1989) beschrieben, aber auch für CYP1A1 (Hayashi et al., 1991), CYP1A2 (Butler et al., 1992), CYP2A6 (Cholerton et al., 1992), CYP2C9 (Stubbins et al., 1996) und CYP2E1 (Hu et al., 1997).

Die meisten Medikamente sind lipophile Substanzen und benötigen eine Biotransformation, bevor sie vom Körper eliminiert werden können. Ohne metabolische Oxidation und Konjugation verlief die Medikamentenclearance viel langsamer, was zur Anreicherung und Toxizität führen würde. Die Cytochrome P450 haben eine Kernrolle bei der Konversion lipophiler Substanzen zu polaren Produkten vor der Elimination. Ebenso benötigen manche Medikamente, die als Prodrugs, d.h. in einer biologisch noch inaktiven Form, verabreicht werden, eine Biotransformation um aktiviert zu werden. Beispiele hierfür sind die Alkylanzien Cyclophosphamid und Ifosfamid.

5.3.2. Die Cytochrome P450 und maligne Erkrankungen

Die Cytochrome P450 können aufgrund ihrer breiten Substratspezifität in vielerlei Hinsicht bei der Entstehung aber auch bei der Behandlung von Krebserkrankungen von Bedeutung sein. Die meisten chemischen Karzinogene – exogene, d.h. Xenobiotika, wie auch endogene, z.B. Steroidhormone - müssen durch Biotransformation aktiviert werden, bevor sie ihre karzinogene Wirkung entfalten können. Beispiele sind die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe, das Aflatoxin B₁, das 17-Beta-Östradiol (Guengerich 1990, 1991; Nedelcheva und Gut, 1994; Kelly et al., 1997).

Angesichts der Rolle der Cytochrome bei der Bioaktivierung prokarzinogener Xenobiotika und endogener Hormone zu karzinogenen Formen, ist die Frage interessant, ob bestimmte CYP-Varianten eine gewisse Disposition für die Exposition mit karzinogenen Stoffen verleihen, und damit das Risiko, an Krebs zu erkranken, erhöhen. Dieser Zusammenhang wurde für verschiedene CYP-Enzyme in mehreren Fall-Kontroll-Studien untersucht. Dabei wurden Hinweise auf Assoziationen zwischen einzelnen Polymorphismen und Krebserkrankungen gefunden, die genaue zeitliche und kausale Beziehung zwischen Xenobiotikaexposition, Cytochrom-Polymorphismen und Krankheit konnte jedoch noch nicht geklärt werden. Beispiele dafür sind der Zusammenhang zwischen Polymorphismus T6235C im *CYP1A1*-Gen und Bronchialkarzinomen (Kawajiri et al., 1990; 1993) oder einem Polymorphismus im Enzym *CYP2D6* und hepatozellulären Karzinomen (Agundez et al., 1996). Über die von Cytochromen P450 katalysierten Mechanismen der Verstoffwechslung von Zytostatika beim Menschen ist bislang nur wenig bekannt. Die Alkylanzien Cyclophosphamid und Ifosfamid sind Prodrugs und benötigen eine Biotransformation, um zytotoxisch aktiv zu werden. In der Leber erfolgt die Hydroxylierung von Cyclophosphamid zu 4-Hydroxy-Cyclophosphamid, das mit einer ringoffenen Form, dem Aldophosphamid, im Gleichgewicht steht. Aus diesem entsteht nichtenzymatisch unter Abspaltung von Acrolein die am stärksten alkylierende Verbindung, das N,N-Bis(2-chlorethyl)-phosphorsäurediamid. In ähnlicher Weise wird auch Ifosfamid bioaktiviert. Die einzelnen Metabolisierungsschritte sind im Folgenden schematisch dargestellt:

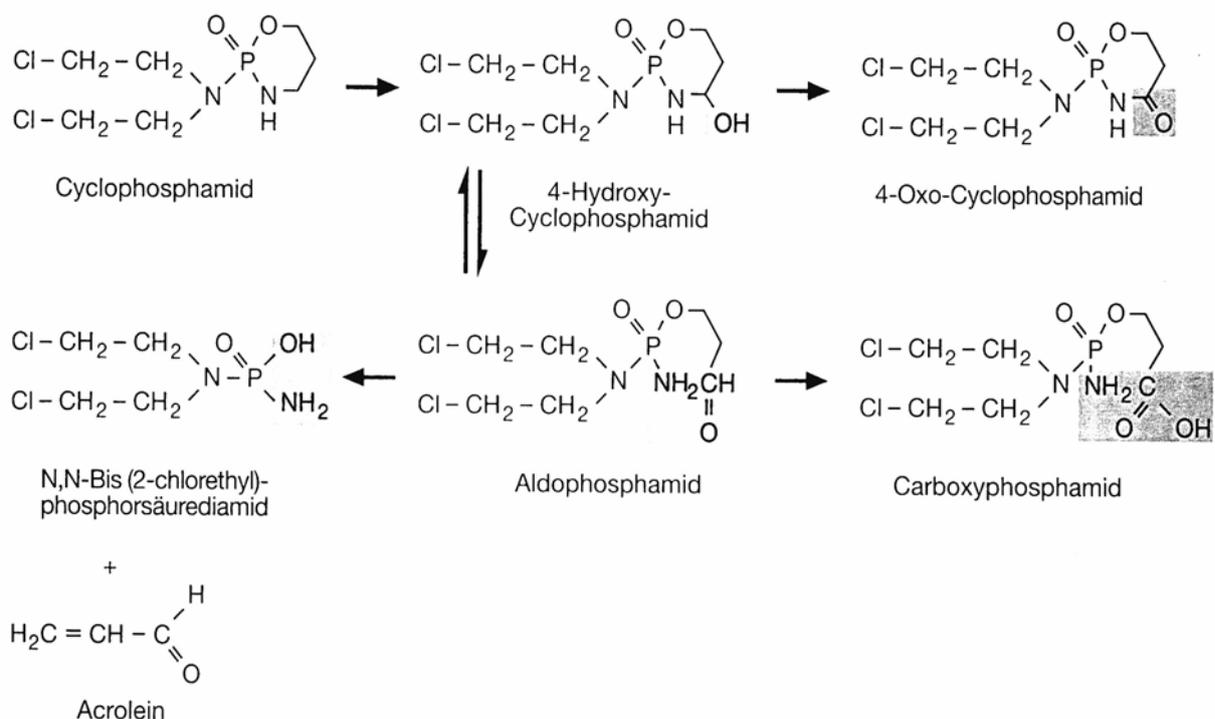


Abbildung 15: Biotransformation von Cyclophosphamid

Anfangs wurde davon ausgegangen, dass CYP2B6 für Cyclophosphamid und CYP3A4 für Ifosfamid das jeweils wichtigste Enzym bei der Bioaktivierung ist (Chang et al., 1993; Code et al., 1997). Andere Autoren sprachen hingegen von einer Hauptrolle von CYP3A4 bei der 4-Hydroxylierung von Cyclophosphamid (Bohnenstengel et al., 1996). CYP3A4 katalysiert ebenfalls die N-Dechloroethylierung von Ifosfamid, den entscheidenden Schritt bei der Inaktivierung des Chemotherapeutikums (Walker et al., 1994). Genauere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass die Cytochrome CYP2B6 und CYP3A4 relativ niedrige Affinitäten für Cyclophosphamid und Ifosfamid besitzen, wodurch die pharmakologische Relevanz dieser biochemischen Reaktionen in Frage gestellt ist.

Die vier Mitglieder der Subfamilie CYP2C (CYP2C8, 2C9, 2C18 sowie 2C19) spielen bei der Bioaktivierung der beiden Alkylanzien ebenfalls eine wichtige Rolle. Chang et al. zeigten in enzymkinetischen Analysen der 4-Hydroxylierung von Cyclophosphamid und Ifosfamid, dass CYP2C19 die höchste apparente Affinität für Cyclophosphamid, gefolgt von CYP2C9, hat, während für Ifosfamid ebenfalls CYP2C19 die höchste Affinität aufzeigt, gefolgt von CYP2C18 (Chang et al., 1997). Dabei hat CYP2C18 jedoch die höchste in vitro katalytische Effizienz, d.h. V_{\max}/K_m sowohl für Cyclophosphamid als auch für Ifosfamid (siehe Abbildung 15C, siehe Fußnote Seite 79) (Chang et al., 1997).

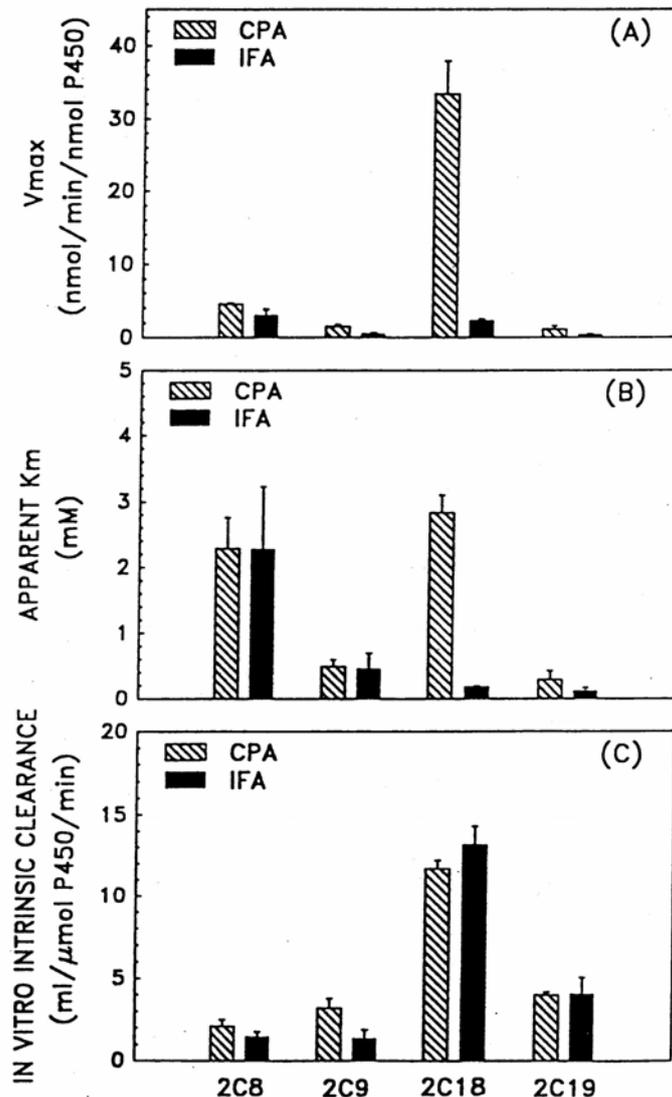


Abbildung 16: Analyse der Enzymkinetik der Cyclophosphamid-4-Hydroxylierung (CPA) und Ifosfamid 4-Hydroxylierung (IFA) mit CYP2C8, 2C9, 2C18 und 2C19 als Katalysatoren. (Chang et al., 1997)

5.3.3. Das Cytochrom 2C18

Das CYP2C18 ist ein noch wenig bekanntes Mitglied der bei der Metabolisierung von Xenobiotika wichtigen Subfamilie CYP2C. Erwartungsgemäß konnte die mRNA-Expression von CYP2C18 in der Leber nachgewiesen werden (Furuya et al., 1991; Richardson et al., 1997; Nishimura et al., 2003), wobei große interindividuelle Unterschiede der mRNA Mengen zu verzeichnen waren. Nishimura et al. bestätigten die *CYP2C18*-Expression im Lebergewebe in einer japanischen Population (Nishimura et al., 2003). In der Haut wird *CYP2C18* stark exprimiert (Zaphiropoulos et al., 1997; Yengi et al., 2003) Die Bedeutung der hohen CYP2C18-Expression in der Epidermis ist noch unklar. *CYP2C18*-mRNA wurde ebenfalls im Gehirn, Uterus, in der Mamma, in der Niere, in der Lunge sowie im Duodenum

gefunden (Klose et al., 1999). Wichtig ist, dass eine *CYP2C18*-Expression in malignen Geweben nachgewiesen werden konnte. Roy et al. berichteten über die *CYP2C18*-Expression in einer B-lymphoblastoiden Zelllinie (Roy et al., 1999).

Die Bestimmung des *CYP2C18*-Anteils am Medikamentenmetabolismus der Leber gestaltet sich zurzeit als schwierig, da noch keine enzymspezifischen Inhibitoren bekannt sind, die zur Differenzierung von *CYP2C18* von anderen Cytochromen eingesetzt werden könnten. Der *CYP2C18*-Proteingehalt in der menschlichen Leber konnte noch nicht genau bestimmt werden, da die Cytochrome *CYP2C18* und *CYP2C19* ähnliche elektrophoretische Mobilitäten aufzeigen (Goldstein et al., 1994; Chang et al., 1997) und mit immunochemischen Methoden nicht voneinander getrennt werden können (Chang et al., 1997).

5.3.4. Das *CYP2C18*-Gen

Die Proteine der vier Mitglieder der Subfamilie 2C werden durch ein Gencluster auf dem humanen Chromosom 10, in Region 10q24.2, kodiert und besitzen untereinander eine hohe Sequenzhomologie (Goldstein und de Morais, 1994; Gray et al., 1995). Furuya et al. beschrieben drei Polymorphismen des *CYP2C18*-Gens, wobei es sich bei einem davon interessanterweise um die Deletion eines einzelnen Nukleotids handelt (C an Position 1413), die zu einer Leserasterverschiebung mit Veränderung der gesamten folgenden Aminosäuresequenz führt (siehe Tabelle 56) (Furuya et al., 1991). Tsuneoka et al. fanden einen weiteren Polymorphismus in der 5'-Flankenregion des *CYP2C18*-Gens, für den sie bei 56 untersuchten gesunden Freiwilligen eine Allelfrequenz von 21.4% bestimmen konnten (Tsuneoka et al., 1996). Komai et al. identifizierten einen SNP im Exon 2, der zu einem Wechsel in der Aminosäuresequenz an Position 68 von Tyr zu einem TAA-Stop Codon führte. Diese Variante ergibt ein aus 67 Aminosäuren bestehendes *CYP2C18*-Protein ohne Hämbindungsregion (Komai et al., 1996). Zhu-Ge et al. identifizierten einen *CYP2C18*-Klon, bei dem Exon 5 fehlte (Zhu-Ge et al., 2002). Zaphiropoulos et al. berichteten von *CYP2C18*-Transkripten in der Epidermis, bei denen sogar mehrere Exons fehlten (Zaphiropoulos et al., 1997). Zur besseren Übersicht ist in Tabelle 59 eine Zusammenfassung aller Splice-Varianten und Isoformen des *CYP2C18*-Proteins mit ihren jeweiligen Besonderheiten dargestellt:

Tabelle 59: Polymorphismen und Splice-Varianten des *CYP2C18*-Gens

Lokalisation	Aminosäuren-sequenz	Besonderheit	Referenz
Exon 8 Position 1154, T zu C	Met ³⁸⁵ zu Thr ³⁸⁵	Funktionell unterschiedliche Phänotypen	Romkes et al., 1991 Kaminsky et al., 1993 Goldstein et al., 1994
Exon 5 Position 655, T zu C	Phe ²¹⁹ zu Leu ²¹⁹		Furuya et al., 1991
Exon 9 Position 1413 C-Deletion	ab Aminosäure 472 gänzlich veränderte Sequenz	Rasterverschiebung	Furuya et al., 1991
Exon 1 Positionen 5-6 TA statt AT	Asp ² zu Val ²		Furuya et al., 1991
5'-Flankenregion Position -460 A zu T		Allelfrequenz 21,4% in japan. Population, Koppelung an Polymorphismus 2C19 _{ml}	Tsuneoka et al., 1996 Kubota et al., 1998 Mamiya et al., 1998 Inoue et al., 1998 Mizugaki et al., 2000
Exon 2 Position 204 T zu A	Tyr ⁶⁸ zu TAA-Stop Codon	nicht-funktionales Protein von nur 67 Aminosäuren Länge	Komai et al., 1996 Kubota et al., 1998 Mamiya et al., 1998 Mizugaki et al., 2000
fehlendes Exon 5			Zhu-Ge et al., 2002 Zaphiropoulos et al., 1997
fehlendes Exon 4 oder Exons 4 bis 6 oder Exons 4 bis 7		Transkripte in Epidermis identifiziert	Zaphiropoulos et al., 1997

5.3.5. Der T1154C Polymorphismus

Die Erstbeschreiber dieses Polymorphismus, Romkes et al., berichteten zusätzlich zu der Punktmutation an Position 1154 auch über Unterschiede in den nicht-kodierenden Sequenzen zwischen den zwei Varianten Met³⁸⁵ und Thr³⁸⁵. Der Klon, der dem Threonin- Allel entspricht – von Romkes et al. 29c genannt – hat eine sehr lange 5'-nichtkodierende Sequenz von 198 bp und ein poly-adenylation-Signal 21 Basen vom poly(A) Ende entfernt (Romkes et al., 1991). Das Methionin-Allel hatte laut der gleichen Arbeit eine ungewöhnlich lange 3'-nichtkodierende Region, die drei mögliche poly-adenylation-Signale enthielt. Dieser so genannte Klon 6b besaß nicht das bei Klon 29c beobachtete poly-adenylation-Signal an der gleichen Position (Romkes et al., 1991). Die beiden Allel-Varianten zeigen unterschiedliche

Aktivitäten. Während das CYP2C18-Thr³⁸⁵-Allel aktivere Tolbutamid-Hydroxylase darstellt als das Met³⁸⁵-Allel (Goldstein et al., 1994; Romkes et al., 1993), ist die Warfarin-Metabolisierungsrate des Met³⁸⁵-Allels im Vergleich zum Thr³⁸⁵-Allel signifikant höher (Kaminsky et al., 1993).

Wie bereits in Abschnitt 1.4.3. erwähnt, wurden für die 4-Hydroxylierung von Cyclophosphamid eine höhere V_{\max} und eine höhere apparente K_m (Michaelis-Konstante) für die CYP2C18-Thr³⁸⁵ Variante als für CYP2C18-Met³⁸⁵ gefunden. Bei der Metabolisierung von Ifosfamid zeigte CYP2C18-Thr³⁸⁵ eine bedeutend niedrigere K_m als das Met³⁸⁵-Allel woraus eine 6mal höhere katalytische Aktivität der Thr-Variante resultiert.¹ Die Variante CYP2C18-Met³⁸⁵ hat also eine höhere Affinität für Cyclophosphamid als die CYP2C18-Thr³⁸⁵-Variante, während letztgenannte Form eine höhere Affinität für Ifosfamid besitzt (Chang et al., 1997). Abbildung 17 stellt die geschilderten Zusammenhänge in schematischer Form dar:

¹ V_{\max} bedeutet die Maximalgeschwindigkeit einer katalysierten Reaktion, die bei hohen Substratkonzentrationen auftritt, wenn das Enzym vollständig mit Substrat gesättigt ist. K_m bezeichnet hingegen die Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Hälfte ihres Maximalwertes liegt und ist damit ein Maß für die Affinität des Enzyms zu seinem Substrat.

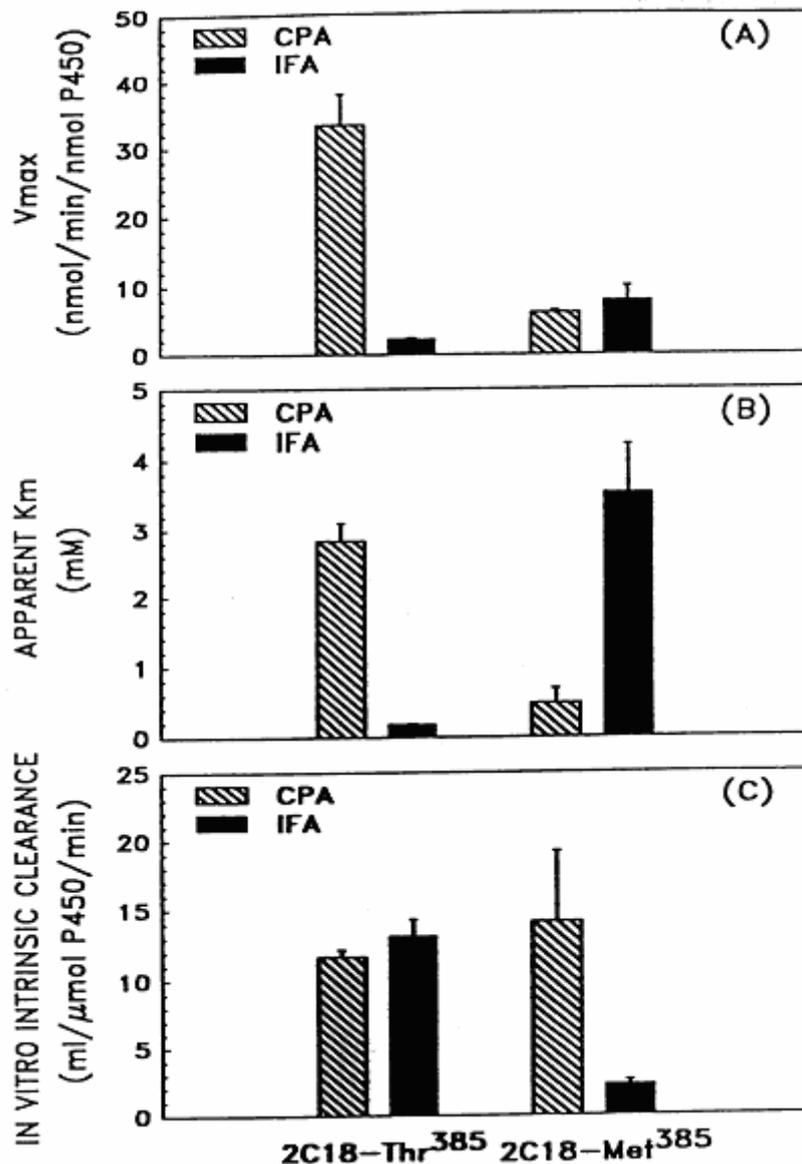


Abbildung 17: Vergleich der 4-Hydroxylierung von Cyclophosphamid und Ifosfamid durch *CYP2C18*^{Thr385} und *CYP2C18*^{Met385} (Chang et al., 1997)

Gotoh bestimmte die Substrate Recognition Sites (SRS) der CYP2-Familie, d.h. die Bereiche des Enzyms, die für die Substraterkennung verantwortlich sind. Nach seinen Ergebnissen fällt die Lokalisation des Polymorphismus an Position 385 des CYP2C18-Proteins nicht in eine SRS (Gotoh, 1992). Da jedoch von mehreren Autoren Unterschiede in der Oxidationsaktivität der beiden Allele festgestellt wurden, wird trotz der Ergebnisse der Arbeit von Gotoh davon ausgegangen, dass die Aminosäurenposition 385 eine Rolle für die Aktivität des Enzyms spielt (Goldstein et al., 1994; Romkes et al., 1993; Chang et al., 1997).

Hinsichtlich der Frequenz der beiden Allele findet man bisher in der Literatur keine genauen Angaben, diese wurde nur für geringe Probanden-Zahlen untersucht. Goldstein et al. sequenzierten die cDNA von fünf Kaukasiern und erhielten Hinweise dafür, dass das Thr385

Allel mit einer höheren Frequenz (70%) vorkommt als das Met385 Allel (30%) (Goldstein et al., 1994).

5.4. Ergebnisse

5.4.1. Der *MDR1* C3435T Polymorphismus bei Gesunden und ALL-Ersterkrankungen

Wie in Abschnitt 4.1. beschrieben, wurde der *MDR1* Polymorphismus C3435T bei 78 Gesunden und 98 Kindern mit ALL-Ersterkrankung zur Bestimmung der Frequenz in der jeweiligen Population untersucht. Für den C3435T Polymorphismus sind Daten mehrerer Autoren publiziert, welche ebenfalls die Frequenz des *MDR1*-Polymorphismus bei deutschstämmigen Kaukasiern untersucht haben. (siehe Abschnitt 2.1.3.) Zum Vergleich zeigt Abbildung 19 eine Gegenüberstellung unserer Ergebnisse mit den publizierten Daten von Hoffmeyer et al., 2000; Cascorbi et al., 2001 und Siegmund et al., 2002.

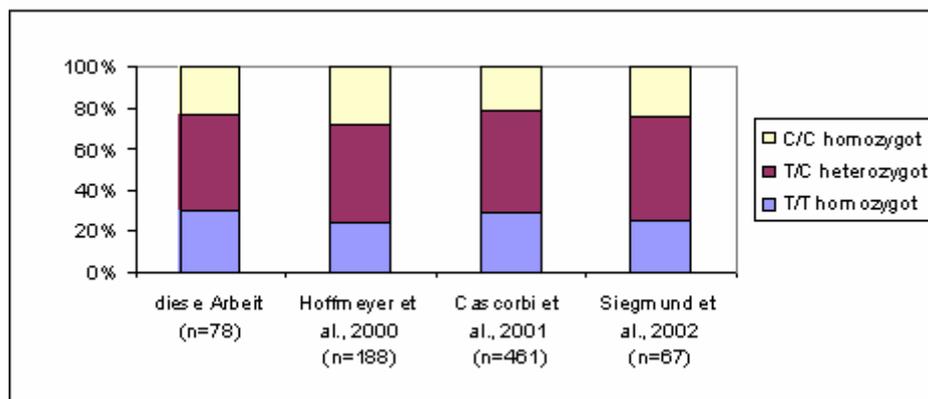


Abbildung 18: Frequenz des *MDR1* C3435T Polymorphismus bei Gesunden

Die 98 Kinder mit ALL-Ersterkrankung stellen das bisher größte pädiatrische Patientenkollektiv mit dieser Diagnose dar, das zur Bestimmung der Allelfrequenz des C3435T Polymorphismus analysiert wurde. Die 2003 publizierte Arbeit von Efferth et al. beschreibt eine laserspektrometrische Bestimmung der Genotypen von 20 T-ALL Zelllinien sowie 53 Patienten mit T-ALL und 7 Freiwilligen. Bei 9/53 Patienten (17.0%) wurde ein C/C Genotyp festgestellt, bei 27/53 Patienten (50.9%) ein C/T Genotyp, während die restlichen 17/53 an T-ALL erkrankten Individuen (32.0%) einen T/T Genotyp aufwiesen. Die Arbeitsgruppe untersuchte dann die mRNA Expression und konnte weder in den Zelllinien noch in den Blutproben der Patienten und gesunden Freiwilligen eine signifikante Korrelation zwischen dem C3435T-Genotyp und der mRNA Expression nachweisen. Der Polymorphismus zeigte laut Efferth et al. auch keinen Einfluss auf das Überleben der Patienten in der Kaplan-Meier Analyse (Efferth et al., 2003). Den von Efferth et al. beschriebenen fehlenden Einfluss des *MDR1* C3435T Genotyps auf das Überleben von

Patienten mit ALL-Ersterkrankung konnten wir in der vorliegenden Arbeit für die Gruppe der Kinder mit ALL-Rezidiv bestätigen (siehe Abbildung 8, Abschnitt 4.2.1.)

Nach einer von Hoffmeyer et al. publizierten Arbeit gibt es eine signifikante Korrelation zwischen P-gp-Aktivität und *MDR1*-Genotyp, wobei der 3435 T/T-Genotyp mit einer 2-fach niedrigeren P-gp-Expression im Vergleich zum 3435 C/C-Genotyp assoziiert ist (Hoffmeyer et al., 2000). Dies würde im Umkehrschluss, in Verbindung mit den Ergebnissen dieser Arbeit, bedeuten, dass das P-gp Expressionsniveau an sich keinen Einfluss auf das Überleben bei Kindern mit ALL-Erstrezidiv hat.

Die Arbeitsgruppe Wuchter et al. aus Berlin publizierte eine Arbeit, in der sie bei 121 Patienten mit neu diagnostizierter AML sowie 102 Kinder mit ALL-Neuerkrankung die P-gp Expressionsspiegel und die funktionelle Aktivität von P-gp bestimmt hatten. Die P-gp Aktivität wurde anschließend sowohl in der Gruppe der AML- als auch der ALL Patienten mit den immunphänotypischen Subgruppen, der Response auf die Induktionstherapie, der Rezidivrate und der Überlebensrate korreliert. Für die Gruppe der ALL-Patienten waren diese Korrelationen nicht signifikant. Während bei der AML die P-gp Expression einen signifikanten Einfluss auf das Langzeitüberleben der Patienten aufzeigte, war dies bei der ALL nicht der Fall (Wuchter et al., 2000).

Dazu im Gegensatz stehen die Ergebnisse einer 1999 publizierten 6-jährigen prospektiven Studie von Dhooge et al. Die Autoren fanden einen signifikanten Unterschied in der P-gp-Expressionsrate bei Kindern mit ALL-Ersterkrankungen (14%) im Vergleich zum ALL-Rezidiv (34%). Die Studie enthielt 102 Patienten mit neu diagnostizierter ALL sowie 35 Patienten mit ALL-Rezidiv und zeigte ein deutlich erhöhtes Rezidivrisiko für P-gp positive Patienten mit ALL-Ersterkrankung im Vergleich zu P-gp negativen Patienten mit der gleichen Diagnose. Dieser Zusammenhang sei laut Dhooge et al. unabhängig von Alter, Leukozytenzahl und Karyotyp der in die Studie eingeschlossenen Patienten zu beobachten gewesen, so dass man das P-gp als unabhängigen prognostischen Faktor für das Rezidivrisiko bei ALL-Ersterkrankungen interpretieren könne (Dhooge et al, 1999).

5.4.2. Der *MDR1* C3435T Polymorphismus bei ALL-Rezidiven

In der vorliegenden Arbeit wurde die bisher größte Zahl an Kindern mit ALL-Erstrezidiv hinsichtlich des *MDR1* C3435T Polymorphismus genotypisiert. Mit Hilfe einer in Abschnitt 3.1. detailliert beschriebenen Fall-Kontroll-Studie untersuchten wir den Einfluss des Polymorphismus auf das ereignisfreie Überleben, auf initiale Blockintervalle sowie auf die Toxizität vor und nach Chemotherapie. Es zeigte sich ein überraschend nicht signifikanter Einfluss der Genotypen auf das EFS. Eine mögliche Erklärung ist ein für die klinische

Signifikanz unzureichend hoher Expressionsspiegel von *MDR1* in den Leukämiezellen. Leider konnten die *MDR1*-mRNA- und Proteinspiegel bei den Patienten unserer Studie nicht untersucht werden, da bei den teilweise jahrelang tiefgefroren aufbewahrten Proben nicht von einer einwandfreien Qualität der mRNA ausgegangen werden kann, die vor allem für quantitative Bestimmungen zu fordern wäre. Unsere Ergebnisse ergaben ebenfalls keinen signifikanten Unterschied der Chemotherapie-Blocktyp-Verteilung in den einzelnen *MDR1*-Polymorphismusuntergruppen und auch keinen Einfluss des Polymorphismus auf die initialen Blockintervalle. Aus den Daten der bisher abgeschlossenen ALL-REZ BFM Studien ist ersichtlich, dass die Therapiedichte einen wesentlichen Parameter für den Erfolg der Rezidivbehandlung darstellt. Verlängerungen der therapiefreien Intervalle wurden deshalb nur bei vital bedrohlichen Komplikationen hingenommen. Fieber und eine notwendige antibiotische Behandlung stellen beispielsweise keinen hinreichenden Grund für eine Therapieverzögerung dar. Die initialen Blockintervalle sind somit ein Parameter für den klinischen Zustand des Patienten, wobei sie nur zwischen keinen oder leichten und sehr schweren Komplikationen zu unterscheiden vermögen, da nur im Falle schwerwiegender Komplikationen eine Verlängerung der therapiefreien Intervalle in Erwägung gezogen wurde. Bei der Toxizitätsanalyse wurde eine interessante Assoziation zwischen einzelnen Therapietoxizitätsparametern im Therapieverlauf und *MDR1*-Genotypen beobachtet, die vor Beginn der Chemotherapie nicht zu verzeichnen war. Eine Erklärung für diesen Sachverhalt ist die Natur des *MDR1*-Gens an sich, das sich gerade dadurch auszeichnet, dass sein Expressionsniveau nach einer Chemotherapie steigt. Insofern kann der nicht vorhandene Zusammenhang zwischen Toxizität vor Chemotherapiebeginn und *MDR1*-Genotypen mit einem zunächst zu niedrigem *MDR1*-Expressionsniveau erklärt werden. Während der nachfolgenden Chemotherapie, die als P-gp-Induktor wirkt (s. Abschnitt 5.2.1.), steigt die *MDR1*-Expression. Dadurch wird der Einfluss der 3435T/T, C/T und C/C-Genotypen auf die Therapietoxizität sichtbar. Es wurde gezeigt, dass die Therapietoxizität für den *MDR1* 3435C/C-Genotyp am niedrigsten war, gefolgt von dem C/T-Genotyp. Der Genotyp T/T war mit der höchsten Toxizität assoziiert.

Laut Hoffmeyer et al. hat das *MDR1* T-Allel eine deutlich niedrigere Expression, so dass in der Zelle weniger P-gp vorhanden ist, das weniger Chemotherapeutika nach extrazellulär befördern kann. Dadurch bleibt eine höhere Menge an Chemotherapeutika intrazellulär und verursacht auf diese Weise eine höhere Toxizität. Eine höhere Therapietoxizität für den T/T-Genotyp konnte für folgende Parameter festgestellt werden: Allgemeinbefinden,

Granulozytenzahl, Infektion, Fieber, Übelkeit, Diarrhoe, Hautveränderungen, Transaminasen und periphere Neurotoxizität.

Von den P-Glykoproteinsubstraten sind folgende Substanzen Teil der ALL-REZ BFM Protokolle und damit die mögliche Ursache für die höhere Toxizität in der T-Allel-Gruppe: Vincristin (Therapieblöcke F1, F2, R1) und Vindesin (Therapieblock R2), Daunorubicin (Therapieblock R2) und Dexamethason sowie Prednison (alle Therapieblöcke). Die Vinca-Alkaloide Vincristin und Vindesin haben die Neurotoxizität als spezifische Nebenwirkung, so dass die höhere periphere Neurotoxizität bei dem *MDR1*-3435T/T-Genotyp unter Umständen auf diese Substanzklasse zurückgeführt werden kann. Eine für Anthrazykline wie Daunorubicin spezifische therapielimitierende Nebenwirkung ist die akute Kardiotoxizität. Da diese jedoch im Rahmen der ALL-REZ BFM Studien nicht als Toxizitätsparameter erhoben wurde, kann hierzu im Zusammenhang mit der Fall-Kontroll-Studie keine Aussage getroffen werden. Toxizitätsparameter wie Allgemeinbefinden, Granulozytenzahl, Infektion, Übelkeit, Hautveränderungen und Transaminasen sind als Nebenwirkungen vieler Chemotherapeutika beschrieben und können nicht einer bestimmten Substanzklasse zugeordnet werden.

5.4.3. Der *CYP2C18* T1154C Polymorphismus bei Gesunden und ALL-Ersterkrankungen

Für den Polymorphismus *CYP2C18* T1154C waren bis zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit noch keine Daten hinsichtlich der Frequenz in einer gesunden Population publiziert. Goldstein et al. sequenzierten die cDNA von fünf Kaukasiern und bemerkten eine höhere Allelfrequenz des Thr385 Allels, d.h. des 1154C/C-Genotyps (Goldstein et al., 1994). In dieser Arbeit wurden 80 gesunde Freiwillige bezüglich des *CYP2C18* T1154C SNP genotypisiert. Dabei konnte die Beobachtung von Goldstein et al. bestätigt werden. 64 der 80 Gesunden Probanden waren homozygot C/C, 16 Individuen waren heterozygot C/T. In dieser Gruppe konnte keine Person mit einer homozygoten T/T-Mutation nachgewiesen werden.

Für die *CYP2C18*-Polymorphismusfrequenz in der Gruppe der ALL-Ersterkrankungen gab es ebenfalls keine publizierten Vordaten. Es wurden 102 Patienten analysiert, davon hatten 27 Kinder eine heterozygote Mutation. Auch in dieser Gruppe konnte kein homozygot T/T-mutierter Genotyp gefunden werden. Interessant erscheint jedoch der höhere Anteil an Heterozygoten in der Gruppe der Ersterkrankungen im Vergleich zur gesunden Gruppe (26.5% versus 20%).

5.4.4. Der *CYP2C18* T1154C Polymorphismus bei ALL-Rezidiven

Im Rahmen unserer Fall-Kontroll-Studie wurden 108 Kinder mit ALL-Erstrezidiv hinsichtlich der T1154C Mutation im *CYP2C18*-Gen untersucht. Die vorliegende Arbeit stellt damit die einzige Studie dieser Art bei ALL-Patienten dar. Wie erwartet, war die Frequenz des Wildtyp-Allels viel höher als die des mutierten Allels – 70.4% der untersuchten Kinder hatten den Genotyp C/C-Wildtyp, 27.8% C/T und 1.9% den homozygoten Genotyp T/T. Damit waren die beiden einzigen homozygoten T/T-Varianten in der Gruppe der ALL-Rezidive zu finden, in den Gruppen der gesunden Probanden und der ALL-Ersterkrankungen waren keine homozygot mutierten Genotypen vorhanden. Auch für diesen Polymorphismus wurde der Einfluss der Genotypen auf das ereignisfreie Überleben, auf initiale Blockintervalle sowie auf die Toxizität vor und nach Chemotherapie untersucht. Dabei ergab sich ein nicht-signifikanter Zusammenhang zwischen *CYP2C18*-Genotypen und dem ereignisfreien Überleben der Patienten. Ein signifikanter Einfluss der Genotypen auf das Überleben wäre durch den von Chang et al. beobachteten Unterschied der beiden Varianten Thr³⁸⁵ und Met³⁸⁵ bei der Metabolisierung von Ifosfamid zu erklären gewesen. *CYP2C18*-Thr³⁸⁵ zeigt laut Chang et al. eine bedeutend niedrigere Michaeliskonstante K_m als das Met³⁸⁵-Allel, woraus eine 6mal höhere katalytische Aktivität der Thr-Variante resultiert (Chang et al., 1997). Eine Auswirkung dieses Unterschieds der *CYP2C18*-Varianten bei der Aktivierung von Ifosfamid auf das Überleben der Patienten hätte aber vorausgesetzt, dass einerseits die Wirkung von Ifosfamid allein ein statistisch signifikanter prognostischer Faktor ist, und andererseits dass Ifosfamid nur durch das Enzym *CYP2C18* bioaktiviert werden kann. Ifosfamid ist das einzige im Rahmen der ALL-REZ BFM Studien eingesetzte *CYP2C18*-Substrat. Es spielt in der Therapie der ALL-Rezidive eine bedeutende Rolle, ein Zurückführen der Prognose der Kinder allein auf die Wirkung dieser einzelnen Substanz innerhalb eines komplexen Therapieprotokolls ist jedoch nicht möglich. Chang et al. publizierten 1997 eine Arbeit in der *CYP2C18* bei der Bioaktivierung von Ifosfamid die höchste in vitro katalytische Effizienz zeigte. Dennoch berichteten die Autoren in der gleichen Arbeit über eine Beteiligung der restlichen Mitglieder der *CYP2C* Gruppe (*CYP2C8*, *2C9*, *2C19*) an der 4-Hydroxylierung von Ifosfamid (Chang et al., 1997). Damit ist im Falle einer Mutation im *CYP2C18*-Gen mit nachfolgender erniedrigter katalytischer Aktivität des Enzyms, wie bei dem Met³⁸⁵-Allel, eine Übernahme der Bioaktivierung von Ifosfamid in der Leber durch ein anderes Cytochrom zumindest denkbar. In diesem Zusammenhang ist deshalb die klinische Relevanz des Polymorphismus im *CYP2C18*-Gen kritisch zu betrachten. Insofern entsprach der fehlende Einfluss der T1154C Mutation auf das ereignisfreie Überleben als Ergebnis der Fall-Kontroll-

Studie der Erwartung. Die fehlende Assoziation zwischen *CYP2C18*-Varianten und initialen Blockintervallen entspricht ebenfalls dem erwarteten Sachverhalt. Ifosfamid, die einzige im Zusammenhang mit *CYP2C18* relevante Substanz, ist Teil des Therapieblocks R2 und wird vor Beginn des Therapieblocks R2 nicht therapeutisch eingesetzt. Insofern kann dieser Polymorphismus bis zum Beginn des R2-Blocks gar keinen Einfluss auf den klinischen Zustand der Kinder haben, und damit auch nicht der Grund für eine Veränderung der Blockintervalle sein. Bei der Untersuchung der Toxizität vor Chemotherapiebeginn sowie im Therapieverlauf zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen den *CYP2C18*-Genotypen und den Toxizitätsparametern Infektion und Diarrhoe vor Beginn der Therapie sowie Allgemeinbefinden, Hämoglobin, Leukozytenzahl, Granulozytenzahl, Thrombozytenzahl, Fieber, Übelkeit, Erbrechen, Creatinin, Proteinurie, Hämaturie, Creatinin Clearance, Bilirubin und Transaminasen im Therapieverlauf. Die höhere Toxizität gerade bei diesen Parametern lässt sich aus dem Spektrum der Nebenwirkungen von Ifosfamid erklären. Das Chemotherapeutikum beeinflusst vor allem die Hämatopoese, was das niedrige Hämoglobin sowie den Abfall der Leukozyten-, Thrombozyten- und Granulozytenzahlen erklärt. Des Weiteren ist Ifosfamid vor allem nephrotoxisch (Creatinin, Proteinurie, Hämaturie, Creatinin Clearance) und hat einen emetogenen Effekt (Toxizitätsparameter Übelkeit und Erbrechen signifikant). Parameter wie zentrale oder periphere Neurotoxizität, Hautveränderungen oder Diarrhoe sind primär nicht Ifosfamid-spezifisch, erwartungsgemäß wurde auch kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem *CYP2C18* T1154C-Polymorphismus und diesen Parametern gefunden.

5.4.5. Zusammenfassung

In zwei retrospektiven Fall-Kontroll-Studien wurden Proben von 112 Kindern mit ALL-Rezidiv hinsichtlich der klinischen und prognostischen Relevanz des *MDR1* C3435T Polymorphismus untersucht. Es konnte weder bei Kindern mit zweitem ALL-Rezidiv im Vergleich zu Patienten in kompletter zweiter Remission (Fall-Kontroll-Studie I) noch bei Respondern versus Non-Respondern der ALL-Rezidiv-Therapie (Fall-Kontroll-Studie II) ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der *MDR1* C3435T-Genotypen festgestellt werden. Die Wahrscheinlichkeit für das ereignisfreie Überleben der Kinder mit ALL-Rezidiv unterschied sich unter den *MDR1*-Genotypen ebenfalls nicht signifikant, ebenso wie der Einfluss des untersuchten *MDR1*-Polymorphismus auf die initialen Chemotherapieblockintervalle. Während sich vor Therapiebeginn kein signifikanter Zusammenhang zwischen Toxizitätsinitialwerten und dem *MDR1* C3435T-Polymorphismus ergab, konnte im Therapieverlauf eine signifikante Korrelation zwischen *MDR1*-Genotypen und folgenden

Toxizitätsparametern: Allgemeinbefinden, Granulozyten, Infektion, Fieber, Übelkeit, Diarrhoe, Hautveränderungen, Transaminasen, periphere Neurotoxizität gezeigt werden. Hinsichtlich der größeren Wahrscheinlichkeit für ein ereignisfreies Überleben für Individuen mit *MDR1* 3435T/T und C/T Genotyp muss die in Abschnitt 2 formulierte Hypothese 1 verworfen werden: Der untersuchte *MDR1*-Polymorphismus ist kein prognostischer Faktor für Patienten mit ALL-Rezidiv. Bezüglich der Therapietoxizität wird die formulierte Hypothese angenommen, der *MDR1*-Genotyp korreliert signifikant mit den oben genannten Toxizitätsparametern.

Hinsichtlich des Cytochroms *CYP2C18* T1154C-Polymorphismus wurden ebenfalls im Rahmen retrospektiver Fall-Kontroll-Studien Proben von 108 Kindern mit ALL-Rezidiv genotypisiert. Weder bei Patienten mit zweitem ALL-Rezidiv im Vergleich zu Kindern in kompletter zweiter Remission (Fall-Kontroll-Studie I) noch bei Respondern versus Non-Respondern der ALL-Rezidiv-Therapie (Fall-Kontroll-Studie II) konnte ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der *CYP2C18*-Genotypen festgestellt werden. Unter den T1154C-Genotypen zeigte sich weder ein Unterschied bezüglich des pEFS noch ein Einfluss des *CYP2C18*-Polymorphismus auf die initialen Chemotherapieblockintervalle.

Bei der Untersuchung der Toxizitätswerte vor Therapiebeginn in Abhängigkeit von den *CYP2C18* Genotypen ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen 1154T/T bzw. C/T Genotypen und den Werten für Infektion und Diarrhoe. Im Therapieverlauf zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Genotypen T/T und C/T des *CYP2C18* Polymorphismus und folgenden Toxizitätsparametern: Allgemeinbefinden, Hämoglobin, Leukozytenzahl, Granulozytenzahl, Thrombozytenzahl, Fieber, Übelkeit, Erbrechen, Creatinin, Proteinurie, Hämaturie, Creatinin-Clearance, Bilirubin und Transaminasen. Hinsichtlich der größeren Wahrscheinlichkeit für ein EFS und Gesamtüberleben für Individuen mit *CYP2C18* 1154T/T und C/T Genotyp muss die in Abschnitt 2 formulierte Hypothese 2 verworfen werden. Bezüglich der Therapietoxizität wird die formulierte Hypothese angenommen, der *CYP2C18*-Polymorphismus korreliert signifikant mit den oben genannten Toxizitätsparametern.