

1. Einleitung

1.1. Einführung

Leukämien sind biologisch und klinisch heterogene Erkrankungen, die aus der autonomen Proliferation einer hämatologischen Zellreihe entstehen. Die Expansion eines malignen Lymphozytenzellklons führt zur generalisierten Ausbreitung im blutbildenden Knochenmark, unter Umständen kommt es zu einer Infiltration extramedullärer Organe und der Ausschwemmung leukämischer Zellen ins Blut. Man unterscheidet mehrere Leukämieformen, die jeweils je nach Herkunft des proliferierenden Zellklons immunologisch in den myeloischen und lymphatischen Typ unterteilt werden. Diese Arbeit analysiert mit Hilfe einer Fall-Kontroll-Studie den Zusammenhang zwischen einem Einzelnukleotidpolymorphismus im Multidrug Resistenz Gen (*MDR1*) sowie einer Punktmutation im Cytochrom P450 *2C18*-Gen (*CYP2C18*) und der Prognose, dem Intervall zwischen Ersterkrankung und Erstrezidiv und der Toxizität während der Chemotherapie bei Kindern mit Erstrezidiv einer akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL).

1.2. Akute lymphoblastische Leukämie (ALL)

1.2.1. Epidemiologie und Ätiologie

Die ALL entwickelt sich aus einer dysregulierten, lymphatischen Vorläuferzelle. Genetische Veränderungen in den Leukämiezellen führen zu einer Blockierung der lymphatischen Differenzierung (Reifungsstopp) und zur Dysregulation der Proliferation. Im Kindesalter ist die ALL die häufigste maligne Erkrankung, sie macht etwa 30% der Neoplasien bei Kindern unter 15 Jahren aus und kommt mit einer Inzidenz von 31 pro 1 Million Kinder vor. In der Altersgruppe der 2 bis 3jährigen Kinder ist die Inzidenz am höchsten, etwa viermal höher als für Neugeborene und Kleinkinder, und etwa 10mal höher als für 19 Jährige. Ebenfalls bestehen Unterschiede zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen. Bemerkenswert ist, dass unter Kaukasiern die ALL-Inzidenz signifikant höher als bei Schwarzen und Asiaten ist (Smith et al., 1999), am höchsten ist sie jedoch bei hispanischen Kindern (McNeil et al., 2002).

Die Pathogenese von Leukämien scheint von endogenen, exogenen und genetischen Faktoren abhängig zu sein. Eine Erhöhung des Erkrankungsrisikos durch radioaktive Strahlung konnte nach der Atombombenexplosion in Hiroshima (Miller et al., 1968) sowie nach therapeutischer Anwendung ionisierender Strahlung bei Schwangeren festgestellt werden (Harvey et al., 1985; MacMahon et al., 1985). Darüber hinaus treten Leukämien auch als Zweitmalignome nach Strahlentherapie im Kindesalter auf (Mike et al., 1982). Zu den exogenen Faktoren bei

der Entstehung von Leukämien zählen, neben einzelnen chemischen Substanzen und Viren, Zytostatika, insbesondere alkylierende Substanzen (Winick et al., 1993; Greaves et al., 1993). Außerdem gibt es Erkrankungen, die mit einer besonders hohen Entartungsrate assoziiert sind. Dazu gehören der Morbus Down, die Ataxia teleangiectatica, das Li Fraumeni Syndrom und das Nijmegen Breakage Syndrom.

1.2.2. Klassifikation der ALL

1.2.2.1. Morphologie

Die gängigste morphologische Klassifikation ist diejenige der FAB (internationale französisch-amerikanisch-britische Kooperation) von 1976, wonach drei Formen der ALL unterschieden werden, die im Folgenden kurz beschrieben werden sollen:

- L1-Morphologie: kleine Zellen, homogenes Bild, schmaler Zytoplasmasaum, regelmäßiger Kern meist ohne Nukleoli, bei ca. 85% der Kinder mit ALL (Bennett et al., 1976).
- L2-Morphologie: große Zellen, heterogenes Bild, mittelbreiter Zytoplasmasaum, unregelmäßig häufig gespaltener Kern mit großen Nukleoli, bei 14% der Kinder mit ALL (Bennett et al., 1976).
- L3-Morphologie: große Zellen, homogenes Bild, stark basophiles Zytoplasma, regelmäßig ovale Kerne mit deutlichen Nukleoli und Vakuolen im Zytoplasma.

Da die FAB-Klassifikation nicht ausreichend mit immunologischen und genetischen Befunden korreliert, klinische und zytogenetische Veränderungen nicht berücksichtigt und ihre prognostische Bedeutung für die ALL fraglich ist, hat sie heute, bis auf die L3-Morphologie, in der Klinik an Bedeutung verloren.

1.2.2.2. Immunphänotypisierung

Eine leukämische Transformation und klonale Expansion kann in den verschiedenen Reifestadien während der Lymphozytendifferenzierung stattfinden. Die Differenzierung von Lymphozyten verläuft in mehreren Stadien, in denen unterschiedliche Antigene exprimiert werden. Die für bestimmte Differenzierungsstadien relevante Antigenexpression ermöglicht die immunphänotypische Klassifikation der leukämischen Zelle entsprechend der normalen Reifungssequenz. Da nur sehr wenige Antigene der Lymphozytendifferenzierung wirklich zelllinienspezifisch sind, erfolgt letztlich die Immunphänotypisierung anhand eines spezifischen Verteilungsmuster von zellreihenassoziierten Antigenen. Die ALL kann somit in Subtypen der B- und T-Zellreihe eingeteilt werden. Zu der Zellreihe der B-Linie zählen die

prä-prä-B-, die common-, die prä- und B-ALL, zu der T-Linie die T-Vorläuferzell- sowie die T-ALL. So sind beispielsweise die Oberflächenmarker CD19, HLA-DR, CD10, CD20 und CD22 für die B-Vorläuferzell-ALL charakteristisch, CD2, CD5, CD7 und CD3 für die T-ALL.

1.2.2.3. Zyto- und molekulargenetische Veränderungen

Genveränderungen in leukämischen Zellen waren zunächst nur mittels zytogenetischer Analyse nachweisbar. Diesem Verfahren sind jedoch nur grobe strukturelle Veränderungen wie Deletionen, Translokationen und Insertionen zugänglich. Durch moderne molekulargenetische Untersuchungsmethoden wie die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) oder die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FiSH) können nun genetische Veränderungen wesentlich sensitiver und spezifischer aufgedeckt werden (Rubnitz et al., 1998). So ist es unter anderem möglich, bestimmte Gensequenzen, deren Proteinprodukte an der malignen Transformation involviert sind und eine Veränderung der Genexpression, der Genregulation oder der Genfunktion zur Folge haben können, zu identifizieren (Rabbits, 1994). Dazu gehört die Beschreibung von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen (Sawyers, 1997).

Bei etwa drei Viertel der pädiatrischen ALL Patienten können Translokationen in den Leukämiezellen nachgewiesen werden. Beispiele für häufig vorkommende Translokationen sind die t(12;21) mit ihrem Fusionsprodukt TEL-AML1, die bei 20-25% der Kinder mit B-Vorläuferzell-ALL festzustellen ist, selten jedoch bei der T-ALL, oder auch t(9;22), das so genannte Philadelphia-Chromosom, das bei 4% aller pädiatrischen ALL zu finden und mit einer besonders schlechten Prognose assoziiert ist. In vielen Fällen zeigt sich auch, dass ALL-Immunphänotypen mit spezifischen chromosomalen Aberrationen assoziiert sind (Golub et al., 1999). Bei einem Drittel aller common-ALL wird eine Hyperdiploidie mit über 50 Chromosomen beobachtet, die auf eine günstige Prognose hinweist (Harbott et al., 1993). Nicht zuletzt der Entwicklung der molekulargenetischen Untersuchungsmethoden ist es auch zu verdanken, dass jetzt eine Vielzahl verschiedener klon- oder leukämiespezifischer Genveränderungen als Marker zum Nachweis von residuellen Leukämiezellen (minimal residual disease – MRD) zur Beurteilung des Krankheits- bzw. Heilungsverlaufs zur Verfügung stehen.

1.2.3. Diagnostik, Parameter für Prognose

Nach den Protokollen der Studiengruppe Berlin Frankfurt Münster (BFM) zur Behandlung von Kindern mit ALL (Berliner Pilotstudie 1970, ALL-BFM 76, 81, 86, 90, 95) wurden bisher mehr als 5000 Kinder behandelt. Das Gesamtergebnis konnte fortlaufend verbessert

werden, die Wahrscheinlichkeit für das ereignisfreie Überleben (EFS) betrug für die Teilnehmer der ALL-BFM-95 Studie (n=2013) 82%. In der Hochrisikogruppe (n=245) konnte allerdings nur ein EFS von 49% erzielt werden, in der Standardrisikogruppe hingegen (n=697) 92%. Als neuer wesentlicher Parameter wurde nach einer Vorstudie im Rahmen des ALL-BFM 90 Protokolls und einer Pilotstudie (MRD 99) die Erfassung von klonspezifischen Rearrangements in den T-Zell-Rezeptoren und den Immunglobulinen mittels klonspezifischer DNA-Sonden als Nachweis einer MRD (minimal residual disease) mit einer Sensitivität von 10^{-4} - 10^{-5} einbezogen (van Dongen et al., 1998; Cave et al., 1998). Alter und Leukozytenzahl bei Diagnose sind in der laufenden Studie ALL-BFM 2000 keine Stratifizierungsmerkmale mehr. Die T-Immunologie spielt nur noch bei der Indikation zur Schädelbestrahlung und Stammzelltransplantation eine Rolle. Auf dieser Grundlage wurden die Risikogruppen SR (Standardrisiko), MR (mittleres Risiko) und HR (Hochrisiko) für das Therapieprotokoll ALL-BFM 2000 neu definiert (Schrappe et al., 2000; Biondi et al., 2000).

1.2.4. ALL-Rezidive

Trotz der großen Erfolge, die man in den letzten 30 Jahren in der Behandlung der ALL im Kindesalter erzielen konnte, kommt es bei 25-30% der Patienten zu Rezidiven. Die Langzeitprognose der Patienten mit ALL-Rezidiv ist deutlich schlechter als für Patienten mit ALL-Ersterkrankung. Sie hängt vor allem vom Zeitpunkt des Rezidivs, vom Manifestationsort des Rezidivs (Henze et al. 1991, Bühner et al. 1993) und dem Immunphänotyp ab (Henze, 1997).

Tabelle 1: Definition der Zeitpunkte des ALL-Erstrezidivs (ALL-REZ BFM)

Zeitpunkt	nach Erstdiagnose	nach Ende der Ersttherapie*	
Spät		≥ 6 Monate	
Früh	≥ 18 Monate	und	< 6 Monate
Sehr früh	< 18 Monate	und	< 6 Monate

* Für den seltenen Fall, dass das Ende der Ersttherapie (i.d.R. Ende der vorangegangenen Dauertherapie) ≥ 6 Monate und die Erstdiagnose < 18 Monate her ist (z.B. nach Therapieabbruch oder nach B-NHL-Therapie), ist der Rezidivzeitpunkt als spät zu definieren.

Tabelle 2: Definition der Rezidivlokalisierung

Knochenmarkbefund:		< 5% Blasten	5% bis < 25% Blasten	≥ 25% Blasten
Extramedulläres Rezidiv	Nein	Kein Rezidiv	kontrollbedürftig	Isoliertes Knochenmarkrezidiv
	Ja	Isoliertes extra-medulläres Rezidiv	Kombiniertes Knochenmark-Rezidiv	

Dabei gilt, dass Rezidive während der Remissionsinduktionstherapie oder während der ersten 6 Monate nach Therapieabschluss (sehr frühe / frühe Rezidive) die schlechteste Prognose mit nur 10-20% Langzeitüberleben aufweisen (Gaynon et al. 1998, Henze et al. 1991, Buchanan et al. 2000). Beträgt der Zeitraum zwischen Ende der Therapie und erstem ALL-Rezidiv mehr als sechs Monate (späte Rezidive), ist die Prognose für Kinder mit Knochenmarkrezidiven mit 30-40% Langzeitüberleben günstiger (Sadowitz et al. 1993, Rivera et al. 1996). Dementsprechend werden die Kinder wie folgt in Strategiegruppen eingeteilt, die Therapie des einzelnen Patienten richtet sich nach dem jeweiligen individuellen Risiko.

Tabelle 3: Definition der Strategiegruppen S1 bis S4

Lokalisation Zeitpunkt	Immunphänotyp: non - T			Immunphänotyp: (prä-) T		
	Extra- medullär isoliert	Knochen- mark kombiniert	Knochen- mark isoliert	Extra- medullär isoliert	Knochen- mark kombiniert	Knochen- mark isoliert
sehr früh	S2	S4	S4	S2	S4	S4
früh	S2	S2	S3	S2	S4	S4
spät	S1	S2	S2	S1	S4	S4

Das ereignisfreie Überleben der nach ALL-REZ BFM 95/96 behandelten Kinder zeigte abhängig von der Strategiegruppe große Unterschiede, wie im Folgenden schematisch dargestellt wird.

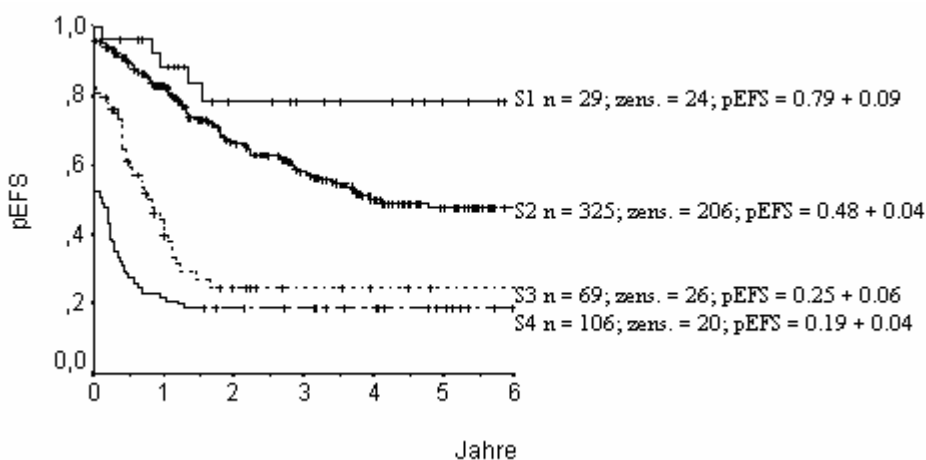


Abbildung 1: ALL-REZ BFM 95/96, Ereignisfreies Überleben in Abhängigkeit von der Strategiegruppe S1-S4; $p < 0.001$

Bei Gruppe S2 kann zwischen S2A, S2B, S2C und S2D differenziert werden. (Tabelle 4)

Tabelle 4: Definition der S2 Untergruppen A-D

Ort	isol. KM	komb. KM		isol. Extramed.
Zeitpunkt	spät	spät	früh	früh/ sehr früh
< 1/ μ l PBC	2A	2A	2B	2D
1 bis < 10.000/ μ l	2B			
\geq 10.000/ μ l	2C			
BCR/ABL+	2C	2C	2C	

Prognostische Bedeutung für Patienten mit ALL-Rezidiven hat ebenfalls der sensitive Nachweis von Leukämie-Residuen (minimal residual disease, MRD) am Tag 36 der ALL-Rezidivtherapie. Kinder mit weniger als 10^{-3} Zellresiduen hatten eine Wahrscheinlichkeit von 86% für ein ereignisfreies Überleben, wogegen Kinder mit 10^{-3} MRD oder mehr eine Wahrscheinlichkeit für ein ereignisfreies Überleben von 0 hatten (Eckert et al., 2001).

Ein großes Problem bei der Therapie der Patienten mit ALL-Rezidiv ist, dass die Leukämiezellen eine sehr viel höhere Resistenz gegenüber Chemotherapeutika aufweisen als bei der Therapie von Ersterkrankungen. Untersuchungen der zellulären Resistenz gegenüber Medikamenten haben gezeigt, dass Zellen von Kindern mit Rezidiv-ALL resistenter sind gegenüber Steroiden, L-Asparaginase, Anthrazyklinen und Thiopurinen als Zellen von Kindern mit ALL-Ersterkrankung (Klumper et al. 1995). Aus diesem Grund werden bei der Therapie eines Rezidivs einerseits andere Substanzen als bei Ersterkrankungen verwendet, andererseits muss auch diese Therapie intensiviert werden, unter Zunahme der Indikationsstellung für Stammzelltransplantationen. Die Patienten mit sehr frühem Knochenmarkrezidiv profitieren angesichts ihrer schlechten Prognose am meisten von der allogenen Knochenmarktransplantation, während Patienten mit späten Rezidiven, insbesondere solche mit isoliert extramedullären Rezidiven, mit alleiniger Chemotherapie noch relativ gute Heilungschancen haben (Borgmann et al. 1995).

1.2.5. Medikamente in der ALL-Therapie

Sowohl die Behandlung der ALL-Ersterkrankung als auch die der ALL-Rezidive besteht aus einer Kombinationstherapie von mehreren Chemotherapeutika. Folgendes Schema soll eine Übersicht über das Protokoll der Studie ALL-REZ BFM 95/96 geben.

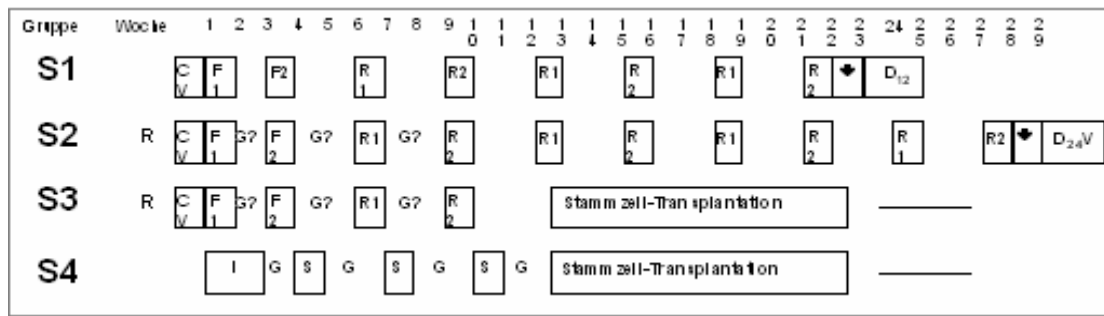


Abbildung 2: Schema des Therapieprotokolls ALL-REZ BFM 95/96 CV, zytoreduktive Phase; D₁₂, Dauertherapie 12 Monate; D_{24V}, Dauertherapie 24 Monate mit VP16 Reinduktionen; R, Randomisation; , Strahlentherapie; E / R1 / R2 / R3 / F1 / F2, Polychemotherapie-Blöcke

Die einzelnen Therapieblöcke bestehen aus folgenden Medikamentenkombinationen:

Tabelle 5: Im Protokoll ALL-REZ BFM 95/96 verwendete Medikamente nach Therapieblock

Therapieblock	Medikamente
F1	Dexamethason p.o., Vincristin i.v., Methotrexat i.v., PEG-Asparaginase i.v., Methotrexat i.th., Cytarabin i.th., Prednison i.th.
F2	Dexamethason p.o., Vincristin i.v., Cytarabin i.v., PEG-Asparaginase i.v., Methotrexat i.th., Cytarabin i.th., Prednison i.th.
R1	Dexamethason p.o., Mercaptopurin p.o., Vincristin i.v., Methotrexat i.v., Cytarabin i.v., PEG-Asparaginase i.v., Methotrexat i.th., Cytarabin i.th., Prednison i.th.
R2	Dexamethason p.o., Thioguanin p.o., Vindesin i.v., Methotrexat i.v., Ifosamid i.v., Daunorubicin i.v., PEG-Asparaginase i.v., Methotrexat i.th., Cytarabin i.th., Prednison i.th.

Eine im Anhang enthaltene Übersicht bietet eine genauere Darstellung der in der Studie ALL-REZ BFM 95/96 in den einzelnen Therapieblöcken verwendeten Therapeutika und deren Dosierung. Ein Großteil der interindividuellen und interethnischen Unterschiede in der Metabolisierungsgeschwindigkeit und -rate gehen auf genetische Unterschiede zurück. Mutationen in einem Gen, das für ein Enzym zur Medikamentenmetabolisierung kodiert, können Enzymvarianten mit unveränderter, höherer, niedrigerer oder gar keiner Aktivität hervorrufen, als Beispiel sei das *MDR1*-Gen genannt. Kommt das mutante Allel mit einer Frequenz von mindestens 1% in der normalen Bevölkerung vor und führt zu einer veränderten Metabolisierung von Medikamenten oder einem veränderten Phänotyp, so spricht man von pharmakogenetischem Polymorphismus (Meyer, 1994). In ihren pharmakologischen und toxikologischen Wirkungen besonders betroffen sind dabei Medikamente, die eine geringe therapeutische Breite aufweisen, und die über einen beträchtlichen First-pass-Metabolismus verstoffwechselt werden (Thummel et al., 1997).

Genauso wie sie Xenobiotika und endogene Karzinogene metabolisieren, sind auch Cytochrome an der Biotransformation von Chemotherapeutika beteiligt - je nachdem, ob das

Medikament an sich oder seine im Organismus gebildeten Metabolite die zytostatische Wirkung besitzen, erhöhen oder erniedrigen die Cytochrome P 450 (CYPs) diese Wirkung durch Aktivierung oder gegebenenfalls auch Inaktivierung.

1.2.5.1. Glukokortikoide

Durch Hemmung des Enzyms Phospholipase 2 blockiert Dexamethason, ein halogeniertes Glukokortikoid, die Freisetzung von Arachidonsäure, der Ausgangssubstanz für Prostaglandine und Leukotriene. Daraus resultiert eine antiphlogistische, immunsuppressive und ulzerogene Wirkung. Lymphoblastische Leukämiezellen exprimieren Glukokortikoidrezeptoren, zu denen Dexamethason, im Vergleich zu anderen Glukokortikoiden eine erhöhte Affinität aufweist. Eine Anbindung von Dexamethason an diese Rezeptoren führt bei lymphoblastischen Leukämiezellen zur Komplexbildung, Translokation in den Zellkern und schließlich zu einem programmierten Zelltod. Es konnte gezeigt werden, dass die Wirkung auf Lymphoblasten abhängig von der Anzahl spezifischer zytoplasmatischer Glukokortikoidrezeptoren ist (Kato et al., 1993).

Als weiteres Glukokortikoid wird bei ALL-Rezidivpatienten Prednison zusammen mit Cytosin-Arabinosid und Methotrexat intrathekal appliziert, um das Risiko eines ZNS-Folgeresidivs zu minimieren. Im Glukokortikoidmetabolismus scheint das P-Glykoprotein (P-gp), das von dem *MDR1*-Gen kodiert wird, eine Rolle zu spielen. Auf diesen Zusammenhang wird in einem späteren Abschnitt dieser Arbeit (s. Abschnitt 5.2.1.) näher eingegangen.

1.2.5.2. Zytostatika

1.2.5.2.1. Vinca-Alkaloide

Die zur Klasse der Mitosehemmstoffe gehörenden Vinca-Alkaloide sind Zellzyklus-spezifisch wirkende Chemotherapeutika, die durch Bindung an Tubulin zu einer Zerstörung der Mikrotubuli führen, was eine Hemmung der Spindelapparatbildung zur Folge hat. Dadurch kommt es zu einer Hemmung der Zellteilung in der Metaphase. Darüber hinaus blockieren die Vinca-Alkaloide die DNA- und RNA-Synthese (Warnecke et al., 1968). Es konnte gezeigt werden, dass Vinca-Alkaloide Substrate der P-gp-Pumpe, dem Genprodukt des *MDR1*-Gens, sind, und letztere eine Rolle bei der Entwicklung einer Resistenz der Leukämiezellen gegen Vincristin und Vindesin spielt (Hoki et al., 1997).

1.2.5.2.2. Methotrexat (MTX)

Durch geringfügige chemische Abwandlung der Folsäure wurden Folsäureantagonisten erhalten, die eine wesentlich höhere Affinität zur Dihydrofolsäure-Reduktase als Folsäure

selbst besitzen und auf diese Weise zu einem Tetrahydrofolsäure-Mangel führen. Die Folge ist eine Störung der Purinnukleotidsynthese und damit eine Verminderung der DNA-/RNA-Synthese. Methotrexat ist der einzige im Handel erhältliche Folsäureantagonist und das einzige Zytostatikum überhaupt, für das ein Antidot zur Verfügung steht, nämlich Tetrahydrofolsäure (Leucovorin), mit dem die zytostatische Wirkung sowie die unter Umständen schweren Nebenwirkungen des Präparats (Knochenmarktoxizität, Hepatotoxizität, Mukositis) antagonisiert werden können.

1.2.5.2.3. Anthrazykline

Diese aus Streptomyces-Arten isolierten Antibiotika (Daunorubicin, Idarubicin, Doxorubicin) gehören zu den in der Therapie der ALL besonders wichtigen Zytostatika, deren Wirkung in der S-Phase der Zellteilung am stärksten ausgeprägt ist. Der zytotoxische Effekt beruht auf verschiedenen Wirkungen. Hierzu gehört die Interkalation in die doppelsträngige DNA, die zur Hemmung der Nukleinsäuresynthese führt, die Induktion von Strangbrüchen durch Hemmung der Topoisomerase II, die Biotransformation zu freien Radikalen, welche ebenfalls Doppelstrangbrüche hervorrufen, sowie die Bindung an Bestandteile der Zellmembran, die die Membranfluidität und -permeabilität erhöhen. Der Einsatz der Anthrazykline wird allerdings durch ihre Kardiotoxizität eingeschränkt, die mit der applizierten Gesamtdosis korreliert und häufig irreversibel ist. Vermutlich beruht die Herzschädigung im Wesentlichen auf der Bildung von Radikalen. Auch die Anthrazykline sind Substrate der P-Glykoprotein-Pumpe und auch hier spielt dieser Mechanismus bei der Resistenzentwicklung der Tumorzellen gegen Daunorubicin eine Rolle (siehe Abschnitt 1.3.1.).

1.2.5.2.4. Alkylanzien

Unter diesem Begriff werden reaktionsfähige, meist bifunktionelle Zytostatika zusammengefasst, deren Zellzyklus-unspezifische Wirkung vor allem auf der Alkylierung von Nukleinsäuren und Proteinen beruht. Nach Aktivierung zu Carbokationen reagieren diese Stoffe außer mit Proteinen unter anderem mit Guanin und führen zu multiplen DNA-Veränderungen (Vernetzung von DNA-Strängen d.h. cross-link-Bildung, abnormer Basenpaarung, Spaltung von DNA-Ketten). Dadurch werden die Nukleinsäure-Reduplikation, und damit die Zellteilung, beeinträchtigt. Die Auswirkung dieser Stoffe gleicht bei mikroskopischer Untersuchung der Zellteilungsvorgänge dem Effekt ionisierender Strahlen, daher auch ihre Bezeichnung als Radiomimetika.

Cyclophosphamid und Ifosfamid sind die bekanntesten Substanzen dieser Gruppe. Die in vitro nahezu unwirksamen Verbindungen (Prodrugs) werden erst im Organismus in die

eigentliche Wirkform umgewandelt. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Biotransformation Cyclophosphamid → 4-Hydroxy-Cyclophosphamid bzw. Ifosfamid → 4-Hydroxy-Ifosfamid wird in der Leber von Enzymen der Gruppe Cytochrom P 450 katalysiert. Die aus vier Mitgliedern bestehende Untergruppe CYP 2C scheint in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle zu spielen. Teil dieser Arbeit ist es, sich mit einem dieser vier Enzyme - CYP2C18 - näher zu befassen.

1.3. MDR1

1.3.1. Das P-Glykoprotein

Ein großes Problem bei der Behandlung von Malignomen stellt deren Resistenz gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika dar. Dieses Phänomen wird als Multidrug Resistenz (MDR) bezeichnet. Die Tumoren können von Beginn an ein Ansprechen auf die Chemotherapie vermissen lassen oder auch erst im Laufe der Therapie eine Resistenz entwickeln. Der klassische Phänotyp der MDR basiert auf der Expression des „multidrug resistance 1“-Gens (*MDR1*). *MDR1* kodiert für ein membrangebundenes Transportprotein der Superfamilie der ABC-Transporter, das P-Glykoprotein (P-gp). Dieses ist in der Lage Substanzen mit hydrophoben Regionen aus der Zelle zu schleusen. Dadurch führt es zu einer verringerten zellulären Akkumulation von vielen in der Therapie von Malignomen eingesetzten Chemotherapeutika.

Das P-Glykoprotein gilt als Teil eines Entgiftungsmechanismus der Zelle, indem es Toxine und Xenobiotika, einschließlich Zytostatika, aus der Zelle pumpt und dadurch zu einer reduzierten Zelltoxizität der Zytostatika führt (Harrison et al., 1995). Außerdem ist das P-Glykoprotein ein wesentlicher Bestandteil der Blut-Hirn Schranke und limitiert die Permeabilität von Medikamenten ins ZNS.

Das P-gp hat eine sehr breite Substratspezifität, eine hohe klinische Relevanz haben dabei die Zytostatika. Im Zusammenhang mit ALL besonders von Bedeutung sind aus dieser Gruppe:

- die Anthrazykline (Doxorubicin, Daunorubicin, Idarubicin) (Bart et al., 2000),
- die Pflanzenalkaloide (Vincristin, Vindesin, Vinblastin) (Schinkel et al., 1994; Hoki et al., 1997),
- die DNA-Topoisomeraseinhibitoren (Etoposid, Teniposid) (Kishi et al., 2004; Schinkel et al., 1996; Relling et al., 1996),

aus der Gruppe der Glukokortikoide:

- das Dexamethason (Schinkel et al., 1995) und das Cortisol (van Kalken et al, 1993),

sowie aus der Gruppe der zentralen Antiemetika:

- das Ondansetron (Schinkel et al., 1996).

Weitere Substrate des P-Glykoproteins werden genauer in Abschnitt 5.2.1. diskutiert. Eine Überexpression von P-gp wird häufig in Krebszellen verschiedenster Art, einschließlich bei akuten Leukämien gefunden (Fojo et al., 1987; Goldstein et al., 1989; Gruber et al., 1992). Die Rolle von P-gp bei ALL-Erkrankungen bleibt jedoch umstritten. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen P-gp-Expressionsrate und ALL-Rezidiv bei Kindern mit ALL-Ersterkrankung wurde von mehreren Autoren beschrieben (Dhooge et al., 1999; Goasguen et al., 1993; Ivy et al., 1996). Auf diese Arbeiten wird im Abschnitt 5.2.3. näher eingegangen.

1.3.2. Das *MDR1*-Gen

Das humane *MDR1*-Gen befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 7, Chromosomenbande 7q21-31 (Roninson et al., 1986). Es besteht aus 28 Exons und 3843 Basenpaaren. In den letzten Jahren sind mehr als 20 Einzelnukleotidpolymorphismen (single nucleotide polymorphisms, SNP) identifiziert worden, mit unterschiedlichen Auswirkungen auf die Aktivität des Proteins. Besondere Bedeutung fällt dem Polymorphismus C3435T im Exon 26 zu, der eine entscheidende Rolle für die Funktion des P-gp zu spielen scheint. Über den Zusammenhang zwischen dem C3435T SNP und der Höhe der P-gp Expression bestehen konträre Publikationen. In den Arbeiten von Hoffmeyer et al. wird das T-homozygote Allel mit einer 2-fach niedrigeren P-gp-Expressionsrate assoziiert, verglichen mit Proben von C-homozygoten Individuen (Wildtyp). Der heterozygote C/T-Genotyp führt zu einer P-gp Expression, die quantitativ zwischen derjenigen der beiden homozygoten Allele einzuordnen ist. Die Korrelation des *MDR1*-Genotyps mit der P-gp Aktivität hat eine Signifikanz von $p=0.056$ (Hoffmeyer et al., 2000).

Wie bereits erwähnt, ist das P-gp ein wesentlicher Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke und limitiert die Permeabilität von P-gp Substraten ins ZNS. Dies ist für die ALL-Therapie besonders von Bedeutung, da P-gp Substrate wie Vincristin, Doxorubicin und Etoposid in standardisierten Therapieprotokollen für Kinder mit ALL verwendet werden und es abhängig vom *MDR1*-Genotyp zu einer höheren Permeabilität der Chemotherapeutika ins ZNS, und damit zu einem geringeren ZNS-Rezidivrisiko, kommt (Stanulla et al., 2001).

1.4. Das Cytochrom P 450 2C18

1.4.1. Die Familie der Cytochrome P 450

In den vorherigen Abschnitten wurde ein Protein beschrieben, das P-gp, das den Organismus vor Umweltschadstoffen bzw. Xenobiotika schützt. Im Laufe der Evolution hat die eukaryote Zelle mehrere solcher Schutzmechanismen entwickelt, einen der wichtigsten stellen die

Cytochrome P 450 (CYP) Systeme dar. Die CYP bilden eine Gen-Superfamilie von intrazellulären, beim Eukaryoten membrangebundenen Hämproteinen, die zu der Enzymklasse der Oxygenasen gehören. Im Speziellen sind dies Monooxygenasen (Hayaishi et al., 1962) oder mischfunktionelle Oxygenasen (Mason, 1957). Von großer klinischer Relevanz ist die Rolle, die die Cytochrome P450 bei der Metabolisierung von Medikamenten und anderen Xenobiotika spielen. Seit Jahren ist bekannt, dass manche Individuen Schnellmetabolisierer (rapid oder extensive metabolizers = RM) von bestimmten Medikamenten, während andere Langsammetabolisierer (slow metabolizers = SM) sind (Meyer, 1994). Diese unterschiedliche Aktivität liegt, unter anderem, an dem Vorhandensein von Polymorphismen einzelner Cytochrome mit entsprechend veränderter Katalysatoraktivität. Das Erforschen und Bestimmen von Polymorphismen des CYP-Systems wird in Zukunft bei der Ermittlung von optimalen individuellen Medikamentendosierungen immer wichtiger werden, um den Therapieeffekt zu maximieren und die Toxizität zu minimieren. Über den von CYP-Enzymen katalysierten Metabolismus von Chemotherapeutika beim Menschen ist bislang nur wenig bekannt. Die Alkylanzien Cyclophosphamid und Ifosfamid sind Prodrugs und benötigen eine Biotransformation, um zytotoxisch aktiv zu werden. Die genauen Schritte, die bei der Bioaktivierung von Cyclophosphamid, und, analog dazu, Ifosfamid nötig sind, werden in Abschnitt 5.3.2. im Detail beschrieben. Neuere Arbeiten haben ergeben, dass vor allem die Subfamilie CYP2C mit ihren vier bisher bekannten Mitgliedern CYP2C8, 2C9, 2C18 und 2C19 (Nelson et al., 1996) eine wichtige Funktion bei der Bioaktivierung der beiden Alkylanzien haben. CYP2C19 hat die höchste Affinität für Cyclophosphamid, gefolgt von CYP2C9, während für Ifosfamid ebenfalls CYP2C19 die höchste Affinität aufzeigt, gefolgt von CYP2C18 (Chang et al., 1997). CYP2C18 hat die höchste in vitro katalytische Effizienz sowohl für Cyclophosphamid als auch für Ifosfamid (Chang et al., 1997).

1.4.2. Das Protein Cytochrom 2C18

Als Substrate von CYP2C18 wurden Pharmaka aus mehreren Substanzklassen identifiziert. Neben Cyclophosphamid und Ifosfamid sind Warfarin aus der Gruppe der Coumarine (Kaminsky et al., 1993, Goldstein und de Morais, 1994), das Antikonvulsivum Phenytoin (Romkes et al., 1991; Goldstein et al., 1994), das orale Antidiabetikum Tolbutamid (Sulfonylharnstoff) (Goldstein et al., 1994; Zhu-Ge et al., 2002), das NSAR Diclofenac (Mancy et al., 1999), Aminopyrin (Niwa et al., 1999), Tienilsäure (Zhu-Ge et al., 2002), Bisphenol A (Niwa et al., 2001) und all-trans-Retinsäure (Marill et al., 2000) Substrate von CYP2C18. Eine Expression von CYP2C18 wird in gesunden wie auch maligne entarteten

Gewebe gefunden. Im normalen Gewebe wurde CYP2C18 in der Leber (Furuya et al., 1991), in der Haut (Zaphiropoulos et al., 1997), im Gehirn, im Uterus, in der Mamma, in der Niere sowie im Duodenum gefunden (Klose et al., 1999). Außerdem wurde CYP2C18 in lymphoblastoiden Zelllinien nachgewiesen (Roy et al., 1999).

1.4.3. Das *CYP2C18*-Gen

Das *CYP2C18*-Gen besteht aus 9 Exons und 1473 Basenpaaren (de Morais et al., 1993). Wie viele andere Cytochrome hat auch *CYP2C18* einen polymorphen Charakter. Schon bei der Erstbeschreibung des Gens wurde ein Polymorphismus an Position 1154 der cDNA erwähnt (C zu T), der einen Aminosäurewechsel von Threonin zu Methionin an Position 385 zur Folge hat (Romkes et al., 1991). Dieser Polymorphismus wurde auch von weiteren Autoren beschrieben (Kaminsky et al., 1993, Goldstein et al., 1994) und ist auch Thema dieser Arbeit. Chang et al. beschreiben für die 4-Hydroxylierung von Cyclophosphamid und Ifosfamid deutliche Unterschiede in der Enzymkinetik der beiden Varianten CYP2C18-Met³⁸⁵ und CYP2C18-Thr³⁸⁵. Dabei zeigt CYP2C18-Thr³⁸⁵ für das Substrat Ifosfamid eine höhere Affinität, woraus eine 6mal höhere katalytische Aktivität der Thr-Variante im Vergleich zur Met-Variante resultiert. Die Variante CYP2C18-Met³⁸⁵ hingegen wies bei der Metabolisierung von Cyclophosphamid sowohl eine höhere Maximalgeschwindigkeit der Enzymreaktion als auch eine höhere Michaelis-Konstante als die *CYP2C18*-Thr³⁸⁵ Variante auf, so dass insgesamt in der katalytischen Effizienz für das Substrat Cyclophosphamid kein Unterschied zwischen den beiden Allelen festzustellen war (Chang et al., 1997), siehe auch Abschnitt 5.3.2. Da sowohl Cyclophosphamid als auch Ifosfamid bedeutende Substanzen im BFM-Protokoll für ALL-Ersterkrankungen (ALL-BFM) und ALL-Rezidiven (ALL-REZ BFM) sind, ist es wichtig, die Wirkung dieses Polymorphismus im *CYP2C18*-Gen in diesem Zusammenhang näher zu betrachten.