

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie  
der Universität Hamburg  
Direktor: Prof. Dr. T. Eschenhagen

---

**Hochdosis-Chemotherapie mit Methotrexat bei Kindern  
mit akuter lymphoblastischer Leukämie:  
Einfluss von *ABCC2*-Polymorphismen  
auf die Methotrexat-Plasmakonzentration**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
im Fachbereich der Medizin  
der Universität Hamburg

vorgelegt von  
Birgit Erney  
geboren in Fürth

Hamburg 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 09.02.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Th. Eschenhagen

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof. Dr. T. Brümmendorf

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. Dr. R. Schneppenheim

Meiner Mutter

# **Inhaltsverzeichnis**

1. Einleitung.....	1
1.1. Akute lymphoblastische Leukämie im Kindesalter.....	1
1.2. Diagnostik.....	1
1.3. Therapie.....	3
1.4. Methotrexat-Hochdosistherapie in der ALL-Therapie.....	5
1.4.1. Therapeutischer Einsatz.....	5
1.4.2. Pharmakodynamik.....	5
1.4.3. Pharmakokinetik.....	7
1.5. Unterschiede in der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik.....	8
1.5.1. Altersspezifische Unterschiede.....	8
1.5.2. Geschlechtsspezifische Unterschiede.....	8
1.5.3. Interindividuelle Unterschiede.....	9
1.5.4. Intraindividuelle Unterschiede.....	9
1.5.5. Einfluss der Zeit.....	10
1.6. Resistenzmechanismen.....	10
1.7. Interaktionen.....	11
1.7.1. Einfluss von MTX auf die Pharmakodynamik von Arzneimitteln.....	13
1.8. Flüssigkeitsbilanz und Urin-Alkalisierung.....	13
1.9. Unerwünschte Arzneimittelwirkungen.....	13
1.10. Transporter.....	15
1.10.1. ABCC-Subfamilie.....	16
1.10.2. ABCC2-Gen und MRP2-Protein.....	16
1.10.2.1. Struktur.....	16

1.10.2.2. Lokalisation.....	17
1.10.2.3. Substratspezifität.....	18
1.10.2.4. Dubin-Johnson-Syndrom.....	19
1.11. Polymorphismen als Ursache der Variabilität der Pharmakokinetik von MTX....	20
2. Patienten, Material und Methoden.....	22
2.1. Patienten.....	22
2.2. Datenbank.....	24
2.3. DNS-Isolation aus Vollblut.....	25
2.4. DNS-Isolation aus Knochenmark.....	25
2.5. Photometrie.....	26
2.6. Polymerasekettenreaktion und Genotypisierung.....	26
2.6.1. Versuchsdurchführung.....	27
2.6.2. Methodenoptimierung.....	29
2.8. Restriktionsverdau.....	32
2.8.1. Theoretischer Hintergrund.....	32
2.8.2. Versuchsdurchführung.....	32
2.9. Agarose-Gelelektrophorese.....	35
2.10. Statistische Auswertung.....	36
2.11. Verwendete Reagenzien.....	36
2.12. Verwendete Geräte.....	36
3. Ergebnisse.....	38
3.1. Polymorphismus c.-24C>T in Exon 1 (rs717620).....	38
3.2. Polymorphismus c.1249G>A in Exon 10 (rs2273697).....	39
3.3. Polymorphismen c.2780T>G und c.2883+11C>T in Exon 21 bzw. Intron 21.....	40

3.4. Polymorphismen c.3298C>T und c.3299G>A in Exon 24.....	40
3.5. Polymorphismus c.3844-73A>G in Intron 27.....	41
3.6. Polymorphismus c.3972C>T in Exon 28 (rs3740066).....	42
3.7. Zweikompartimentenanalyse.....	43
3.8. Plasmakonzentrationen.....	44
3.9. MTX-Konzentration und Alter.....	47
3.10. MTX-Konzentration und Körperoberfläche.....	48
3.11. MTX-Konzentration und ABCC2 Polymorphismen.....	49
3.11.1. c.-24C>T Polymorphismus.....	49
3.11.2. Zweikompartiment-Analyse der MTX-Kinetik unter Einbeziehung der Variablen Geschlecht und c.-24C>T Polymorphismus.....	52
3.11.3. Weitere Polymorphismen: Polymorphismus c.1249G>A in Exon 10, Polymorphismus c.2883+11C>T in Exon 21 und Polymorphismus c.3844-73A>G in Intron 27.....	53
3.11.3.1. Polymorphismus c.1249G>A in Exon 10 (rs 2273697).....	53
3.11.3.2. Die haplotypisch gekoppelten Polymorphismen c.3844-73A>G in Intron 27, c.4146+11G>C in Intron 29, c.4290G>T in Exon 30, c.448C>T in Exon 31, c.4508+12G>A in Intron 31 und c.4544G>A in Exon 32.....	54
3.11.3.3. Polymorphismus c.3972C>T in Exon 28 (rs 3740066).....	55
4. Diskussion.....	57
5. Ausblick.....	62
6. Zusammenfassung.....	63
6.1. Hintergrund und Ziele.....	63
6.2. Methoden.....	63
6.3. Ergebnisse.....	63
6.4. Praktische Schlussfolgerungen.....	63

7. Literaturverzeichnis.....	65
8. Internetquellen.....	73
9. Abkürzungsverzeichnis.....	74
10. Danksagung.....	76
11. Lebenslauf.....	77

## **1. Einleitung**

Bei Kindern die an akuter lymphoblastischer Leukämie erkranken, wird im Rahmen der Chemotherapie nach den gegenwärtig gebräuchlichen Protokollen eine Hochdosistherapie mit Methotrexat (MTX) durchgeführt. Zur Limitierung der Toxizität werden zu definierten Zeitpunkten die MTX-Konzentrationen im Blut bestimmt, um eine an die Plasmakonzentrationen angepasste Rescue-Strategie durchzuführen. Dabei zeigen sich immer wieder hohe Konzentrationsunterschiede, sowohl inter- als auch intraindividuell. Da MTX u.a. über den Arzneimitteltransporter MRP2 ausgeschieden wird, stellt sich in dieser Arbeit die Frage, ob und inwieweit genetische Polymorphismen im ABCC2-Gen die Elimination von MTX beeinflussen.

### **1.1. Akute lymphoblastische Leukämie im Kindesalter**

Die akute lymphoblastische Leukämie ist die häufigster Krebserkrankung im Kindesalter und macht etwa ein Drittel aller neoplastischen Erkrankungen in dieser Altersgruppe aus. Die Inzidenz beträgt 3,3 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner unter 15 Jahren. Der Häufigkeitsgipfel der Altersverteilung liegt zwischen dem zweiten und fünften Lebensjahr. Das Verhältnis von Jungen zu Mädchen beträgt 1,2 : 1. Die Überlebensrate beträgt heute in Abhängigkeit von den initialen Risikofaktoren im Mittel 80%.

Die Hauptsymptome lassen sich vor allem durch die Knochenmarksinsuffizienz erklären. Dazu gehören: Blässe, Abgeschlagenheit, Blutungsneigung (Petechien) und Infektzeichen (Fieber). Des Weiteren finden sich häufig Hepatosplenomegalie und eine Lymphadenopathie. In 20% der Fälle klagen die Patienten über Knochen- und Gelenkschmerzen. Durch die daraus resultierenden Schwierigkeiten beim Gehen besteht die Gefahr von Fehldiagnosen wie Verstauchung oder rheumatoide Arthritis. Bei einigen Kindern kommt es zu einer, meist einseitigen, Hodenschwellung oder Hautinfiltraten. Bei einem Befall des zentralen Nervensystems können Symptome wie Kopfschmerzen oder Hirnnervenausfälle hinzutreten.

### **1.2. Diagnostik**

Die Diagnose wird durch die Knochenmarkspunktion in Verbindung mit dem Blutbild gestellt. Definitionsgemäß muss der Anteil der Blasten im Knochenmark an den kernhaltigen Zellen über 25% sein, sonst liegt ein Non-Hodgkin-Lymphom vor. Die Einteilung nach dem Immunphänotyp wird folgendermaßen vorgenommen:

- B- Vorläufer-ALL: pro-B-ALL, common ALL (c-ALL), prä-B-ALL
- B-ALL
- T-ALL: frühe T-ALL, intermediäre (kortikale) T-ALL, reife T-ALL



Zum Ausschluss eines ZNS-Befalls ist eine Liquorpunktion zwingend notwendig (<http://leitlinien.net/025-014.htm>)

ALL-Leukämiezellen weisen in 20% der Fälle zusätzlich zu den lymphatischen Merkmalen auch myeloische Marker auf. Durch Impulszytrophotometrie kann der DNS-Gehalt der Blasten bestimmt werden. Ein erhöhter DNS-Index ( $\geq 1,16$ ) ist mit einer besseren Prognose assoziiert (Schrappe et al. 2000).

Die drei wichtigsten tumorzytogenetischen Veränderungen sind die Translokationen t(9;22), t(4;11) und t(12;21). Die reziproke Translokation t(9;22) führt zu einer Verbindung des BCR-Gens (breakpoint cluster region) von Chromosom 22 mit ABL-Gen (Abelson), welches sich auf Chromosom 9 befindet. Das Fusionsprotein ist eine Proteinkinase, die Signalwege verändert, die für die Proliferation, das Überleben und die Selbsterneuerung von hämatopoetischen Stammzellen wichtig sind. Das Fusionsprotein der Translokation t(4;11), das aus dem N-terminalen Anteil von MLL (mixed-lineage leukemia, Gen auf Chromosom 11) und dem C-terminalen Anteil von AF4 (ALL1-verbundenes Gen von Chromosom 4) besteht, beeinträchtigt die Expressionsmuster von Homeobox-Genen. Dies führt letztendlich zu einer Schädigung der Selbsterneuerung und des Wachstums von hämatopoetischen Stammzellen. Die Translokation t(12;21) hat ein Fusionsgen aus dem 5'-Ende des TEL-Gens (translocation-ETS-leukemia, Chromosom 12) und nahezu der gesamten kodierenden Region des AML1-Gens (Transkriptions-Faktor-Gen, encodiert eine alpha-Untereinheit eines kernbindenden Faktors, einem wichtigen Regulator der Formation der hämatopoetischen Stammzelle) von Chromosom 21 zur Folge. Das entstehende Fusionsprotein hemmt die transkriptionale Aktivität, die normalerweise durch AML 1 gesteuert wird. Es kommt zu einer Schädigung der Selbsterneuerungskapazität und der Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen. Diese genetischen Veränderungen sind für die Prognose wichtig. Eine Hyperdiploidie (mehr als 50 Chromosomen pro Leukämiezelle) und die Translokation t(12;21) mit dem TEL-AML1-Fusionsgen bei der B-Vorläuferzell-ALL deuten beispielsweise auf eine sehr gute Prognose hin. Dies ist in 50% der ALL im Kindesalter der Fall. Mit einer schlechten Prognose geht die ALL ein, die eine Translokation t(4;11) mit dem Entstehen des MLL-AF4 Fusionsgen ausweist. Dieses ist v.a. bei ALL im Säuglingsalter zu finden (50%). Einen Einfluss des Alters auf den prognostischen Effekt der genetischen Abnormität zeigt die Translokation t(9;22) mit dem BCR-ABL Fusionsgen. Kinder im Alter zwischen einem und neun Jahren haben im Vergleich zu Jugendlichen mit dem gleichen Fusionsgen eine bessere Prognose (Pui et al. 2006; Pui et al. 2004).

### 1.3. Therapie

Die Therapie der ALL erfolgt in Deutschland zumeist nach dem Protokoll der Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) Studie. Ziel der BFM-Studie ist die Rezidivrate und die Morbidität zu senken und gleichzeitig die Risiken und Langzeitfolgen der Therapie zu minimieren. Durch die Entwicklung der Behandlungsprotokolle stieg die Wahrscheinlichkeit für ein rezidivfreies Überleben für acht Jahre zwischen 1981 und 1990 von 65,8% (ALL-BFM 81) auf 75,9% (ALL-BFM 90) (Schrappé et al. 2000). Daneben existiert auch die COALL-Studie.

Die Stratifizierung in der ALL-BFM 2000 Studie erfolgt neben immunologischen Markern vorwiegend auf der Basis des Ansprechens auf die initiale Phase der Chemotherapie. In einer Präphase wird Prednison für sieben Tage unter stetiger Erhöhung der Dosis bis zu 60 mg/m<sup>2</sup> gegeben. An Tag 8 wird dann im peripheren Blut die Anzahl der leukämischen Blasten bestimmt. Ist diese  $\geq 1000/\mu\text{l}$  fällt der Patient in die Gruppe der sogenannten Prednison poor responder (PRP), die ein höheres Rezidivrisiko haben als die Prednison good responder (PGR). Nach 33 Tagen Induktionstherapie wird die Knochenmarksremission beurteilt. Die vollständige Remission ist definiert als M1-Mark mit weniger als 5% Blasten im Knochenmark bei normaler oder gering vermindelter Zellularität im Knochenmark, dem Fehlen von lokalisierten Leukämie-Infiltraten und von Leukämiezellen im Liquor. Außerdem wird während der Induktionstherapie an Protokolltag 33 und vor Protokoll M (Konsolidierungstherapie) das Ansprechen der Leukämie auf die Therapie untersucht. Hierfür wird die minimale Resterkrankung (MRD = minimal residual disease) bestimmt. Dies sind die nach dem Erreichen einer Remission verbleibenden residuellen Zellen eines malignen Tumors. Aus diesen Ergebnissen erfolgt die Einteilung in eine der drei Risikogruppen, die folgendermaßen definiert sind:

Risikogruppe	Kriterien für die Eingruppierung
Standard Risiko (SR)	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Gutes Ansprechen auf Prednison</li><li>2. Zytomorphologisch komplette Remission an Tag 33</li><li>3. Kein Nachweis der Translokation t(9;22) oder t(4;11) bzw. der Fusionsgene BCR/ABL oder MLL/AF4</li><li>4. MRD negativ an Tag 33 und vor Protokoll M</li></ol> <p>Alle vier Kriterien müssen erfüllt sein, damit der Patient der Risikogruppe SR zugeordnet wird.</p>

Risikogruppe	Kriterien für die Eingruppierung
Mittleres Risiko (MR)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Gutes Ansprechen auf Prednison</li> <li>2. Zytomorphologisch komplette Remission an Tag 33</li> <li>3. Kein Nachweis der Translokation t(9;22) oder t(4;11) bzw. der Fusionsgene BCR/ABL oder MLL/AF4</li> <li>4. Kein Standardrisiko-MRD Kriterium liegt vor (d.h. MRD negativ an Tag 33 und vor Protokoll M)</li> <li>5. Kein Hochrisiko-MRD Kriterium liegt vor (d.h. MRD vor Protokoll <math>\leq 10^{-3}</math>)</li> </ol>
Hochrisiko (HR)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Schlechtes Ansprechen auf Prednison</li> <li>2. Zytomorphologisch inkomplette Remission an Tag 33</li> <li>3. Nachweis der Translokation t(9;22) bzw. des Fusionsgenes BCR/ABL</li> <li>4. Nachweis der Translokation t(4;11) bzw. des Fusionsgenes MLL/AF4</li> <li>5. MRD vor Protokoll M <math>\geq 10^{-3}</math> (hohes Niveau an Resterkrankung)</li> </ol> <p>Ein Kriterium reicht für die Einstufung in die Risikogruppe HR.</p>

Tabelle 1: Kriterien der Risikogruppen (aus dem ALL-BFM 2000 Protokoll)

Die Chemotherapie besteht aus vier Phasen. In der ersten Phase (Induktionstherapie) wird der Patient mit einer Kombination aus Prednison oder Dexamethason mit Vincristin, Daunorubicin, Asparaginase, Methotrexat, Cyclophosphamid, Cytarabin und 6-Mercaptopurin behandelt. Ziel der Induktionstherapie ist v.a. die Eradikation von mehr als 99% der anfänglich vorhandenen Leukämie-Zell>Last. Inzwischen liegt die Rate der kompletten Remission bei 98% der Patienten (Pui et al. 2006). Daran schließt sich in der Konsolidierungsphase eine Hochdosistherapie mit Methotrexat und 6-Mercaptopurin an. Etwa zwei Wochen nach Ende der Induktionstherapie und nach ausreichender hämatologischer Rekonstitution werden im Abstand von zwei Wochen vier Hochdosisinfusionen mit Methotrexat verabreicht. In der darauf folgenden Reduktionsphase bekommen die Patienten Dexamethason, Asparaginase, Doxorubicin, Vincristin, Cytarabin, Cyclophosphamid und Thioguanin. Als Erhaltungstherapie wird 6-Mercaptopurin und Methotrexat p.o. über 24 Monate gegeben.

In einigen Fällen ist eine allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation nötig. Indikationen hierfür sind: Translokation t(9;22) bzw. BCR/ABL-Rekombination, Translokation t

(4;11) bzw. MLL/AF4-Rekombination,  $\geq 5\%$  Blasten im Knochenmark nach Induktionstherapie, schlechtes frühes Ansprechen ( $> 1000$  Blasten im Blut an Tag 8) und den zusätzlichen Faktoren Leukozyten  $> 100.000/\text{mm}^3$  und einer ALL vom immunologischen T- oder pro-B-Typ.

Bei Patienten der Hochrisiko-Gruppe, mit T-ALL oder ZNS-Befall erfolgt auch eine präventive bzw. kurative Schädelbestrahlung. Da die Radiatio des Schädels jedoch sowohl akute als auch chronische Komplikationen (u.a. Zweittumoren) zur Folge haben kann, wurde sie größtenteils durch intrathekale Chemotherapie ersetzt. Zu diesem Zweck wird zu definierten Therapiezeitpunkten eine intrathekale Applikation von MTX vorgenommen. Lediglich bei Hochrisiko-Patienten kann auf die kraniale Radiatio nicht verzichtet werden. Die Dosierung bewegt sich zwischen 12 und 18 Gy.

#### **1.4. Methotrexat-Hochdosistherapie in der ALL-Therapie**

Die Hochdosistherapie mit MTX im Rahmen der ALL-Therapie im Kindesalter wurde 1986 zum ersten Mal im ALL-BFM-Protokoll eingesetzt.

##### 1.4.1. Therapeutischer Einsatz

In niedriger Dosierung wird MTX z.B. bei rheumatoider Arthritis und Psoriasis gegeben. Im Rahmen der Tumorthherapie hat MTX sich vor allem bei der Behandlung der akuten lymphoblastischen Leukämie, des Osteosarkoms, des non-Hodgkin-Lymphoms, des Chorion- und Mammakarzinoms bewährt. Die intrathekale Gabe wird bei meningealen Leukämien, Lymphomen und der Meningitis carcinomatosa angewandt. Die Dosierungen in der Tumorthherapie variieren zwischen 20 - 60  $\text{mg}/\text{m}^2$  bis 12000  $\text{mg}/\text{m}^2$  pro Tag.

##### 1.4.2. Pharmakodynamik

MTX ist ein Folsäure-Antagonist, der sich von Folsäure durch eine 4-NH<sub>2</sub>-Gruppe und eine Methylgruppe am N10-Atom unterscheidet. Dadurch bindet Methotrexat mit 10<sup>5</sup>-fach höherer Affinität als das natürliche Substrat Dihydrofolat an das katalytische Zentrum der Dihydrofolat-Reduktase und blockiert somit seine Aktivität.

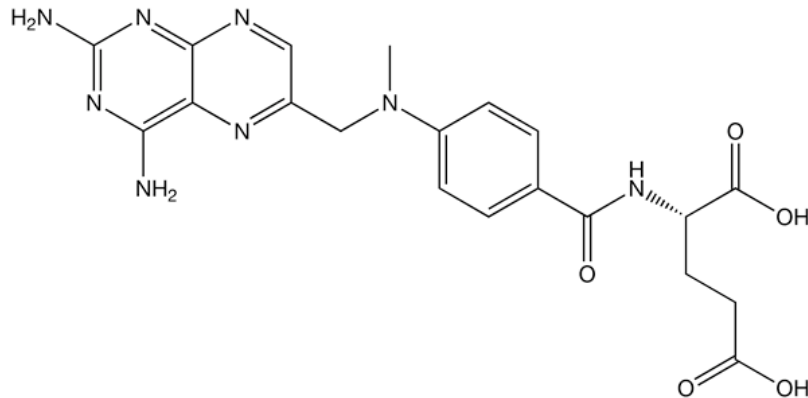


Abbildung 1: Strukturformel von Methotrexat

MTX hemmt die Dihydrofolat-Reduktase nahezu aller Spezies. Im Gegensatz dazu inhibieren Trimethoprim und Pyrimethamin relativ selektiv die Dihydrofolat-Reduktase von Bakterien bzw. Parasiten, während das menschliche Enzym kaum beeinflusst wird. MTX ist hydrophil und wird durch spezifische Transporter in die Zelle aufgenommen. Dort wird es durch Anheftung von Polyglutamatresten modifiziert. Polyglutamiertes MTX (MTX-(Glu)<sub>n</sub>) kann die Zelle nur schlecht verlassen und kumuliert daher intrazellulär. Die (MTX-(Glu)<sub>n</sub>) Derivate tragen wesentlich zur Wirkung von MTX bei (Masson et al. 1996).

MTX interagiert mit dem C1-Stoffwechsel, der für die Synthese von Thymidin, Purin, Methionin und Serin essentiell ist (Forth et al. 2001). Bei der Synthese von Desoxythymidinmonophosphat (dTMP) durch die Thymidylat-Synthase wird von N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-Methylen-Tetrahydrofolsäure (5,10-Methylen-FH<sub>4</sub>) ein C1-Rest auf Desoxyuridinmonophosphat (dUMP) übertragen. Um anschließend erneut für eine C1-Übertragung zur Verfügung zu stehen, muss Dihydrofolat durch die Dihydrofolat-Reduktase in FH<sub>4</sub> umgewandelt werden. Dieser Prozess wird durch MTX gehemmt. Polyglutamiertes MTX blockiert auch den C1-Transfer bei der de novo Synthese von Purinen. Bei diesem Prozess ist allerdings nicht die direkte Hemmung der Dihydrofolat-Reduktase entscheidend, sondern die Inhibition von Enzymen, die für die Formylierung von Zwischenprodukten der Purinsynthese notwendig sind. Zusätzlich hemmen MTX und MTX-Polyglutamate die 5-Amino-4-Imidazolcarboxamid Ribotid (AICAR) Transformylase (AICAR-TFase). Dieses Enzym katalysiert die Reaktion 10-Formyl-Tetrahydrofolsäure + AICAR → 5'-Phosphoribosyl-5-Formamido-4-Imidazol-Carboxamid (Formyl-AICAR). Formyl-AICAR ist ein Zwischenprodukt bei der de novo Synthese von Purinen (Allegra et al. 1985).

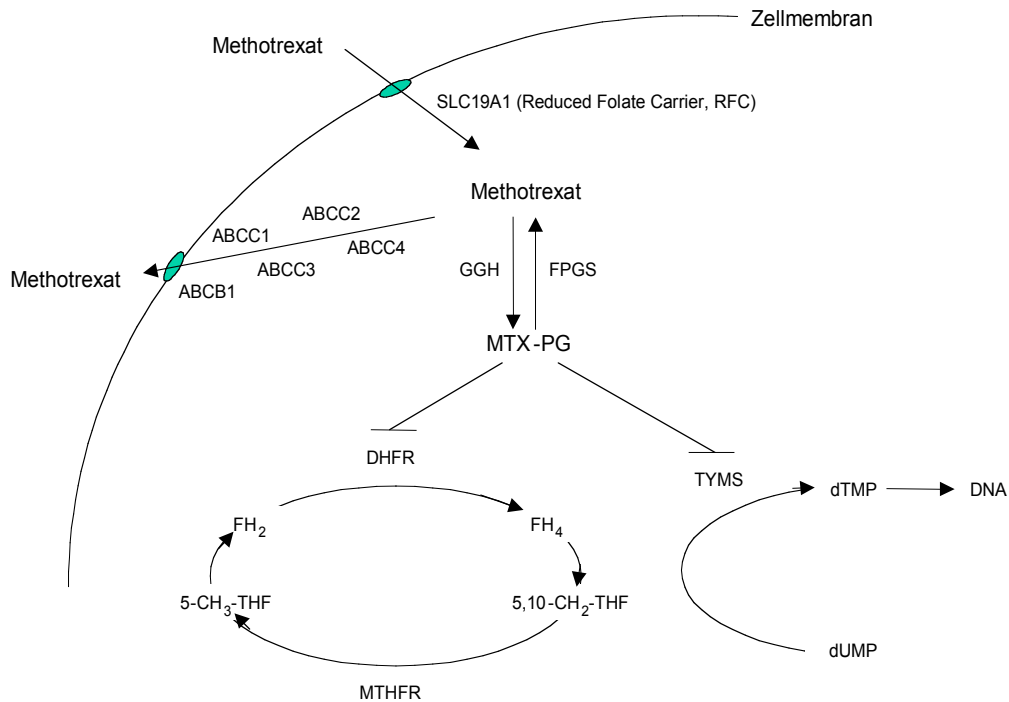


Abbildung 2: Pharmakodynamik von MTX (nach Ranganathan et al. 2004)

SCL: Solute carrier

ABC: ATP-binding cassette

GGH:  $\gamma$ -Glutamyl-Hydrolase

FPGS: Folylpolylglutamyl-Synthase

MTX-PG: polyglutamiertes MTX

DHFR: Dihydrofolat-Reduktase

FH<sub>4</sub>: Tetrahydrofolsäure

TYMS: Thymidylat-Synthase

FH<sub>2</sub>: Dihydrofolsäure

dTMP: Desoxythymidinmonophosphat

DNS: Desoxyribonukleinsäure

dUMP: Desoxyuridinmonophosphat

5,10-CH<sub>2</sub>-THF: N<sub>5</sub>,N<sub>10</sub>-Methylen-Tetrahydrofolsäure

MTHFR: Methylen-Tetrahydrofolsäure-Reduktase

5-CH<sub>3</sub>-THF: N<sub>5</sub>-Methylen-Tetrahydrofolsäure

### 1.4.3. Pharmakokinetik

In Dosen unter 25 mg/m<sup>2</sup> wird MTX gut aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert, in höheren Dosierungen ist eine intravenöse Gabe erforderlich, da die Aufnahme aus dem Darmtrakt einer Sättigungskinetik unterliegt (Calabresi et al. 1999). In der Infusionstherapie von MTX (Dosis > 1,5 g/m<sup>2</sup>) werden Plasmaspitzenpiegel von 0,1 - 1,0 mM erreicht. MTX liegt zu circa 50% an Plasmaproteine gebunden vor. Die Elimination erfolgt nach intravenöser Gabe in einer dreiphasigen Kinetik aus dem Plasma. Die erste Phase wird durch die schnelle Verteilung im zentralen Kompartiment bestimmt. Daran schließt sich die renale Elimination der unveränderten Substanz ( $\alpha$ -Halbwertszeit: ein bis drei Stunden). In der dritten Phase kommt es zu einer Umverteilung von tieferen Kompartimenten (z.B. Gastrointestinaltrakt) in zentrale Kompartimente ( $\beta$ -Halbwertszeit: acht bis zehn Stunden). Von der resorbierten Substanz werden bei geringer Dosis (2,5 - 15 mg/kg) zwischen 40% und 50% und bei

höherer Dosis (150 µg/kg) etwa 90% unverändert innerhalb von 48 Stunden im Urin ausgeschieden. Ein geringer Anteil (10%) wird biliär eliminiert. Der Hauptmetabolit von MTX ist 7-Hydroxy-MTX (7-OH-MTX). Dem Metabolismus kommt bei der Clearance nur eine untergeordnete Bedeutung zu. 7-OH-MTX besitzt jedoch wie auch MTX selbst, die Fähigkeit im distalen Tubulus der Niere zu präzipitieren. Dies hat eine Abnahme der renalen Clearance von MTX zur Folge, wodurch die MTX-Plasmakonzentration zunimmt und das Risiko einer erhöhten Toxizität besteht (Aquerreta et al. 2002). Eine weitere Interferenz könnte durch die Konkurrenz von MTX und 7-OH-MTX um Arzneimitteltransporter auftreten.

## **1.5. Unterschiede in der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik**

### 1.5.1. Altersspezifische Unterschiede

Pharmakokinetische Parameter bei Kindern können nicht mit denen von Erwachsenen gleichgesetzt werden. Nicht nur der Körperbau unterscheidet sich zwischen Erwachsenen und Kindern, sondern auch die Absorption und Elimination der Medikamente sowie die Aktivität von Enzymen und Transportsystemen. Bei MTX beobachtete man einen Abfall der Clearance ab höheren Dosen je älter die Patienten waren. Dies mag damit zusammenhängen, dass das Alter mit der Kreatinin Clearance korreliert, die wiederum eine positive Korrelation mit der MTX Clearance zeigt (Bressolle et al. 1997). Auch pharmakodynamische Unterschiede sind bekannt, so tolerieren Kinder z.B. höhere Dosen des Zytostatikums Paclitaxel als Erwachsene, obwohl die Pharmakokinetik ähnlich ist (Sonnichsen et al. 1994). Infolgedessen sind pharmakokinetische Studien an Kindern wichtig für das Design einer optimalen Chemotherapie. Aus logistischen und ethischen Gründen sind Studien an Kindern jedoch schwieriger durchzuführen.

### 1.5.2. Geschlechtsspezifische Unterschiede

Eine Studie, die die Pharmakokinetik und -dynamik von per os applizierten MTX, 6-Mercaptopurin und Thioguanin untersuchte, stellte fest, dass die MTX-AUCs bei Mädchen um 30% höher waren als bei Jungen, die die dieselbe Dosis erhielten (Balis et al. 1998).

MTX-AUC [µmol x h/L] Mädchen	MTX-AUC [µmol x h/L] Jungen	P-Wert
4,0 (1,9 - 12)	3,0 (1,1 - 9,4)	0,0074

Tabelle 2: MTX-AUC in Abhängigkeit vom Geschlecht

Der Mechanismus, der diesem Phänomen zugrunde liegt, ist noch unklar, diskutiert wird z.B. ein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Carrier-vermittelten Absorption. Ob Mädchen

auf Grund der stärkeren MTX-Exposition bessere Heilungschancen haben, kann aus dieser Studie allerdings nicht geschlussfolgert werden, da eine Beziehung zwischen der AUC und den Heilungschancen nicht untersucht wurde. In einer Studie von Wall et al. wurde der Effekt einer individuellen Hochdosis-MTX-Therapie bei Kindern mit einem Rezidiv einer ALL untersucht. Hierbei zeigte sich bezüglich des Geschlechts ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer niedrigen MTX-Clearance und dem weiblichen Geschlecht. Die Autoren diskutierten diese Tatsache als Ursache der besseren Heilungschancen von Mädchen (Wall et al. 2000).

Schmiegelow et al. fanden bei Jungen höhere MTX-Spiegel in Erythrozyten als bei Mädchen (Schmiegelow et al. 2003). Die intrazelluläre MTX-Konzentration hängt von der Aufnahme in die Zelle und der Polyglutaminierung ab. Im Gegensatz dazu, ist die AUC von MTX, wie sie bei der Studie von Balis als Parameter verwendet wurde, mit der Bioverfügbarkeit und der Elimination assoziiert. Es wäre also möglich, dass die niedrigeren MTX-AUCs bei männlichen Patienten damit zusammenhängen, dass bei ihnen mehr polyglutaminiertes MTX intrazellulär verbleibt.

### 1.5.3. Interindividuelle Unterschiede

Interindividuelle Unterschiede in Arzneimittelkonzentrationen oder Wirkungen werden häufig durch genetische Polymorphismen verursacht, die sich in Genen befinden, die für Rezeptoren, Ionenkanäle und Enzyme kodieren. Genetische Varianten von Enzymen des Arzneistoffmetabolismus und Arzneimitteltransportes wirken indirekt über die Pharmakokinetik auf die Effektivität einer Arzneitherapie. Polymorphismen in den Zielmolekülen beeinflussen die Wirksamkeit der Arzneimittel direkt und können ein breites Spektrum an Folgen haben, das von einer Unwirksamkeit bis hin zu schweren überdosierungsbedingten Nebenwirkungen reichen kann. Besonders intensiv hat man in diesem Zusammenhang bereits das Cytochrom P-450 Enzymsystem untersucht.

### 1.5.4. Intraindividuelle Unterschiede

Bei einigen Patienten wird beobachtet, dass die MTX Spitzenspiegel der einzelnen Zyklen stark variieren. Deshalb kann aus dem ersten MTX Spitzenspiegel nicht zwingend auf die Medikamentenexposition der gesamten Therapie geschlossen werden. Warum es diese intraindividuellen Unterschiede gibt, kann mit dem aktuellen Wissensstand leider nicht vollständig erklärt werden. Es gibt jedoch einige Studien, die sich mit diesem Phänomen bereits beschäftigen. Der Hauptmetabolit von MTX ist 7-Hydroxy-MTX. 1985 konnten Erttmann et al. bei Osteosarkom-Patienten, die MTX in einer Dosierung von 12 g/m<sup>2</sup> über vier Stunden erhielten, nicht nur eine interindividuelle sondern auch eine starke intraindividuelle Variabilität nachweisen (Erttmann et al. 1985). Die Konzentrationen von 7-



Hydroxy-MTX sanken bei steigender Zykluszahl. Dieses Erkenntnis steht allerdings im Gegensatz zu einer Untersuchung von Lankelma et al., die auf Grund von Enzyminduktion eine vermehrte Produktion von 7-Hydroxy-MTX pro Zyklus vermuteten (Lankelma et al. 1980).

Shibayama et al. untersuchten bei Ratten den Effekt der MTX-Therapie auf die Expressionslevel von einigen Arzneimitteltransportern, darunter auch MRP2. Sie wollten damit eine Erklärung für die intraindividuelle Variabilität der MTX-Plasmakonzentrationen finden. Einen Tag nach der Injektion von 150 mg/kg zeigten sich keine signifikanten Veränderungen in der Expression der Transporter. Nach vier Tagen fand sich eine Reduktion der Expression von MRP2 in der Leber und im Ileum, nicht jedoch an der Niere (Shibayama et al. 2006). Ob diese Ergebnisse auch auf den Menschen zutreffen, bleibt noch abzuwarten. Es ist allerdings ein Ansatz, die Ursachen der intraindividuellen Variabilität zu erklären.

#### 1.5.5. Einfluss der Zeit

Dieselbe Studie, die die geschlechtsspezifischen Unterschiede bezüglich der AUC nach oraler Aufnahme von MTX feststellte, untersuchte auch die Veränderung der AUC über die Zeit (Balis et al. 1998). Hierbei konnte kein Effekt der Zeit beobachtet werden, da es weder einen Anstieg noch einen Abfall der AUC von MTX über den Zeitraum der Dauertherapie gab. Interessanterweise fand man aber eine unterschiedliche Clearance am Tag und in der Nacht. Bei einigen Kindern mit ALL verringerte sich die renale Clearance von MTX in der Nacht. Dieser tagesabhängige Effekt könnte mit einer reduzierten tubulären Sekretion in der Nacht zusammenhängen, wenn der Urin-pH niedriger ist. Hierfür gibt es derzeit jedoch noch keine aussagekräftigen Studien. Eine Folge für die Chemotherapie könnte sein, dass MTX eher nachts appliziert werden könnte, um somit höhere Konzentrationen zu erreichen (Ferrazzini et al. 1991; Koren et al. 1992).

#### **1.6. Resistenzmechanismen**

Die Resistenz gegenüber MTX ist multifaktoriell. Diskutierte Mechanismen sind eine Verminderung des hochaffinen Membrantransporters, Reduktion der Affinität von MTX zur Dihydrofolat-Reduktase, Zunahme der Dihydrofolat-Reduktasespiegel durch Genamplifikation und Reduktion der MTX-Polyglutamatbildung.

Um die toxischen Folgen der Hochdosis-MTX-Therapie zu minimieren, wird in der Therapie zwingend Formyltetrahydrofolsäure (Leukovorin) gegeben. Leukovorin blockiert die Wirkung von MTX in den gesunden Zellen, in die es über aktiven Transport gelangt (sogenannte Rescue-Therapie). In Tumorzellen antagonisiert Leukovorin die MTX-Wirkung aus nicht endgültig geklärten Ursachen nur in geringem Umfang.

## **1.7. Interaktionen**

Interaktionen zwischen Medikamenten sind besonders bei einer Polychemotherapie zu beachten. Es existieren viele Pharmaka, die bei gleichzeitiger Applikation die Wirkung oder Konzentrationen von MTX entweder abschwächen oder erhöhen. Ebenso nimmt MTX Einfluss auf den Stoffwechsel von Medikamenten. Die Wirkung organischer Säuren auf den Anteil des freien MTX wurde schon in einigen Studien untersucht (Liegler et al. 1969; Paxton 1984; Evans et al. 1985; Gewirtz et al. 1985; Ferrazzini et al. 1990). Diese Säuren, wie Sulfamethoxazol, Salicylate und Probenecid erhöhen den Anteil des freien MTX durch eine Verdrängung aus der Plasmaproteinbindung und erniedrigen zudem die renale Sekretion durch Konkurrenz um den Transporter. Gerade bei Trimethoprim-Sulfamethoxazol hatte diese Erkenntnis wichtige Folgen. Das Antibiotikum wird bei der Behandlung der ALL als *Pneumocystis carinii* Prophylaxe verwendet. Während der Hochdosistherapie mit MTX muss Trimethoprim-Sulfamethoxazol abgesetzt werden. In vitro wurde auch eine Konkurrenz um die Proteinbindung zwischen MTX und Adriamycin, Bleomycin und Cyclophosphamid entdeckt (Coassolo et al. 1980). Teniposid, ein Topoisomerase-II-Hemmer, der in der Behandlung von malignen Lymphomen und anderen malignen Erkrankungen eingesetzt wird, erhöhte die intrazelluläre Akkumulation von MTX Polyglutamaten (Rodman et al. 1990). In vitro konnte dieser Effekt auch bei Vincristin festgestellt werden (Goldman et al. 1976). Bei Kindern mit einem ALL-Rezidiv konnte gezeigt werden, dass sich bei gleichzeitiger Gabe von Teniposid und MTX die systemische Clearance der beiden Medikamente nicht unterschied, der 48 Stunden Wert von MTX jedoch signifikant niedriger war. Es wird diskutiert, dass Teniposid die Konversion von MTX zu Polyglutamaten induziert (Rodman et al. 1990).

Im Folgenden soll Tabelle 3 einen Überblick über Arzneistoffe geben, die die Pharmakokinetik oder -dynamik von MTX beeinflussen.

Medikamente	Interaktionsmechanismus
Salicylate	Verdrängung aus der Plasmaproteinbindung
Amidopyrin-Derivate	
Phenylbutazon	
Phenytoin	
Barbiturate	
Tetrazykline	
Sulfonamide	
Doxorubicin	
Trimethoprim-Sulfamethoxazol	
Probenecid	
para-Aminobenzoessäure	
orale Antikonzeptiva	
Salicylate	
Nicht-steroidale Antiphlogistika	
para-Aminobenzoessäure	
Probenecid	
Penicillin	
Sulfonamide	
Cefalotin	
Glykopeptide	
Ciprofloxacin	
Trimethoprim-Sulfamethoxazol	
Omeprazol	Verzögerung der renalen Elimination
Aminoglykoside	Verstärkung der Nephrotoxizität
Cholestyramin	Erhöhung der nicht-renalen Elimination von MTX durch Unterbrechung des enterohepatischen Kreislaufes
Cisplatin	Verzögerung der renalen Clearance von MTX
Etoposid	Verzögerung des zellulären Effluxes von MTX

Medikamente	Interaktionsmechanismus
Etrenitat	Erhöhung der Serumkonzentration von MTX → erhöhte Hepatotoxizität
Vincristin	Erhöhung der zellulären Aufnahme von MTX

Tabelle 3: Arzneistoffe, die die Pharmakokinetik oder -dynamik von MTX beeinflussen (Fachinformation der Hersteller; [www.medizinimdialog.com/mid4\\_01/klinischRelev.htm](http://www.medizinimdialog.com/mid4_01/klinischRelev.htm); Suzuki et al. 2002; Beorlegui et al. 2000; Reid et al. 1993)

### 1.7.1. Einfluss von MTX auf die Pharmakodynamik von Arzneimitteln

MTX verstärkt die Wirkung von oralen Antikoagulanzen, da es die Prothrombinzeit verlängert und verlangsamt den Abbau und die Clearance von Theophyllin durch Konkurrenz an Adenosin-Rezeptoren ([http://rxlist.com/cgi/generic/theosr\\_ad.htm](http://rxlist.com/cgi/generic/theosr_ad.htm); [http://www.gelbe-liste.de/04\\_suche/glsuche.php?gl%5Bsm%5D=4&gl%5Bpraepdetail%5D=1&gl%5Bpraepnr%5D=474621](http://www.gelbe-liste.de/04_suche/glsuche.php?gl%5Bsm%5D=4&gl%5Bpraepdetail%5D=1&gl%5Bpraepnr%5D=474621)).

### 1.8. Flüssigkeitsbilanz und Urin-Alkalisierung

Um die Präzipitation von MTX und MTX-Metaboliten in der Niere zu verhindern, wird während der Hochdosistherapie eine standardisierte Infusionstherapie durchgeführt, die bilanziert wird. MTX ist bei niedrigem pH schwer wasserlöslich und kann in der Niere Kristalle bilden. Die Folge davon ist eine verringerte MTX-Elimination. Dadurch erhöht sich die Wahrscheinlichkeit von schweren Nebenwirkungen des Zytostatikums. Aus diesem Grund wird bei einem Urin-pH < 7 Natriumbicarbonat infundiert.

Bei einer Studie zur Erforschung des Effekts der Hydratation auf die MTX-Plasmakonzentrationen bei Kindern mit ALL wurde festgestellt, dass die Gesamtoxizität in beiden Gruppen zwar gleich war, aber die Nebenwirkungen in der besser infundierten Gruppe weniger schwer waren (6 vs. 16%) (Christensen et al. 1988). Eine andere Studie konnte zeigen, dass die Häufigkeit von toxischen MTX-Effekten bei besserer Flüssigkeitsbilanzierung und Harn-Alkalisierung von 26% auf 11% gesunken ist. Die Häufigkeit von MTX Konzentrationen mit hohem Risiko sank von 22% auf 7% (Relling et al. 1994).

### 1.9. Unerwünschte Arzneimittelwirkungen

In erster Linie zeigen sich diese auf schnell proliferierende Zellen von Wechselgeweben (Knochenmark und gastrointestinales Epithel). Die maximale Ausprägung der Mukositis, der Myelosuppression und der Thrombozytopenie findet sich fünf bis zehn Tage nach Gabe von

MTX. Weitere Nebenwirkungen sind Dermatitis (Erythem, Desquamation), Tubulusnekrosen durch Präzipitation in den Nierentubuli, Enzephalopathie, zerebrale Atrophie, Sehstörungen, Lebertoxizität (Transaminasenerhöhung, Ikterus), Pneumonitis, Haarausfall, Osteoporose, Störungen der Spermatogenese und der Ovulation, Vaskulitis, Fieber und Stoffwechselstörungen. Bei chronischer Anwendung im Rahmen der Therapie der rheumatoiden Arthritis oder der Psoriasis kam es bei einigen Patienten zu einer Leberfibrose und -zirrhose. Des Weiteren sind Folsäureantagonisten embryotoxisch und können zu Neuralrohrdefekten führen.

Wie bereits dargestellt, ist die Pharmakokinetik von MTX stark variabel, sowohl interindividuell als auch intraindividuell. Faktoren, die mit einer erhöhten Toxizität einhergehen sind, abgesehen von der bereits weiter oben angesprochenen Störung der Nierenfunktion, eine inadäquate Infusionsintensität des Patienten, ein niedriger Urin-pH, Komedikation (siehe Interaktionen), niedrige Konzentration von Plasmaproteinen, Erbrechen und Mangelernährung. Es gibt jedoch auch Patienten, in denen eine verzögerte Ausscheidung von MTX nicht in Zusammenhang mit einem dieser Risikofaktoren gebracht werden kann. Darauf ergibt sich die Frage, inwieweit genetische Polymorphismen die pharmakokinetischen Eigenschaften von MTX beeinflussen können.

## 1.10. Transporter

Methotrexat wird über einen Arzneimitteltransporter eliminiert, der aus der Familie der ABC-Transporter stammt. Membrantransportproteine spielen eine zentrale Rolle bei der Vermittlung der zellulären Aufnahme und Ausscheidung von endogenen und exogenen Substanzen.

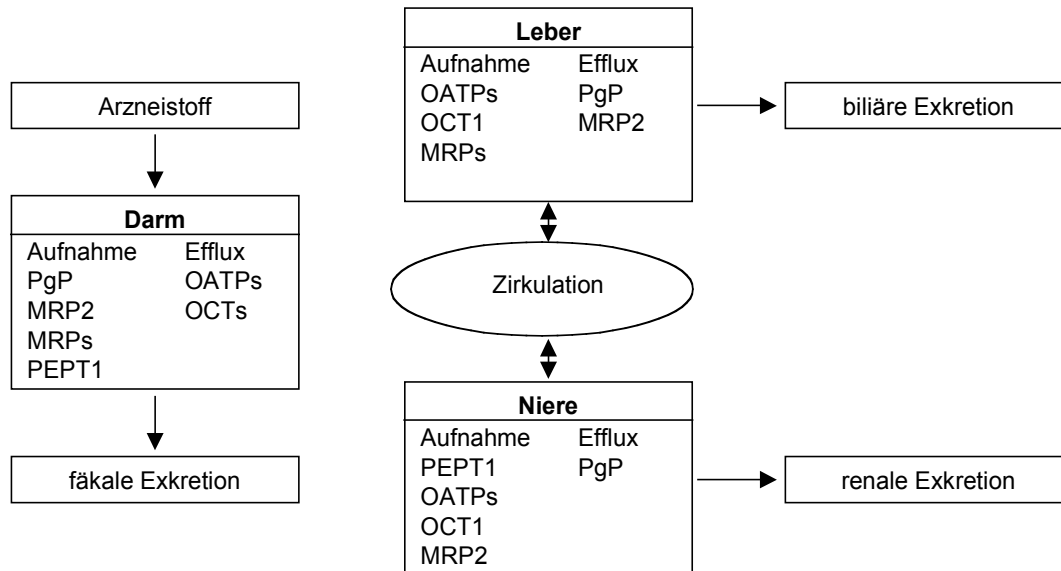


Abbildung 3: Schema zur Funktion einiger Transmembrantransporter (nach Gerloff et al. 2003)

Die wichtigste Gruppe, die für die Aufnahme von Stoffen bekannt ist, die die sogenannte „solute carrier family“ (SLC). Die Transporter, die basolateral innerhalb polarisierter Epithelzellen lokalisiert sind, gehören zu den sekundär aktiven Transportern. Die Energie wird aus dem elektrochemischen Potenzial intra- und/ oder extrazellulärer Ionen gewonnen. Subtypen der SCL-Familie kodieren zum Beispiel für die „organic anion transporters“ (OATs), „organic cation transporters“ (OCTs) und „organic anion transporting polypeptides“ (OATPs) (Tirona et al. 2002; Mizuno et al. 2003). Das OATP-C Gen kodiert für einen Transporter, der an der basolateralen Hepatozytenmembran lokalisiert ist. Einige seiner Polymorphismen führten zu einer deutlichen Verminderung der Transportfunktion in vitro. Weitere Aufnahmetransporter sind die „Equilibrative nucleoside transporters“ (ENTs) und die „Proton/peptide cotransporters“ (PEPTs).

Die ABC-Transporter (ATP-binding cassette proteins) bilden die größte Superfamilie transmembraner Transportproteine. Sie sind häufig für den Auswärtstransport von Stoffen aus der Zelle verantwortlich. Die Energie der primär aktiven Transporter wird durch die intrazelluläre Hydrolyse von ATP bereit gestellt. Bisher sind 5 Mitglieder identifiziert, die basierend auf der Homologie der Aminosäuresequenz in sieben Subklassen unterteilt werden:

- ABCA/ABC

- ABCB/MDR/TAP
- ABCC/MRP/CFTR
- ABCD/ALD
- ABCE/OABP
- ABCF/CGN20
- ABCG/White

Die wichtigsten Vertreter sind die „multidrug resistance proteins“ (MDR) der Unterfamilie ABCB und die „multidrug resistance associated proteins“ (MRP) der Unterfamilie ABCC (Dean et al. 2001; Tirona et al. 2002; Mizuno et al. 2003; Schwab et al. 2003).

### 1.10.1. ABCC-Subfamilie

Zur ABCC-Subfamilie der ABC-Transporter zählen 12 Transporter (ABCC1-12) mit einem unterschiedlichen Aufgabenspektrum. Das CFTR („cystis fibrosis transmembrane regulator“) Protein ist ein Chloridionenkanal, der eine Rolle bei der exokrinen Sekretion spielt. Mutationen im CFTR Gen führen bei homozygotem oder compound heterozygotem Vorliegen zur Zystischen Fibrose (Schmitt et al. 2002). Die ABCC8 und 9 Transporter binden Sulfonylharnstoff und regulieren Kaliumkanäle, die unter anderem für die Insulinsekretion wichtig sind. Die übrigen neun Transporter sind „multidrug resistance associated proteins“ (MRPs) (Dean et al. 2001). Für den MTX-Transport ist vor allem ABCC2 (MRP2) bedeutsam.

### 1.10.2. ABCC2-Gen und MRP2-Protein

#### *1.10.2.1. Struktur*

Das ABCC2-Gen ist auf Chromosom 10q24 lokalisiert (Taniguchi et al. 1996). Die kanonische Splicevariante besteht aus 32 Exons. Das Gen umspannt auf der genomischen DNS 45 Kilobasen (Toh et al. 1999; Tsujii et al. 1999). Das membranständige Glykoprotein MRP2 enthält 1545 Aminosäuren und hat eine Molekülmasse von 190 kDa. 17 transmembranspannende alpha Helices (TM1 - TM17) ziehen durch die Phospholipiddoppelschicht der biologischen Membranen und formen drei Transmembrandomänen (MDS1-3). Diese sind für die Substratspezifität wichtig. In das Zytoplasma der Zelle ragen zwei Nukleotid-bindende Domänen (NBD1 und 2), die für die Bindung und Hydrolyse des ATP verantwortlich sind. Die NBDs beinhalten zwei charakteristische Motive (Walker A und B). Außerdem gibt es noch das Motiv C, welches sich N-terminal von Walker B befindet.

Jeweils eine Transmembrandomäne und eine Nukleotid-bindende Domäne formen sich zu zwei homologen Hälften, die durch einen gering konservativ erhaltenen intrazellulären Loop miteinander verbunden sind (linker region L1). Am Amino-Terminus ist der Transporter durch die linker region 0 mit der MSD1 verbunden. Das Carboxy-Ende (COOH) liegt intrazellulär, während der Amino-Terminus (NH<sub>2</sub>) extrazellulär zu finden ist (Borst et al. 1999; König et al. 1999a; Gerk et al. 2002; Kruh et al. 2003).

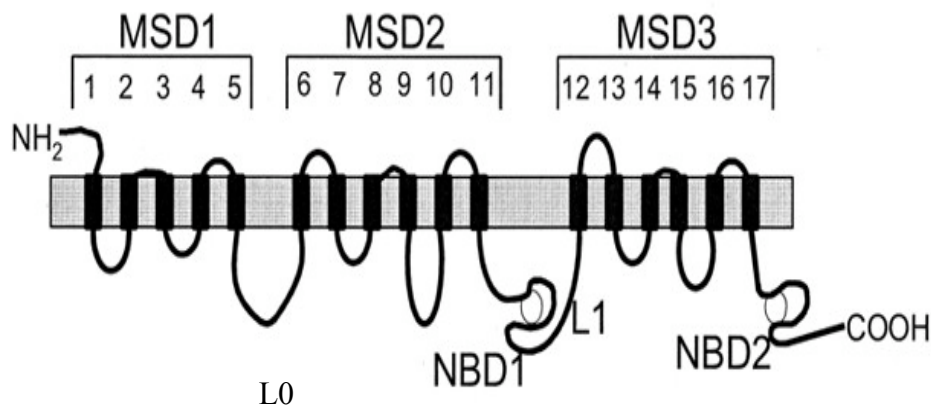


Abbildung 4: Zweidimensionales Membrantopologie-Modell für MRP2 (nach Suzuki et al. 2002)

#### 1.10.2.2. Lokalisation

Das MRP2-Protein wird unter anderen in der apikalen Membran von Hepatozyten exprimiert, wo es für die biliäre Exkretion von organischen Anionen und für die Ausscheidung von konjugiertem Bilirubin verantwortlich ist (cMOAT = „canalicular multiorganic anion transporter“) (Keppler et al. 1997a; Keppler et al. 1997b; Kamisako et al. 1999; König et al. 1999b; Suzuki et al. 2002). Zusätzlich verhindert es die intrazelluläre Akkumulation seiner Substrate und schützt so die Hepatozyten vor toxischen Einflüssen (Mizuno et al. 2003). Ein weiterer Expressionsort ist die Niere. Man fand MRP2-Transmembrantransporter in der apikalen Membran renaler Epithelzellen des proximalen Tubulus (Schaub et al. 1997; Schaub et al. 1999; Suzuki et al. 2002). Interessanterweise wird diese Expression bei Ratten durch Cisplatin induziert (Demeule et al. 1999).

Auch im Intestinaltrakt wird MRP2 an der apikalen Membran von Enterozyten gefunden (Fromm et al. 2000). Der Grad der Expression nimmt von proximal nach distal ab und ist im Duodenum am höchsten (Mottino et al. 2000). Der Transporter hat im Gastrointestinaltrakt einen limitierenden Einfluss auf die orale Bioverfügbarkeit seiner Substrate.

In einigen Blut-Gewebe-Schranken, wie Blut-Hirn-Schrank und Plazenta, kann ebenfalls MRP2 nachgewiesen werden (Tirona und Kim 2002; Potschka et al. 2003; Nies et al. 2004). Im Synzytiotrophoblasten werden durch MRP2-Proteine potentiell gefährdende Substanzen auswärts transportiert und stellen so einen Schutz des Feten dar (St-Pierre et al. 2000;



Tirona und Kim 2002). Einige Beispiele für Tumorgewebe, die MRP2 exprimieren sind Ovarial-Karzinome (Arts et al. 1999), kolorektale Karzinome (Hinoshita et al. 2000), Leukämien (van der Kolk et al. 2000; van der Kolk et al. 2001), Mesotheliome (Soini et al. 2001) und Karzinome der Leber (Nies et al. 2001).

### 1.10.2.3. Substratspezifität

MRP2 transportiert ein breites Spektrum an endogenen und exogenen organischen Anionen. Diese werden meist nach intrazellulärer Kopplung an Glutathion, Glukuronide oder Sulfate als Konjugate aus der Zelle ausgeschieden. Nicht-konjugierte organische Anionen werden im Kotransport mit reduziertem Glutathion eliminiert (Borst et al. 1999; König et al. 1999; Suzuki et al. 2002; Mizuno et al. 2003). Als wichtiges physiologisches Substrat gilt konjugiertes Bilirubin. Es wird in Form von Mono- oder Diglukuroniden aus den Hepatozyten in die Galle durch MRP2 sezerniert (Kamisako et al. 1999). Weitere endogene Substrate sind Gallensäuren, die an Glukuronide oder Sulfate gekoppelt sein können (Suzuki et al. 2002; Trauner et al. 2003). Der MRP2-Transporter in der Leber ist maßgeblich an der Regulierung des intrazellulären Redoxstatus beteiligt und dadurch ein Abwehrmechanismus gegenüber oxidativem Stress (Paulusma et al. 1999).

Darüber hinaus transportiert MRP2 die Leukotriene C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> und E<sub>4</sub> und neben MTX zahlreiche weitere Medikamente. Im folgenden soll einen Überblick über die Substrate von MRP2 geben (Suzuki et al. 2002).

Substratgruppe	Substrate
Cysteinyl Leukotriene	LTC <sub>4</sub> , LTD <sub>4</sub> , LTE <sub>4</sub> , N-Acetaldehyd LTE <sub>4</sub>
Reduziertes Glutathion (GSH) und GSH-Konjugate organischer Verbindungen	Reduziertes Glutathion (GSH), oxidiertes Glutathion (GSSG), 2,4-Dinitrophenol-S-Glutathion, Glutathion-bimane, GSH-Konjugate von Bromosulfofophthalein, GSH-Konjugate von Bromoisoverlerylurea, GSH-Konjugate von N-ethylmaleimid, GSH-Konjugate von Eythacrynsäure, GSH-Konjugate von α-Naphthylisothiocyanat, GSH-Konjugate von Methylfluorescin, GSH-Konjugate von Prostaglandin A1, GSH-Konjugate von (+)-anti-benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid, GSH-Konjugate von 4-Hydroxynonenal
GSH-Konjugate von Metallen	Antimon, Arsen, Bismuth, Cadmium, Kupfer, Silber, Zink

Substratgruppe	Substrate
Glukuronid-Konjugate	Bilirubin-Monoglukuronid, Bilirubin-Diglukuronid, 17- $\beta$ -Estradiol, 17- $\beta$ -D-Glukuronid, Trijodthyronin-Glukuronid, p-Nitrophenol- $\beta$ -D-Glukuronid, 1-Naphthol- $\beta$ -D-Glukuronid, E3040-Glukuronid, SN-38-Glukuronid, Grepafloxacin-Glukuronid, 4-(Methylnitrosmino)-1-(3-Pyridyl)-1-Butanol-Glukuronid, Temisartan-Glukuronid, Acetaminophen-Glukuronid, Diclofenac-Glukuronid, Indomethacin-Glukuronid, Glukuronid-Konjugate von PhIP und seinen Metaboliten, Liquiritigenin-Glukuronid, Glycyrrhizin
Sulfatierte Konjugate	Dehydroepiandrosteron-Sulfat
Gallensäuren-Konjugate	Cholat-3-O-Glukuronid, Litcholat-3-O-Glukuronid, Chenodesoxychol-3-O-Glukuronid, Nordesoxychol-3-Sulfat, Litcholat-3-Sulfat, Taurolitcholat-3-Sulfat, Glycolithchol-3-Sulfat, Taurochenodeoxychol-3-Sulfat
Nicht-konjugierte Verbindungen	Bromosulfophthalein, Dibromosulfophthalein, Carboxyfluorescein, reduzierte Folate, Methotrexat, Irinotecan (Carboxylat), 7-Ethyl-10-Hydroxycamptothecin (Carboxylat), Ampicillin, Ceftriaxon, Cefodizim, Grepafloxacin, Pravastatin, Themocaprilat, p-Aminohippursäure, Fluo-3, Sulfinpyrazon (GSH-gekoppelt), Vinblastin (GSH-gekoppelt), PhIP (GSH-gekoppelt), Etoposid, Vincristin, Doxorubicin, Epirubicin, Cisplatin

Tabelle 4: Substratgruppen mit Substraten von MRP2 (Suzuki et al. 2002)

#### 1.10.2.4. Dubin-Johnson-Syndrom

Das Dubin-Johnson-Syndrom (DJS) ist durch eine Erhöhung des konjugierten Bilirubins charakterisiert, verursacht durch das Vorliegen von nicht funktionellen MRP2-Transportern auf Grund von Mutationen im ABCC2-Gen. Es wurde erstmals 1954 beschrieben (Dubin and Johnson 1954; OMIM #2375000) und ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, die mit konjugierter Hyperbilirubinämie einhergeht. Durch die intrazelluläre Kumulation von konjugiertem Bilirubin kommt es zu einem milden Ikterus und zu melanin-ähnlicher Pigmentablagerung in der Leber. Makroskopisch sieht man dies an der schwarzbraunen Verfärbung des Organs (König et al. 1999; Suzuki et al. 2002). Bei Betroffenen ist das MRP2-Protein in der kanalikulären Membran der Hepatozyten in der Regel immunhistochemisch nicht nachweisbar. Eine Ausnahme bildet der Aminosäureaustausch

R1150H (Exon 25). Hier wird zwar ein vollständiges MRP2 an der apikalen Membran exprimiert, das jedoch nicht funktionell ist (Kartenbeck et al. 1996; Mor-Cohen et al. 2001; Tirona et al. 2002; Keitel et al. 2003). Homozygotie führt zum klassischen Dubin-Johnson-Syndrom während heterozygote Träger nur eine moderate Erhöhung der Fraktion der Koproporphyrine im Urin mit normalen Werten für totales und direktes Bilirubin zeigen. Neben dieser mit dem DJS assoziierten Mutationen wurden in einigen Vorarbeiten bereits Polymorphismen bei Japanern (Ito et al. 2001; Itoda et al. 2002; Suzuki et al. 2002) und Kaukasiern (Göres et al. 2008) beschrieben.

### **1.11. Polymorphismen als Ursache der Variabilität der Pharmakokinetik von MTX**

Genetische Polymorphismen in Membrantransportern werden als eine wesentliche Determinante zur interindividuellen und interethnischen Variabilität bezüglich der Verteilung von Medikamenten diskutiert. Die ALL im Kindesalter repräsentiert eine Krankheit, bei der eine individuell angepasste Dosierung sehr von Vorteil sein könnte. Die Zytostatika haben einerseits eine geringe therapeutische Breite und es besteht immer die Gefahr schwerer Schädigung durch die Medikamente und Medikamenten-induzierte Nebenwirkungen sind oft therapielimitierend. Andererseits wurde beobachtet, dass angepasste Dosierungen basierend auf der Medikamenten-Clearance die Heilungschancen verbessern konnten (Pui 1997).

Mehrere Studien zur Therapie der ALL im Kindesalter haben gezeigt, dass es wichtig ist, möglichst hohe intrazelluläre Konzentrationen der Zytostatika zu erreichen (Whitehead et al. 1990; Whitehead et al. 1992; Crom et al. 1994; Masson et al. 1996). Eine bessere Voraussage der Pharmakokinetik und damit auch der Toxizität hätte nicht nur eine verbesserte Lebensqualität des Patienten zur Folge, sondern auch eine bessere Wirkung der Chemotherapie, da unerwartete Toxizität dazu führen kann, dass die Therapiepausen länger werden oder die Therapie sogar abgebrochen werden muss.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von häufigen Polymorphismen im ABCC2-Gen (MRP2-Transporter) auf die Pharmakokinetik von Methotrexat im Rahmen der MTX-Hochdosistherapie bei Kindern mit ALL untersucht. Die Fragestellung war, ob genetische Polymorphismen im ABCC2-Gen bei einem monozentrischen Kollektiv von Kindern mit akuter lymphoblastischer Leukämie mit einer Veränderung der MTX-Konzentrationen einhergehen. Untersucht wurden die folgenden Polymorphismen:

	SNP	rs Nr.	DNA Sequenz	Aminosäure- austausch	Genotyp			Häufigkeit der W-Allele
					W/W	W/R	R/R	
Exon 1	c.-24C>T	rs717620	GAAGAGTCTT C/T GTTCCAGACG	-	38	20	1	0,81 (0,73 - 0,87)
Exon 10	c.1249G>A	rs2273697	GGAGTACACC G/A TTGGAGAAAC	Val417Ile	37	22	0	0,81 (0,73 - 0,87)
Exon 21	c.2780T>G	-	CTGAAGTCCC T/G GAGAAACTCC	Leu927Arg	58	1	0	0,992 (0,95 - 0,998)
Intron 21	c.2833+11C>T	-	GTGAACACCA C/T ACAGAAAAGT	-	58	1	0	0,992 (0,95 - 0,998)
Exon 24	c.3298C>T	-	TCAGTCCTTG C/T GCAGCTGGATT	Arg1100Cys	58	1	0	0,992 (0,95 - 0,998)
Exon 24	c.3299G>A	-	TCAGTCCTTGC G/A CAGCTGGATT	Arg1100His	58	1	0	0,992 (0,95 - 0,998)
Intron 27	c.3844-73A>G	-	GTTCTATGAC A/G CGAGTCTGG	-	53	6	0	0,949 (0,89 - 0,98)
Exon 28	c.3972C>T	rs3740066	CTTGTGACAT C/T GGTAGCATGG	Ile1324Ile	22	32	5	0,64 (0,55 - 0,72)
Intron 29	c.4146+11G>C	rs8187703	GTGAGCTCTA G/C AACTTACTCG	-	53	6	0	0,949 (0,89 - 0,98)
Exon 30	c.4290G>T	rs7904678	CCCACGAAGT G/T ACAGAGGCTG	Val1430Val	53	6	0	0,949 (0,89 - 0,98)
Exon 31	c.4488C>T	rs8187707	ACAGGCTGCA C/T ACCATCATGG	His1496His	53	6	0	0,949 (0,89 - 0,98)
Intron 31	c.4508+12G>A	rs8187708	TGAGTGTAGG G/A GGACAGGGCT	-	53	6	0	0,949 (0,89 - 0,98)
Exon 32	c.4544G>A	rs8187710	ATTATAGAGT G/A CGGCAGCCCT	Cys1515Tyr	53	6	0	0,949 (0,89 - 0,98)

Tabelle 5: Übersicht über die single nucleotid Polymorphismen und deren Auswirkungen auf das Protein

## **2. Patienten, Material und Methoden**

### **2.1. Patienten**

Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg begutachtet und der Durchführung ohne Auflagen zugestimmt. Von der onkologischen Station der Kinderklinik der Universität Erlangen wurde eine Liste mit insgesamt 189 Patienten, die seit 1981 zur Behandlung der akuten lymphoblastischen Leukämie aufgenommen wurden, zur Verfügung gestellt. Die in die Arbeit aufgenommene Patientenzahl reduzierte sich erheblich, da nur Patienten eingeschlossen wurden, die nach den Therapieprotokollen ALL-BFM 95, ALL-BFM 99 Pilot und ALL-BFM 2000 behandelt wurden, weil die Datenerhebung zuvor lückenhaft war. Von dem übrigen Kollektiv wurden aus folgenden Gründen weitere Patienten ausgeschlossen:

- es gab keine oder zu wenig Daten bezüglich der Therapie des Patienten
- die Patienten waren inzwischen verstorben und die DNS-Isolierung aus dem Knochenmark nicht möglich
- die Patienten waren der Hochrisiko-Gruppe zugeteilt worden
- die Patienten kamen nicht mehr in die onkologische Ambulanz. Aus diesem Grund wurden die Patienten persönlich angeschrieben, mit der Bitte sich in der Klinik zur Blutentnahme vorzustellen oder sich beim Hausarzt Blut entnehmen zu lassen und an das Institut zu senden
- einige Patienten wollten an der Studie nicht teilnehmen

Die endgültige Patientenzahl belief sich auf 44 Patienten. Die Geschlechterverteilung betrug bei diesem Kollektiv 15 Patientinnen zu 29 Patienten. Der jüngste Patient war bei Diagnosestellung 1,8, der älteste 15,4 Jahre alt. Der Altersdurchschnitt lag bei 6,8 Jahren. Bei Aufnahme hatten über 50% der Patienten eine geringe Beeinträchtigung nach dem Karnofsky-Index, circa 36% hatten keine Beeinträchtigung durch die Erkrankung und nur bei einem Prozentsatz von etwa 10% war die Aktivität stark eingeschränkt. Drei der Patienten litten an einer der folgenden Systemerkrankungen: Kartagener-Syndrom (Immotiles Cilien-Syndrom), juvenile Xanthogranulomatose und Trisomie 21 mit aneurysmatisch verschlossenem Ventrikelseptumdefekt. Bei zwei Patienten bestand der Verdacht auf hämolytisch-urämisches Syndrom bzw. maligne Systemerkrankung bei Knochenmarksdepression und Panzytopenie.

Immunphänotypisch teilte sich das Kollektiv in 30 Patienten mit c-ALL, sieben Patienten mit prä-B-ALL, fünf Patienten mit einer intermediären T-ALL und einem Patient mit prä-T-ALL. Bei einem Patienten fehlte die Einteilung nach dem Immunphänotyp. Alle Patienten wurden der FAB-Klassifikation L1 zugerechnet, die auf der Morphologie basiert. Bei 12 Patienten wurde eine Koexpression myeloischer Marker auf den Leukämiezellen festgestellt und die

Expression des TEL-AML1-Gens war bei einem der insgesamt 23 auf dieses Charakteristikum untersuchten Patienten positiv. Eine BCR-ABL- oder MLL/AF4-Rekombination wurde nicht gefunden oder war nicht untersucht worden. Über 50% der Patienten litten bei Diagnosestellung an einer Hepatosplenomegalie und/ oder an einer Lymphadenopathie. Dies waren initial die am häufigsten festgestellten pathologischen Organbefunde. Weiter extrazentralnervöse Organbeteiligungen betrafen bei sechs Patienten das Mediastinum und bei einem Patienten die Hoden. Sieben Patienten wurden als ZNS-positiv eingestuft, da Blasten im Liquor gefunden wurden oder eine Raumforderung nachgewiesen wurde.

Die Behandlung erfolgte jeweils nach dem aktuellsten ALL-BFM-Therapieprotokoll. 20 Patienten wurden nach dem ALL-BFM 95 Protokoll therapiert, drei Patienten nach dem ALL-BFM 99 Pilot Protokoll und die übrigen 21 Patienten nach dem ALL-BFM 2000 Protokoll. Innerhalb eines Protokolls wurden die Patienten in sechs Therapiearme eingeteilt, abhängig von dem Risiko an einem Rezidiv zu erkranken. Es gab zwei Standard-Risiko-Gruppen (SR1 und SR2), zwei Gruppen mit sogenanntem mittlerem Risiko (MR1 und MR2) und zwei mit hohem Risiko (HR1 und HR2). Je nach Verteilung auf die verschiedenen Therapiearme unterschied sich die chemotherapeutische Behandlung der Patienten.

Das Patientenkollektiv verteilte sich wie folgt auf die Therapiearme:

Therapiearm	Anzahl	Prozent
SR1	5	11,36
SR2	10	22,73
MR1	3	6,82
MR2	26	59,09

Tabelle 6: Häufigkeitsverteilung der Therapiearme

Von den 44 Patienten erlitt ein Patient drei Jahre nach Erstdiagnosestellung ein Rezidiv.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Patientencharakteristika.

Charakteristikum	Mittelwert mit Standardabweichung bzw. Median und Quartilenabstand
Alter [Jahre]	6,8 ± 4,4
Körpergröße [cm]	121 ± 28
Körpergewicht [kg]	26,0 ± 15,3
Körperoberfläche [m <sup>2</sup> ]	0,93 ± 0,38

Charakteristikum	Mittelwert mit Standardabweichung bzw. Median und Quartilenabstand
Body mass index [kg/m <sup>2</sup> ]	16,3 ± 2,4
Hämoglobin [g/dl]	8,9 ± 2,4
Leukozyten [/ $\mu$ l] *	9,3 (37,9)
Thrombozyten [/ $\mu$ l] *	92 (177)
Kreatinin [mg/dl]	0,44 ± 0,19
Weibliches Geschlecht	15 (34%)
Männliches Geschlecht	29 (66%)
Hepato- und/ oder Splenomegalie	28 (64%)
ZNS-Beteiligung	4 (9%)
Immunphänotyp: c-ALL	30 (68%)
Immunphänotyp: prä-B-ALL	7 (16%)
Immunphänotyp: T-Zell-ALL	5 (11%)
Immunphänotyp: prä-T-Zell-ALL	1 (2%)
Therapieprotkoll ALL-BFM 1995	20
Therapieprotkoll ALL-BFM 1999 Pilot und 2000	24
Methotrexat-Dosis [mg/m <sup>2</sup> ] pro Zyklus	4999 ± 29

Tabelle 7: Patientencharakteristika der ALL-Studien-Population. Für kontinuierliche Variablen wurde der Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Für Variablen mit nicht-normaler Verteilung wurde der Median und der Quartilenabstand (interquartile range) angegeben (\*).

## **2.2. Datenbank**

Es wurde eine relationale Datenbank mit File Maker Pro 5.0 erstellt. Hierbei wird eine Verbindung zweier Dateien, dem Master-File und dem Related-File anhand eines Schlüsselfeldes, in dem gleiche Werte stehen müssen (in diesem Fall der Namensschlüssel) erstellt. Die Patientennamen wurden wie folgt verschlüsselt: „erster Buchstabe des Vornamen - erster Buchstabe des Nachnamen - Geburtsdatum“ (Muster: t-r-14-04-64). Die erste Seite beinhaltete Basisinformationen zum Patienten, wie Geburtsdatum, Geschlecht, Diagnosedatum, Alter, Blutbild und Untersuchungsbefund bei Diagnosestellung, Therapiestudie, Therapiezweig und Klassifikation der ALL. Je nach Therapiezweig wurden

verschiedene Therapieprotokolle angelegt. Im Induktionsprotokoll und in Protokoll II und III wurden die Chemotherapeutika inklusive Dosierungen erfasst. Der Schwerpunkt der Datenbank lag auf den Protokollen der Methotrexat-Hochdosistherapie. Pro Patient gab es entsprechend der Zykluszahl vier Hochdosis-Protokolle. In jedem Protokoll wurden die Dosierungen des Methotrexats, die gemessenen MTX-Konzentrationen und die Flüssigkeitsbilanzierungen des Patienten erfasst. Zusätzlich wurden Blutbilder einen Tag vor und einen Tag nach der Therapie erhoben.

### **2.3. DNS-Isolation aus Vollblut**

Ausgangsmaterial war EDTA-Vollblut (ca. 5 ml), welches peripher venös entnommen und bei -20 °C gelagert wurde. Für die Bearbeitung wurde das Blut auf Raumtemperatur gebracht. Zur Isolation der DNS wurde QIAamp Blood Midi Kit (Qiagen) benutzt, das auf folgenden Prinzipien beruht: Lyse der Zellen durch Detergentien, enzymatischer Verdau mit Proteinase K, vollständiges Entfernen der gelösten Stoffe durch Zentrifugation während die DNS durch Absorption an einer Silicat-Filtermembran (*spin column*) zurückgehalten wird. Dies geschieht durch Bindung der negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren an positiv geladene Oberflächenmoleküle der Membran. Zuletzt folgt die Elution störender Stoffe durch Lösung in ethanolhaltigem Puffer.

Das Blut wurde bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. In ein 2 ml Eppendorf-Gefäß wurde 20 µl Proteinase K pipettiert. Dazu wurden 200 µl Blut sowie 200 µl AL-Puffer gegeben. Das Gemisch wurde 15 Sekunden lang gevortext, kurz zentrifugiert und anschließend 10 Minuten bei 56 °C inkubiert. Nach einer kurzen Zentrifugation wurden 200 µl abs. Ethanol hinzugegeben, das Gemisch erneut 15 Sekunden lang gevortext und kurz zentrifugiert. Das entstehende Gemisch wurde in ein Zentrifugenröhrchen mit einer Filtermembran umpipettiert. An diesen Filter wurde die DNS bei einminütiger Zentrifugation bei 8000 rpm absorbiert. Durch mehrfaches Waschen mit AW1- und AW2-Puffer wurden störende Substanzen eliminiert. Abschließend wurden 200 µl Aqua ad iniectabilia auf die Säulenmatrix pipettiert und nach dreiminütiger Inkubation bei 8000 rpm zentrifugiert. Die DNS löste sich somit von der Matrix. Auf diese Weise wurde aus 200 µl eingesetztem Vollblut 200 µl gereinigtes DNS-Extrakt gewonnen.

### **2.4. DNS-Isolation aus Knochenmark**

Da einige Patienten verstorben waren, wurde versucht, die DNS aus Knochenmarks-Ausstrichen zu extrahieren. Die Ausstriche wurden vom Labor der Kinderklinik zur Verfügung gestellt. Zum Befeuchten wurden 25 µl 1x PSB-Puffer auf den Objektträger pipettiert. Mit einer desinfizierten Skalpellklinge wurde das Material abgetragen und in ein Eppendorf-Gefäß gegeben. Hinzu wurden 20 µl Proteinase K und 225 µl AL-Puffer pipettiert und nach



gründlichem Mischen bei 56 °C über Nacht inkubiert. Das weitere Prozedere entsprach dem der DNS-Isolation aus Vollblut. Bei der der Polymerasekettenreaktion folgenden Gelelektrophorese stellte sich heraus, dass durch dieses Verfahren keine Produkte entstanden waren. Ursächlich war am ehesten die unsachgemäße Lagerung der Knochenmarksausstriche, so dass letztendlich auf die Analyse verzichtet werden musste.

## **2.5. Photometrie**

Die Bestimmung der DNS-Konzentration erfolgte in einem Photometer (SmartSpec 3000) durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Bei 260 nm und einer Küvettentiefe von einem Zentimeter entspricht eine OD von eins einer Konzentration von 50 µg DNS/ ml (Extinktionskoeffizienz 50 µg DNS/ ml x cm<sup>-1</sup>). Zusätzlich wurde die OD bei einer Wellenlänge von 280 nm und 320 nm gemessen. Dies erfolgte zur Abschätzung des Reinheitsgrades. Der OD260/ OD280-Quotient der Proben sollte im Bereich von 1,8 - 2,0 liegen. Es wurden 20 µl DNS im Verhältnis 1:5 mit AAI verdünnt und in einer Quarzküvette gemessen. Die Menge an DNS errechnete sich nach folgender Formel: µg DNS/ ml = OD260 nm x 50 x Verdünnungsfaktor (5).

## **2.6. Polymerasekettenreaktion und Genotypisierung**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) erlaubt die enzymatische Amplifikation spezifischer Nucleotidsequenzen in vitro. Die Durchführung erfolgt in Thermocyclern. Ausgangspunkt ist ein Segment einer doppelsträngigen DNS, das durch thermische Denaturierung in zwei Einzelstränge aufgeschmolzen wird. Als Schmelztemperatur wird die Temperatur bezeichnet, bei der die DNS-Moleküle zu 50% denaturiert sind. Sie kann anhand der Zusammensetzung aus GC- und AT-Paaren berechnet werden. Anschließend erfolgt die Hybridisierung von synthetischen Oligonukleotiden (Primern) an der einsträngigen Matrizen-DNS. Dafür muss eine geeignete Annealing-Temperatur gewählt werden. Sie liegt normalerweise 5 °C unter der berechneten Schmelztemperatur, muss jedoch gelegentlich niedriger gewählt werden, um eine effiziente Hybridisierung zu erlangen. Bei zu niedrigen Temperaturen kommt es allerdings zur unspezifischen Bindung der Primer an ähnliche Sequenzbereiche der Matrizen-DNS. Die Primer fungieren als Startermoleküle (*forward primer*) für die DNS-Polymerase, die einen neuen, zu der Matrize komplementären DNS-Strang synthetisiert. Durch geeignete Primerwahl werden nur die für die Fragestellung interessanten Bereiche amplifiziert. Für den Aufbau des jeweiligen Stranges müssen die Nucleoside Adenosin, Cytosin, Guanin und Thymin in ausreichender Menge vorhanden sein (als dNTP-Gemisch verfügbar). Die am häufigsten verwendete DNS-Polymerase wird aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen (Taq-Polymerase). Sie ist sehr temperaturresistent und ermöglicht so das häufige Durchführen des Elongations-Strangtrennungs-Zyklus, da sie nicht nach jedem Denaturierungszyklus neu hinzugefügt werden muss. Durch mehrfaches

Wiederholen dieses Vorgangs erfolgt eine exponentielle Amplifikation der DNS. Zusätzlich wird ein Puffer benötigt, da die DNS-Polymerase nur unter geeigneten pH-Bedingungen synthetisieren kann und  $MgCl_2$ , das die Aktivität der Polymerase erhöht.

Das Prinzip der allelspezifischen Polymerasekettenreaktion beruht auf wildtyp- und mutationsspezifischen Primern. Bei einem single nucleotid Polymorphismus unterscheidet sich der Wildtyp von der Mutante nur durch eine einzige Punktmutation. Eine einzelne Abweichung der Base am 3'-Ende des Primers ist allerdings nicht spezifisch genug, die lediglich eine Sequenz exakt zu amplifizieren, da die Taq-Polymerase diese eine Fehlpaarung ignorieren kann und somit nicht zwischen Wildtyp und Mutante zu unterscheiden ist. Zur Spezifizierung wurde deswegen auch die drittletzte Base geändert, indem sie durch ihre komplementäre Base ersetzt wurde. Somit ergaben sich ein bzw. zwei mismatches und dies verhinderte eine Amplifikation der DNS, bei der zwei Fehlpaarungen vorlagen. Um die Synthese und anschließende Analyse der zu untersuchenden DNS-Sequenzen zu gewährleisten, musste das Amplifikat ausreichend lang genug sein.

#### 2.6.1. Versuchsdurchführung

##### Reaktionsansatz

Die angegebenen Volumina beziehen sich auf den Ansatz für eine einzige Probe. Für eine höhere Probenzahl  $n$  wurde ein  $n$ -facher Ansatz berechnet. Zur Verminderung von Pipettierfehlern wurden die Komponenten mit Ausnahme der Ausgangs-DNS für alle Proben in einem 2 ml Eppendorf-Gefäß als sogenannter Master Mix zusammengemischt. Davon wurden je 14  $\mu$ l Ansatz entnommen und in ein PCR-Gefäß (Biozym Tube Plates und Caps, Biozym, Hess. Oldendorf) pipettiert, in welches vorher ein bzw. zwei  $\mu$ l genomische DNS gegeben worden waren. Der Ansatz wurde durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit der DNS-Probe vermischt. Beispielhaft ist der Ansatz für eine allelspezifische PCR gezeigt.

Reagenzien	Volumen [ $\mu$ l]
Puffer Y	1,5
dNTP	1,5
MgCl <sub>2</sub>	0,9
Primer-Mix: forward und reverse (jeweils 50 $\mu$ M) je nach Ansatz Wildtyp- oder Mutanten-Primer)	0,24
Aqua ad iniectabilia	9,51
Taq-Polymerase (PeqLab, Erlangen) (5 U/ $\mu$ l)	0,35
DNS-Template	1 bzw. zwei bei Proben mit niedriger Konzentration an DNS

Tabelle 8: Reagenzien für Master Mix

Als Negativkontrolle wurde ein PCR-Gefäß mit H<sub>2</sub>O statt der Ausgangs-DNS mitgeführt (NTC: non template control). Somit konnten eventuelle Verunreinigungen ausgeschlossen werden. Die gefüllten PCR-Gefäße wurden in den Thermocycler eingesetzt. Ein typisches Programm sah folgendermaßen aus:

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
94 °C	2 Minuten	1
94 °C	30 Sekunden	40
59 °C	45 Sekunden	
72 °C	30 Sekunden	
72 °C	2 Minuten	1
4 °C	hold	

Tabelle 9: Temperaturbedingungen im Thermocycler

Der letzte Abschnitt der Polymerisationsphase wurde etwas länger (zwei Minuten) gewählt, damit die DNS-Polymerase alle synthetisierten DNS-Stränge vervollständigen konnte. Die Proben wurden im Thermocycler bei 4 °C gekühlt und anschließend sofort weiterverwertet oder im Kühlschrank bei 4 °C für maximal zwei Tage gelagert.

## 2.6.2. Methodenoptimierung

Je nach Verhältnis der Basenzusammensetzung des Primers unterschied sich die Annealing-Temperatur der einzelnen Exons voneinander. Um optimale Temperaturbedingungen zu finden, wurde für jedes Exon eine sogenannte Gradienten-PCR durchgeführt. Auf einem Thermoblock werden dabei unterschiedliche Temperaturen erreicht. Die Spannweite bewegte sich zwischen 58 °C und 65 °C.

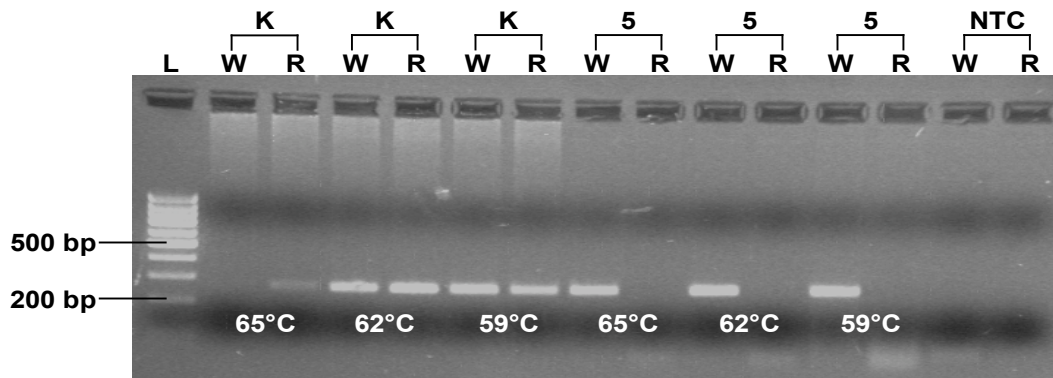


Abbildung 5: Beispiel für eine Gradienten-PCR am Polymorphismus c.4146+11G>C. L: Längenstandard, W: Wildtyp, R: Mutante, K: Heterozygotenkontrolle, „5“: Probennummer 5, jedem Pat. wurde eine Probennummer zugeordnet. In diesem Fall sieht man einen homozygoten Wildtyp. NTC: non-template control

War die Annealing-Temperatur zu hoch gewählt, konnte nicht genug Produkt amplifiziert werden. Bei zu niedriger Annealing-Temperatur entstanden dagegen unspezifische Nebenprodukte, die die Beurteilung erschwerten.

Für den Polymorphismus c.3972C>T erbrachte eine Touchdown-PCR das beste Ergebnis. Hierbei wurde in den ersten 20 Hybridisierungszyklen die Annealing-Temperatur von 62 °C schrittweise auf 56 °C gesenkt, in dem pro Zyklus eine Temperaturabnahme von 0,3 °C stattfand. Anschließend wurden noch 15 Zyklen bei 56 °C durchlaufen. Dadurch erhöhte sich die diskriminative Wirkung der PCR (Wu et al. 2005).

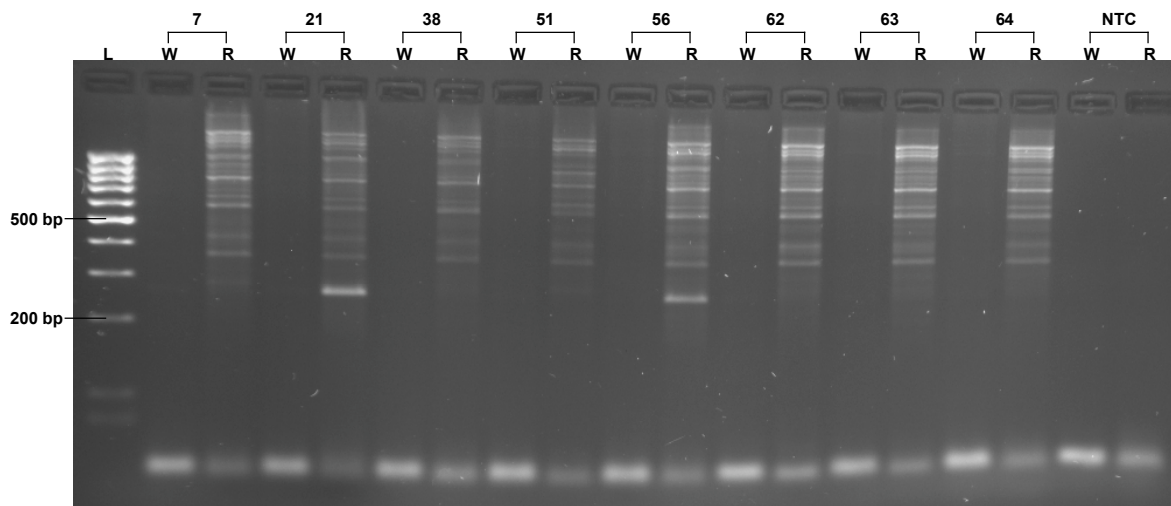


Abbildung 6: Polymorphismus c.3972C>T, Annealing-Temperatur konstant 63 °C, 33 Zyklen. L: Längenstandard, W: Wildtyp, R: Mutante. Die Zahlen entsprechen den Probennummern. Jedem Pat. wurde eine Probennummer zugeordnet. Einige Proben konnten auf Grund der nicht-optimalen Bedingungen nicht ausgewertet werden, so dass eine zuverlässige Befundung nicht erfolgen konnte. NTC: non-template control

In Abbildung 6 wurde die Annealing-Temperatur über 33 Zyklen konstant bei 63 °C gehalten. Es entstanden viele unspezifische Nebenprodukte, die die Beurteilung erschwerten. Mittels der Touchdown-PCR konnten die ungewollten Produkte reduziert werden.

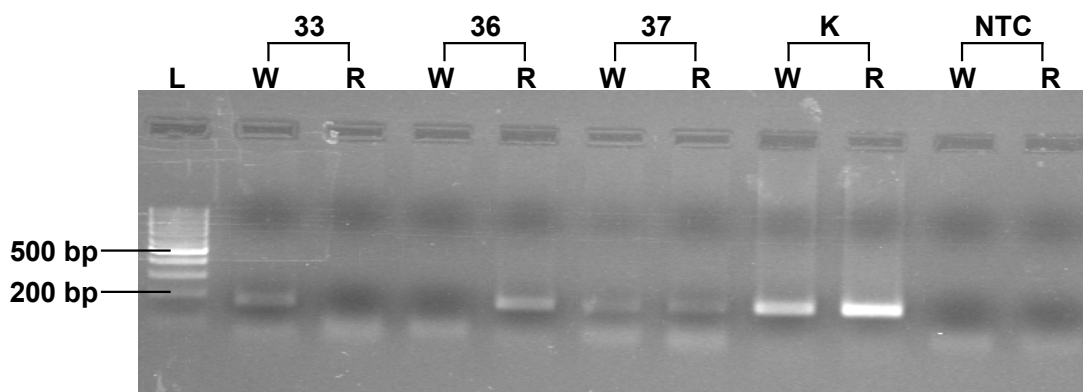


Abbildung 7: Polymorphismus c.3972C>T, Touchdown-PCR: in den ersten 20 Zyklen erfolgte eine schrittweise Reduktion der Annealing-Temperatur von 62 °C auf 56°C, danach folgten noch 15 Zyklen mit einer Annealing-Temperatur bei 56 °C. L: Längenstandard, W: Wildtyp, R: Mutante. Die Zahlen entsprechen den Probennummern. Jedem Pat. wurde eine Probennummer zugeordnet. Probe 33 zeigt einen homozygoten Wildtyp, Probe 36 eine Homozygotie für das seltenere Allel, Probe 37 zeigt einen C/T Genotyp. K: Heterozygote Kontrolle. NTC: non-template control

Abbildung 7 zeigt das Ergebnis der Touchdown-PCR: es traten keine unspezifischen Nebenprodukte mehr auf, so dass eine zuverlässige Befundung erfolgen konnte.

Durch die Zugabe von 3 µl Glycerin pro Ansatz (dafür wurden nur 6,51 µl AAI eingesetzt) konnte bei den Polymorphismen c.-24C>T, c.3298C>T und c.3299G>A die Signalintensität verstärkt und das Produkt stabiler generiert werden. Abbildung 8 stellt eine PCR ohne Glycerin-Zugabe dar. Im Vergleich zeigt sich in Abbildung 9 (PCR-Ansatz mit 3 µl Glycerin) eine Zunahme der Signalintensität.

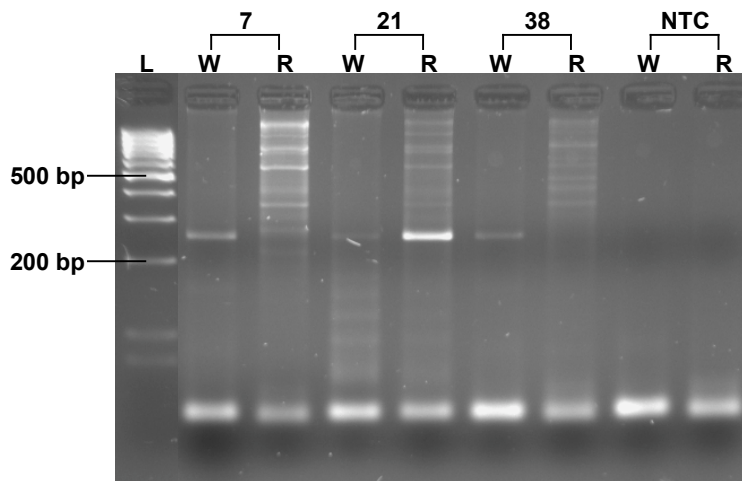


Abbildung 8: Polymorphismus c.-24C>T ohne Glycerin. L: Längenstandard, W: Wildtyp, R: Mutante. Die Zahlen entsprechen den Probennummern. Jedem Pat. wurde eine Probennummer zugeordnet. Eine zuverlässige Befundung konnte auch hier nicht erfolgen. NTC: non-template control

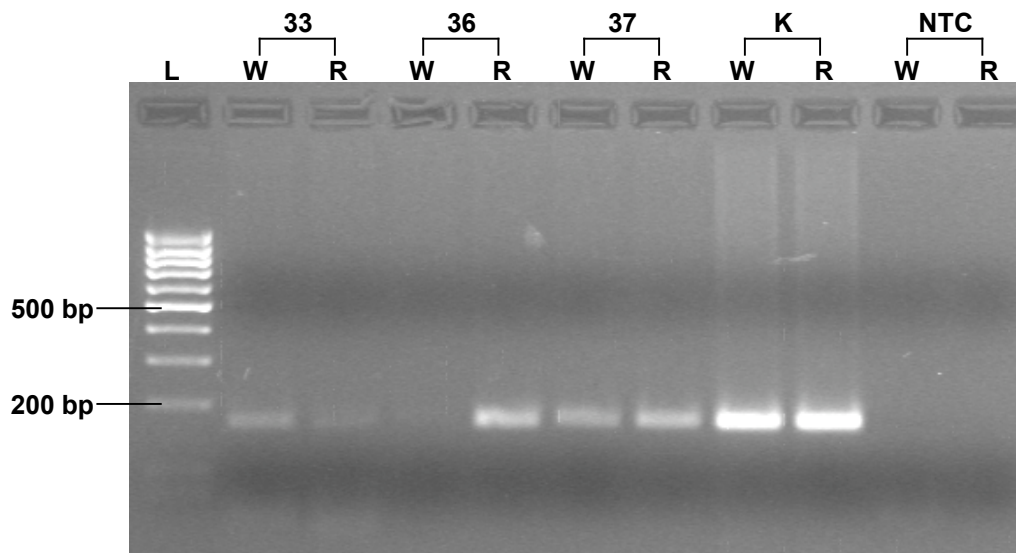


Abbildung 9: Polymorphismus c.-24C>T mit Glycerin, K: Heterozygotenkontrolle. L: Längenstandard, W: Wildtyp, R: Mutante. Die Zahlen entsprechen den Probennummern. Jedem Pat. wurde eine Probennummer zugeordnet. Die Proben 33 und 37 zeigen einen -24C/T Genotyp. Probe 36 zeigt eine Homozygotie für das seltenere Allel. K: Heterozygote Kontrolle. NTC: non-template control

## **2.8. Restriktionsverdau**

### **2.8.1. Theoretischer Hintergrund**

Da die allelspezifische PCR in einigen Fällen uneindeutige und zum Teil wenig robuste Ergebnisse zeigte, wurden zusätzliche Untersuchungen durch Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLP) für Polymorphismus c.-24C>T, c.1249G>A und c.3972C>T vorgenommen. Hierfür wurden entsprechend des Basenaustausches geeignete Restriktionsendonukleasen gesucht, die eine eindeutige Differenzierung zwischen den Allelen erlauben. Abhängig davon, welche genetische Variante vorliegt, wird das PCR-Produkt geschnitten bzw. der Schnitt durch das Enzym bleibt aus. Daher stellt sich der Unterschied zwischen den Sequenzvarianten als Größenunterschied nach gelelektrophoretischer Auftrennung dar. Da nicht notwendiger Weise in der Sequenz ein Restriktionsenzym schneidet, kann es nötig sein, in den Primer einzelne Punktmutationen einzuführen, so dass dann ein RFLP resultiert (sogennante forced mutation RFLP).

### **2.8.2. Versuchsdurchführung**

Als Edukte für den enzymatischen Verdau wurden die PCR-Produkte aus der Standardpolymerasekettenreaktion verwendet. Diese wurden mit den genannten Restriktionsendonukleasen (Firma MWG-Biotech) entsprechend der vom Hersteller angegebenen optimalen Reaktionsbedingungen geschnitten. Hierbei wurden als Variablen die Art des Puffers, die Temperaturoptima und die Inkubationszeit berücksichtigt, um den Aktivitätsgrad der Enzyme zu optimieren und somit einen möglichst vollständigen und exakten Verdau zu gewährleisten. Der exemplarisch für eine Enzymmenge von 5 U aufgeführte Reaktionsansatz (Tabelle 10) versteht sich als Ansatz für eine Probe. Für eine entsprechend höhere Probenzahl n wurde ein n-facher Ansatz berechnet. Bei entsprechend abweichenden Enzymkonzentrationen (U/μl) wird die eingesetzt Enzymmenge geändert und mit inverser Volumenänderung des aqua ad iniectionabilia ausgeglichen. Bei Proben mit DNS-Konzentrationen < 50 ng/μl wurde das eingesetzte Volumen an gelöster DNS erhöht und das Volumen an aqua ad iniectionabilia reduziert.

Reagenzien	Volumen
PCR-DNS (~100 ng/μl)	~2 μl
Puffer (10 x)	1,7 μl
Enzym (10 U/μl)	0,5 μl
Aqua ad iniectabilia	12,8 μl
Summe	17 μl

Tabelle 10: Reaktionsansatz für Restriktionsverdau

Die Restriktionsendonukleasen sind in Tabelle 11 dargestellt.

Polymorphismus	Enzym	Sequenz
c.-24C>T	cMo_F	5'-ATG GGT GGG ATG AAA GGT CA-3'
	cMO-Rwt-Taq1	5'-AAT AAT ATT CTG GAC TGC GTC TGG ATC-3'
c.1249G>A	cMORa_F_NcoI	5'-ATC CTT GGC TTT GTC CTT GG-3'
	cMORa_R_NcoI	5'-AAT AAT CAG GTT CAC TGT TTC TCC CA-3'
c.3844-73A>G	cMo_fl_F (BSTU1)	5'-TGC TAC CCT TCT CCT GTT CTA-3'
	cMo_fl_R	5'-ATC CAG GCC TTC CTT CAC TCC-3'
c.3972C>T	cMOW_F_ER5	5'-AAT AAT TCA GAG GGA TCA CTT GTG ATA T-3'
	cMOW_R_ER5	5'-TCC CTC CAT CCA AAT GAT GA-3'

Tabelle 11: Restriktionsendonukleasen

Nach erfolgter Inkubation für je 12 Stunden (37 °C im Brutschrank; 60 °C im Thermoblock) wurden die enzymatisch erzeugten Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese dargestellt. Hierfür wurden auf ein 2,5%iges DNS-Agarose-Gel 15 μl des Restriktionsansatz zusammen mit 3 μl 6x Probenauftragspuffer vermischt (Endkonzentration des Puffers 1x) und nach elektrophoretischer Trennung photographisch dokumentiert. Ein 100 bp Größenstandard diente zur Größenabschätzung der getrennten Fragmente.



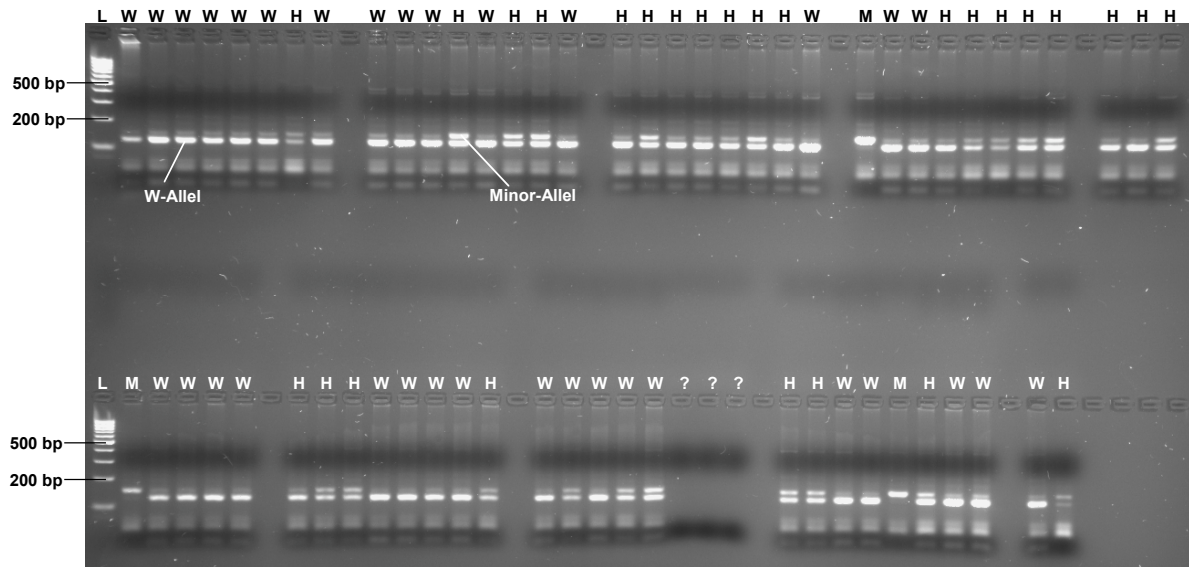


Abbildung 10: Polymorphismus c.1249G>A, L: Längenstandard, W: Wildtyp-Homozygotie, H: Heterozygoter Genotyp, M: Homozygotie für das seltenere Allel

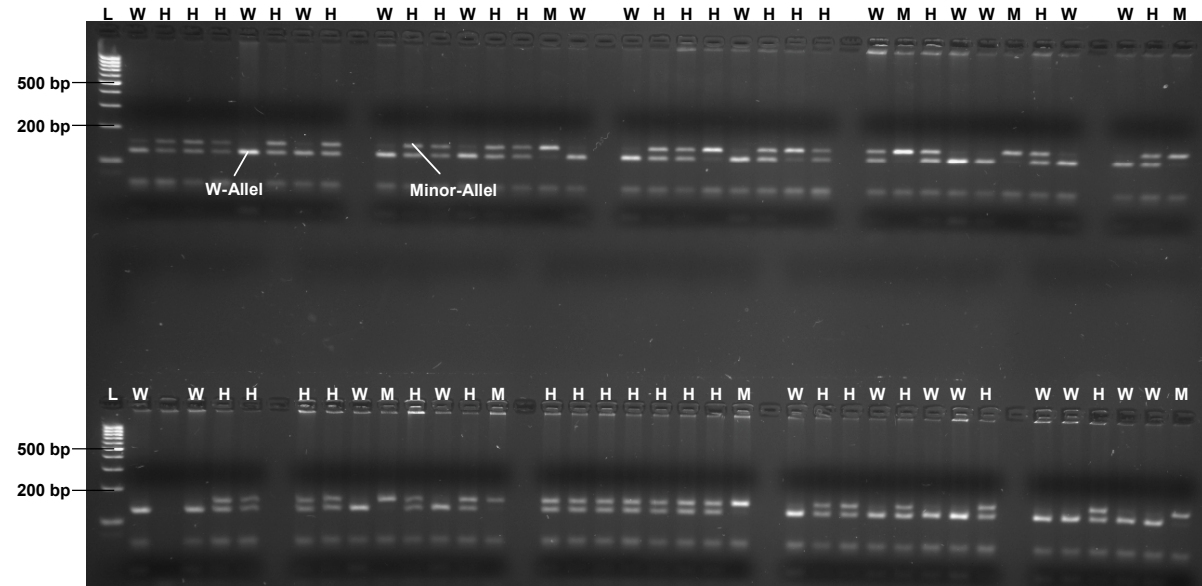


Abbildung 11: Polymorphismus c.3972C>T, L: Längenstandard, W: Wildtyp-Homozygotie, H: Heterozygoter Genotyp, M: Homozygotie für das seltenere Allel

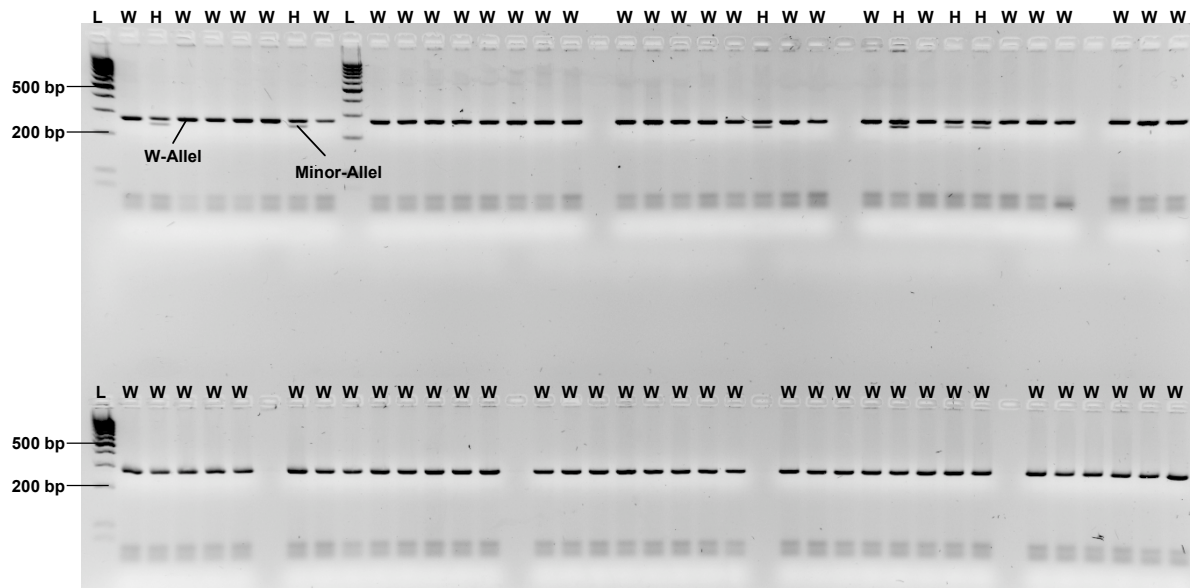


Abbildung 12: Polymorphismus c.4146+11G>C, L: Längenstandard, W: Wildtyp-Homozygotie, H: Heterozygoter Genotyp, M: Homozygotie für das seltenere Allel

## **2.9. Agarose-Gelelektrophorese**

Die PCR-Ergebnisse wurden durch Agarose-Gelelektrophorese beurteilt. Die DNS-Moleküle werden in einem elektrischen Feld auf einem Medium (Agarose-Gel) bewegt. Die Laufweite der Moleküle hängt ab von der Elektrophorese, der elektrischen Feldstärke, der Ladung des Moleküls (die wiederum vom Ionisationsgrad abhängt), der Porosität der Matrix (Agarose-Gel) und der Größe des DNS-Moleküls.

Für die Herstellung des 2,5%igen Agarose Gels wurden 100 ml 1x TAE-Puffer in ein Glasgefäß gefüllt und unter Rühren 2,5 g small base Agarose (Biozym, Hess. Oldendorf und PeqLab, Erlangen) hinzugefügt. Die Mischung wurde in einer Mikrowelle aufgekocht und bis zur Homogenität gelöst. Anschließend wurden unter erneutem Rühren 10 µl verdünnte Ethidiumbromidlösung (1:10) dazu pipettiert. Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basen der DNS. Unter Anregung mit UV-Licht werden die fluoreszierenden Banden durch Lichtemission im sichtbaren Bereich deutlich. Das abgekühlte, noch flüssige Gel wurde in eine Gelform mit Probekämmen gegossen und unter die Abzugshaube zum Aushärten gestellt. 15 µl Produkt wurden mit 3 µl Probenauftragspuffer (6x) vermischt und auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in einer mit 1x TAE gefüllten Gelkammer, an der eine Stärke von 120 V angelegt wurde. Die Banden wurden photographisch dokumentiert (Gel Doc 2000 Gel Documentation System). Mit Hilfe eines 100 bp Längenstandards (PeqLab, Erlangen) konnte die jeweilige Größe der PCR-Produkte ermittelt werden. Der Probenauftragspuffer bestand aus 50 mg Bromphenolblau, 25 mg Xylencyanol und 37,8 g (30%) Glycerin in 100 ml aqua bidest und wurde steril filtriert.

## **2.10. Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgt mit StatView (Version 5.0; SAS Institute, Cary, NC). Parametrische und nichtparametrische Tests wurden angewendet für normalverteilte und nicht-normalverteilte Parameter. Ein p-Wert < 0,05 wurde als signifikant angenommen. Die Berechnung des Kopplungsgleichgewichts der Polymorphismen wurde mit dem Arlequin Programm durchgeführt (Arlequin, Version 2.0; Universität von Genf, Genf, Schweiz). Die pharmakokinetische Analyse erfolgte mit WinNonlin (Version 5.0.1, Pharsight, Mountain Viws, Calif.). Es wurde ein Zweikompartiment-Modell mit kontinuierlichen Infusionen in zwei Dosierungsabschnitten (500 mg/m<sup>2</sup> in 30 Minuten, 4500 mg/m<sup>2</sup> in den folgenden 23,5 Stunden) zugrunde gelegt.

## **2.11. Verwendete Reagenzien**

Agarose: small DNA, Agarise, Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland

Aqua ad injectabilia: Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland

Bromphenolblau: Sigma, Deisenhofen, Deutschland

Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphate (dNTPs): Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland

DNS-Längenstandard 100 bp: PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

Ethanol: Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland

Ethidiumbromid: Sigma, Deisenhofen, Deutschland

Glycerin: Merck, Darmstadt, Deutschland

Oligonukleotide (Primer): MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland

PBS-Puffer: Phosphate Buffered Saline: Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland

PCR-Kits: PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

QIAmp DNA Blood Midi Kit: QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland

Xylencyanol: Sigma, Deisenhofen, Deutschland

## **2.12. Verwendete Geräte**

Elektrophoresekammern und Zubehör: Sub-Cell GT und Mini-Sub-Cell GT, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

Elektrophorese-Spannungsgeräte: Power Pac 300 Power Supply, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

Gel Doc 200 Gel Documentation System: Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

PCR Softstrips 0,2 ml und Caps: Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland

Pipetten: Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Quarzküvetten: Hellma GmbH & Co. KG, Mühlheim, Deutschland

Spektrophotometer: SmartSpec 3000, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

Thermocycler: DNA Thermal Cycler, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland und RoboCycler Gradient 96, Stratagene, Amsterdam, Niederlande

USF Reinstwassersystem: PURELAB Plus, USF Deutschland GmbH, Ransbach-Baumbach, Deutschland

Vortex-Genie 2: Scientific Industries, Bohemia, New York, USA

Zentrifugen: Centrifuge 5415 D und 5810 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Polymorphismus c.-24C>T in Exon 1 (rs717620)

Der Polymorphismus c.-24C>T liegt in der 5' untranslatierten Region des Exons 1 der mRNA. Der Nachweis des Polymorphismus erfolgte sowohl durch allelspezifische PCR als auch durch Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus. Der Nachweis durch PCR-RFLP erwies sich als robuster. Die Lokalisation des Polymorphismus in Beziehung zur Sequenz des Exons 1 sowie der flankierenden Sequenzen des Promoters und des Introns 1 ist in Abbildung 13 dargestellt.

```
atggttgggatgaaaggtcatcctttacggagaacatcagaatggtaGATAATTCCTGTCCACT
TTCTTTGATGAAACAAGTAAAGAAGAAACAACACAATCATATTAATAGAAGAGTCTT
C/T
GTTCAGACGCAGTCCAGGAATCATGCTGGAGAAGTTCTGCAACTCTACTTTTTGGgtgagaaat
tacatttatcttcatattgactcttctcagactcagaacaagtggtagtttagttaacttagggtg
gtcaccaacaagaaccagaa
```

Abbildung 13: Lokalisation des ABCC2-Polymorphismus c.-24C>T (rs 717620)

Die Basen des Exons 1 sind in Großbuchstaben dargestellt. Das Startcodon ist unterlegt und die Primer-Bindungsstellen unterstrichen. Im Reverse-Primer, der komplementär zur dargestellten Sequenz ist, befindet sich an der fett hervorgehobenen Position ein Basenaustausch (*aataataatctggactgcgtctggatc*). Dadurch entsteht in der c.-24C-Variante (Wildtyp) eine Taq1-Schnittstelle (TCGA), die in der c.-24T-Variante fehlt. Um den Unterschied zwischen geschnittenen und ungeschnittenen PCR-Produkten zu vergrößern, wurde der Reverse Primer am 5'-Ende um einen 9 Basen langen AAT-Repeat verlängert. Somit ergibt sich eine Größe des PCR-Produkts von 150 bp.

Beispiele für die Genotypisierung durch RFLP sind in Abbildung 14 dargestellt. Die Variante -24C wird durch das Restriktionsenzym Taq1 gespalten, während die -24T-Variante keine Restriktionsschnittstelle für das Enzym aufweist. Die Fragmentgrößen sind 123 bp + 27 bp bei Vorliegen des c.-24C (Wildtyp) und 150 bp bei Vorliegen des Minor-Allels (c.-24T).

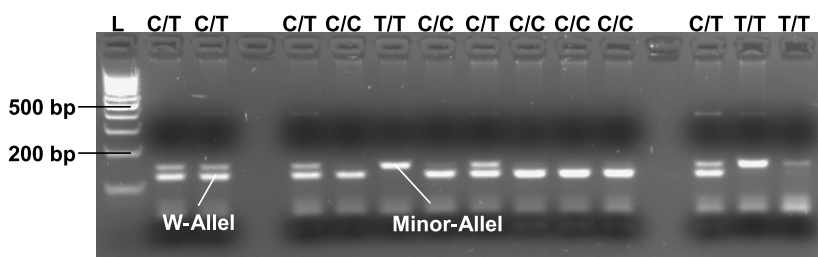


Abbildung 14: Beispiele für die Genotypisierung des c.-24C>T-Polymorphismus durch *forced mutation* RFLP. Die PCR-Produkte wurden mit Taq1 verdaut. L: Längenstandard, W-Allel: Wildtyp-Allel. Die Genotypen sind oberhalb der Auftragungsstelle kenntlich gemacht.

Die Genotyp-Verteilung der Patienten ist in Tabelle 12 zusammengefasst:

Genotyp	Patientenzahl	Prozent
C/C	19	43
C/T	21	48
T/T	4	9

Tabelle 12: Genotyp-Häufigkeiten des c.-24C>T Polymorphismus

### **3.2. Polymorphismus c.1249G>A in Exon 10 (rs2273697)**

Dieser Polymorphismus ist in der Kodierregion des Exons 10 lokalisiert und geht mit einem Aminosäureaustausch (Val417Ile) einher. Der Nachweis erfolgte durch *forced mutation* RFLP nach Verdau mit dem Restriktionsenzym Nco1 (Abbildungen 15 und 16).

```

atccttggcctttgtccatgggtcctaatttcaatccttatcttttagGCATTGACCCTATCCAACTT
GGCCAGGAAGGAGTACACC
G/A
TTGGAGAAACAGTGAACCTGATGTCTGTGGATGCCAGAAAGCTCATGGATGTGACCAACTTCATGC
ACATGCTGTGGTCAAGTGTTCTACAGATTGTCTTATCTATCTTCTTCCCTATGGAGAGAGTTGGGAC
CCTCAGTCTTAGCAGGTGTTGGGGTGATGGTGCTTGTAATCCCAATTAATGCGATACTGTCCACCA

```

Abbildung 15: Lokalisation des ABCC2-Polymorphismus c.1249G>A (rs2273697) im Exon 10. Die Basen des Exons 10 sind in Großbuchstaben dargestellt und die Primer-Bindungsstellen unterstrichen.

Sowohl im Forward- als auch im Reverse-Primer sind an den fett hervorgehobenen Positionen Punktmutationen eingefügt. Die Veränderung der Sequenz des Forward-Primers (atccttggcctttgtccttgg) diente der Entfernung einer nativ vorkommenden Nco1-Schnittstelle. Die durch den Reverse Primer (aataatcagggtcactgtttctcca) eingeführte Mutation führte zum Auftreten einer Nco1-Schnittstelle im Minor-Allel (ccatgg). Um den Unterschied zwischen geschnittenen und ungeschnittenen PCR-Produkten zu vergrößern, wurde der Reverse-Primer am 5'-Ende um einen 6 Basen langen AAT-Repeat verlängert. Somit ergibt sich für das Amplikon eine Länge von 112 bp. Abbildung 16 zeigt Beispiele für die Genotypisierung durch RFLP. Das Restriktionsenzym Nco1 spaltet die Amplikons der c.1249A-Variante (Minor-Variante), nicht jedoch die c.1249G-Variante. Die Fragmentgrößen betragen: c. 1249G-Allel 112 bp bzw. c.1249A-Allel 88 bp + 24 bp.

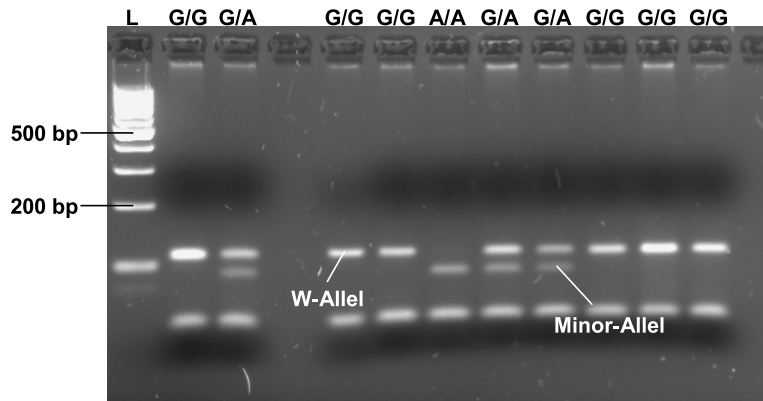


Abbildung 16: Beispiele für die Genotypisierung des Polymorphismus c.1249G>A (rs2273697) in Exon 10 durch *forced mutation* RFLP. L: Längenstandard, W-Allel: Wildtyp-Allel. Die bestimmten Genotypen sind oberhalb der Auftragungsstelle kenntlich gemacht

Die Genotyp-Verteilung der untersuchten Patienten ist in Tabelle 13 dargestellt.

Genotyp	Patientenzahl	Prozent
G/G	28	64
G/A	16	36
A/A	0	0

Tabelle 13: Genotyp-Häufigkeiten des c.1249G>A Polymorphismus (rs2273697)

### **3.3. Polymorphismen c.2780T>G und c.2883+11C>T in Exon 21 bzw. Intron 21**

In der untersuchten Region des Exons 21 wurden in der vorangegangenen Arbeit zum Vorkommen von Polymorphismen bei gesunden Kaukasiern zwei seltene Polymorphismen beschrieben. Die Polymorphismen c.2780T>G (Leu927Arg) und c.2883+11C>T liegen in Exon 21 bzw. im Intron 21 (Göres 2008). Beide Minor-Allele konnten bei den untersuchten Patienten durch allelspezifische PCR nicht nachgewiesen werden.

### **3.4. Polymorphismen c.3298C>T und c.3299G>A in Exon 24**

Das Exon 24 umspannt 156 bp. Die vorangegangene Untersuchung an gesunden Kaukasiern (Göres 2008) ergab das Vorliegen von zwei seltenen Polymorphismen in diesem Exon. Dabei betrafen die Polymorphismen benachbarte Positionen der DNS. Der Basenaustausch c.3298C>T hat einen Aminosäureaustausch von Arginin nach Cystein an Position 1100 zur Folge. Der Basenaustausch c.3299G>A betrifft das gleiche Triplet und ist mit einem Austausch Arg1100His verknüpft.

```

tggtgtatctctcctaatacgttttctagGATATTTCCACAGTGGATGACACCCTGCCTCAGTC
CTTG
C>T
G>A
CAGCTGGATTACATGCTTCCTGGGGATAATCAGCACCCCTTGTCATGATCTGCATGGCCACTCCT
GTCTTCACCATCATCGTCATTCCTCTTGGCATTATTTATGTATCTGTTTCAGgtaggtttggaaa
tggctaagtcatccttccttcctctct

```

Abbildung 17: Lokalisation der Polymorphismen c.3298C>T und c.3299G>A im Exon 24. Das Exon ist wiederum in Großbuchstaben dargestellt. Die Primerbindungsstellen sind durch Unterstreichung hervorgehoben.

Jeder der Polymorphismen führt zum Wegfall einer Fnu4H1-Schnittstelle (GCNGC), die im Amplifikat des Wildtyp-Allels vorliegt. Nach Amplifikation des Exons und der flankierenden Intronabschnitte resultiert ein 225 bp großes Amplikon. Das Wildtyp-Allel (c.3298C bzw. c.3299G) wird durch Fnu4H1-Verdau in ein 154 bp und 71 bp großes Fragment gespalten. Die Produkte beider varianten Allele werden durch Restriktionsverdau mit Fnu4H1 nicht geschnitten. Beide seltenen Polymorphismen (c.3298C>T und c.3299G>A) konnten im Patientenkollektiv nicht nachgewiesen werden.

### **3.5. Polymorphismus c.3844-73A>G in Intron 27**

Dieser Polymorphismus mit dem Basenaustausch c.3844-73A>G liegt innerhalb des Introns 27. Er ist mit Polymorphismen in Exon 30 (c.4290G>T; Val1420Val; rs7904678), Exon 31 (c.4488C>T; His1496His; rs8187707) und Exon 32 (c.4544G>A; Cys1515Tyr; rs8187710) sowie Intron-Polymorphismen in Intron 29 (c.4146+11G>C; rs8187703) und Intron 31 (c.4508+12G>A; rs8187708) gekoppelt. D.h. wenn im Intron 27 das Minor-Allel vorliegt, so liegen auch an den anderen Orten die Minor-Varianten vor. Diese Kopplung war in der Voruntersuchung an 59 gesunden Kaukasiern vollständig, so dass zur Genotypisierung der Patienten für diesen gekoppelten Haplotyp der Polymorphismus Intron 27 als Leit-Polymorphismus verwendet wurde.

Die Bestimmung erfolgte durch Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus. Hierbei konnte eine native Schnittstelle im Minor-Allel zur Genotypisierung verwendet werden.

```

tgctacccttctcctggttctatgac
a/g
cgagtcctgggtggactggttcggctgagttgccaccttataaaaacttacttctcatcttgtctccttg
ccagGCACCCTGGGTGACTGATAAGAGGCCTCCGCCAGATTGGCCCAGCAAAGGCAAGATCCAGTTTA
ACA ACTACCAAGT GCGGTACCGACCTGAGCTGGATCTGGTCCTCAGAGGGATCACTTGTGACATCGGT
AGCATGGAGAAGgtagggtggagtgaaggaaggcctggat

```

Abbildung 18: Bestimmung des in Intron 27 lokalisierten Polymorphismus c.3844-73A>G durch RFLP. Das Amplifikat schließt das gesamte Exon 28 (in Großbuchstaben dargestellt) und Abschnitte der Introns 27 und 28 ein.



Nur im Minor-Allel (c.3844-73G) liegt eine Schnittstelle (cgcg) für das Enzym BstUI vor. Daher wird das 268 bp große Produkt bei Vorliegen des Minor-Allels in Fragmente mit einer Größe von 244 bp und 24 bp gespalten.

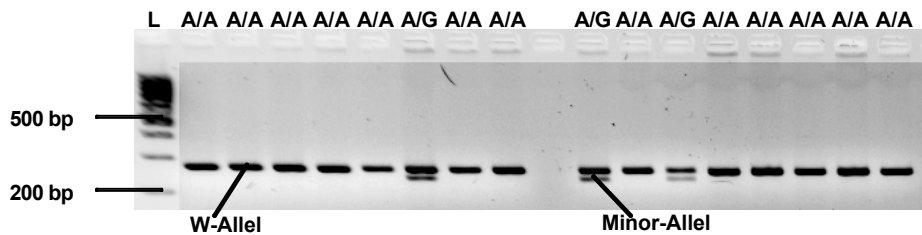


Abbildung 19: Beispiele für die Genotypisierung des Polymorphismus c.3844-73A>G in Intron 27 durch forced mutation RFLP. L: Längenstandard, W-Allel: Wildtyp-Allel. Die bestimmten Genotypen sind oberhalb der Auftragsstelle kenntlich gemacht

Die Genotyp-Verteilung des gekoppelten Haplotyps kann der Tabelle 14 entnommen werden.

Genotyp	Patientenzahl	Prozent
W/W	41	93
W/Hap	3	7
Hap/Hap	0	0

Tabelle 14: Genotypverteilung für den Polymorphismus c.3844-73A>G, der als Leitpolymorphismus für die Bestimmung des im Text beschriebenen Haplotyps verwendet wurde. W: Wildtyp-Allel, Hap: Minor-Variante

### **3.6. Polymorphismus c.3972C>T in Exon 28 (rs3740066)**

In Exon 28 ist der häufigste Polymorphismus c.3972C>T lokalisiert, der nicht mit einem Aminosäureaustausch verknüpft ist (Ile1324Ile). Der Nachweis erfolgte durch *forced mutation* RFLP mit dem Restriktionsenzym EcoRV.

```

CAGAGGGATCACTTGTGACAT
C>T
GGTAGCATGGAGAAGgtaggtggagtgaaggaaggcctggatgggaggccttgtgatcaacaacaat
tggacagagtggagagcagctgggcccctaagccttcatcatttggatggagga

```

Abbildung 20: Nachweis des stummen Polymorphismus c.3972C>T durch forced mutation RFLP. Das PCR Produkt umspannt einen Teil von Exon 28 und Intron 28.

In den Forward-Primer (***aataattcagagggatcactt**gtgat*) ist eine Punktmutation eingefügt, deren Position fett markiert ist. Zusätzlich wurde der Primer um die Basen aataatt verlängert, um den Unterschied zwischen geschnittenen und ungeschnittenen PCR-Produkten zu

vergrößern. Bei Vorliegen des c.3972C-Allels wird das PCR-Produkt durch EcoRV (Erkennungssequenz: gatatc) in zwei Fragmente der Größe 125 bp und 27 bp geschnitten, während bei Vorliegen des c.3972T-Allels das PCR-Produkt in seiner ungeschnittenen Größe von 152 bp verbleibt.

Exemplarisch sind Ergebnisse der Genotypisierung in der Abb. 20 dargestellt.

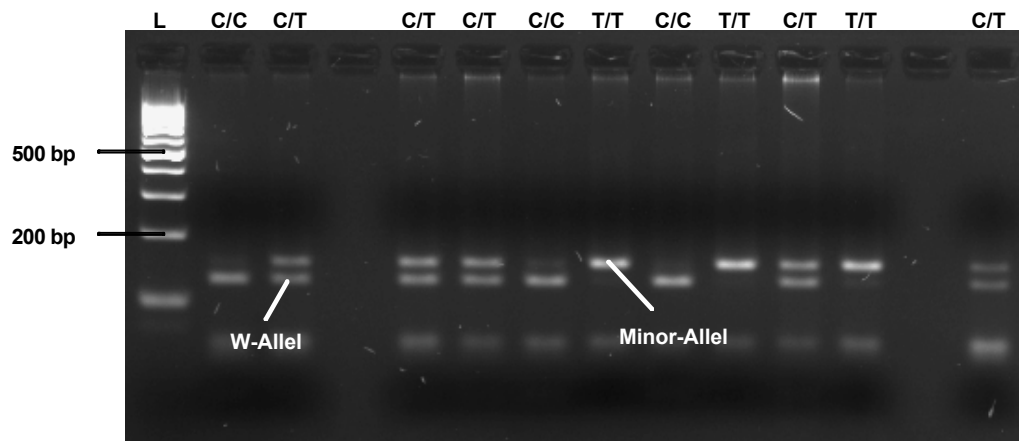


Abbildung 21: Beispiele für die Genotypisierung des Polymorphismus c.3972C>T in Exon 28 durch forced mutation RFLP. L: Längenstandard, W-Allel: Wildtyp-Allel. Die bestimmten Genotypen sind oberhalb der Auftragsstelle kenntlich gemacht

Die Genotyp-Verteilung kann der Tabelle 15 entnommen werden.

Genotyp	Patientenzahl	Prozent
C/C	8	18
C/T	30	68
T/T	6	14

Tabelle 15: Genotyp-Häufigkeiten des c.3972C>T Polymorphismus (rs3740066)

### **3.7. Zweikompartimentenanalyse**

Bei einem einfachen Zweikompartimentmodell resultieren zwei unterschiedliche Abschnitte des Konzentrationsverlaufs im zentralen Kompartiment, die durch die Konzentrationsbestimmung im Blut oder Plasma definiert werden. In der ersten Phase fällt die Plasmakonzentration schneller als in der zweiten Phase. Die erste Phase ist gekennzeichnet einerseits durch Beladung des peripheren Kompartiments, das als ein im Organismus vorhandener Speicher für die zugeführten Medikamente betrachtet werden kann, und andererseits der Elimination aus dem zentralen Kompartiment durch Metabolismus oder Exkretion. In der zweiten Phase wird das periphere Kompartiment in das

zentrale Kompartiment entladen, so dass der Plasmakonzentrationsabfall jetzt langsamer erfolgt.

Wesentlich für den Verlauf der Plasmakonzentration sind die Geschwindigkeitskonstanten, mit denen diese Prozesse erfolgen. Die Dosierungskonstante ( $k_1$ ) beschreibt die Zufuhr des Medikaments in das zentrale Kompartiment. Die Eliminationskonstante ( $k_{10}$ ) ist die Geschwindigkeitskonstante der Elimination, die aus dem zentralen Kompartiment erfolgt. Die Konstanten  $k_{12}$  und  $k_{21}$  beschreiben die Geschwindigkeiten, mit denen der Arzneistoff in das periphere Kompartiment ( $k_{12}$ ) bzw. aus dem peripheren Kompartiment in das zentrale Kompartiment ( $k_{21}$ ) verteilt wird. Dieses Modell wird in Abbildung 22 illustriert.

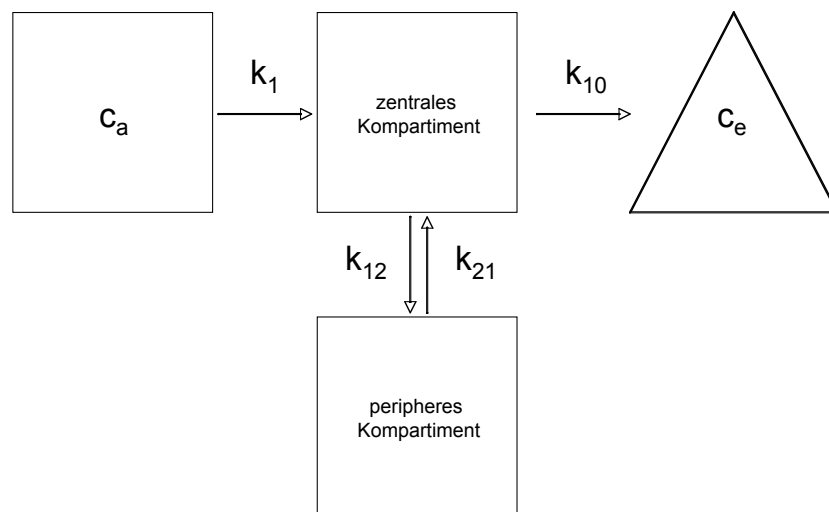


Abbildung 22: Zwei-Kompartiment-Modell,  $c_a$ : aufgenommene Substanzkonzentration,  $c_e$ : eliminierte Substanzkonzentration,  $k_1$ : Dosierungskonstante,  $k_{10}$ : Eliminationskonstante,  $k_{12}$ : Verteilungskonstante vom zentralen in das periphere Kompartiment,  $k_{21}$ : Verteilungskonstante vom peripheren in das zentrale Kompartiment

### **3.8. Plasmakonzentrationen**

Die Blutentnahme zur MTX-Konzentrationsbestimmung wurde 24, 36, 42 und 48 Stunden nach Beginn der MTX-Infusion durchgeführt. Bei Patienten mit einer Ausscheidungsstörung von Methotrexat wurden auch noch zu späteren Zeitpunkten Blut für die Konzentrationsbestimmung abgenommen. Da dieser Werte jedoch nur vereinzelt im Kollektiv vorkamen, wurden sie in die vergleichenden Auswertungen nicht einbezogen. Da jeder Patient vier Hochdosis-MTX-Zyklen durchlief, gab es für jeden Patienten vier Messwerte zu jedem einzelnen Zeitpunkt (MTX nach 24 Stunden bei Zyklus 1, 2, 3 und 4, MTX nach 36 Stunden bei Zyklus 1, 2, 3 und 4 usw.). Insgesamt standen uns 692 MTX-Werte zur Verfügung, zwölf Plasmakonzentrationen fehlten (1,7% der Werte). Um die intraindividuelle

Variabilität zu vermindern wurden zunächst Plasmakonzentrationen zu den vier unterschiedlichen Zeitpunkten gemittelt.

Die erste MTX-Plasmakonzentration wurde 24 Stunden nach Infusionsbeginn bestimmt. Der Mittelwert aller Patienten lag zu diesem Zeitpunkt bei 37,5  $\mu\text{mol/L}$ , mit einem Maximum von 63,6  $\mu\text{mol/L}$  und einem Minimum von 17,4  $\mu\text{mol/L}$ . Bei getrenntgeschlechtlicher Betrachtung des Mittelwertes stellte sich heraus, dass es Unterschiede zwischen männlichen ( $n = 29$ ) und weiblichen ( $n = 15$ ) gab ( $p = 0,045$ ). Dabei lag die mittlere Konzentration bei weiblichen Patienten im Mittel um 7,3  $\mu\text{mol/L}$  höher als bei männlichen Patienten. Zu späteren Zeitpunkten (36 h, 42 h, 48 h) der Konzentrationsbestimmung wurde dieser Unterschied noch deutlicher. Während der Unterschied zwischen dem Mittelwert der männlichen und weiblichen Patienten zur Stunde 24 nur 17% betrug, lag er in den nachfolgenden Bestimmungen um 30%.

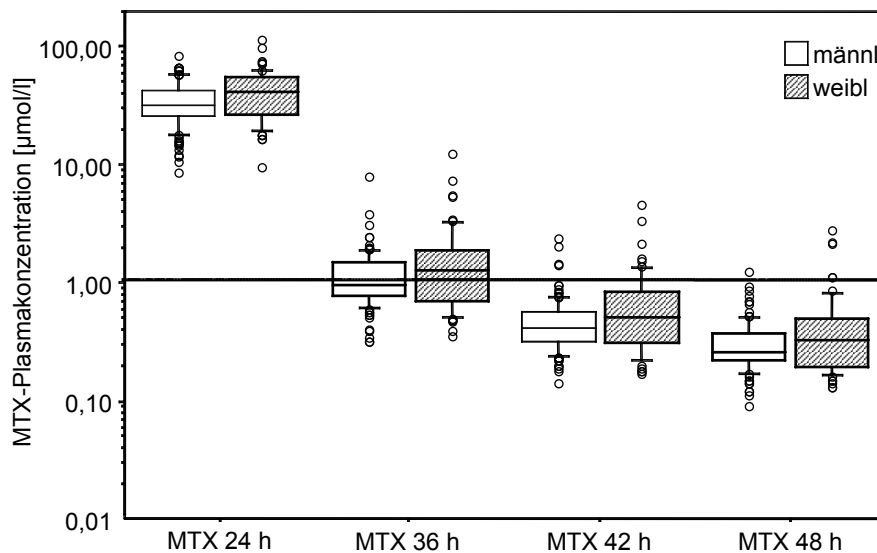


Abbildung 23: Box-Diagramm MTX-Plasmakonzentrationen zur Stunde 24, 36, 42 und 48 nach Geschlecht getrennt dargestellt

Tabelle 16 zeigt die individuell gemittelten Plasmakonzentrationen [ $\mu\text{mol/L}$ ] der vier Zyklen getrennt nach dem Untersuchungszeitpunkt und dem Geschlecht.

	Mittelwert	Std.abw.	Minimum	Maximum	p-Wert	$\Delta c$ [ $\mu\text{mol/L}$ ]
<b>24 Std.</b>						
gesamt	37,5	11,5	17,4	63,6		
männl.	35,0	9,6	17,4	59,6	0,045	7,3
weibl.	42,3	13,6	23,0	63,6		
<b>36 Std.</b>						

	Mittelwert	Std.abw.	Minimum	Maximum	p-Wert	$\Delta c$ [ $\mu\text{mol/L}$ ]
gesamt	1,4	1,0	0,5	5,8		
männl.	1,2	0,6	0,6	3,0	0,055	0,6
weibl.	1,8	1,4	0,5	5,8		
<b>42 Std.</b>						
gesamt	0,6	0,4	0,2	1,9		
männl.	0,5	0,2	0,3	1,1	0,045	0,2
weibl.	0,7	0,5	0,2	1,9		
<b>48 Std.</b>						
gesamt	0,4	0,2	0,2	1,1		
männl.	0,3	0,1	0,2	0,6	0,02	0,2
weibl.	0,5	0,3	0,2	1,1		

Tabelle 16: Mittelwerte, Standardabweichung, Minimum, Maximum, p-Wert und Konzentrationsdifferenz zwischen weiblichen und männlichen Patienten.  $\Delta c$  = mittlerer Konzentrationsunterschied

Da in dieser orientierenden Untersuchung signifikante Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Patienten hinsichtlich der Mittelwerte der MTX-Konzentrationen aller Zyklen beobachtet wurden, stellte sich die Frage, ob dieser auch bei Betrachtung der gepaarten Einzelwerte bestehen. Daher wurde ANOVA für gepaarte Messwerte durchgeführt, welche auch der Frage nach Konzentrationsunterschieden in den sequentiell verabfolgten Zyklen nachging. Auch in dieser Analyse zeigte sich ein deutlicher Effekt des Geschlechts auf die Plasmakonzentrationen von MTX. Mädchen hatten durchgehend höhere MTX-Konzentrationen. Dabei streuten die Werte bei Betrachtung des Standardfehlers allerdings deutlich. Dies änderte sich bei Einführung des c.-24C>T Polymorphismus als zusätzliche Variante. Bei Betrachtung der MTX-Konzentrationen in Abhängigkeit von den einzelnen Zyklen stellte sich ein Trend zu abnehmenden Werten dar. Dieser erreichte allerdings zu keinem der Zeitpunkte Signifikanzniveau ( $p > 0,08$ ).

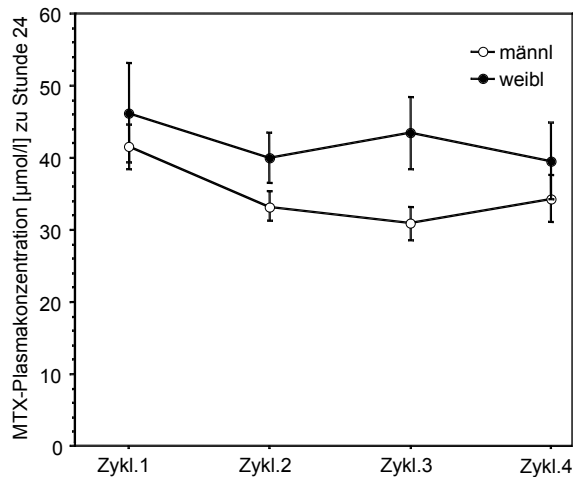


Abbildung 24: MTX-Plasmakonzentrationen zu Stunde 24 getrennt nach Geschlecht und Zyklus

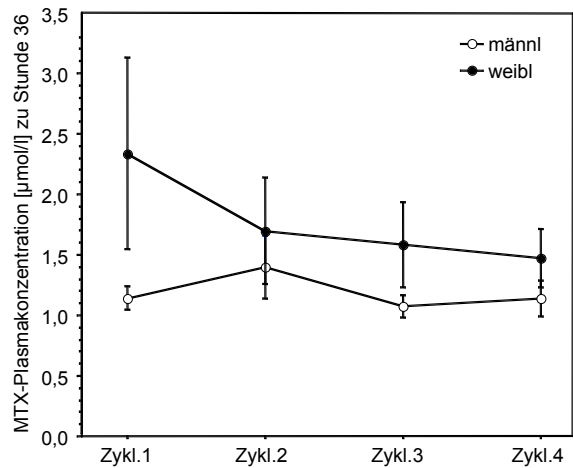


Abbildung 25: MTX-Plasmakonzentrationen zu Stunde 36 nach Geschlecht und Zyklus

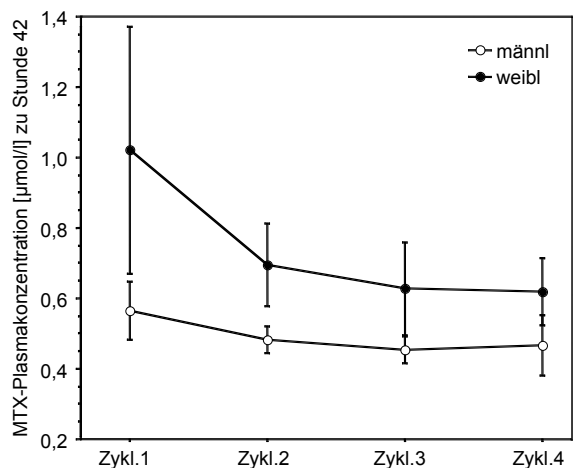


Abbildung 26: MTX-Plasmakonzentrationen zu Stunde 42 getrennt nach Geschlecht und Zyklus

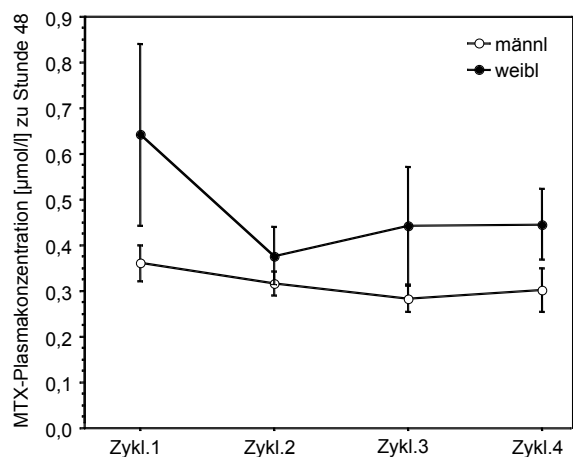


Abbildung 27: MTX-Plasmakonzentrationen zu Stunde 48 nach Geschlecht und Zyklus

### **3.9. MTX-Konzentration und Alter**

Um zu untersuchen, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Alter der Patienten und der MTX-Konzentration gibt, wurde das Kollektiv in vier Altersklassen eingeteilt. Patienten der Klasse 1 waren zwischen 0 und 3 Jahre alt, Klasse 2 schloss alle Patienten zwischen 4 und 6 Jahren ein, Klasse 3 beinhaltete die Patienten zwischen 7 und 12 und schließlich Klasse 4 in der alle Patienten älter als 12 Jahre waren. Eine ANOVA für die jeweiligen Zeitpunkte der MTX-Konzentrationsbestimmung ergab keinen signifikanten Zusammenhang zwischen den Variablen ( $p > 0,47$ ).

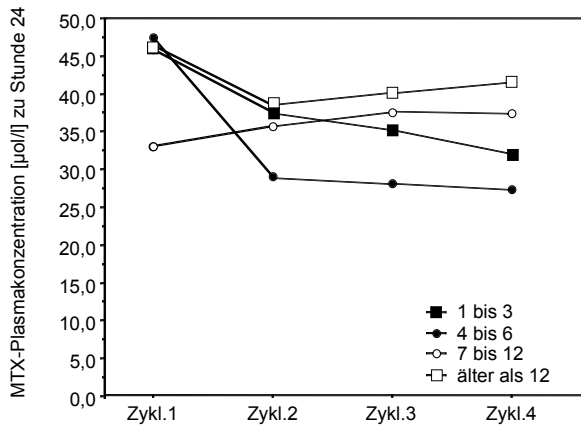


Abbildung 28: MTX-Plasmakonzentration zu Stunde 24 getrennt nach Altersklassen und Zyklus

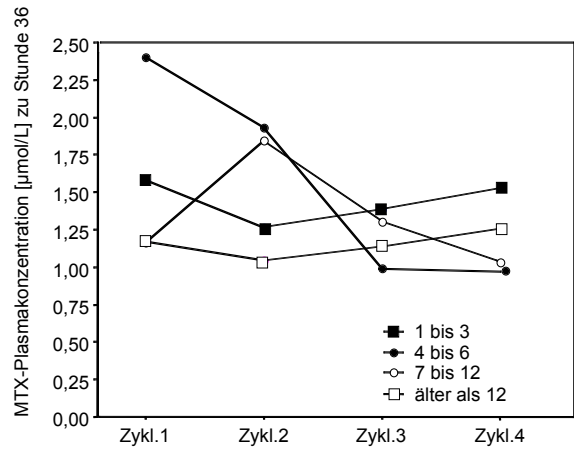


Abbildung 29: MTX-Plasmakonzentration zu Stunde 36 getrennt nach Altersklassen und Zyklus

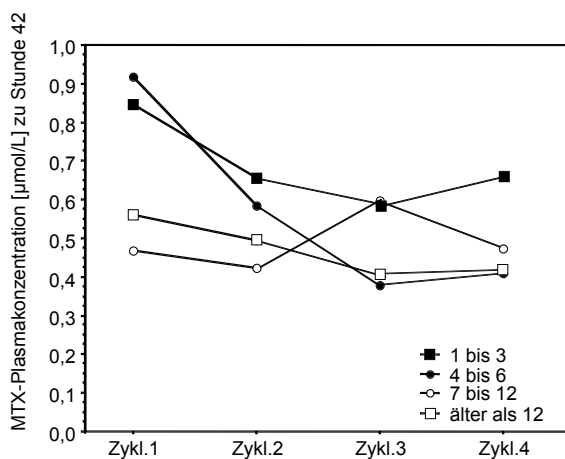


Abbildung 30: MTX-Plasmakonzentration zu Stunde 42 getrennt nach Altersklassen und Zyklus

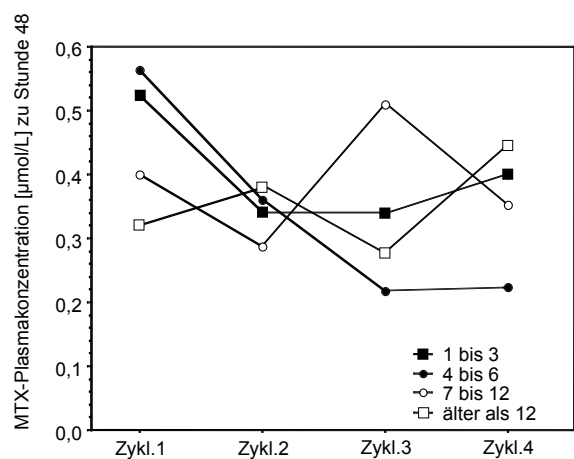


Abbildung 31: MTX-Plasmakonzentration zu Stunde 48 getrennt nach Altersklassen und Zyklus

### 3.10. MTX-Konzentration und Körperoberfläche

Die Dosierung des Methotrexats wurde anhand der Körperoberfläche des Patienten berechnet. Für die Varianzanalyse wurden die Patienten nach der Körperoberfläche in Terzilen geteilt. Diese Einteilung ergab etwa drei gleich große Gruppen. Eine ANOVA für die Körperoberfläche und den Mittelwert der Methotrexatkonzentration 24 Stunden nach Infusionsbeginn ließ vermuten, dass ein grenzwertiger Zusammenhang zwischen diesen beiden Variablen besteht ( $p = 0,060$ ). Bei Betrachtung der MTX-Konzentration zu den späteren Zeitpunkten war der p-Wert jedoch nicht mehr signifikant ( $p > 0,293$ ). Es erscheint

möglich, dass der Zusammenhang zwischen der 24-Stunden-Konzentration und der Körperoberfläche nur zufällig zustande kam.

Die zentrale Fragestellung der Arbeit war, ob Zusammenhänge zwischen häufigen Polymorphismen im ABCC2-Gen und den Methotrexat-Konzentrationen gibt. Da sich schon bei der Betrachtung der MTX-Konzentrationen eine Geschlechterdifferenz herauskristallierte, wurden auch die genotypischen Analysen getrenntgeschlechtlich durchgeführt. Dabei stellte der Mittelwert der MTX-Konzentrationen die abhängige Variable dar und der Genotyp sowie das Geschlecht die unabhängigen Variablen.

### **3.11. MTX-Konzentration und ABCC2 Polymorphismen**

#### **3.11.1. c.-24C>T Polymorphismus**

Der SNP c.-24C>T im nicht translatierten Abschnitt des Exon 1 gehört zu den häufig vorkommenden Polymorphismen im ABCC2 Gen. Innerhalb des Patientenkollektivs ergaben sich folgende Genotyp-Häufigkeiten:

Homozygot Wildtyp (-24C/-24C) 19

Heterozygotie (-24C/-24T) 21

Homozygot Minor-Allel (-24T/-24T) 4

Bei Betrachtung der nach dem c.-24C>T Genotyp getrennten, gemittelten MTX-Konzentrationen ergab sich zu einigen Zeitpunkten ein grenzwertig signifikanter Zusammenhang. Dabei zeigten Patienten mit dem Vorliegen einer oder mehrerer Minor-Allele höhere Plasmakonzentrationen als Patienten mit dem -24C/C Genotyp.

	<b>c.-24C&gt;T Polymorphismus in Exon 1</b>				
Std.	gesamt	-24C/C	-24C/T	-24T/T	p-Wert
24	37,5 ± 11,5	35,6 ± 11,0	39,6 ± 11,2	35,8 ± 16,4	0,53
36	1,4 ± 1,0	1,0 ± 0,4	1,6 ± 1,2	2,1 ± 1,1	0,05
42	0,6 ± 0,4	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,4	0,7 ± 0,4	0,22
48	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,6 ± 0,3	0,07

Tabelle 17: Mittelwerte mit Standardabweichung der gemittelten MTX-Plasmakonzentrationen [µmol/L] zu den vier Zeitpunkten getrennt nach c.-24C>T Polymorphismus



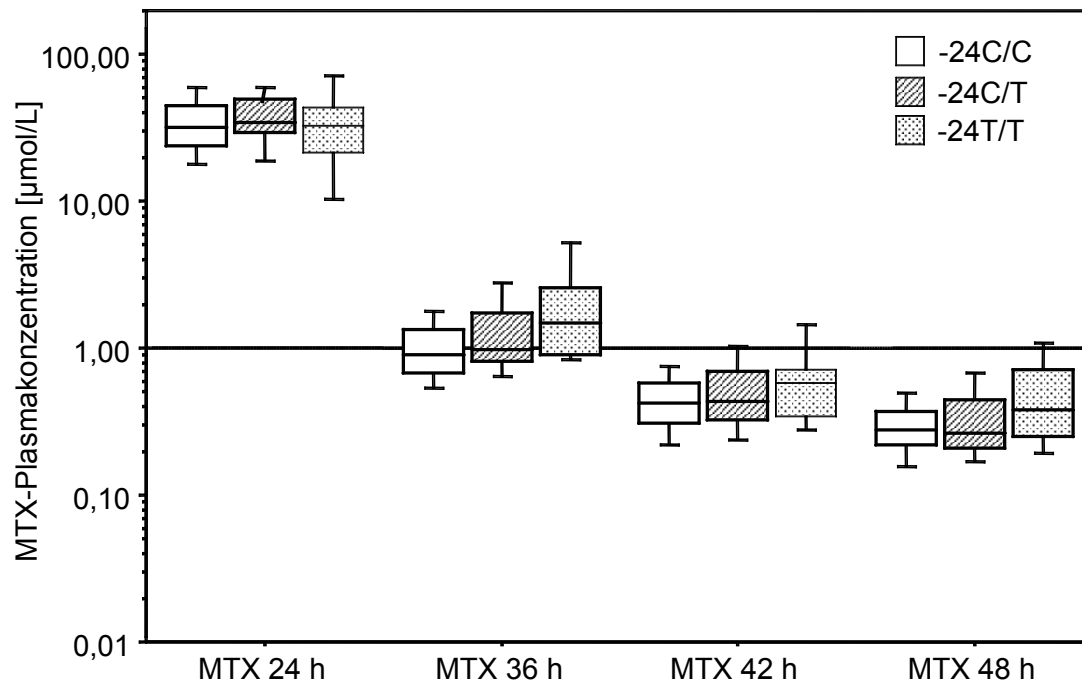


Abbildung 32: Boxplot, MTX-Plasmakonzentrationen getrennt nach c.-24C>T Polymorphismus zu den vier Zeitpunkten in logarithmischer Darstellung

c.-24C>T Polymorphismus in Exon 1										
	gesamt	männliche Pat.			weibliche Pat.			p-Wert		
		-24C/C	-24C/T	-24T/T	-24C/C	-24C/T	-24T/T	p1	p2	p3
	n = 44	14	14	1	5	7	3			
24	37,5 ± 11,5	35,6 ± 10,9	35,0 ± 8,7	27,0	35,5 ± 12,6	48,7 ± 10,6	38,7 ± 18,8	0,094	0,18	0,196
36	1,4 ± 1,0	1,2 ± 0,4	1,1 ± 0,5	3,0	0,7 ± 0,2	2,5 ± 1,6	1,9 ± 1,1	0,88	0,003	0,003
42	0,5 ± 0,4	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,7	0,3 ± 0,1	1,0 ± 0,5	0,7 ± 0,5	0,036	0,038	0,009
48	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,5	0,3 ± 0,1	0,6 ± 0,3	0,6 ± 0,4	0,159	0,049	0,032

Tabelle 18: Mittelwerte mit Standardabweichung der MTX-Plasmakonzentrationen [µmol/L] zu den vier Zeitpunkten getrennt nach c.-24C>T Polymorphismus und nach Geschlecht. p1: Effekt des Geschlechts auf die MTX-Konzentration, p2: Effekt des c.-24C>T Polymorphismus auf die MTX-Konzentration, p3: Effekt der Interaktion zwischen Geschlecht und c.-24C>T Polymorphismus auf die MTX-Konzentration

Die Effekte sind im nachfolgenden Boxplot graphisch dargestellt.

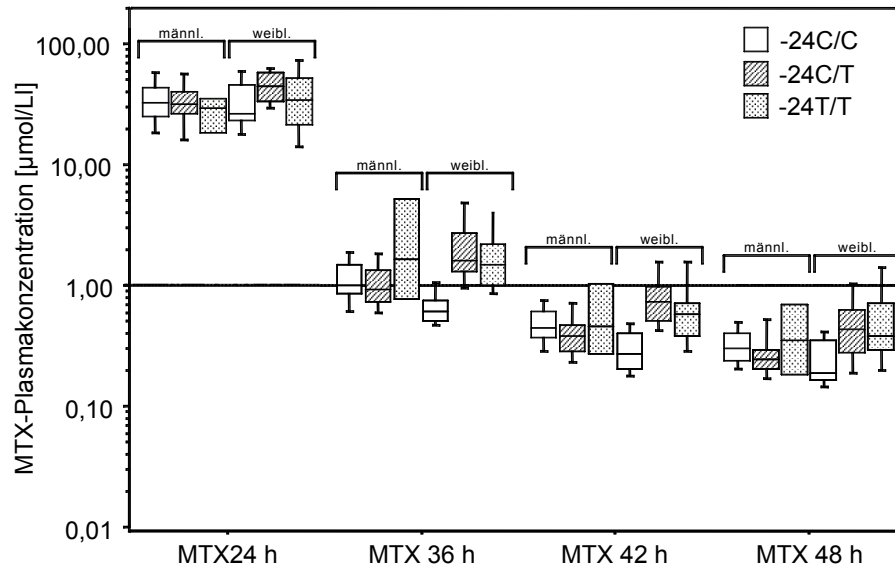


Abbildung 33: Boxplot, Einfluss des Geschlechts sowie des c.-24C>T Polymorphismus auf die MTX-Plasmakonzentration in logarithmischer Darstellung

Um die Effekte besser zu verdeutlichen, wurden Genotypen mit mindestens einem Minor-Allel zusammengefasst. Somit bestand eine Gruppe aus Patienten mit dem -24C/C Genotyp, während die zweite Gruppe Patienten umfasste, die mindestens ein Minor-Allel besaßen. Diese Gruppierung wurde gewählt, da naturgemäß nur wenige Patienten homozygot für das Minor-Allel waren. In der Gruppe der männlichen Patienten hatte lediglich ein Patient diesen Genotyp.

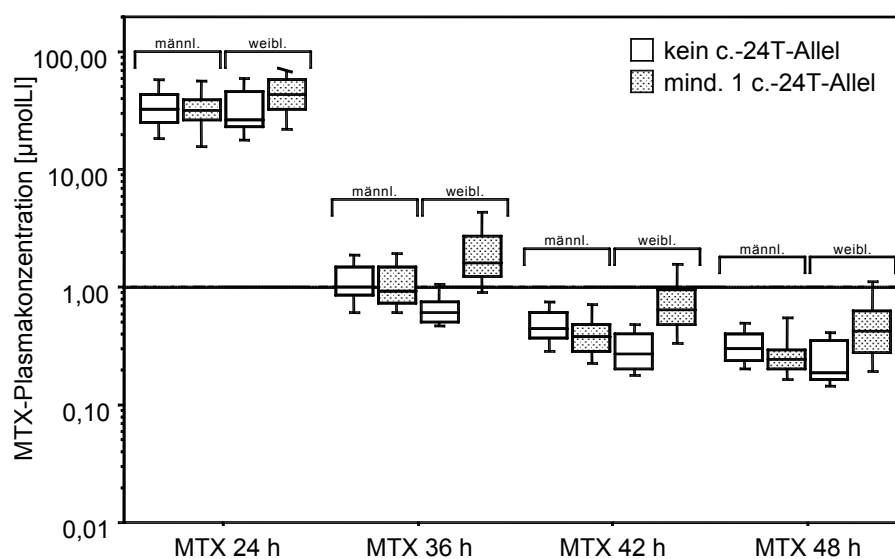


Abbildung 34: Boxplot, MTX-Plasmakonzentrationen getrennt nach Geschlecht und c.-24C>T Polymorphismus

Auch hier stellte sich die Frage, ob der signifikante Zusammenhang zwischen Geschlecht und c.-24C>T Polymorphismus bei Betrachtung der gepaarten Einzelwerte zu sehen wäre. Eine ANOVA konnte diesen Effekt bestätigen (Tabelle 19).

	p-Wert			
	24 Std.	36 Std.	42 Std.	48 Std.
Geschlecht	0,13	0,26	0,31	0,12
Mindestens 1 c.-24T-Allel	0,22	0,005	0,019	0,017
Interaktion Geschlecht mit c.-24T-Allel	0,13	0,009	0,006	0,006

Tabelle 19: p-Werte mit dem Zeitpunkt (Kategorie für MTX) als abhängige Variable und dem Geschlecht und dem -24T Genotyp als unabhängige Variablen

### 3.11.2. Zweikompartiment-Analyse der MTX-Kinetik unter Einbeziehung der Variablen Geschlecht und c.-24C>T Polymorphismus

Die Zweikompartiment-Analyse wurde unter Einbeziehung der Variablen c.-24C>T Genotyp und Geschlecht durchgeführt. Als Ausgangsvariablen wurden Daten verwendet, die bereits Bestimmungen des Verteilungsvolumens und der Geschwindigkeitskonstanten definiert haben (Wall et al. 2000). Diese dienten dem Programm als Ausgangsparameter zur Bestimmung der entsprechenden Werte bei den einzelnen Patienten. Die für jeden Zyklus der Patienten bestimmten Werte wurden für den einzelnen Patienten gemittelt und einer statistischen Analyse unterzogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 20 dargestellt.

	Genotyp				p-Wert		
	männlich		weiblich		c.-24T	Geschlecht	Interaktion
	C/C	T/C oder T/T	C/C	T/C oder T/T			
AUC <sub>36-48</sub>	7,18 ± 3,21	7,30 ± 5,26	4,61 ± 1,81	14,17 ± 12,78	0,003	0,17	0,0039
K <sub>10</sub>	0,741 ± 0,24	0,782 ± 0,26	0,836 ± 0,31	0,647 ± 0,30	0,70	0,15	0,032
K <sub>12</sub>	0,067 ± 0,026	0,085 ± 0,068	0,098 ± 0,12	0,102 ± 0,11	0,35	0,068	0,49
K <sub>21</sub>	0,122 ± 0,038	0,134 ± 0,044	0,143 ± 0,054	0,153 ± 0,072	0,44	0,13	0,94
α-HWZ	0,91 ± 0,23	0,86 ± 0,23	0,82 ± 0,24	1,04 ± 0,33	0,14	0,42	0,0096
β-HWZ	6,98 ± 1,96	6,35 ± 1,50	6,08 ± 1,89	6,22 ± 2,34	0,81	0,40	0,58

Tabelle 20: Multivariate Analyse der AUC<sub>36-48</sub> und Parametern des pharmakokinetischen Modell

In Übereinstimmung mit der Betrachtung der Einzelwerte zeigte sich ein höheres Konzentrations-Zeit-Integral ( $AUC_{36-48h}$ ) bei Trägern mit mindestens einem c.-24T-Allel. Dies spiegelte sich auch in der Notwendigkeit zu einer intensiveren Rescue-Therapie wider (s.o.).

Die signifikante Interaktion zwischen dem c.-24 Genotyp und dem Geschlecht der Patienten zeigt sich in einer Verlängerung der  $\alpha$ -Halbwertszeit bei weiblichen c.-24T-Allelträgerinnen. Dieser Unterschied dürfte nach dieser Analyse auf eine verminderte Elimination von MTX aus dem zentralen Kompartiment zurückzuführen sein, da die Konstante  $k_{10}$  bei weiblichen c.-24T-Allelträgerinnen vermindert ist.

### 3.11.3. Weitere Polymorphismen: Polymorphismus c.1249G>A in Exon 10, Polymorphismus c.2883+11C>T in Exon 21 und Polymorphismus c.3844-73A>G in Intron 27

Bei dem Polymorphismus c.1249G>A und dem gelinkten Polymorphismus c.3844-73A>G kamen im Patientenkollektiv ausschließlich Patienten mit heterozygotem Vorliegen der Minor-Allele vor. Patienten mit homozygotem Vorliegen von Minor-Allelen wurden nicht beobachtet. Bezüglich des seltenen Polymorphismus c.2883+11C>T in Exon 21 konnte in unserem Kollektiv nur das Wildtyp-Allel nachgewiesen werden.

#### *3.11.3.1. Polymorphismus c.1249G>A in Exon 10 (rs 2273697)*

Eine Analyse des c.1249G>A Polymorphismus und der MTX-Plasmakonzentration zeigte auch unter Berücksichtigung der Variable Geschlecht keinen signifikanten Zusammenhang.

	<b>Polymorphismus c.1249G&gt;A in Exon 10</b>			
	gesamt (n = 44)	c.1249G/G (n = 28)	c.1249G/A (n = 16)	p-Wert
24 Std.	37,5 ± 11,5	36,1 ± 11,6	40,0 ± 11,2	0,08
36 Std.	1,4 ± 1,0	1,4 ± 1,1	1,5 ± 0,7	0,6
42 Std.	0,6 ± 0,4	0,6 ± 0,4	0,6 ± 0,3	0,26
48 Std.	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,28

Tabelle 21: Mittelwerte mit Standardabweichung der MTX-Plasmakonzentration [ $\mu\text{mol/L}$ ] getrennt nach Polymorphismus c.1249G>A zu den vier Zeitpunkten

Polymorphismus c.1249G>A in Exon 10						
	gesamt (n = 44)	männlich		weiblich		p-Wert
		c.1249G/G (n = 17)	c.1249G/A (n = 12)	c.1249G/G (n = 11)	c.1249G/A (n = 4)	
24 Std.	37,5 ± 11,5	34,0 ± 9,7	36,5 ± 9,7	39,3 ± 14,0	50,5 ± 9,1	0,26
36 Std.	1,4 ± 1,0	1,1 ± 0,6	1,3 ± 0,5	1,7 ± 1,5	1,9 ± 1,2	0,1
42 Std.	0,6 ± 0,4	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,3	0,7 ± 0,5	0,8 ± 0,5	0,67
48 Std.	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,3	0,6 ± 0,3	0,74

Tabelle 22: Mittelwerte mit Standardabweichung der MTX-Plasmakonzentration [ $\mu\text{mol/L}$ ] getrennt nach Polymorphismus c.1249G>A und Geschlecht zu den vier Zeitpunkten

3.11.3.2. Die haplotypisch gekoppelten Polymorphismen c.3844-73A>G in Intron 27, c.4146+11G>C in Intron 29, c.4290G>T in Exon 30, c.448C>T in Exon 31, c.4508+12G>A in Intron 31 und c.4544G>A in Exon 32

Der Polymorphismus c.38844-73A>G ist mit den Polymorphismen c.4146+11G>C in Intron 29, c.4290G>T in Exon 30, c.448C>T in Exon 31, c.4508+12G>A in Intron 31 und c.4544G>A in Exon 32 gekoppelt. Hatte ein Patient eine Punktmutation im Intron 27, so lag auch die Minor-Variante in den anderen Introns bzw. Exons vor. So genügte die Analyse des Polymorphismus c.3844-73A>G in Intron 27, um einen Zusammenhang zwischen der MTX-Plasmakonzentration und dem Genotyp bzw. dem Geschlecht zu untersuchen. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang.

Polymorphismus c.3844-73A>G in Intron 27				
	gesamt (n = 44)	c.3844-73A/A (n = 41)	c.3844-73A/G (n = 3)	p-Wert
24 Std.	37,5 ± 11,5	37,9 ± 11,7	32,1 ± 8,2	0,43
36 Std.	1,4 ± 1,0	1,4 ± 1,0	1,0 ± 0,5	0,32
42 Std.	0,6 ± 0,4	0,6 ± 0,4	0,4 ± 0,2	0,16
48 Std.	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,7	0,18

Tabelle 23: Mittelwerte mit Standardabweichung der MTX-Plasmakonzentration [ $\mu\text{mol/L}$ ] getrennt nach Polymorphismus c.3844-73A>G zu den vier Zeitpunkten

Polymorphismus c.3844-73A>G in Intron 27						
	gesamt (n = 44)	männlich		weiblich		p-Wert
		c.1249G/G (n = 28)	c.1249G/A (n = 1)	c.1249G/G (n = 13)	c.1249G/A (n = 2)	
24 Std.	37,5 ± 11,5	34,8 ± 9,8	40,36	44,5 ± 13,1	27,9 ± 5,6	0,12
36 Std.	1,4 ± 1,0	1,2 ± 0,6	0,9	1,9 ± 1,5	1,0 ± 0,7	0,58
42 Std.	0,6 ± 0,4	0,5 ± 0,2	0,3	0,8 ± 0,5	0,4 ± 0,2	0,77
48 Std.	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,2	0,5 ± 0,3	0,3 ± 0,1	0,55

Tabelle 24: Mittelwerte mit Standardabweichung der MTX-Plasmakonzentration [ $\mu\text{mol/L}$ ] getrennt nach Polymorphismus c.3844-73A>G und Geschlecht zu den vier Zeitpunkten

### 3.11.3.3. Polymorphismus c.3972C>T in Exon 28 (rs 3740066)

Der c.3972C>T Polymorphismus in Exon 28 ist ein sehr häufig vorkommender SNP. In unserem Kollektiv fand sich bei den weiblichen Patienten nur eine Patientin mit einer Homozygotie für den Wildtyp, bei 11 heterozygoten Patientinnen und 3 Patientinnen mit dem Vorliegen zweier Minor-Allele. In der größeren Gruppe der männlichen Patienten zeigten 7 Probanden den Exon 28 Wildtyp. Bei 19 Patienten fanden wir den heterozygoten Genotyp c.3972C/T, 3 Patienten hatten den 972T/T Genotyp. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der MTX-Plasmakonzentration und diesem Polymorphismus konnte in unserer Untersuchung nicht beobachtet werden.

Polymorphismus c.3972C>T in Exon 28					
	gesamt (n = 44)	c.3972C/C (n = 8)	c.3972C/T (n = 30)	c.3972T/T (n = 6)	p-Wert
24 Std.	37,5 ± 11,5	34,1 ± 8,16	39,2 ± 11,5	33,6 ± 15,1	0,17
36 Std.	1,4 ± 1,0	1,3 ± 0,4	1,4 ± 1,0	1,7 ± 1,2	0,65
42 Std.	0,6 ± 0,4	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,4	0,6 ± 0,3	0,76
48 Std.	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,5 ± 0,3	0,41

Tabelle 25: Mittelwerte mit Standardabweichung der MTX-Plasmakonzentration [ $\mu\text{mol/L}$ ] getrennt nach Polymorphismus c.3972C>T zu den vier Zeitpunkten

Polymorphismus c.3972C>T in Exon 28								
	gesamt (n = 44)	männlich			weiblich			p- Wert
		c.3972C/ C (n = 7)	c.3972C/ T (n = 19)	c.3972T/ T (n = 3)	c.3972C/ C (n = 1)	c.3972C/T (n = 11)	c.3972T/T (n = 3)	
24 Std.	37,5 ± 11,5	35,2 ± 8,1	36,0 ± 9,9	28,4 ± 11,7	26,2	44,7 ± 12,2	38,7 ± 18,8	0,36
36 Std.	1,4 ± 1,0	1,4 ± 0,4	1,1 ± 0,4	1,4 ± 1,3	0,7	1,8 ± 1,5	1,9 ± 1,1	0,43
42 Std.	0,6 ± 0,4	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,4	0,7 ± 0,6	0,7 ± 0,5	0,47
48 Std.	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,2	0,5 ± 0,3	0,6 ± 0,4	0,34

Tabelle 26: Mittelwerte mit Standardabweichung der MTX-Plasmakonzentration [ $\mu\text{mol/L}$ ] getrennt nach Polymorphismus c.3972C>T und Geschlecht zu den vier Zeitpunkten

Zusammenfassend konnte lediglich für den c.24C>T Polymorphismus ein signifikanter Einfluss auf die MTX-Plasmakonzentration nachgewiesen werden. Allerdings ist die Aussagekraft der Analysen für die seltener vorkommenden Polymorphismen durch die geringe Patientenzahl begrenzt.

## **4. Diskussion**

Diese Untersuchung hatte den Einfluss häufiger Polymorphismen im ABCC2-Gen auf die Plasmakonzentration von Methotrexat in der Hochdosistherapie zum Gegenstand. Hintergrund der Fragestellung ist die erhebliche interindividuelle Variabilität der Methotrexat-Konzentrationen. Diese Variabilität besteht auch, wenn die MTX-Dosierung anhand der Körperoberfläche berechnet wird. Faktoren, die möglicherweise zu einer Variabilität der MTX-Plasmakonzentrationen beitragen können sind u.a. Geschlecht, Alter, Interaktion mit anderen Medikamenten, Nierenfunktion und die Infusionstherapie des Patienten während der Hochdosistherapie. Man beobachtet jedoch auch in Patienten mit normaler renaler Funktion und ausreichender Hydratation hohe MTX-Plasmakonzentrationsunterschiede.

In einer vorangegangenen Studie wurden durch PCR-SSCP und Sequenzierung 12 genetische Abweichungen von der Referenzsequenz in Kaukasiern festgestellt (Göres 2008). Drei davon wurden in flankierenden Intronabschnitten von Exons gefunden, eine fand sich in der 5'-UTR. Die anderen acht Polymorphismen befanden sich in der kodierenden Region. Von diesen waren drei stumme Polymorphismen. Die verbleibenden fünf waren mit einem Aminosäureaustausch assoziiert. Die häufigsten Polymorphismen in Kaukasiern waren: c.-24C>T in der 5'-UTR von Exon 1, c.1249G>A in Exon 10 (Val417Ile) sowie c.3972C>T in Exon 28 (Ile1324Ile). Die Polymorphismen in Exon 1, Exon 10 und Exon 28 waren bereits vorbeschrieben (Ito et al. 2001; Ranganathan et al. 2004; Colomobo et al. 2005). Von den gelinkten Polymorphismen waren c.4146+11G>C, c.4488C>T und c.4544G>A vorbekannt. Die anderen zwei SNPs und ihr linkage disequilibrium waren unseres Wissens nicht vorbeschrieben.

Die Beteiligung des ABCC2-Proteins am MTX-Transport wurde in vitro erstmals in Zellkultur-Experimenten und in vivo durch eine Veränderung der Pharmakokinetik von MTX in Tiermodellen des Dubin-Johnson-Syndrom festgestellt (Masereeuw et al. 2003). Im Jahre 2005 wurde ein Fall von Hulot et al. beschrieben, der die Bedeutung des ABCC2-Gens bezüglich des MTX-Transports untersucht hat (Hulot et al. 2005). Der Patient, ein erwachsener Mann (Kaukasier) mit einem B-Zell-Lymphom, litt an einer schweren Ausscheidungsstörung von MTX im Rahmen einer MTX-Hochdosischemotherapie. Eine genetische Untersuchung der Patienten-DNS auf Mutationen im ABCC2-Gen zeigte eine heterozygote c.1271A>G Mutation (Arg412Gly), in der ein hochkonserviertes Arginin durch Glycin im zytoplasmatischen Teil der zweiten membranspannenden Domäne (Position 412) ersetzt wurde, eine Region, die mit Substratspezifität assoziiert ist. Die Funktion dieser ABCC2-Variante wurde an chinesischen Hamster-Ovar-Zellen (CHO-Zellen) untersucht. Dabei zeigte sich bei CHO-Zellen mit Glycin an Position 412 des MRP2-Gens ein vollständiger Verlust der Transportaktivität. Weder MTX noch GS-MF, ein Glutathion-Derivat von MTX, wurden transportiert. Nachdem sich der Patient von den schweren



Nebenwirkungen erholt hatte, wurde das Koproporphyrin I/ Koproporphyrin III Verhältnis im Urin bestimmt, ein Methode um das Dubin-Johnson-Syndrom zu diagnostizieren. Eine Erhöhung des Verhältnis bei dem Patienten belegte das Vorliegen eines DJS-Trägerstatus. Man folgerte, dass die Verzögerung der MTX-Ausscheidung durch den Mechanismus einer Haploinsuffizienz begründet war. Die gefundene genetische Variante war eine seltene Mutation, die zuvor noch nicht beschrieben worden war.

Die im Rahmen der Studie untersuchten pädiatrischen 44 Patienten wurden auf Grund einer akuten lymphoblastischen Leukämie gemäß dem ALL BFM 1995 bzw. ALL BFM 1999 Pilot oder ALL BFM 2000 Protokoll therapiert. Diese Protokolle sehen eine Gabe von 5000 mg MTX pro m<sup>2</sup> Körperoberfläche vor. Eine so hoch dosierte Therapie mit MTX kann nur durchgeführt werden, wenn die Kinder durch die Gabe von Calcium-Folinat (Leukovorin) vor einem anhaltenden zytostatischen Effekt geschützt werden. Die Leukovorin-Dosis wird anhand des Körpergewichts der Patienten und der Plasmakonzentration von MTX zu definierten Untersuchungszeitpunkten nach Beendigung der MTX-Infusion bemessen. Die MTX-Hochdosistherapie wird trotz des höheren Toxizitätsrisikos angewendet, da vorangegangene Studien einen positiven Zusammenhang zwischen MTX-Plasmakonzentrationen und Heilungsrate gezeigt hatten (Evans et al. 1986). Bei den Patienten in dieser Studie wurden nach Ende der 24-stündigen Infusion Plasmakonzentrationen im Mittel von 37,5 µmol/L gemessen. Nach 36, 42 und 48 Stunden betragen die mittleren Plasmakonzentrationen 1,4 µmol/L, 0,6 µmol/L bzw. 0,4 µmol/L. Mehrere Kovariablen wurden auf einen möglichen Einfluss auf den Verlauf der Plasmakonzentrationen überprüft. Weder Alter noch die Körperoberfläche oder die Kreatinin-Clearance der Patienten waren in dem Studienkollektiv mit Unterschieden in den MTX-Konzentrationen zu den untersuchten Zeitpunkten assoziiert. Demgegenüber konnte ein signifikanter Einfluss des Geschlechts auf den Plasmakonzentrationsverlauf festgestellt werden. Mädchen hatten höhere Plasmakonzentrationen als Jungen. Ein Geschlechtseffekt auf den Konzentrationsverlauf wurde bereits in anderen Untersuchungen beschrieben. In der Studie von Balis et al. zeigten sich nach oraler Gabe von Methotrexat im Rahmen der Erhaltungstherapie ebenfalls höhere Plasmakonzentrationen bei weiblichen Patienten (Balis et al. 1998). Ein entsprechender Befund wurde auch nach intravenöser Hochdosistherapie beobachtet (Wall et al. 2000). Dieser geschlechtsspezifische Effekt auf die Pharmakokinetik von MTX konnte in anderen Studien jedoch nicht nachgewiesen werden (Seidel et al. 2000).

Das ABCC2-Gen wurde als Kandidatengen ausgewählt, da zu Beginn der Untersuchungen bekannt war, dass ABCC2 in der Lage ist, MTX in der Zellkultur zu transportieren und da die bereits zu diesem Zeitpunkt vorhandenen Tiermodelle der Groningen Yellow/transporter-deficient Ratten (TR(-)-Ratten) und der Hyperbilirubinämischen Esai-Ratten (EHB-Ratten) Veränderungen in der Pharmakokinetik von MTX aufwiesen.

Die MRP2-Mutation in den TR(-)-Ratten ist eine Einzelnukleotid-Deletion, die zu einer Leserasterverschiebung und dem Auftreten eines vorzeitigen Stop-Codons führt (Paulusma

et al. 1996). In EHB-Ratten liegt eine Einzelnukleotid-Substitution vor, die zu einer Nonsense-Mutation führt (Ito et al. 1997). Im Vergleich zu Wildtyp-Ratten liegt bei EHB- bzw. TR(-)-Ratten eine Verminderung des Galleflusses, eine Erhöhung der Konzentration von Bilirubin-Glukuroniden im Blut und eine Verminderung der Sekretion von reduziertem Glutathion, einige Glutathion-, Glukuronid- und Sulfat-Konjugaten vor. Ursache für den relativ unauffälligen Phänotyp und die normale Lebenserwartung der Ratten dürften kompensatorische Mechanismen sein. So kann durch die Induktion des nahe verwandten Transporters MRP3 in Hepatozyten eine Kompensation für die Einschränkung der Sekretion von Bilirubin-Glukuroniden erreicht werden (Hirohashi et al. 1998; König et al. 1999). Auch Chen et al. zeigten in ihrer Studie, dass die Hochregulation von anderen Transportern den Verlust von MRP2 in TR(-)-Ratten kompensieren kann. In dieser Untersuchung fand sich eine 200%ig höhere Expression von MRP4 in der Niere im Vergleich zu Wildtyp-Ratten (Chen et al. 2005).

Chu et al. publizierten 2006 eine Studie über „Knockout-Mäuse“ (MRP2<sup>-/-</sup> Mäuse), denen das MRP2-Gen fehlte. Serumanalysen zeigten signifikant erhöhte Bilirubin-Plasma- und Urinkonzentrationen im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe (Chu et al. 2006). Die von Paulusma et al. beschriebene Reduktion der biliären Exkretion von Glutathion in TR(-)-Ratten fand sich auch in den MRP2<sup>-/-</sup> Mäusen wieder. Es ist allerdings zu vermuten, dass auch bei den MRP2<sup>-/-</sup> Mäusen alternative Transporter existieren, da die biliäre Glutathion-Exkretion zwar deutlich reduziert, jedoch nicht gänzlich aufgehoben war. Zusätzlich wurde eine verringerte biliäre Sekretion von Dibromosulfophthalein (DBSP) nachgewiesen. Nach i.v. Applikation der Substanz fand sich eine signifikant erniedrigte DSBP-Elimination in den MRP2<sup>-/-</sup> Mäusen.

Wie bereits oben erwähnt, kam es in MRP2-defizienten Ratten zu einer verstärkten Expression von MRP3 in Hepatozyten. Dieser Effekt konnte in den von Chu et al. untersuchten Knockout-Mäusen nicht nachgewiesen werden. Man erklärte sich diese Diskrepanz durch das in gesunden Mäusen bestehende höhere MRP3-Expressionsniveau (Belinsky et al. 2005). Im Gegensatz zur fehlenden MRP3-Heraufregulation fand sich jedoch eine Induktion des MRP4-Proteins in der Leber der Knockout-Mäuse. Der zugrunde liegende Mechanismus konnte bislang noch nicht geklärt werden.

Auch Vlaming et al. untersuchten MRP2<sup>-/-</sup> Mäuse (Vlaming et al. 2006). Die Tiere waren ebenso durch eine stark reduzierte biliäre Glutathion-Exkretion und einen reduzierten Gallefluss mit konsekutiver Hyperbilirubinämie charakterisiert. Interessanterweise zeigte sich hier zusätzlich zu einer geringen MRP4-Induktion auch eine verstärkte Expression von MRP3, einem Effekt, der in den Knockout Mäusen von Chu nicht beobachtet wurde. Die Studie untersuchte den Transport der Chemotherapeutika Doxorubicin, Methotrexat, Irinotecan und der Karzinogene 2-Amino-1-Methyl-1-Phenylimidazol[4,5-b]Pyridin (PhIP) und 2-Amino-3-Methylimidazol[4,5-f]Quinolin (IQ). Diese heterozyklischen Amine haben nachgewiesenermaßen eine kanzerogene Potenz. PhIP ist ein MRP2-Substrat und es wurde

postuliert, dass MRP2 zum Schutz des Organismus vor den kanzerogenen Effekten von PhIP betragen könnte (Dietrich et al. 2001). In den Knockout-Mäusen von Vlaming fanden sich im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen erhöhte PhIP-Plasmakonzentrationen. Der Einfluss von MRP2 auf den MTX-Transport stellte sich dosisabhängig dar. Bei einer Dosierung von 1 mg/kg zeigte sich kein Unterschied in der Plasmakonzentration zwischen Wildtyp und MRP2<sup>-/-</sup> Mäusen. Bereits ab 10 mg/kg fand man jedoch einen moderaten, aber signifikanten Konzentrationsunterschied, der sich bei 50 mg/kg verdeutlichte. Der Anteil von 50 mg/kg MTX im Intestinum war 30 Minuten nach intravenöser Applikation der Substanz in den Knockout-Mäusen signifikant niedriger. Man schlussfolgerte eine Beteiligung von MRP2 an der hepatobiliären oder direkten intestinalen Exkretion von MTX in das intestinale Lumen. Das Phänomen der Dosisabhängigkeit wurde durch die Theorie erklärt, dass MRP2 ein MTX-Transporter mit einer niedrigen Affinität aber einer hohen Kapazität ist. Bei niedrigen Dosen und Konzentrationen scheinen andere Eliminationsmechanismen zu dominieren. Masuda et al. untersuchten an den MRP2-defizienten Eisai hyperbilirubinämischen Ratten die Exkretion von MTX. Als Kontrollgruppe dienten normale Sprague Dawley Ratten (SDR). Nach intravenöser Applikation von MTX zeigte sich eine langsamere biliäre Exkretion von MTX in EHB-Ratten (Masuda et al. 1997).

Wie bereits angesprochen zeigte sich in unserem Kollektiv ein signifikanter Einfluss des Geschlechts auf die MTX-Plasmakonzentrationen, indem Mädchen höhere MTX-Plasmakonzentrationen aufwiesen. Fragestellung der Arbeit war der Einfluss genetischer Polymorphismen im ABCC2-Gen auf die Konzentration von MTX im Plasma. In unserer Analyse fand sich, dass die -24T Variante in der 5'-UTR von Exon 1 mit einer erhöhten MTX-Plasmakonzentration assoziiert war. Es gab so zwei Variablen, die einen Einfluss auf die MTX-Plasmakonzentration hatten. In einer multivariaten ANOVA untersuchten wir anschließend den Zusammenhang dieser beiden Variablen, nämlich dem Geschlecht einerseits und dem -24T-Polymorphismus andererseits. Hierbei konnte eine signifikante Interaktion der beiden Variablen festgestellt werden. Dies erweckte die Vorstellung, dass die -24T-Allele oder andere hiermit verbundene bislang unbekannt Polymorphismen für weibliche pädiatrische Patienten wichtig sein könnten. Der Effekt der Interaktion war sowohl bei Heterozygotie für den c.-24C>T Polymorphismus als auch bei Patientinnen mit einem -24T/T Genotyp nachweisbar. Der Polymorphismus, der in der 5'-UTR der mRNA lokalisiert ist, hat zwar keinen Aminosäureaustausch zur Folge, es wurde jedoch gezeigt, dass diese Region einen wesentlichen Teil des ABCC2-Promoters in Leberzellen darstellt (Tanaka et al. 1999).

In einer Studie von Zhang et al. wurde an Ratten nachgewiesen, dass die 5'-nichttranslatierte Region bei der translationalen Regulation der MRP2-Expression beteiligt ist. In der Untersuchung wurde der Effekt der MRP2 5'-UTR auf die Expression des Luciferase Reporter Gens des Leuchtkäfers in transfizierten HepG2-Zellen bestimmt. Die Transkription

von MRP2 mRNA in der Leber von Ratten wird an mehreren Stellen begonnen. Sie enthält aufwärts offene Leseraster (*upstream open reading frames*) in der 5'-UTR, die an den drei AUG Start Codons -213, -149 und -109 beginnen. Die experimentelle Studie mit dem Luciferase Reporter Gen zeigte, dass die 5'-UTR ohne ein aufwärts offenes Leseraster eine maximale Luciferase-Aktivität zur Folge hatte, im Gegensatz zur 5'-UTR mit einem bis drei offenen Leserastern. Eine Schädigung des aufwärts offenen Leserasters durch Mutation am Triplett -109 erbrachte eine Erhöhung der Luciferase-Aktivität um das zwei- bis dreifache. Bei Triplett -149 konnte dagegen nur eine geringe Erhöhung nachgewiesen werden. Man schlussfolgerte, dass unter den aufwärts offenen Leserastern in der 5'-UTR von MRP2, das aufwärts offene Leseraster, welches am AUG Start Codon -109 begann, eine wichtige Rolle in der Expression des MRP2-Proteins spielt. Die 5'-UTR könnte folglich an der translationalen Regulation der Proteinexpression beteiligt sein.

Dies untermauert die Möglichkeit, dass der -24T Polymorphismus eine Veränderung der Expression des MRP2 zur Folge hat und die weiblichen Patienten aus diesem Grund unter einer verzögerten Ausscheidung von MTX litten. Die Zweikompartimentenanalyse legt eine verminderte renale Expression nahe, da  $k_{10}$  vermindert ist und die  $\alpha$  Halbwertszeit verlängert. Diese Vermutung konnte bei Erwachsenen zumindest auf der Ebene der mRNA-Expression bestätigt werden (Haenisch et al. 2007). Ob dieser Polymorphismus isoliert eine Funktionsänderung des MRP2-Transporters auslöst oder ob weitere, noch nicht entdeckte Polymorphismen dazu beitragen, bleibt offen. Weitere pharmakogenetische Studien werden nötig sein, um diese Frage zu beantworten. Ferner bleibt zu klären, worin die Ursache des offensichtlich geschlechtsspezifischen Effekts des c.-24C>T Polymorphismus liegen. Ein denkbarer Mechanismus wäre ein hormoneller Einfluss auf die Expression von ABCC2.

## **5. Ausblick**

Der Begriff Pharmakogenetik wurde Anfang der 50er Jahre von Friedrich Vogel, einem Heidelberger Humangenetiker, geprägt. Er erkannte, dass genetische Variationen die individuelle Reaktion auf Arzneimittel beeinflussen können. Dies beinhaltet die Absorption, Distribution, Metabolisierung sowie Elimination von Substanzen. Bekannte Beispiele für Polymorphismen in Enzymen des Metabolismus sind die Cytochrom-P-450-Enzyme wie z.B. CYP2D6, CYP2C9 und CYP2C19 oder die Thiopurin-S-Methyltransferase. Ziel der Pharmakogenetik sollte sein, die Auswahl und Dosierung eines Arzneimittels optimal an den individuellen Bedarf anzupassen und somit auch das Risiko unerwünschter Arzneimittelwirkungen zu reduzieren. In Deutschland wird die Zahl medikamentenbedingter Todesfälle auf 16000, die ernster Nebenwirkungen auf über 120000 Fälle geschätzt (Schönhöfer 1999). Natürlich müssen neben der individuellen genetischen Ausstattung auch die anderen Einflussmöglichkeiten auf die Arzneimittelwirkung berücksichtigt werden. Hierzu gehören Alter, Geschlecht, Körpergewicht, Nierenfunktion, Leberfunktion, Komorbiditäten sowie Arzneimittelwechselwirkungen. Auch die Compliance des Patienten ist eine wichtige Einflussgröße, die nicht außer Acht gelassen werden darf.

Ein Problem der Genotypisierung sind die ethischen Aspekte und der Schutz des Individuums vor Missbrauch genetischer und persönlicher Daten. Zu befürchten ist, dass pharmakogenetische Minderheiten, also Patienten mit seltenem genetischen Profil, von Studien ausgeschlossen werden. Auch für behandelnde Ärzte bedeutet das Voranschreiten der Pharmakogenetik einen Wandel. Das Auswerten genetischer Tests verlangt ein profundes Wissen der Humangenetik. Ein großer Vorteil der Pharmakogenetik ist unumstritten die Erhöhung der Arzneimittelsicherheit, was wiederum eine Verbesserung der Compliance implizieren kann. Durch Kenntnis genetischer Polymorphismen mit Auswirkung auf die Metabolisierung von Arzneimitteln können toxische Nebenwirkungen verhindert werden. Gerade bei einem Medikament wie Methotrexat, welches lebensbedrohliche Nebenwirkungen hat, ist dies von besonderer Wichtigkeit.

## **6. Zusammenfassung**

### **6.1. Hintergrund und Ziele**

Bei der Bestimmung der Methotrexat-Plasmakonzentrationen im Rahmen der MTX-Hochdosis-Therapie bei Kindern mit akuter lymphoblastischer Leukämie zeigen sich immer wieder hohe Konzentrationsunterschiede, sowohl inter- als auch intraindividuell. Methotrexat wird u.a. über den Arzneimitteltransporter MRP2 eliminiert. In dieser Arbeit wurde der Einfluss häufiger Polymorphismen im ABCC2-Gen, welches für das MRP2 Protein kodiert, auf die Plasmakonzentration von Methotrexat in der Hochdosistherapie bei Kindern mit akuter lymphoblastischer Leukämie untersucht.

### **6.2. Methoden**

In die Studie wurden Patienten eingeschlossen, die in der onkologischen Abteilung der Kinder- und Jugendklinik der Universität Erlangen-Nürnberg auf Grund einer ALL in Behandlung waren bzw. gewesen waren. Blutproben zur Genotypisierung wurden im Rahmen der Routineuntersuchungen entnommen, sowie eine detaillierte Datensammlung erhoben, die Informationen zum Patienten, zum Krankheitsbild, zu Komedikationen, die MTX-Plasmakonzentrationen und Blutuntersuchungen enthielt. Die Genotypisierung wurde mittels allelspezifischer Polymerasekettenreaktion und Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus durchgeführt.

### **6.3. Ergebnisse**

In die Studie wurden 44 Patienten eingeschlossen. Untersucht wurden 12 genetische Abweichungen von der Referenzsequenz, die in einer vorangegangenen Studie durch PCR-SSCP und Sequenzierung in gesunden Kaukasiern festgestellt worden waren. In der Analyse fand sich zum einen ein signifikanter Einfluss des Geschlechts auf den Plasmakonzentrationsverlauf, indem weibliche Patienten höhere Plasmakonzentrationen aufwiesen. Zum anderen zeigte sich eine Assoziation zwischen der -24T Variante in der 5'-UTR von Exon 1 und einer erhöhten MTX-Plasmakonzentration. Eine multivariate ANOVA deckte eine signifikante Interaktion der beiden Variablen, dem Geschlecht sowie dem -24T-Polymorphismus auf.

### **6.4. Praktische Schlussfolgerungen**

In dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass der c.-24C>T Polymorphismus in der 5'-UTR der mRNA des Exon 1 im ABCC2-Gen bei weiblichen pädiatrischen Patienten mit einer erhöhten MTX-Plasmakonzentration bei der intravenösen Hochdosistherapie mit MTX im Rahmen der Behandlung der akuten lymphoblastischen Leukämie in signifikantem

Zusammenhang steht. Dieser Effekt der Interaktion konnte bei Heterozygotie (-24C/T) als auch bei Homozygotie (-24T/T) nachgewiesen werden. Ob der c.-24C>T Polymorphismus isoliert eine Funktionsänderung des MRP2-Transporters bewirkt oder ob weitere, noch nicht entdeckte Polymorphismen dazu beitragen, bleibt offen. Erhöhte MTX-Plasmakonzentrationen gehen zum einen mit einer erhöhten Heilungsrate, zum anderen jedoch auch mit einem erhöhten Toxizitätsrisiko einher. Eine Genotypisierung zu Beginn einer MTX-Hochdosistherapie mit individueller Anpassung der Methotrexatdosis könnte das Risiko unerwünschter Arzneimittelwirkungen reduzieren.

## **7. Literaturverzeichnis**

Allegra CJ, Drake JC, Jolivet J, Chabner BA (1985) Inhibition of phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide transformylase by methotrexate and dihydrofolic acid polyglutamates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82: 4881-5

Aqueretta I, Aldaz A, Giráldez J, Sierrasesúmaga L (2002) Pharmacodynamics of high-dose methotrexate in pediatric patients. *Ann Pharmacother*, 36: 1344-50

Arts HJ, Katsaros D, de Vries EG, Massobrio M, Genta F, Danese S, Arisio R, Scheper RJ, Kool M, Scheffer GL, Willemse PH, van der Zee AG, Suurmeijer AJ (1999) Drug resistance-associated markers P-glycoprotein, multidrug resistance-associated protein 1, multidrug resistance-associated protein 2, and lung resistance protein as prognostic factors in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res*, 5: 2798-805

Balis FM, Holcenberg JS, Poplack DG, Ge J, Sather HN, Murphy RF, Ames MM, Waskerwitz MJ, Tubergen DG, Zimm S, Gilchrist GS, Bleyer WA (1998) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral methotrexate and mercaptopurine in children with lower risk acute lymphoblastic leukemia: a joint children's cancer group and pediatric oncology branch study. *Blood*, 92: 3569-77

Belinsky MG, Dawson PA, Shchaveleva I, Bain LJ, Wang R, Ling V, Chen ZS, Grinberg A, Westphal H, Klein-Szanto A, Lerro A, Kruh GD (2005) Analysis of the in vivo functions of Mrp3. *Mol Pharmacol*, 68: 160-8

Beorlegui B, Aldaz A, Ortega A, Aquerreta I, Sierrasesumega L, Giraldez J (2000) Potential interaction between methotrexate and omeprazole. *Ann Pharmacother*, 34: 1024–1027

Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J (1999) The multidrug resistance protein family. *Biochim Biophys Acta*, 1461: 347-57

Bressolle F, Bologna C, Kinowski JM, Arcos B, Sany J, Combe B (1997) Total and free methotrexate pharmacokinetics in elderly patients with rheumatoid arthritis. A comparison with young patients. *J Rheumatol*, 24: 1903-9

Calabresi P, Chabner BA (1999) Chemotherapie maligner Erkrankungen. In: Goodman und Gilman, *Pharmakologische Grundlagen der Arzneimitteltherapie Teil 2*. McGraw-Hill Professional-Verlag, Seite 1245 - 1268

Chen C, Slitt AL, Dieter MZ, Tanaka Y, Scheffer GL, Klaassen CD (2005) Up-regulation of Mrp4 expression in kidney of Mrp2-deficient TR- rats. *Biochem Pharmacol*, 70: 1088-95

Christensen ML, Rivera GK, Crom WR, Hancock ML, Evans WE (1988) Effect of hydration on methotrexate plasma concentrations in children with acute lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*, 6: 797-801



Chu XY, Strauss JR, Mariano MA, Li J, Newton DJ, Cai X, Wang RW, Yabut J, Hartley DP, Evans DC, Evers R (2006) Characterization of mice lacking the multidrug resistance protein MRP2 (ABCC2). *J Pharmacol Exp Ther*, 317:579-89

Coassolo P, Valentin M, Bourdeaux M, Briand C (1980) Modification of human serum albumin binding of methotrexate by folinic acid and certain drugs used in cancer chemotherapy. *Eur J Clin Pharmacol* 17: 123-7

Colombo S, Soranzo N, Rotger M, Sprenger R, Bleiber G, Furrer H, Buclin T, Goldstein D, Décosterd L, Telenti A (2005) Influence of ABCB1, ABCC1, ABCC2, and ABCG2 haplotypes on the cellular exposure of nelfinavir in vivo. *Pharmacogenet Genomics*, 15: 599-608

Crom WR, de Graaf SS, Synold T, Uges DR, Bloemhof H, Rivera G, Christensen ML, Mahmoud H, Evans WE (1994) Pharmacokinetics of vincristine in children and adolescents with acute lymphocytic leukemia. *J Pediatr*, 125: 642-9

Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res*, 11: 1156-66

Demeule M, Brossard M, Beliveau R (1999) Cisplatin induces renal expression of P-glycoprotein and canalicular multispecific organic anion transporter. *Am J Physiol*, 277: F832-40

Dietrich CG, de Waart DR, Ottenhoff R, Bootsma AH, van Gennip AH, Elferink RP (2001) Mrp2-deficiency in the rat impairs biliary and intestinal excretion and influences metabolism and disposition of the food-derived carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo. *Carcinogenesis*, 22: 805-11

Dietrich CG, de Waart DR, Ottenhoff R, Schoots IG, Elferink RP (2001) Increased bioavailability of the food-derived carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in MRP2-deficient rats. *Mol Pharmacol*, 59: 974-80

Dubin IN, Johnson FB (1954) Chronic idiopathic jaundice with unidentified pigment in liver cells; a new clinicopathologic entity with a report of 12 cases. *Medicine (Baltimore)*, 33: 155-97

Erttmann R, Bielack S, Landbeck G (1985) Kinetics of 7-hydroxy-methotrexate after high-dose methotrexate therapy. *Cancer Chemother Pharmacol*, 15: 101-4

Evans WE, Christensen ML (1985) Drug interactions with methotrexate. *J Rheumatol Suppl*, 12 Suppl 12: 15-20

Evans WE, Crom WR, Abromowitch M, Dodge R, Look AT, Bowman WP, George SL, Pui CH. (1986) Clinical pharmacodynamics of high-dose methotrexate in acute lymphocytic leukemia. Identification of a relation between concentration and effect. *N Engl J Med*, 314: 471-7

Ferrazzini G, Klein J, Sulh H, Chung D, Giesbrecht E, Koren G (1990) Interaction between trimethoprim-sulfamethoxazole and methotrexate in children with leukemia. *J Pediatr*, 117: 823-6

Ferrazzini G, Sohl H, Robieux I, Johnson D, Giesbrecht E, Koren G (1991) Diurnal variation of methotrexate disposition in children with acute leukemia. *Eur J Clin Pharmacol*, 41: 425-7

Forth W, Henschler D, Rummel W (2001) *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 8. Auflage. Urban & Fischer Verlag, München, Jena, Seite 961 - 963

Fromm MF, Kauffmann HM, Fritz P, Burk P, Kroemer HK, Warzok RW, Eichelbaum M, Siegmund W, Schrenk D (2000) The effect of rifampin treatment on intestinal expression of human MRP transporters. *Am J Pathol*, 157: 1575-80

Gerk PM, Vore M (2002) Regulation of expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and its role in drug disposition. *J Pharmacol Exp Ther*, 302: 407-15

Gerloff T, Roots I (2003) Pharmacogenetic implications of transmembrane transporters for the uptake, distribution and excretion of drugs. *Dtsch Med Wochenschr*, 128: 2431-6

Gerwitz DA, Holt SA (1985) Protein binding as a component of drug interaction in cellular pharmacokinetic studies. Effects of probenecid on transport and accumulation of methotrexate in Ehrlich ascites tumor cells in vitro. *Biochem Pharmacol*, 34: 747-54

Goldman ID, Gupta V, White JC, Lofffield S (1976) Exchangeable intracellular methotrexate levels in the presence and absence of vincristine at extracellular drug concentrations relevant to those achieved in high-dose methotrexate-folinic acid "rescue" protocols. *Cancer Res*. 36: 276-9

Göres R (2008) Polymorphismus des MRP2 Gens in einer kaukasischen Bevölkerung. Medizinische Dissertation, Universität Hamburg

Haenisch S, Zimmermann U, Dazert E, Wruck CJ, Dazert P, Siegmund W, Kroemer HK, Warzok RW, Cascorbi I (2007) Influence of polymorphisms of ABCB1 and ABCC2 on mRNA and protein expression in normal and cancerous kidney cortex. *Pharmacogenomics J*, 7: 56-65

Hinoshita E, Uchiumi T, Taguchi K, Kinukawa N, Tsuneyoshi M, Maehara Y, Sugimachi K, Kuwano M (2000) Increased expression of an ATP-binding cassette superfamily transporter, multidrug resistance protein 2, in human colorectal carcinomas. *Clin Cancer Res*, 6: 2401-7

Hirohashi T, Suzuki H, Ito K, Ogawa K, Kume K, Shimizu T, Sugiyama Y (1998) Hepatic expression of multidrug resistance-associated protein-like proteins maintained in eisai hyperbilirubinemic rats. *Mol Pharmacol*, 53: 1068-75

Hulot JS, Villard E, Maguy A, Morel V, Mir L, Tostivint I, William-Faltaos D, Fernandez C, Hatem S, Deray G, Komajda M, Leblond V, Lechat P (2005) A mutation in the drug

transporter gene ABCC2 associated with impaired methotrexate elimination. *Pharmacogenet Genomics*, 15: 277-85

Ito K, Suzuki H, Hirohashi T, Kume K, Shimizu T, Sugiyama Y (1997) Molecular cloning of canalicular multispecific organic anion transporter defective in EHBR. *Am J Physiol*, 272: G16-22

Ito S, Ieiri I, Tanabe M, Suzuki A, Higuchi S, Otsubo K (2001) Polymorphism of the ABC transporter genes, MDR1, MRP1 and MRP2/cMOAT, in healthy Japanese subjects. *Pharmacogenetics*, 11: 175-84

Itoda M, Saito Y, Soyama A, Saeki M, Murayama N, Ishida S, Sai K, Nagano M, Suzuki H, Sugiyama Y, Ozawa S, Sawada J (2002) Polymorphisms in the ABCC2 (cMAT/MRP2) gene found in 72 established cell lines derived from Japanese individuals: an association between single nucleotide polymorphisms in the 5'-untranslated region and exon 28. *Drug Metab Dispos*, 30: 363-4

Kamisako T, Leier I, Cui Y, König J, Buchholz U, Hummel-Eisenbeiss J, Keppler D (1999) Transport of monoglucuronosyl and bisglucuronosyl bilirubin by recombinant human and rat multidrug resistance protein 2. *Hepatology*, 30: 485-90

Kartenbeck J, Leuschner U, Mayer R, Keppler D (1996) Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology*, 23: 1061-6

Keitel V, Nies AT, Brom M, Hummel-Eisenbeiss J, Spring H, Keppler D (2003) A common Dubin-Johnson syndrome mutation impairs protein maturation and transport activity of MRP2 (ABCC2) *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 284: G165-74

Keppler D, König J (1997a) Hepatic canalicular membrane 5: Expression and localization of the conjugate export pump encoded by the MRP2 (cMRP/cMOAT) gene in liver. *FASEB J*, 11: 509-16

Keppler D, König J, Büchler M (1997b) The canalicular multidrug resistance protein, cMRP/MRP2, a novel conjugate export pump expressed in the apical membrane of hepatocytes. *Adv Enzyme Regul*, 37: 321-33

König J, Nies AT, Cui Y, Leier I, Keppler D (1999a) Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta*, 1461: 377-94

König J, Rost D, Cui Y, Keppler D (1999b) Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology*, 29: 1156-63

Koren G, Ferrazzini G, Sohl H, Robieux I, Johnson D, Giesbrecht E (1992) Chronopharmacology of methotrexate pharmacokinetics in childhood leukemia. *Chronobiol Int*, 9: 434-8

Kruh GD, Belinsky MG (2003) The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene*, 22: 7537-52

Lankelma J, van der Klein E, Ramaekers F (1980) The role of 7-hydroxymethotrexate during methotrexate anti-cancer therapy. *Cancer Lett*, 9: 133-42

Liegler DG, Henderson ES, Hahn MA, Oliverio VT (1969) The effect of organic acids on renal clearance of methotrexate in man. *Clin Pharmacol Ther*, 10: 849-57

Masereeuw R, Notenboom S, Smeets PH, Wouterse AC, Russel FG (2003) Impaired renal secretion of substrates for the multidrug resistance protein 2 in mutant transport-deficient (TR-) rats. *J Am Soc Nephrol*, 14: 2741-9

Masson E, Relling MV, Synold TW, Lui Q, Schuetz JD, Sandlund JT, Pui CH, Evans WE (1996) Accumulation of methotrexate polyglutamates in lymphoblasts is a determinant of antileukemic effects in vivo. A rationale for high-dose methotrexate. *J Clin Invest*, 97: 73-80

Masuda M, Iizuka Y, Yamazaki M, Nishigaki R, Kato Y, Ni'inuma K, Suzuki H, Sugiyama Y (1997) Methotrexate is excreted into the bile by canalicular multispecific organic anion transporter in rats. *Cancer Res*, 57: 3506-10

Mizuno N, Tiwa T, Yotsumoto Y, Sugiyama Y (2003) Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. *Pharmacol Rev*, 55: 425-61

Mor-Cohen R, Zivelin A, Rosenberg N, Shani M, Muallem S, Seligsohn U (2001) Identification and functional analysis of two novel mutations in the multidrug resistance protein 2 gene in Israeli patients with Dubin-Johnson syndrome. *J Biol Chem*, 276: 36923-30

Mottino AD, Hoffman T, Jennes L, Vore M (2000) Expression and localization of multidrug resistant protein mrp2 in rat small intestine. *J Pharmacol Exp Ther*, 293: 717-23

Nies AT, König J, Pfannschmidt M, Klar E, Hofmann WJ, Keppler D (2001) Expression of the multidrug resistance proteins MRP2 and MRP3 in human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, 94: 492-9

Nies AT, Jedlitschky G, König J, Herold-Mende C, Steiner HH, Schmitt HP, Keppler D (2004) Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain. *Neuroscience*, 129: 349-60

Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJ, Bakker CT, Otter M, Scheffer GL, Scheper RJ, Borst P, Oude Elferink RP (1996) Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science*, 271: 1126-8

Paulusma CC, van Geer MA, Evers R, Heijn M, Ottenhoff R, Borst P, Oude Elferink RP (1999) Canalicular multispecific organic anion transporter/multidrug resistance protein 2 mediates low-affinity transport of reduced glutathione. *Biochem J*, 338 (Pt 2): 393-401

Paxon JW (1984) Interaction of probenecid with the protein binding of methotrexate. *Pharmacology*, 28: 86-9

Potschka H, Fedrowitz M, Loscher W (2003) Multidrug resistance protein MRP2 contributes to blood-brain barrier function and restricts antiepileptic drug activity. *J Pharmacol Exp Ther*, 306: 124-31

Pui CH (1997) Acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am*, 44: 831-46

Pui CH, Evans WE (2006) Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, 354: 166-78

Pui CH, Relling MV, Downing JR (2004) Mechanisms of Disease. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, 350: 1535-48

Ranganathan P, Culverhouse R, Marsh S, Ahluwalia R, Shannon WD, Eisen S, McLeod HL (2004) Single nucleotide polymorphism profiling across the methotrexate pathway in normal subjects and patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics*, 5: 559-69

Reid T, Yuen A, Catolico M, Carlson RW (1993) Impact of omeprazole on the plasma clearance of methotrexate. *Cancer Chemother Pharmacol*, 33: 82-84

Relling MV, Fairclough D, Ayers D, Crom WR, Rodman JH, Pui CH, Evans WE (1994) Patient characteristics associated with high-risk methotrexate concentrations and toxicity. *J Clin Oncol*, 12: 1667-72

Rodman JH, Sunderland M, Kavanagh RL, Ochs J, Yalowich J, Evans WE, Rivera GK (1990) Pharmacokinetics of continuous infusion of methotrexate and teniposide in pediatric cancer patients. *Cancer Res*. 50: 4267-71

Schaub TP, Kartenbeck J, König J, Vogel O, Witzgall R, Kriz W, Keppler D (1997) Expression of the conjugate export pump encoded by the *mrp2* gene in the apical membrane of kidney proximal tubules. *J Am Soc Nephrol*, 8: 1213-21

Schaub TP, Kartenbeck J, König J, Spring H, Dörsam J, Staehler G, Störkel S, Thon WF, Keppler D (1999) Expression of the MRP2 gene-encoded conjugate export pump in human kidney proximal tubules and in renal cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol*, 10: 1159-69

Seidel H, Andersen A, Kvaløy JT, Nygaard R, Moe PJ, Jacobsen G, Lindqvist B, Slørdal L (2000) Variability in methotrexate serum and cerebrospinal fluid pharmacokinetics in children with acute lymphocytic leukemia: relation to assay methodology and physiological variables. *Leuk Res*, 24: 193-9

Schmiegelow K, Björk O, Glomstein A, Gustafsson G, Keiding N, Kristinsson J, Mäkipernaa A, Rosthøj S, Szumlanski C, Sørensen TM, Weinshilboum R (2003) Intensification of mercaptopurine/methotrexate maintenance chemotherapy may increase the risk of relapse for some children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*, 21: 1332-9

Schmitt L, Tampe R (2002) Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr Opin Struct Biol*, 12: 754-60

Schönhöfer P (1999) Klinik-basierte Erfassung Arzneimittel-bedingter Erkrankungen im Pharmakovigilanz-System. *Arzneimitteltherapie*, 17: 83–86

Schrapppe M, Reiter A, Ludwig WD, Harbott J, Zimmermann M, Hiddemann W, Niemeyer C, Henze G, Feldges A, Zintl F, Kornhuber B, Ritter J, Welte K, Gadner H, Riehm H (2000) Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. *Blood*, 95: 3310-22

Schrapppe M, Reiter A, Zimmermann M, Harbott J, Ludwig WD, Henze G, Gadner H, Odenwald E, Riehm H (2000) Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. *Berlin-Frankfurt-Munster. Leukemia*, 14:2205-22

Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF (2003) Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 43: 285-307

Shibayama Y, Ushinohama K, Ikeda R, Yoshikawa Y, Motoya T, Takeda Y, Yamada K (2006) Effect of methotrexate treatment on expression levels of multidrug resistance protein 2, breast cancer resistance protein and organic anion transporters Oat1, Oat2 and Oat3 in rats. *Cancer Sci*, 97: 1260-6

Soini Y, Järvinen K, Kaarteenaho-Wiik R, Kinnula V (2001) The expression of P-glycoprotein and multidrug resistance proteins 1 and 2 (MRP1 and MRP2) in human malignant mesothelioma. *Ann Oncol*, 12: 1239-45

Sonnichsen DS, Relling MV (1994) Clinical pharmacokinetics of paclitaxel. *Clin Pharmacokinet*, 27: 256-69

St-Pierre MV, Serrano MA, Macias RI, Dubs U, Hoehli M, Lauper U, Meier PJ, Marin JJ (2000) Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 279: R1495-503

Suzuki H, Sugiyama Y (2002) Single nucleotide polymorphisms in multidrug resistance associated protein 2 (MRP2/ABCC2): its impact on drug disposition. *Adv Drug Deliv Rev*, 54: 1311-31

Tanaka T, Uchiumi T, Hinoshita E, Inokuchi A, Toh S, Wada M, Takano H, Kohno K, Kuwano M (1999) The human multidrug resistance protein 2 gene: functional characterization of the 5'-flanking region and expression in hepatic cells. *Hepatology*, 30: 1507-12

Taniguchi K, Wada M, Kohno K, Nakamura T, Kawabe T, Kawakami M, Kagotani K, Okumura K, Akiyama S, Kuwano M (1996) A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Res*, 56: 4124-9

Tirona RG, Kim RB (2002) Pharmacogenomics of organic anion-transporting polypeptides (OATP). *Adv Drug Deliv Rev*, 54: 1343-52

Toh S, Wada M, Uchiumi T, Inokuchi A, Makino Y, Horie Y, Adachi Y, Sakisaka S, Kuwano M (1999) Genomic structure of the canalicular multispecific organic anion-transporter gene (MRP2/cMOAT) and mutations in the ATP-binding-cassette region in Dubin-Johnson syndrome. *Am J Hum Genet*, 64: 739-46

Trauner M, Boyer JL (2003) Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev*, 83: 633-71

Tsujii H, König J, Rost D, Stöckel B, Leuschner U, Keppler D (1999) Exon-intron organization of the human multidrug-resistance protein 2 (MRP2) gene mutated in Dubin-Johnson syndrome. *Gastroenterology*, 117: 653-60

van der Kolk DM, Vellenga E, van der Veen AY, Noordhoek L, Timmer-Bosscha H, Ossenloppele GJ, Raymakers RA, Muller M, van den Berg E, de Vries EG (2000) Deletion of the multidrug resistance protein MRP1 gene in acute myeloid leukemia: the impact on MRP activity. *Blood*, 95: 3514-9

van der Kolk DM, de Vries EG, Noordhoek L, van den Berg E, van der Pol MA, Muller M, Vellenga E (2001) Activity and expression of the multidrug resistance proteins P-glycoprotein, MRP1, MRP2, MRP3 and MRP5 in de novo and relapsed acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 15: 1544-53

Vlaming ML, Mohrmann K, Wagenaar E, de Waart DR, Elferink RP, Lagas JS, van Tellingen O, Vainchtein LD, Rosing H, Beijnen JH, Schellens JH, Schinkel AH (2006) Carcinogen and anticancer drug transport by Mrp2 in vivo: studies using Mrp2 (Abcc2) knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 318: 319-27

Wall AM, Gajjar A, Link A, Mahmoud H, Pui CH, Relling MV (2000) Individualized methotrexate dosing in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 14(2): 221-5

Whitehead VM, Rosenblatt DS, Vuchich MJ, Shuster JJ, Witte A, Beaulieu D (1990) Accumulation of methotrexate and methotrexate polyglutamates in lymphoblasts at diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukemia: a pilot prognostic factor analysis. *Blood*, 76: 44-9

Whitehead VM, Vuchich MJ, Lauer SJ, Mahoney D, Carroll AJ, Shuster JJ, Esseltine DW, Payment C, Look AT, Akabutu J, et al. (1992) Accumulation of high levels of methotrexate polyglutamates in lymphoblasts from children with hyperdiploid (greater than 50 chromosomes) B-lineage acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. Blood, 80: 1316-23

Wu WM, Tsai HJ, Pang JH, Wang HS, Hong HS, Lee YS (2005) Touchdown thermocycling program enables a robust single nucleotide polymorphism typing method based on allele-specific real-time polymerase chain reaction. Anal Biochem, 339: 290-6

Zhang Y, Li W, Vore M (2007) Translational regulation of rat multidrug resistance-associated protein 2 expression is mediated by upstream open reading frames in the 5' untranslated region. Mol Pharmacol, 71: 377-83

## **8. Internetquellen**

<http://ethikdiskurs.ch/medizinehtik/projekte/pharmakogenetik> (letzter Besuch 06.02.2007)

[http://www.gelbe-liste.de/04\\_suche/glsuche.php?gl%5Bsm%5D=4&gl%5Bpraepdetail%5D=1&gl%5Bpraepnr%5D=474621](http://www.gelbe-liste.de/04_suche/glsuche.php?gl%5Bsm%5D=4&gl%5Bpraepdetail%5D=1&gl%5Bpraepnr%5D=474621) (letzter Besuch 26.05.2008)

<http://leitlinien.net/025-014.htm> (letzter Besuch 19.05.2008)

[http://medizinimdialog.com/mid4\\_01/klinisch.Relev.htm](http://medizinimdialog.com/mid4_01/klinisch.Relev.htm) (letzter Besuch 31.05.2005)

<http://roche.de/diagnostics/gendiagnostik/pharmakogenetik.htm> (letzter Besuch 06.02.2007)

[http://rxlist.com/cgi/generic/theosr\\_ad.htm](http://rxlist.com/cgi/generic/theosr_ad.htm) (letzter Besuch 30.12.2006)



## **9. Abkürzungsverzeichnis**

5'-UTR: 5'-untranslated region

ABC: ATP-binding cassette

ABL: Abelson

abs.: absolut

ALL: akute lymphoblastische Leukämie

ANOVA: analysis of variance

AUC: area under the curve

BCR: breakpoint cluster region

BFM: Berlin-Frankfurt-Münster

cMOAT: canalicular multiorganic anion transporter

CFTR: cystis fibrosis transmembrane regulator

CHO-Zellen: chinesische Hamster-Ovar-Zellen

DBSP: Dibromosulfophthalein

DJS: Dubin Johnson Syndrom

DNS: Desoxyribonukleinsäure

dNTP: Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphate

ENT: Equilibrative nucleoside transporter

GSH: reduziertes Glutathion

GSSG: Glutathion-Disulfid

Gy: Gray

HR: Hohes Risiko

IQ: 2-Amino-3-Methylimidazol[4,5-f]Quinolin

kb: Kilobasen

kDa: Kilo Dalton

ml: Milliliter

mg: Milligramm

mM: Millimol

MR: Mittleres Risiko

MRD: minimal residual disease

mRNA: messenger ribonucleic acid  
MRP: Multidrug resistance proteine  
MTX: Methotrexat  
 $\mu$ l: Mikroliter  
NBD: Nukleotid-bindende Domäne  
OAT: organic anion transporter  
OATP: organic anion transporting polypeptide  
OCT: organic cation transporter  
OD: optische Dichte  
PCR: Polymerasekettenreaktion  
PEPT: Proton/peptide cotransporters  
Pg: P-Glykoprotein  
PhIP: 2-Amino-1-Methyl-6-Phenylimidazol[4,5-b]Pyridin  
PRP: Prednison poor responder  
RFLP: Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus  
SDR: Sprague Dawley Ratten  
SLC: solute carrier family  
SNP: single nucleotid polymorphism  
SR: Standard Risiko  
TEL: translocation-ETS-leukemia  
TM: transmembranspannende alpha Helix  
TR(-): hepatic anion transport-deficient rat strain  
WR: Wistar Hannover  
7-OH-MTX: 7-Hydroxy-MTX

## **10. Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. T. Eschenhagen für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und für die stetige Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der Erstellung der Dissertation.

Mein Dank gilt besonders auch Herrn Dr. T. Rau für die wissenschaftliche und geistige sowie emotionale Betreuung während meiner Doktorarbeit.

Desweiteren danke ich allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität Erlangen-Nürnberg und des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität Hamburg für die tatkräftige Unterstützung im Labor und stets freundliche und fachkundige Hilfe.

Letztendlich danke ich meinem Vater und am allermeisten meiner Mutter, die mich bis zu ihrem Tode auch in den schweren Phasen immer unterstützt hat.

## **11. Lebenslauf**

Birgit Erney

geboren am 21.01.1980 in Fürth

### Schulbildung

1986 - 1990: Grundschule Herzogenaurach

1990 - 1999: Gymnasium Herzogenaurach

### Hochschulbildung

10`1999 - 10`2006: Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Alexander-Universität  
Erlangen-Nürnberg

09`2001: Ärztliche Vorprüfung (Physikum)

03`2003: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

04`2005: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

10`2006: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation als Ärztin

### Berufstätigkeit

ab 05`2007: Assistenzärztin am Evangelischen Krankenhaus Münster, Abteilung für Innere  
Medizin

### **Eidesstaatliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: