

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
(Department) Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
(Schwerpunkt: Onkologie, Hämatologie, klinische Immunologie,
Rheumatologie)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz**

**Untersuchung von genetischen Polymorphismen im
Methotrexat-Stoffwechsel und -Transport bei Patienten
mit primärem ZNS-Lymphom**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Markus Johannes Günther

aus

Ludwigsburg

2010

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Hebart

2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Handgretinger

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Primäre Lymphome des zentralen Nervensystems	2
1.1.1	Epidemiologie	2
1.1.2	Histologie und pathologische Einteilung	2
1.1.3	Ätiologie und Pathogenese	4
1.1.4	Symptomatik und Diagnostik der PCNSL	5
1.1.5	Prognose und Therapie der PCNSL	6
1.2	Der Folsäurestoffwechsel und Methotrexat	7
1.3	Mutationen im Folsäurestoffwechsel	9
1.3.1	Methylentetrahydrofolatreduktase	9
1.3.1.1	Punktmutation C677T	10
1.3.1.2	Punktmutation A1298C	12
1.3.2	Reduziertes Folat-Carrierprotein	14
1.3.2.1	Punktmutation G80A	15
1.3.3	Thymidylat-Synthase	16
1.3.3.1	28 bp tandem/triplet repeat Polymorphismus	17
1.3.3.2	6bp Deletion/Insertion	18
1.4	G-PCNSL-SG-1-Studie	20
1.5	Zielsetzung dieser Arbeit	22
2	Material	23
2.1	Geräte und Gebrauchsmaterialien	23
2.2	Reagenzien	24

2.3	Verwendete Kits	26
2.4	Patienten, Untersuchungsmaterial, Studiendokumentation	28
3	Methoden	29
3.1	Beschreibung der verwendeten Methoden	29
3.1.1	DNA-Isolierung mit dem QIAGEN DNA Blood Mini Kit®	29
3.1.2	Quantifikation der extrahierten DNA mit Hilfe von Spektralphotometrie	30
3.1.3	Restriktionsendonukleasen	30
3.1.4	Gel-Elektrophorese	31
3.1.5	Funktionsweise des LightCyclers	33
3.1.6	Mutationsanalyse im LightCycler	35
3.2	Durchführung der Experimente	37
3.2.1	Experimente mit dem LightCycler	37
3.2.1.1	Analyse einer Punktmutation im Gen der Methylentetrahydrofolatreduktase an der Basenposition 677, Cytosin → Thymin	38
3.2.1.2	Analyse der Punktmutation im Gen der Methylentetrahydrofolat-reduktase an der Basenposition 1298, Adenosin → Cytosin	40
3.2.1.3	Analyse einer Punktmutation im Gen des reduzierten Folat-Transporters an der Basenposition 80; Guanosin → Adenosin	43
3.2.2	Nachweis des 28 bp <i>tandem/triplet repeat</i> in der 5'-Promotor-Region der Thymidylat-Synthase	44
3.2.3	Nachweis der 6 bp Deletion in der 3'-UTR der Thymidylat-Synthase	45
3.3	Statistische Berechnungen	47
4	Ergebnisse	49

4.1	Auswertung der molekularbiologischen Experimente	49
4.1.1	Experimente im LightCycler	49
4.1.1.1	SNP MTHFR C677T	49
4.1.1.2	SNP MTHFR A1298C	50
4.1.1.3	SNP RFC G80A	50
4.1.2	Analyse des TS 28 bp <i>tandem/triplet repeat</i>	50
4.1.3	RFLP in der TS: Nachweis der 6 bp Deletion	51
4.2	Epidemiologie	53
4.2.1	Beobachtete und erwartete Allelfrequenzen nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	53
4.2.2	Charakterisierung des Patientenkollektivs	55
4.2.3	Risikohaplotyp und Risikoindex	56
4.2.4	Prädisposition für ein primäres ZNS-Lymphom	57
4.3	Auswirkung der Polymorphismen auf das <i>Outcome</i>	60
4.4	Auswirkung der Mutationen auf overall survival und progression free survival	61
4.4.1	Beobachtungszeiträume	61
4.4.2	Überlebenszeitanalyse aller Patienten für OAS und PFS	63
4.4.2.1	OAS, PFS, Risikohaplotyp und Risikoindex	64
4.4.3	Überlebenszeitanalyse für den SNP MTHFR C677T	65
4.4.4	Überlebenszeitanalyse für den SNP MTHFR A1298C	67
4.4.5	Überlebenszeitanalyse für den SNP RFC G80A	68
4.4.6	Überlebenszeitanalyse des 28 bp <i>tandem/triplet repeat</i> in der TS	70
4.4.7	Überlebenszeitanalyse des TS 6 bp Deletions-Polymorphismus	71
4.5	Cox-Regression	73

4.6	Auswirkung der Mutationen auf die Toxizität von MTX	73
4.6.1	Schwerste dokumentierte Nebenwirkung	77
4.6.2	Granulopenie	80
4.6.3	Leukopenie	83
4.6.4	Maximale nicht-hämatologische Nebenwirkung	84
5	Diskussion	92
5.1	Diskussion der Methodik	93
5.2	Epidemiologie	96
5.3	Allelfrequenzen bei Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen	96
5.4	Polymorphismen und deren Auswirkung auf die Überlebenszeit und das <i>Outcome</i>	100
5.4.1	Cox-Regression	100
5.4.2	Methylentetrahydrofolatreduktase	101
5.4.3	Reduziertes Folat-Carrierprotein	102
5.4.4	Thymidylat-Synthase	104
5.5	Polymorphismen und deren Auswirkung auf die Toxizität von Methotrexat	106
5.5.1	Kombinierter Risikohaplotyp	106
5.5.2	Risikoindex	108
5.5.3	Auswirkungen der Polymorphismen in der Methylentetrahydrofolatreduktase auf die Toxizität von MTX	110
5.5.3.1	Vorliegen des MTHFR 677T-1298C Haplotyps	114
5.5.4	Auswirkungen des G80A Polymorphismus im reduzierten Folat-Carrierprotein auf die Toxizität von Methotrexat	115

5.5.5	Auswirkungen der Polymorphismen der Thymidylat-Synthase auf die Toxizität einer HD-MTX-Therapie	118
5.6	Schlussfolgerung	119
6	Zusammenfassung	124
7	Literaturverzeichnis	127
8	Anhang	145
8.1	WHO-Empfehlung für die Graduierung akuter und subakuter Toxizität	145
8.2	Abbildungsverzeichnis	145
8.3	Tabellenverzeichnis	147
8.4	Abkürzungsverzeichnis und Übersetzungen	148
	Danksagung	154
	Lebenslauf	155

1 Einleitung

Das primäre ZNS-Lymphome (PCNSL) ist seit 1974 als eigenständige Entität bekannt und zeigt seitdem eine steigende Inzidenz. Von ätiologischer Seite wird das PCNSL bei immunsupprimierten Patienten (HIV-infizierte oder organtransplantierte) vom PCNSL bei immunkompetenten Patienten unterschieden⁶³.

Die Therapie des primären ZNS-Lymphoms stellt noch immer eine Herausforderung dar, da mit den bisherigen Therapieoptionen, wie Chemotherapie und Hirnbestrahlung, kein langfristiger Erfolg erzielt werden kann. Dies hat sich durch den Einsatz von Cytarabin oder Hochdosis-Methotrexat in Kombination mit einer Ganzhirnbestrahlung geändert¹⁰⁹. Unter der HD-MTX-Therapie treten jedoch immer wieder WHO-Grad-III/IV-Toxizitäten auf, die dann einen therapielimitierenden Faktor darstellen.

Methotrexat ist ein Folsäure-Antagonist und greift über die Hemmung von Schlüsselenzymen im Folsäurestoffwechsel in die Synthese von Nukleotiden ein. Genetische Mutationen in Enzymen des Folat-Stoffwechsel können zu einer verminderten Aufnahme von Methotrexat in die Zellen mit einem daraus folgenden erhöhten Plasmaspiegel, zu einer schnelleren oder auch langsameren Metabolisierung führen, als deren Konsequenz dann toxische Nebenwirkungen entstehen. Möglicherweise könnte so eine intrinsische Resistenz oder auch die Sensitivität der malignen Zellen gegenüber Methotrexat erklärt werden.

Ziel dieser Arbeit ist zu klären, in wieweit toxische Wirkungen von Methotrexat in Zusammenhang mit Mutationen auf genetischer Ebene im Folsäurestoffwechsel stehen. Ebenso soll untersucht werden, ob man an Hand dieser Mutationen eine Aussage über das Ansprechen auf diese Chemotherapie machen kann, und ob sich dies auf das Überleben der Patienten auswirkt. Weiterhin soll erörtert werden, ob die Polymorphismen im Folatzyklus mit dem Risiko für ein primäres ZNS-Lymphom korrelieren.

1.1 Primäre Lymphome des zentralen Nervensystems

1.1.1 Epidemiologie

Bei Betrachtung der Epidemiologie des primären ZNS-Lymphoms muss man im Patientengut zwischen immunsupprimierten und immunkompetenten Patienten unterscheiden. Erstere sind häufig mit dem HI-Virus infiziert oder werden mit Immunsuppressiva nach einer Organtransplantation behandelt. Innerhalb dieser Patientengruppe treten PCNSL bei 2 bis 10%⁸⁷ auf, mit einem Anstieg der Häufigkeit seit der AIDS-Epidemie in den achtziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts⁶³. Die Diagnose PCNSL stellt bei HIV-infizierten Patienten eine AIDS-definierende Erkrankung dar⁴³.

Auch bei immunkompetenten Patienten nimmt in den letzten Jahren die Inzidenz aus bisher ungeklärten Gründen zu⁹⁶. Der Häufigkeitsgipfel liegt im 5. bis 7. Lebensjahrzehnt⁹⁸ mit einem medianen Alter von 55 bis 57 Jahren⁶³. Das Manifestationsalter bei immunsupprimierten Patienten liegt deutlich niedriger^{25,49}, mit einem medianen Alter von 31 Jahren bei überwiegend männlichen Patienten⁶³. Bei einer Inzidenz von ca. 0,5 Neuerkrankungen pro Jahr und 100.000 Einwohner treten in Deutschland jährlich circa 400 Neuerkrankungen auf⁶².

1.1.2 Histologie und pathologische Einteilung

Primäre ZNS-Lymphome sind Non-Hodgkin-Lymphome, die sich extranodal im Hirnparenchym als „Hirntumor“ manifestieren. Sie machen circa 3% aller primären Hirntumoren⁴ aus. Zirka 3 – 5% aller extranodalen Lymphome sind ZNS-Lymphome^{16,87}. In 85% der Fälle bleibt das Lymphom auf das Hirnparenchym, Rückenmark und Leptomeningen beschränkt^{25,87}. Auch das Auge, genauer die Retina, als Teil des zentralen Nervensystems, kann mit

betroffen sein²⁹, so zeigen 10 – 20% der Patienten bei Diagnosestellung eine Augenbeteiligung²⁵.

Bei fortgeschrittenen und disseminierten systemischen Lymphomen kann eine sekundäre Infiltration des Gehirns festgestellt werden. Die Häufigkeit solcher sekundären ZNS-Lymphome beträgt 5 - 29% systemischer NHL⁶³.

Makroskopisch erscheinen die Lymphome als solitäre oder multiple Raumforderungen im Hirnparenchym gelegen, meist mit einem diffusen, infiltrativen Wachstum. Die meisten Tumoren liegen supratentoriell, häufig mit einer engen Nachbarschaftsbeziehung zu den Stammganglien, dem Thalamus oder den Wänden der Seitenventrikel^{16,29}. Eine asymptomatische Meningeosis kommt mit einer Häufigkeit von 30 - 70% vor⁶³. Nekrosen im Tumorgewebe sieht man eher bei den HIV-assoziierten PCNSL.

Mikroskopisch lässt sich ein perivascular gelegenes enzephalitis- oder vaskulitisähnliches Infiltrat mit großen, zusammenliegenden Blasten, kleinen Lymphozyten und Monozyten erkennen. Bei höherer Vergrößerung ähneln die Blasten Zentroblasten oder Immunoblasten. Fast ausschließlich handelt es sich bei den PCNSL um B-Zell-Lymphome. Eine häufig nachgewiesene BCL-6- und MSH-2-Expression¹⁰⁹ lässt darauf schließen, dass es sich um B-Zellen des Keimzentrums eines Lymphfollikels bzw. um B-Zellen mit einer Keimzentrumsdifferenzierung handelt²⁹.

Der immunhistochemische Nachweis von CD20 oder CD79a, sowie immunhistochemische Färbungen mit dem monoklonalen Antikörper L26 belegen, dass es sich um B-Zell-Lymphome handelt²⁹. Nach der WHO-Klassifikation sind mehr als 90% der PCNSL großzellige B-Zell-Lymphome (DLBCL)^{57,88}, andere histologische Subtypen wie das T-Zell-Lymphom, das anaplastische großzellige Lymphom, das *low-grade* PCNSL und die Lymphomatosis cerebri sind Raritäten¹⁶.

1.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie des PCNSL ist noch nicht endgültig geklärt. Die Verwandtschaft zu Follikelzentrumszellen ist durch den typischen B-Phänotyp, sowie durch die hohe Expression von BCL-6 und MSH-2 sehr wahrscheinlich ^{16,29,109}.

Der Nachweis von Epstein-Barr-Virus (EBV) bei immunkompetenten Patienten gelingt nur sehr selten, ganz im Gegensatz zu immunsupprimierten Patienten, bei denen zu fast 100% EBV-DNA in PCNSL-Zellen nachgewiesen werden kann ⁵⁰.

1998 konnte von Corboy *et al.* in 56% der Biopsien aus Tumorgewebe bei Patienten mit PCNSL das humane Herpes-Virus-8 (HHV-8) nachgewiesen werden. Das HHV-8 gehört zur Familie der γ -Herpesviren, die einen starken Lymphtropismus besitzen. Es könnte sein, dass HHV-8 infizierte Lymphozyten die Blut-Hirn-Schranke überwinden können und es dann im geschützten Raum des Gehirn zu einer Zellvermehrung kommt ¹⁷.

Kadoch *et al.* beschreiben, dass BCA-1, ein auf B-Zellen wirkendes Chemokin, in beträchtlicher Menge in PCNSL synthetisiert wird. BCA-1 fördert das *homing* der B-Zellen in sekundäre lymphatische Gewebe. Die Bindung dieses Chemokins an seinen Rezeptor CXCR5, der auch in PCNSL exprimiert wird, könnte in die extranodale Manifestation des ZNS-Lymphoms verwickelt sein ¹⁰⁸.

2006 konnten Rubenstein *et al.* die ektope Produktion des B-Zell-Wachstumsfaktors Interleukin-4 durch primäre ZNS-Lymphomzellen nachweisen. Auch von Gefäßendothelzellen im PCNSL wird IL-4 synthetisiert, ganz im Gegensatz zu Endothelien in anderen extranodalen NHL. Dies könnte auch zum speziellen angiotropen Wachstumsmuster der Lymphomzellen im ZNS beitragen ⁹³.

1.1.4 Symptomatik und Diagnostik der PCNSL

Im Vordergrund der klinischen Symptomatik steht bei über 50% der Patienten ein hirnorganisches Psychosyndrom⁹⁷. Korfel *et al.* berichten über Persönlichkeitsveränderungen bei 24% der Fälle, zerebelläre Symptome bei 21%, Kopfschmerzen bei 15%, Krampfanfälle bei 13%, motorische Dysfunktion bei 11% und Visusveränderungen bei 8% der PCNSL-Fälle. Weniger häufig zeigen sich Symptome für einen erhöhten Hirndruck, im Sinne von Übelkeit und Erbrechen. Die neurologischen Symptome bestehen meistens seit weniger als drei Monaten⁸⁷.

Zur Diagnose eines primären ZNS-Lymphoms sind mehrere Untersuchungen notwendig: Neben der klinisch-neurologischen Untersuchung hat die radiologische Bilddiagnostik einen hohen Stellenwert. Bei der Kernspintomographie mit Gadolinium als Kontrastmittel lässt sich eine homogene Anreicherung ohne zentrale Nekrose im Tumorgebiet erkennen⁹. Die Patienten zeigen Läsionen in den Hemisphären und/oder in periventrikulären Arealen, häufig sind der Thalamus, die Basalganglien oder das Corpus callosum betroffen^{25,87}. Ein begleitendes Hirnödem ist meist nur geringfügig ausgeprägt⁶³. Im CT lässt sich eine iso- oder hyperdense Läsion erkennen, bei Kontrastmittelgabe reichert der Tumor dieses an. Für differentialdiagnostische Zwecke eignet sich auch die Positronenemissionstomographie (PET), da ZNS-Lymphome eine erhöhte ¹⁸FDG-Aufnahme zeigen^{36,92}.

Da auch intraokuläre PCNSL vorkommen, sollten Patienten unbedingt ophthalmologisch mit der Spaltlampe untersucht werden⁴⁵.

Eine Liquorzytologie ist in 5 - 20% wegweisend⁴⁹, daher sollte eine Lumbalpunktion bei Zweifeln auch mehrmals durchgeführt werden⁵³. Die Methode der Wahl zur endgültigen Diagnosestellung „primäres Lymphom des zentralen Nervensystems“ ist die stereotaktische Biopsie und anschließende histopathologische Aufarbeitung des gewonnenen Materials⁴⁷. Allerdings muss vor der Biopsie die Gabe von Kortikosteroiden ex juvantibus unterbleiben⁹⁵, da sonst eine histologische Beurteilung erschwert werden kann^{53,63,129}.

1.1.5 Prognose und Therapie der PCNSL

Von allen Patienten mit einem aggressiven NHL haben Patienten mit einem PCNSL die schlechteste Prognose; das mediane Überleben beträgt nur wenige Monate ⁶³.

Das mediane Überleben mit Hilfe einer chirurgischen Therapie beträgt vier Monate ⁸⁷. Da aber häufig durch die Resektion nur ein Zustand mit neurologischem Defizit erreicht werden kann, vor allem bei einer tiefen Lokalisation im Gehirn, ist eine chirurgische Therapie nur selten indiziert ²⁶.

Vor diesem Hintergrund avancierte die Radiotherapie zur Methode der Wahl in der Behandlung der PCNSL. Das mediane Überleben konnte durch eine Ganzhirnbestrahlung (WBRT) auf 15 bis 18 Monate ausgedehnt werden ⁸⁷. Allerdings leiden ältere Patienten häufig an einer verspäteten Neurotoxizität, die auf die WBRT zurückzuführen ist ⁸⁶.

Das bei systemischen Lymphomen gut wirksame CHOP-Protokoll wirkt durch die begrenzte Blut-Hirn-Schrankengängigkeit nicht ^{4,87}. Durch die Verwendung von schrankengängigen Substanzen wie Methotrexat, Cytosin-Arabinosid, Procarbazin, CCNU oder Temozolomid konnte eine Verlängerung der Überlebenszeit erreicht werden.

Durch die Kombination von Methotrexat mit einer Ganzhirnbestrahlung kann eine Verlängerung der medianen Überlebenszeit von 15 - 18 Monaten (WBRT alleine) auf 33 - 43 Monate erreicht werden. Die 5-Jahres-Überlebensrate unter dieser Therapie beträgt 19 - 35%. Problematisch ist aber, dass auch die Kombination von MTX und WBRT zu neurotoxischen Spätfolgen führt: 13 - 40% der Patienten entwickeln eine Leukenzephalopathie ¹⁰⁹. Aus diesem Grund wird in einigen Therapieschemata auf die Strahlentherapie in der Primärbehandlung verzichtet, um das Risiko der neurotoxischen Spätfolgen zu reduzieren. In einer Metaanalyse zeigte sich, dass die hochdosierte MTX-Therapie der stärkste positive therapieassoziierte prognostische Faktor ist ⁹⁰. Unter einer alleinigen Therapie mit Hochdosis-MTX sind komplette Remissionen in bis zu 65% der Fälle beschrieben worden ⁴¹, allerdings variieren die Angabe in der Literatur stark ^{21,90}. In der NOA-3-Studie konnten nur in ca. 30% der Fälle komplette

Remissionen nach sechs Zyklen HD-MTX nachgewiesen werden⁸⁷, in der NABTT 96-07 Studie dagegen in 52% der Fälle⁴.

1.2 Der Folsäurestoffwechsel und Methotrexat

Folsäure gehört zur Gruppe der B-Vitamine und ist beim Menschen essentiell für die Synthese von Purinen und Pyrimidinen. Der größte Anteil an Folsäure liegt intrazellulär als N₅-Methyl-Tetrahydrofolsäure vor und dient als Coenzym im C₁-Stoffwechsel. Folsäure wird über das reduzierte Folat-Carrierprotein (RFC) und über den humanen Folatrezeptor in die Zelle transportiert. Dort findet die Umwandlung in die *in vivo* wirksame Form Tetrahydrofolsäure (THF) statt. THF wird zu 5,10-Methylen-THF umgewandelt und stellt dann das Schlüsselsubstrat im Folsäurestoffwechsel dar, das in drei verschiedene Richtungen dirigiert werden kann: a) in Richtung Thymidin-Synthese, b) in Richtung Purin-Synthese und c) mit Hilfe der MTHFR über die Bildung von N₅-Methyl-THF in Richtung Methionin-Synthese. Mit Hilfe von N₅-Methyl-THF und der Methionin-Synthase wird aus Homocystein Methionin synthetisiert, das einen Vorläufer von S-Adenosyl-Methionin (SAM) darstellt, welches wiederum unter anderem bei der DNA-Methylierung mitwirkt. Die Konzentration an 5,10-Methylen-THF verschiebt das Reaktionsgleichgewicht in die einzelnen Richtungen¹¹⁸.

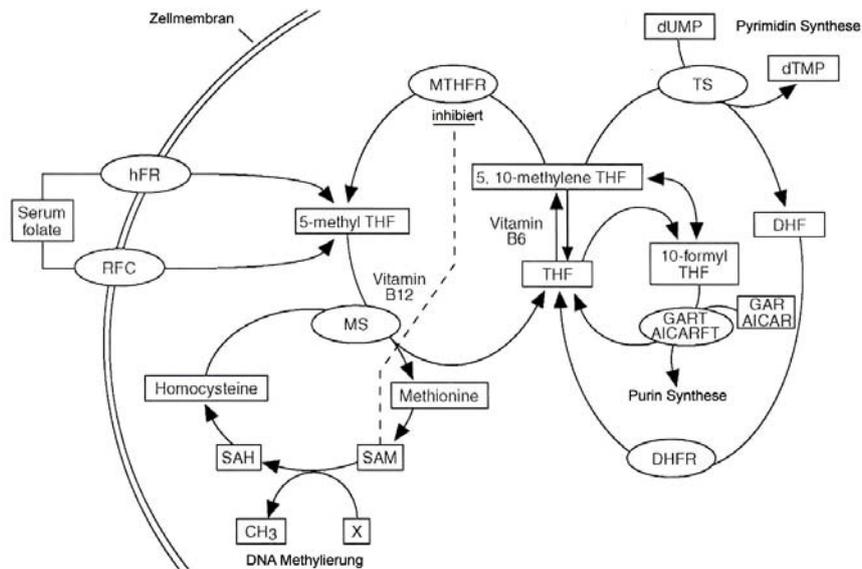


Abb. 1: Folsäuremetabolismus, DNA-Synthese und DNA-Methylierung.

(modifiziert, nach: Ulrich CM ¹¹⁸) Enzyme in Ovalen, Substrate in Rechtecken; AICAR: 5-Aminoimidazol-4-Carboxamid Ribonucleotid; AICARFT: AICAR Transformylase; DHF: Dihydrofolat; DHFR: Dihydrofolatreduktase; GAR: Glycinamid Ribonucleotid; GART: GAR Transformylase; hFR: humaner Folatrezeptor; MS: Methionin-Synthase; MTHFR: 5,10-Methylentetrahydrofolatreduktase; RFC: reduzierter Folat-Carrier; SAH: S-Adenosyl-Homocystein; SAM: S-Adenosyl-Methionin; THF: Tetrahydrofolat; TS: Thymidylat-Synthase.

Folat-Antagonisten, wie Methotrexat und Thymidylat-Synthase-Inhibitoren, wie 5-Fluoruracil, greifen in den Folsäuremetabolismus ein und nutzen die Rolle, die die Folsäure im Replikationszyklus der Zellen spielt.

MTX wird über den RFC in die Zelle geschleust und dort an Glutaminsäuren gekoppelt; so kann es die Zelle nicht mehr verlassen. Es ähnelt in der chemischen Struktur der Folsäure und kann so an viele Enzyme des Folsäurestoffwechsel binden und diese auch inhibieren. Es wirkt daher spezifisch in der S-Phase des Zellzyklus. Speziell MTX hemmt die Dihydrofolatreduktase, welche Dihydrofolat zu Tetrahydrofolat reduziert. Durch das Fehlen dieses Kohlenstoffdonors wird die Synthese von Pyrimidinen und Purinen, sowie die DNA-Reparatur gehemmt. Durch das Fehlen von Folsäure ist die Umwandlung von dUMP zu dTMP gestört, es kommt zum Fehleinbau von Uracil bei der DNA-Replikation mit daraus folgenden Doppelstrangbrüchen ⁹¹. Methotrexat Polyglutamate hemmen zusätzlich auch die MTHFR.

Methotrexat wird in der Therapie der rheumatoiden Arthritis, der Psoriasis, des systemischen Lupus erythematoses und in der Behandlung maligner Erkrankungen (akute lymphatische Leukämie, maligne Lymphome, Chorion-, Mamma-, Zervix-, Ovarialkarzinom, HNO-Tumore, Osteosarkom, Meningeosis leucaemica) eingesetzt ⁴⁹.

Manche MTX-Nebenwirkungen (orale und intestinale Mukositis, Anämie, Thrombozytopenie) stehen in direktem Zusammenhang mit dem Folsäureantagonismus, vor allem in den Geweben mit hohem Zellumsatz und besonderem Bedarf an Purinen, Pyrimidinen und Methionin ¹¹⁰.

Eine MTX-Therapie ist unter Umständen mit schwerer Akuttoxizität verbunden. Diese besteht in einer Myelosuppression: Dabei erreicht die Erythropoese ihren Nadir nach 6 - 13 Tagen. Der Nadir für die Thrombozyten ist nach 5 - 12 Tagen, der Nadir der Leukozyten nach 4 - 7 Tagen erreicht. Als weitere Nebenwirkungen können Alopezie, Erbrechen, Übelkeit, Appetitlosigkeit, Hepatitis, Dermatitis und eine Alveolitis oder Pneumonitis auftreten ¹⁰⁹.

1.3 Mutationen im Folsäurestoffwechsel

1.3.1 Methylentetrahydrofolatreduktase

Die Methylentetrahydrofolatreduktase ist ein zentrales Enzym im Folsäurestoffwechsel. Sie wandelt 5,10-Methylen-THF irreversibel in 5-Methyl-THF um. Dies wird wiederum mit Hilfe des Coenzym Vitamin B12 und der Methioninsynthase, die Homocystein in Methionin umwandelt, zu Tetrahydrofolat verstoffwechselt (siehe Abb. 1) ¹¹⁸.

Das Gen für die MTHFR liegt auf dem Chromosom 1 am Locus 1p36.3 ¹⁰².

1.3.1.1 Punktmutation C677T

1995 wurde der erste *single-nucleotide*-Polymorphismus (SNP) in der MTHFR entdeckt. Bei dieser Punktmutation ist im Gen Cytosin an der Basenposition 677 durch Thymidin ersetzt. Daraus resultiert ein Aminosäuretausch im Codon 222; Valin tritt an die Stelle von Alanin¹¹⁸. Die Mutation liegt innerhalb des katalytischen Zentrums des Enzyms⁸³, daher kann eine veränderte Enzymfunktion erwartet werden.

Die Frequenz des T-Allels wird mit 0,30 - 0,39 bei Kaukasiern angegeben¹¹⁸.

Der C677T Polymorphismus wurde als Risikofaktor für atherosklerotische Gefäßwandveränderungen^{100,120}, Neuralrohrdefekte^{55,100,121}, kolorektale Adenome¹¹⁶ und für die diabetische Nephropathie beschrieben.

Beim Vergleich der Enzymaktivität der MTHFR innerhalb der drei verschiedenen Genotypen (CC, CT, TT) lässt sich nachweisen, dass der TT-Genotyp nur 32%, der CT-Genotyp 64% der Aktivität des CC-Genotyps aufweist. Der Aminosäuretausch resultiert in einer thermolabilen Variante mit niedrigerer Aktivität^{10,100}. Parallel hierzu reduziert der TT-Genotyp die *in vivo* Verfügbarkeit von 5-Methyl-THF³³ und beeinträchtigt die Remethylierung von Homocystein zu Methionin mit nachfolgender Hyperhomocysteinämie und Mangel an SAM^{23,35,55,100,110,111}. Die Hyperhomocysteinämie stellt ihrerseits einen Risikofaktor für kardio- und zerebrovaskuläre Erkrankungen dar¹²². Unter einer Therapie mit MTX kann das Homocystein zusätzlich noch weiter ansteigen^{110,122}. Diese Situation wird durch einen hohen Alkoholkonsum, einen hohen Folsäurebedarf (z.B. Schwangerschaft) und eine niedrige Folsäureaufnahme mit der Nahrung begünstigt.

Bei der Behandlung der rheumatoiden Arthritis leiden mehr Patienten des TT-Genotyps unter einer MTX assoziierten Toxizität (Anstieg der Transaminasen, Stomatitis, Übelkeit, etc.) als Patienten des CC-Genotyps¹²⁰. Patienten mit mindestens einem mutierten Allel haben ein größeres Risiko die Therapie auf Grund eines Transaminasenanstieges abbrechen zu müssen (RR=2,38; 95% KI=1,06-5,34). Durch eine ergänzende Therapie mit Folsäure kann die Inzidenz

an Nebenwirkungen¹²⁴, ebenso wie die Homocystein-Konzentration im Blutplasma gesenkt werden¹²².

Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom haben während der Behandlung ein 42-fach erhöhtes Risiko eine Grad III oder IV tox. Nebenwirkung (sowohl hämatologisch, als auch nicht-hämatologisch) zu erleiden, wenn sie zum TT-Genotyp gehören und mit Patientinnen des kombinierten CT- und CC-Genotyps verglichen werden. Ebenso haben sie einen erhöhten Homocystein-Spiegel¹¹⁰.

Weiterhin besteht ein Zusammenhang mit der Inzidenz von malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems: Skibola *et al.* beobachteten 1999 bei der akuten lymphatischen Leukämie (ALL), dass der TT-Genotyp mit einem 4,3-fach niedrigeren Erkrankungsrisiko verknüpft ist als der CC-Genotyp. Dieser Sachverhalt trifft allerdings nicht für die AML zu¹⁰⁷. Gemmati *et al.* fanden ein 3,6-fach/1,7-fach (TT/CT) erniedrigtes Erkrankungsrisiko für eine ALL (OR=0,28; 95% KI= 0,12-0,72)³⁵ und führten dies darauf zurück, dass eine erniedrigte MTHFR Aktivität besser für die DNA-Synthese sei, da damit der Fehleinbau von Uracil und die daraus folgenden Doppelstrangbrüche der DNA vermindert werden^{35,80}.

2001 wurde gezeigt, dass der kombinierte CT/TT-Genotyp mit einem verminderten Risiko für ein NHL assoziiert ist (OR=0,64; 95% KI= 0,39-1,05)⁸⁰. 2004 wurde dies teilweise widerlegt: Der TT-Genotyp ist beim NHL (OR=1,5; 95% KI=0,97-2,2) mit einem erhöhtem Erkrankungsrisiko verbunden¹⁰⁵. Kinder mit dem 677 TT-Genotyp erkranken im Vergleich zu den beiden anderen Genotypen häufiger an einem lymphoblastischen Lymphom¹⁰¹.

Aplenc *et al.* zeigten, dass Kinder mit einer ALL und dem TT-Genotyp ein erhöhtes Risiko eines Rückfalles aufweisen. Auch das rückfallfreie Überleben (RFS) nach 10 Jahren lies dies erkennen: CC-Genotyp 78,9%, TT-Genotyp 66,6%. Die Mutation war mit keiner Veränderung des Risikos für Infektionen und nicht mit dem Auftreten von tox. Nebenwirkungen assoziiert². Ähnliches zeigten Kishi *et al.*: Sie konnten keinen Zusammenhang zwischen dem MTHFR Genotyp und Nebenwirkungen (zerebrale Anfälle und Thrombose) finden⁶¹.

Ganz im Gegensatz hierzu litten in der Studie von Chiusolo *et al.* 60% der Patienten mit dem TT-Genotyp unter MTX-Toxizitäten im Vergleich zu 33,3%

und 24% der Patienten mit dem CC- oder CT-Genotyp. Alle Patienten waren an einer ALL erkrankt und erhielten eine Chemotherapie, die MTX beinhaltet¹⁴.

Ulrich *et al.* zeigten, dass Patienten mit dem TT-Genotyp unter einer Prophylaxe der *graft-versus-host disease* (GVHD) mit Methotrexat nach Knochenmarkstransplantation auf Grund einer CML häufiger an Toxizitäten als die anderen Patienten litten: Die Patienten hatten im Durchschnitt einen 5,7 Punkte höheren oralen Mukositis-Index am Tag 1-18 (OMI), die Erholung der Thrombozytenzahlen auf 20000/ μ l verlief um 34% langsamer im Vergleich zu Patienten des CC-Genotyps¹¹⁹.

1.3.1.2 Punktmutation A1298C

Bei dieser Punktmutation wird Adenin durch Cytosin an der Basenposition 1298 im Exon 7 des MTHFR-Gens ersetzt. Dadurch kommt es im Codon 429 zu einem Austausch von Glutaminsäure durch Alanin. Die C-Allel Frequenz beträgt bei Kaukasiern 0,30 – 0,33⁹¹.

Die Mutation liegt in der S-Adenosyl-Methionin-regulatorischen Domäne des Enzyms und verursacht eine Konformationsänderung, die mit einer Verminderung der Enzymaktivität einhergeht⁹¹.

Die *Loci* der beiden MTHFR Mutationen liegen nur 2,1 kb auseinander und stehen in einem starken Kopplungsungleichgewicht, d.h. die beiden Polymorphismen existieren sehr selten auf dem gleichen Gen und der kombinierte Genotyp 677TT und 1298CC ist in der Bevölkerung sehr ungewöhnlich^{55,83,91,105,127}.

Wenn man den Mutationsstatus an der Basenposition 677 nicht beachtet, so ergibt sich durch die Mutation A1298C im homozygoten mutierten Status (1298CC) eine Verringerung der Enzymaktivität auf ca. 60%^{121,127}. Patienten mit 677CC/1298AC haben eine Aktivität von 60%, 677CC/1298CC 52%, 677CT/1298AC 36% wenn man die Aktivität mit 677CC/1298AA vergleicht¹⁰.

Bei den homozygoten 1298CC Individuen lässt sich ein leichter bis gar kein Trend zur höheren Homocystein-Konzentration erkennen^{10,23,83,121}. Jedoch

haben Patienten mit 677TT/1298AA signifikant niedrigere Plasmafolsäure-Spiegel, eine erhöhte Homocystein-Konzentration und eine niedrigere Rate an genomischer DNA-Methylierung als Patienten mit 677CC/1298AA oder 677CT/1298AC, aber nur bei Betrachtung der kombinierten Genotypen. Der SNP A1298C hat dagegen alleine keinen Einfluss auf die Plasmafolsäure^{34,83,121}. Die Methylierung lymphozytärer DNA von Patienten mit dem 1298AA Wildtyp ist reduziert im Vergleich zu den anderen beiden Genotypen³⁴.

In einer Studie von Kumagai *et al.* zur Evaluation von tox. Nebenwirkungen bei niedrig dosiertem MTX zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis (RA) konnte kein Zusammenhang mit dem SNP A1298C festgestellt werden⁶⁶. Berkun *et al.* zeigten hingegen, dass Nebenwirkungen von Methotrexat wesentlich häufiger bei Patienten des AA-Genotyps auftreten (OR=5,24; 95% KI=1,38-20)⁶. In einer anderen Studie hingegen wurde gezeigt, dass das MTHFR 1298C Allel mit erhöhter Toxizität bei früher rheumatoider Arthritis assoziiert ist¹³⁰.

Die Untersuchungen von Berkun *et al.* und von Hughes *et al.* wiesen auch nach, dass die beiden Polymorphismen in der MTHFR keinen Einfluss auf die Effektivität einer Therapie mit MTX bei der rheumatoiden Arthritis haben^{6,52}.

Aplenc *et al.* untersuchten 520 Kinder mit ALL, die mit MTX therapiert wurden, auf den Zusammenhang der MTHFR Genotypen mit dem Auftreten von Nebenwirkungen und Infektionen. Es konnte keine Assoziation mit tox. Nebenwirkungen, der Dauer der Chemotherapie, dem Risiko für ein Rückfall oder Komplikationen auf Grund von Infektionen festgestellt werden². De Jonge *et al.* zeigten hingegen, dass der 1298 AC-Genotyp bei Kindern mit ALL mit einer geringeren MTX Empfindlichkeit und einer höheren hämatologischen Toxizität verbunden ist, als bei den beiden homozygoten Genotypen²⁰.

Laut Skibola *et al.* wiesen erwachsene Patienten mit dem 1298 AC-Genotyp ein 3-fach niedrigeres Risiko, Patienten mit dem 1298 CC-Genotyp ein 14-fach niedrigeres Risiko (OR=0,07; 95% KI=0,00-1,77) auf an einer ALL zu erkranken, wenn man den AA-Genotyp als Referenz betrachtet. Gegenüber einer AML wurde kein protektiver Effekt entdeckt¹⁰⁷. Gemmati *et al.* konnten dieses Ergebnis nicht bestätigen; sie fanden keinen Zusammenhang zwischen

SNP MTHFR A1298C und einer ALL, sowohl in der Einzelanalyse, als auch in Kombination mit SNP MTHFR C677T ³⁵.

Matsuo *et al.* zeigten an einer japanischen Population, dass Patienten mit mindestens einem mutierten Allel in den beiden SNP ein ca. 2-fach niedrigeres Risiko (OR= 0,45; 95% KI=0,25-0,80) für ein malignes Lymphom haben, als Patienten mit voller MTHFR Enzymaktivität (677CC/1298AA). Im Speziellen wiesen die Genotypen 677CT/TT und 1298AC/CC ein verringertes Risiko für eine Erkrankung an einem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom auf im Vergleich zu den Genotypen 677CC und 1298AA (OR=0,29; 95% KI=0,14-0,64) ⁸⁰. Skibola *et al.* konnten dies in ihrer US-amerikanischen Population nicht bestätigen, wobei sie aber ein erniedrigtes Risiko für die Haplotypen-Kombination 677C/1298C bezüglich der Erkrankung an einem NHL sehen konnten (OR=0,88). Weiterhin stellten sie ein grenzwertig erhöhtes Risiko (OR=1,2) einer Erkrankung für den Haplotyp 677T/1298A an einem diffusen großzelligen Lymphom fest ¹⁰⁵.

1.3.2 Reduziertes Folat-Carrierprotein

Der Folsäuretransport über die Zellmembran findet zum größten Teil über den reduzierten Folat-Carrier (RFC) statt ^{38,137}. Das reduzierte Folat-Carrierprotein kann von größter pharmakogenetischer Relevanz sein, da es auch für den Transport von Methotrexat in die Zelle verantwortlich ist ^{118,131} und ein gestörter Transport ein häufiger Mechanismus für eine MTX-Resistenz darstellt. Diese ist mit einer niedrigeren RFC Expression und/oder mit einem Funktionsverlust des Proteins assoziiert ^{30,137}.

Ferreri *et al.* befassten sich mit der Methylierung des Promoters des RFC-Gens beim primären ZNS-Lymphom. Alle Patienten, bei denen der Promoter nicht methyliert war (27 von 38), hatten beim *follow-up* nach drei Jahren kein Rezidiv, im Gegensatz zu allen anderen Patienten, die innerhalb der drei Jahre gestorben waren. Promotermethylierung ist beim PCNSL mit einer niedrigeren Remissionsrate und einem kürzeren krankheitsfreien Überleben assoziiert.

Ebenso zeigen die PCNSL mit Promotermethylierung eine niedrige bis gar keine RFC-Expression im Tumorgewebe³⁰.

Guo *et al.* untersuchten die intrinsische Resistenz von Osteosarkomen gegenüber MTX. 17 von 26 (65%) der Tumorbiopsate zeigten eine erniedrigte RFC-Expression und geringe Mengen an RFC mRNA. Ebenso zeigte die Arbeitsgruppe, dass Patienten, deren Tumoren normale Mengen an RFC und DHFR mRNA aufweisen, die beste Antwort auf die Chemotherapie zeigten und 90% aus dieser Gruppe keine Metastasen hatten⁴².

Gorlick *et al.* zeigten, dass bei Patienten, die an einem Rezidiv einer mit MTX behandelten ALL leiden, 71% der leukämischen Blasten eine gestörte Methotrexat Aufnahme zeigen, wohingegen nur 13% der Blasten schon zu Beginn der Therapie eine niedrige Methotrexat-Transportrate aufweisen. In 6 von 9 Proben war der gestörte Transport mit einer niedrigeren RFC-Expression assoziiert³⁸. Levy *et al.* zeigten 2003, dass eine niedrige RFC-Expression bei Diagnosestellung mit einem ungünstigen krankheitsfreien Überleben bei Kinder mit ALL assoziiert ist³⁰.

1.3.2.1 Punktmutation G80A

Ein häufig anzutreffender Polymorphismus stellt der SNP G80A dar. Sowohl die Base Guanosin, als auch die Base Adenosin kann als Wildtyp betrachtet werden. Im RFC Protein in der ersten Transmembrandomäne wird an der Aminosäureposition 27 Histidin durch Arginin ersetzt^{67,131}. Die Allelfrequenz der A-Variante wird bei Kaukasiern mit 0,47 bis 0,48 angegeben¹¹⁸.

Die erste Transmembrandomäne wurde als wichtiger Ort für Mutationen, die Resistenzen gegenüber Folsäureantagonisten hervorrufen und sich in Substrataffinitäten äußern, identifiziert¹³⁸. Studien zeigten aber entgegen aller Erwartung, dass sich das RFC_{27 Histidin} Protein in der Aufnahme und im Transport von Substraten nur geringfügig vom RFC_{27 Arginin} Protein unterscheidet¹³¹. Auch Chango *et al.* zeigten, dass der G80A Polymorphismus keinen erkennbaren Einfluss auf den Plasmafolsäurespiegel hat, allerdings

haben Patienten mit dem MTHFR 677TT und dem RFC 80 GG-Genotyp ein moderat erhöhtes Plasmahomocystein¹¹. Gegenzug fanden Drogan *et al.*: Der AA-Genotyp war im Vergleich zum GA-Genotyp mit einem erhöhten Plasmahomocystein assoziiert²⁴.

Yang *et al.* zeigten, dass der SNP RFC G80A keinen Einfluss auf das Ansprechen einer MTX-haltigen präoperativen Chemotherapie beim Osteosarkom hat¹³⁴.

Dervieux *et al.* fanden heraus, dass Patienten mit mindestens einem der homozygoten Genotypen TS 2R/2R und RFC 80AA mit einer 3,7-fach (95% KI=1,7-9,1; P=0,01) erhöhten Wahrscheinlichkeit besser auf MTX ansprechen, als Patienten anderer Genotypen. Patienten mit dem RFC 80 AA-Genotyp haben eine höhere Konzentration an MTX-Polyglutamaten in den Erythrozyten und zeigen ein besseres Ansprechen auf die Therapie als Patienten mit dem GA oder GG-Genotyp²². Auf der anderen Seite zeigten Laverdière *et al.*, dass Kinder mit einer ALL und dem RFC 80 AA-Genotyp ein schlechteres *Outcome* als Kinder mit dem GG-Genotyp aufweisen. Sie erleiden häufiger einen Rückfall oder sterben an einem Rezidiv (OR=3,0; 95% KI= 1,1-8,1; P=0,03). Außerdem zeigen sie höhere MTX-Plasmalevel beim Vergleich mit den anderen Genotypen⁶⁷.

1.3.3 Thymidylat-Synthase

Auch die Thymidylat-Synthase ist ein Schlüsselenzym im Folsäurestoffwechsel. Sie katalysiert die Übertragung einer Methylgruppe von 5,10-Methylen-THF auf Desoxyuridinmonophosphat. Dabei entsteht sowohl Desoxythymidinmonophosphat als auch Dihydrofolat. Aus Dihydrofolat wird durch eine Reduktion 5,10-Methylen-THF zurückgewonnen.

Die Thymidylat-Synthase stellt den Hauptangriffspunkt von 5-Fluoruracil dar.

Das Gen für die TS ist auf dem Chromosom 18 am Locus 18p11.32 lokalisiert^{113,118}.

1.3.3.1 28 bp tandem/triplet repeat Polymorphismus

In der untranslatierten Region im 5'-Teil des Gens findet sich eine Serie von sich wiederholenden 28 bp langen Sequenzen^{51,118}. Am häufigsten kommen zweifache (*tandem*) oder dreifache (*triplet*) Wiederholungen vor, jedoch wurden auch schon vier bis neun Wiederholungen bei afrikanischen Stämmen gesehen⁷⁷. Die Allelfrequenz wird bei Kaukasiern für den *tandem repeat* mit 0,46 und für den *triplet repeat* mit 0,54 angegeben. Die vierfache Wiederholung hat bei Afro-Amerikanern eine Allel Frequenz von 0,02. Die Sequenz fungiert als *cis-acting Enhancer* für die Transkription^{114,118} und trägt damit zur Effektivität der Expression des TS Gens bei⁵¹. In der Literatur wird sie auch als *TSER2R>3R* bezeichnet.

Kawakami *et al.* zeigten, dass die TS mRNA mit dem *triplet repeat* eine größere Translationseffektivität besitzt, im Vergleich zur TS mRNA mit dem *tandem repeat* und somit die Aktivität der TS beeinflusst. Damit könnte die Anzahl der Wiederholungen zur Vorhersage der Effektivität einer Chemotherapie dienen, die an der Thymidylat-Synthase angreift⁵⁸.

Bei Patienten mit dem TS 3R/3R-Genotyp wurde eine niedrige Plasmafolsäure und ein erhöhtes Plasmahomocystein gemessen. Dieses Phänomen wurde noch verstärkt, wenn der TS 3R/3R-Genotyp mit dem MTHFR 677 TT-Genotyp kombiniert auftrat, wobei hier wohl die MTHFR die Hauptrolle spielt¹¹². Brown *et al.* kamen zu einem gegensätzlichen Ergebnis: Sie fanden keinen Zusammenhang zwischen den 28 bp *repeats*, Plasmafolsäure und dem Plasmahomocystein. Ebenso konnte der Zusammenhang mit dem SNP MTHFR C677T nicht bestätigt werden⁸.

Von Kumagai *et al.* wurde 2003 gezeigt, dass Patienten bei der Behandlung einer rheumatoiden Arthritis mit Methotrexat signifikant höhere Spiegel zur Krankheitskontrolle benötigten, wenn der homozygote 3R-Genotyp vorliegt. Ein Schluss ihrer Studie war, dass die Effektivität einer MTX-Therapie mit dem TS 28 bp Genotyp korreliert.^{22,66}

Ulrich *et al.* zeigten 2002, dass Patienten des 3R/3R-Genotyps ein erniedrigtes Risiko für kolorektale Adenome haben, wenn sie große Mengen an Folsäure

aufnehmen. Umgekehrt besitzen Patienten mit dem 2R/2R-Genotyp bei geringer Folsäureaufnahme ein hohes Risiko¹¹⁴.

Kinder mit einer ALL, die Träger des 3R/3R-Genotyps sind, haben eine schlechtere Prognose. Sie bekommen häufiger ein Rezidiv oder sterben an ihrer Krankheit während oder kurz nach der Therapie und haben somit ein kürzeres krankheitsfreies Überleben⁶⁴. In einer Studie mit 205 ALL-Patienten, die mit MTX behandelt wurden, zeigte sich, dass Patienten mit mindestens einem 2R-Allel eine größere Chance auf ein Ansprechen der Therapie haben als Patienten mit dem homozygoten 3R-Genotyp⁶⁴. Patienten mit dem 3R-Allel und dem 870 AA-Genotyp im Cyclin D1 Gen haben ein noch geringeres *EFS*^{18,77}.

Im Gegensatz dazu zeigten Skibola *et al.*, dass Patienten des 3R/3R-Genotyps verglichen mit den Patienten des 2R/2R-Genotyps ein vierfach geringeres Risiko haben an einer ALL zu erkranken. Aus ihrer Sicht verstärkt die höhere Expression der TS die Umwandlung von dUMP zu dTMP und verringert damit den intrazellulären Uracilspiegel. Uracil kann fälschlicherweise in die DNA eingebaut werden und dort Strangbrüche verursachen. In sich schnell teilenden Geweben, die den größten DNA Umsatz aufweisen, wie das der Hämatopoese, könnte ein niedriger Uracilspiegel theoretisch ein Schutz vor Leukämie darstellen¹⁰⁶.

1.3.3.2 6bp Deletion/Insertion

Die 6 Basenpaar Deletion mit der Sequenz TTAAAG im untranslatierten 3'-Bereich (3'-UTR) der Thymidylat-Synthase wurde erstmals im Jahr 2000 von Ulrich *et al.* nach einer *expressed-sequence-tags*-Analyse (EST) beschrieben (TS1498del6). Die Allel Frequenz wird bei Kaukasiern mit 0,29 angegeben¹¹⁵, ist aber bei verschiedenen ethnischen Gruppen unterschiedlich. In einigen dieser Gruppen steht die 6 bp Deletion im Kopplungsungleichgewicht mit dem 28 bp *tandem/triplet repeat* Polymorphismus im 5'-Bereich der TS^{75,105,114}.

Die 3'-UTR wirkt als Posttranskriptionsfaktor und ist wichtig für die Stabilität der mRNA und die Regulation der Genexpression *in vitro*. *In vivo* bewirkt der Polymorphismus sowohl eine erniedrigte TS mRNA Konzentration als auch eine verringerte TS Expression⁷⁵. Auch bei kolorektalen Tumoren ist die Deletion, beginnend am Basenpaar 1494, mit einer erniedrigten mRNA Konzentration vergesellschaftet¹¹⁸. Etienne *et al.* konnten allerdings keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und der TS Enzymaktivität feststellen²⁸. Patienten mit dem -6/-6 Genotyp haben eine höhere Folsäurekonzentration in den Erythrozyten und eine niedrigere Homo-cystein-Konzentration im Serum verglichen mit den -6/+6 oder +6/+6 Genotypen. Ein additiver Effekt bezüglich der Folsäurekonzentration wird bei Patienten mit dem MTHFR 677 CC-Genotyp beobachtet⁶⁰.

Kumagai *et al.* zeigten 2003, dass bei Patienten mit rheumatoider Arthritis und dem -6/-6 Genotyp, die mit niedrig-dosiertem MTX behandelt wurden, eine größere Senkung des C-reaktiven Proteins (CRP), als Marker für die entzündliche Aktivität, erreicht werden kann und schlossen daraus, dass Patienten mit einer niedrigeren TS Expression sensitiver auf MTX reagieren⁶⁶.

Skibola *et al.* untersuchten 2004 den Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus in der 3'-UTR der TS und dem Risiko für NHL: Für die Deletion homozygote Personen hatten ein um 43% reduziertes Risiko an einem NHL zu erkranken im Vergleich zu Probanden, die homozygot für die Insertion (+6/+6) waren. In der Untergruppe der diffusen großzelligen Lymphome zeigte sich eine noch deutlichere Reduktion des Risikos um 70%, wenn man den -6/-6 Genotyp mit dem +6/+6 Genotyp verglich. Personen mit dem 2R Allel und dem +6/+6 Genotyp haben ein 50 bis 70% höheres Risiko an einem NHL zu erkranken. Speziell der kombinierte Genotyp TS 2R2R/+6+6 ist, verglichen mit dem 3R3R/+6+6 Genotyp, mit einem 1,5-fach erhöhten Risiko für ein NHL assoziiert. Wenn jedoch nur eine TS -6 bp Kopie vorliegt, kehrte sich die Assoziation um: TS 2R2R/-6+6 OR 0,41 (95% KI=0,20-0,87)¹⁰⁵.

1.4 G-PCNSL-SG-1-Studie

Am 9. Oktober 2002 wurde die G-PCNSL-SG-1-Studie zum Stellenwert der Ganzhirnbestrahlung in der Primärtherapie primärer ZNS-Lymphome mit Hochdosis-Methotrexat initiiert¹⁰⁹. Es soll untersucht werden, ob ein Aufschub der Bestrahlung bis zum Rezidiv ohne signifikante Einbußen in der Prognose erfolgen kann. Damit könnte ein verzögertes Auftreten möglicher Spättoxizität (Leukenzephalopathie) durch die Bestrahlung erreicht werden.

Die an der Studie teilnehmenden Patienten mit primärem ZNS-Lymphom werden initial systemisch mit hoch dosiertem Methotrexat behandelt. Anschließend erfolgt eine Aufteilung in zweimal zwei Studienarme: Bei einer Komplettremission (CR) erhalten die Patienten im ersten Arm (A1) nach 4 bis 7 Wochen eine Ganzhirnbestrahlung (*WBRT*), im zweiten Arm (A2) erst nach der Diagnose eines Rezidivs. Erreichen die Patienten nach der Chemotherapie keine komplette Remission, sondern nur eine Teilremission oder ein *stable disease*, so werden sie dem Arm 3 (B1) oder dem Arm 4 (B2) zugeordnet. In B1 erfolgt ebenfalls eine *WBRT*, in B2 erhalten die Patienten Cytarabin (AraC) in maximal 4 dreiwöchigen Zyklen mit 4 X 3 g/m² KOF in 48 h.

Die initiale Chemotherapie besteht aus 6 14-tägigen Zyklen Methotrexat (Tag 1, 4 g/m²) und im ersten Zyklus zusätzlich Dexamethason (Tag -3 bis 6, 3 X 8 mg/d). Jeweils 24 h nach MTX-Gabe wird ein Leucovorin-*Rescue* mit 25 mg Folsäure alle 6 Stunden intravenös durchgeführt, solange bis der MTX-Spiegel im Serum unter 0,1 µM abgefallen ist. Die *WBRT* hat eine Intensität von 45 Gy in 1,5 Gy Fraktionen.

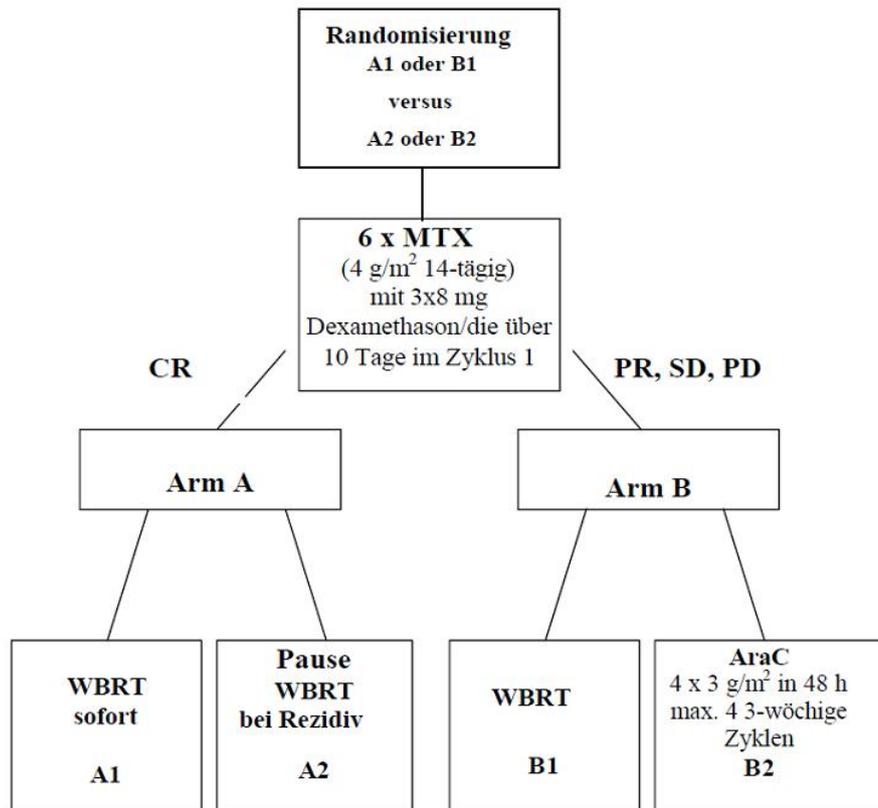


Abb. 2: Flussdiagramm der Studie

Die primären Endpunkte der Studie sind:

1. Die progressionsfreie Überlebenszeit mit sofortiger Bestrahlung gegenüber der Bestrahlung erst beim Auftreten eines Rezidivs oder beim Fortschreiten der Erkrankung und
2. die Remissionsrate unter Hochdosis-MTX mit Dexamethason und den Salvage-Therapien (Arme B1 und B2).

Das wichtigste Einschlusskriterium der Studie ist ein histologisch oder zytologisch/immunzytologisch gesichertes primäres Non-Hodgkin-Lymphom des ZNS ohne eine Manifestation außerhalb des zentralen Nervensystems. Weiterhin müssen die Patienten älter als 18 Jahre sein und es muss ein schriftliches Einverständnis vorliegen. Sie müssen eine negative HIV-Serologie vorweisen und dürfen unter keinen anderen aktiven Infektionen leiden. Zusätzlich dürfen sie zuvor nicht am Gehirn bestrahlt worden sein und das PCNSL darf außer mit Kortikosteroiden, Antiepileptika und Diuretika nicht behandelt worden sein.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Analyse der Genotypen aus genomischer DNA für folgende fünf Polymorphismen in Enzymen des Methotrexat-Stoffwechsels und –Transports erfolgen:

- a. Methylentetrahydrofolatreduktase C677T
- b. Methylentetrahydrofolatreduktase A1298C
- c. reduziertes Folat-Carrierprotein G80A
- d. Thymidylat-Synthase 28 bp *tandem/triplet repeat* in der 5'-*UTR*
- e. Thymidylat-Synthase 6 bp Deletion in der 3'-*UTR*.

Die Häufigkeiten der einzelnen Polymorphismen werden bei der Diagnose PCNSL im Vergleich zu in der Literatur beschriebenen gesunden Kontrollgruppen dokumentiert. Anhand der Genotypfrequenzen soll berechnet werden, ob ein bestimmter Genotyp für die Erkrankung prädisponiert. Zusätzlich sollen die Zusammenhänge der unter a. bis e. genannten Polymorphismen mit der in der G-PCNSL-SG1-Studie dokumentierten Toxizität der Hochdosis-MTX-Therapie und dem Ansprechen auf die Hochdosis-MTX-Therapie untersucht werden. Die Toxizität der MTX-Therapie wird mit Hilfe der WHO-Skala zur Bewertung von Nebenwirkungen in der Krebstherapie in den Graden 0 bis IV erfasst (WHO Handbook for reporting results of cancer treatment, No. 48 (1979), WHO Offset Publications, Geneva). Die tox. Nebenwirkungen werden in folgenden Kategorien in dieser Arbeit erfasst: Hämoglobin, Leukozyten, Granulozyten, Thrombozyten und die maximale nicht-hämatologische Nebenwirkung (siehe Anhang). Das Ansprechen wird an Hand des krankheitsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens gemessen.

Sollte es mit Hilfe dieser Untersuchungen gelingen nachzuweisen, dass durch das Vorliegen einer oder mehrerer Polymorphismen das Ansprechen oder die Nebenwirkungen auf die MTX-Therapie vorausgesagt werden kann, so wäre es zukünftig möglich individuelle Therapiekonzepte zu entwickeln.

2 Material

2.1 Geräte und Gebrauchsmaterialien

BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Falcon Röhrchen (50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Gel-Bad Horizon 11*14	GIBCO BRL (Invitrogen Corp.) Karlsruhe
Gel Casting System	GIBCO BRL (Invitrogen Corp.) Karlsruhe
Gel-Scanner Image Master	Pharmacia Biotech, Freiburg i. B.
Heraeus HERAsafe HSP 15 Sterilbank	Kendro Laboratory Products, Osterode
Kühlschränke:	
○ -20 °C	Liebherr, Ochsenhausen
○ +4 °C	Liebherr, Ochsenhausen
LightCycler und Zubehör:	
Computer: HP Vectra VL, Pentium II,	Hewlett Packard, USA
○ Microsoft Worksstation NT	Microsoft, USA
○ LightCycler Instrument 1.0	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
○ LightCycler Carousel Centrifuge	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
○ LightCycler Reaktionskapillaren	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
○ LC Software Version 3.5	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Mikrowelle	Robert Bosch GmbH, Gerlingen
Netzgerät GPS 200/400	Parmacia / LKB
PCR Gerät Gene Amp, PCR System 2400	Perkin Elmer, USA
Pipetten: 10/100/1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen (10/100/1000 µl)	Biozym, Hessisch Oldendorf

Photometer Küvetten UVette®	Eppendorf, Hamburg
Safe lock Cups (1,5/2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer 5437	Eppendorf, Hamburg
Waage	Sartorius, Göttingen
Wasserbad (56 °C)	Köttermann, Uetze/Hänigsen
Wippe RedRocker	Hofer Scientific Instruments, USA
Zentrifugen:	
○ Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
○ Heraeus Biofuge 13	Kendro Laboratory Products, Osterode
○ Heraeus Multifuge 3s	Kendro Laboratory Products, Osterode

2.2 Reagenzien

Agarose, A9539-250 G	Sigma, Deisenhofen
Agarose, high resolution, 9012-36-6, A-4718	Sigma, Deisenhofen
Ampuwa (H ₂ O)	Fresenius, Bad Homburg v.d.H.
DMSO (Dimethylsulfoxid) 99,5%	Sigma, Deisenhofen
Ethanol 100%	Merck, Darmstadt
GelStar® Nucleic Acid Gel Stain	
99,9% DMSO	Cambrex Bio Science Rockland
0,01 % Farbstoff	Inc., USA
Gel loading buffer	
65% (w/v) Sucrose	
10 mM Tris-HCl, pH 7,5	
10 mM EDTA	
0,3% (w/v) Bromphenol Blau	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Molekulargewichtsmarker (100 bp DNA Leiter)	
100 mM Tris-HCl, pH 7,5	
10 mM EDTA	
0,05% Bromphenol Blau	
5% Glycerol	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Primer und Sonden für den LightCycler	TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin
Primer für die konventionelle PCR	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
RCLB-Buffer 1000 ml	
Tris 10 mMol/l	
Magnesiumchlorid 6-Hydrat 0.5 mMol/l	
Natriumchlorid 10 mMol/l	
eingestellt mit 1M-HCl auf pH 7,6	
sterilfiltriert und sterilisiert	Universitätsapothek Tübingen
Restriktionsenzym <i>Dra I</i> (AAA/TTT) 10U/μl	
Storage Buffer:	
20 mM Tris-HCl	
100 mM NaCl	
0,1 mM EDTA	
10 mM 2-Mercaptoethanol	
0,1 mg/ml Albumin aus Rinderserum	
50% Glycerol (v/v)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
pH ca. 8,0 (4°C)	
SuRE/Cut Buffer M (10X):	
100 mM Tris-HCl	
500 mM NaCl	
100 mM MgCl ₂	
10 mM Dithioerythriol	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
pH 7,5 (37°C)	
TAE-Puffer (10X)	
0,4 M Tris-Acetat	
0,01 M EDTA	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.3 Verwendete Kits

QIAamp DNA Mini Kit (DNA-Extraktion)

Waschpuffer AW1 und AW2

Puffer AL

Proteinase K

Qiagen GmbH, Hilden

- PCR Master, Roche Diagnostics, Mannheim;
Mastermix für die konventionelle PCR:

Tab. 1: Inhalt PCR Master Mix Kit

PCR Master Mix (2X):	25 U Taq DNA Polymerase in 20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 3mM MgCl ₂ , Brij 35 0,01% (v/v), dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 0,4 mM), mit einem pH von 8,3 bei 20°C; insgesamt 500 µl
steriles Wasser	PCR grade, 1 ml

- LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes (Reaktionsgemisch mit Taq-Polymerase), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim:

Tab. 2: Zusammensetzung der LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes

LightCycler FastStart Enzyme	10 mM MgCl ₂ , dNTP-Mix (dUTP statt dTTP), FastStart Taq DNA Polymerase; insgesamt 64 µl
LightCycler FastStart Reaction Mix Hybridization Probes	
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	25 mM; 1 ml
H ₂ O (PCR grade)	1 ml

- Folgende Primer wurden verwendet:

Tab. 3: Sequenzen der PCR-Primer

MTHFR C677T	5' - aggccagcctctcctgactg
	5' - aggacgggtgcggtgagagtg
MTHFR C1298A	5' - cttggggagctgaaggactactac (vorwärts)
	5' - cactttgtgaccattccggtttg (rückwärts)
RFC G80A	5' - acgtggcctgagcaggat (vorwärts)
	5' - cctgctcccgcgtgaagt (rückwärts)
TS 28 bp repeats	5' - gtggctcctgcgtttcccc
	5' - ccaagcttggtccgagccggccacaggcatggcgcg
TS 6 bp Deletion	5' - caaatctgaggagctgagt
	5' - cagataagtggcagtacaga

- Im LightCycler wurden folgende Master Hybridization Probes (TIB Molbiol Syntheselabor GmbH, Berlin) verwendet:

Tab. 4: Sequenzen der Sonden für die Mutationsanalyse im LightCycler

MTHFR C677T	5' - cgggagccgatttcatca -- FL
	5' - LC Red640 - cgcagctttctttgaggctgaca -- PH
MTHFR C1298A	5' - ctcaaagacactttcttactggtc -- FL
	5' - LC Red640 - ctctccccccacatcttcagcag -- PH
RFC G80A	5' - aggcgcccaggacc -- FL
	5' - LC Red640 - agctcggggtcaggcccagggttc -- PH

2.4 Patienten, Untersuchungsmaterial, Studiendokumentation

Im Rahmen der „Phase IV-Studie zum Stellenwert der Ganzhirnbestrahlung in der Primärtherapie primärer ZNS-Lymphome mit Hochdosis-Methotrexat – G-PCNSL-SG-1“, durchgeführt von Prof. Dr. Thiel (Berlin), Dr. Korfel (Berlin), Prof. Dr. Weller (Tübingen) und Prof. Dr. Herrlinger (Tübingen), wurde nach Punkt 16.2.4 des Studienprotokolls 20 ml peripher-venöses EDTA-Blut zur HLA-Typisierung der Patienten vor MTX-Gabe asserviert. Daraus wurde zur HLA-Typisierung und zur Beantwortung der Fragestellungen dieser Arbeit humane DNA extrahiert.

Entsprechend dem Studienprotokoll wurde nach jedem der 6 initialen MTX-Zyklen anhand eines standardisierten Erfassungsbogen die toxischen Nebenwirkungen des Chemotherapeutikums anhand der WHO-Skala zur Graduierung akuter und subakuter Nebenwirkungen¹⁰⁹ in den Graden 0 – IV erfasst. In diesem Zusammenhang bedeutete „Grad 0“, dass der Patient keine Nebenwirkung, Grad I eine geringe, Grad II eine mäßige oder deutliche, Grad III eine starke oder ausgeprägte und Grad IV eine lebensbedrohliche Nebenwirkung erleiden musste. Diese Daten der Studiendokumentation aus der Studienzentrale in Berlin lagen zur Korrelation mit den Genotypen der Patienten vor.

Zur Analyse der Überlebenszeiten wurde sowohl der Zeitpunkt der letzten Nachuntersuchung, des Ausscheidens aus der Studie, eines eventuellen Todes und die Todesursache, soweit feststellbar, herangezogen. Die Nachuntersuchungen fanden im ersten Jahr alle 3 Monate, im zweiten Jahr alle 4 Monate und ab dem 3. Jahr halbjährlich statt. Im Rahmen dessen wurde eine Remissionsbeurteilung durchgeführt und die Patienten in die Gruppen: „komplette Remission“ (*CR*), „partielle Remission“ (*PR*), „progrediente Erkrankung“ (*PD*), „*stable disease*“ (*SD*) oder „Rezidiv“ eingeteilt.

Die Auswertungen dieser Arbeit basieren auf das *follow-up* vom November 2005.

3 Methoden

3.1 Beschreibung der verwendeten Methoden

3.1.1 DNA-Isolierung mit dem QIAGEN DNA Blood Mini Kit®

Zur Isolierung von humaner DNA wurden 5 - 10 ml peripher-venöses Blut, mit EDTA oder Citrat als Antikoagulans ungerinnbar gemacht, auf 40 ml mit RCLB in einem 50 ml Falcon-Tube® aufgefüllt. Der Puffer dient zur Lyse der kernlosen Erythrozyten, um die Ausbeute an gewonnener DNA zu erhöhen. Er verursacht durch seine Hypotonizität einen osmotischen Wassereinstrom durch die Zellmembran der Erythrozyten und bringt sie so zum Platzen, da die Erythrozyten auf einen hypotonen Schock wesentlich empfindlicher reagieren als die anderen im Blut enthaltenen Zellen. Daraufhin wurden die Proben zehn Minuten lang bei Raumtemperatur auf einer Wippe inkubiert und danach zehn Minuten lang bei 1600 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt, das zurückbleibende Pellet wurde resuspendiert und wiederum mit RCLB auf 40 ml aufgefüllt, zehn Minuten lang auf der Wippe inkubiert und mit 1600 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgekippt und der Bodensatz resuspendiert. Nun sind die Erythrozyten lysiert und Hämoglobin, welches die PCR inhibieren könnte beseitigt. Die Probe besteht jetzt nur noch aus mononukleären Zellen. 200 µl dieser Probe wurden nun mit 200 µl AL-Puffer und 20 µl Proteinase K versetzt, gevortext und für 20 bis 25 min bei 56°C im Wasserbad inkubiert. Die Proteinase K verdaut alle Restbestandteile (Membranen, Zellorganellen, Enzyme, etc.) der Zellen. Nach der Inkubation wurden 200 µl Ethanol (99%) hinzugefügt, gut gemischt und die Probe komplett auf die Elutionssäule überführt. Durch eine anschließende Zentrifugation von einer Minute bei 12000 U/min soll die DNA vollständig an die Silicagel-Membran binden. Das Filtrat wurde verworfen und die Säule auf ein neues Auffangbehältnis (2ml Tube) überführt. Nun folgten zwei Waschschriffe: Zuerst wurden 500 µl AW1-Puffer zugefügt und drei Minuten bei 12000 U/min zentrifugiert. Die Säule wurde auf ein neues 2 ml Tube überführt, das alte

wurde samt Filtrat verworfen. Als nächstes wurden 500 µl AW2-Puffer hinzugegeben und mit den gleichen Einstellungen zentrifugiert, das Tube erneut samt Filtrat verworfen und die Säule auf ein 1,5 ml Eppendorf-Cup überführt. Die Säule wurde nun zur Elution der an die Membran gebundenen DNA mit 200 µl destilliertem Wasser beladen und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde zwei Minuten lang bei 10000 U/min die im Wasser gelöste DNA ins Auffangbehältnis zentrifugiert.

3.1.2 Quantifikation der extrahierten DNA mit Hilfe von Spektralphotometrie

Die DNA-Konzentration einer Probe kann sehr leicht mit Hilfe eines Photometers gemessen werden. Doppelsträngige DNA absorbiert spektrales Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm. Die Proben werden im Photometer gegenüber einem Leerwert von 0 (Wasser) gemessen. Die Absorption von einer Einheit bei $\lambda=260$ nm entspricht dann 50 µg doppelsträngiger DNA pro ml Flüssigkeit. Zur Messung wird 100 µl einer 1:50-Verdünnung in eine UVette[®] eingesetzt; die Umrechnung in die Einheit µg/ml übernimmt das Gerät.

Parallel zur Absorption bei $\lambda=260$ nm (DNA) wird die Absorption bei der Wellenlänge $\lambda=280$ nm (Protein) gemessen. Aus beiden wird das Verhältnis gebildet ($A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$). Aus dem Wert des Verhältnisses von DNA/Protein lässt sich auf die Reinheit der extrahierten DNA schließen: ein Wert von 1,7 bis 1,9 bedeutet reine DNA. Andere Werte deuten auf eine Kontamination mit Protein, Phenol, etc. hin (Qiagen Bench Guide).

3.1.3 Restriktionsendonukleasen

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen können große DNA-Moleküle an spezifischen Sequenzen in kleinere Moleküle zerschnitten werden.

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, durch die sich Bakterien vor der DNA fremder Organismen schützen. Sie können spezifische DNA-Sequenzen erkennen und die DNA-Helix hier zerschneiden. Diese Schnittstellen sind häufig Palindrome. Als Palindrome werden in der Genetik kurze DNA-Sequenzen bezeichnet, die sowohl vorwärts als auch rückwärts gelesen die gleiche Basenabfolge haben.

Sind Basen in diesen Palindrom-Sequenzen mutiert, so kann das entsprechende Restriktionsenzym das DNA-Molekül nicht mehr an dieser Stelle schneiden. Dadurch entstehen Fragmente, die sich in der Länge von jenen unterscheiden, die keine Mutation aufweisen. Um einen Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP) in einem bestimmten Genabschnitt nachzuweisen, muss man diesen Abschnitt mittels PCR zuerst vervielfältigen. Die im anschließenden Enzymverdau entstandenen Produkte kann man dann mittels Agarose-Gel-Elektrophorese der Länge nach auftrennen und sichtbar machen.

3.1.4 Gel-Elektrophorese

Mit Hilfe der Gel-Elektrophorese können DNA-Stränge ihrer Größe nach aufgetrennt und mit Strängen bekannter Größe verglichen werden. Die DNA-Fragmente wandern durch eine Gelmatrix bestimmter Porengröße in einem elektrischen Feld.

Agarose-Gele werden für die Analyse von Molekülen mit einem Durchmesser größer als 10 nm verwendet. Agarose ist ein Polysaccharid und wird aus roten Meeralgen hergestellt. Agarose wird durch Aufkochen in Pufferlösung gelöst und geliert beim Abkühlen zu einer Matrix. Durch die Variation der Agarose-Konzentration können DNA-Fragmente der Größe 0,08 - 60 kb separiert werden. Je höher die Agarose-Konzentration ist, desto höher ist auch die Auflösungsfähigkeit des Gels. In einem 2%-igen Agarose-Gel können Fragmente mit einer Kettenlänge von 0,1 bis 2 kb aufgetrennt werden.

Die Wanderungsgeschwindigkeit, mit der sich DNA-Fragmente durch das Gel im elektrischen Feld bewegen, hängt von verschiedenen Bedingungen ab: Am wichtigsten ist die Größe der DNA (Teilchenradius r), aber auch die Pufferbedingungen, die Feldstärke E und die Agarose-Konzentration (Viskosität η) spielen eine Rolle. DNA ist (unter Pufferbedingungen) durch die Phosphatreste im Helixgerüst negativ geladen und wandert daher von der Kathode zur Anode. Je kleiner die Moleküle sind, desto höher ist ihre Wanderungsgeschwindigkeit und somit länger auch ihr Weg, den sie im Gel zurücklegen.

Zur Herstellung einer Gelmatrix wurden in einem Erlenmeyerkolben 2 g Agarose mit 10 ml 10x TAE-Puffer und 90 ml deionisiertem Wasser vermischt (2%-iges Gel) und in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Sobald das Agarosegemisch kochte, wurde es aus der Mikrowelle genommen und unter Rühren ein wenig abgekühlt, um dann 10 μ l Gel Star[®] einzufüllen. Gel Star bindet an DNA und fluoresziert unter UV-Licht. Dies dient zur Detektion der Banden bei der Auswertung nach der Elektrophorese. Wenn sich das noch flüssige Gel mit dem Gel Star[®] vermischt hatte, konnte man das Gel in die Gelkammer aus Plexiglas gießen und den Kamm einstecken, der als Platzhalter für die Taschen im festen Gel diente. Zum Gelieren stellte man das Gel für ca. 30 Minuten bei ungefähr 4°C in den Kühlschrank. Sobald das Gel fest war, konnte man es in das Puffer-Bad überführen, den Platzhalter entfernen, das Gel mit 1x TAE-Puffer überdecken und die Taschen befüllen.

Zur Herstellung eines 4%-igen hochauflösenden Gels wurde wie oben beschrieben verfahren, mit der einzigen Ausnahme, dass statt 2 g Standard-Agarose 4 g Spezial-Agarose (Sigma, A-4718) eingesetzt wurden.

Als Bezugssystem wurde die erste Tasche mit 5 μ l DNA-Ladder (Molekulargewichtsstandard) befüllt. Dies ist ein Gemisch aus verschiedenen DNA-Fragmenten, deren Länge bzw. Molekulargewicht bekannt war. Alle weiteren Taschen konnten nun mit den zu analysierenden Proben befüllt werden: Die geschah mit 10 μ l eines Gemisches aus 10 μ l DNA-Probe und 2,5 μ l Loading-Buffer[®]. Dies ist ein Farbstoff, der während der Elektrophorese markiert wie weit die Fragmente in der Gelmatrix gewandert sind. Anschließend

legte man solange eine Spannung von ca. 125 Volt an das Gelbad an, bis eine angemessene Auftrennung der Fragmente erreicht war.

Zur Darstellung der aufgetrennten Banden wurde das Gel mit UV-Licht bestrahlt. Der an die DNA gebundene Gel Star[®] brachte die Fragmente zum Fluoreszieren, die Banden wurden nun fotografiert und ausgewertet.

3.1.5 Funktionsweise des LightCyclers

Gegenüber der konventionellen PCR-Technik bietet der LightCycler folgenden entscheidenden Vorteil: Man kann die Amplifizierung in Echtzeit auf einem angeschlossenen Bildschirm mitverfolgen. Durch mitgeführte Standards ermöglicht dies sogar eine „online“ Quantifizierung der PCR-Produkte. Bei konventionellen Verfahren müssen immer wieder zu bestimmten Zeiten Aliquots aus den Reaktionsansätzen entnommen werden, und das entsprechende Produkt über eine Agarose-Gel-Elektrophorese oder Southern-Blotting nachgewiesen werden. Dies ist nicht nur zeitaufwendig, sondern auch arbeitsintensiv und birgt Fehlerquellen.

Die im LightCycler zu amplifizierende und zu detektierende DNA wird über sogenannte Hybridization Probes nachgewiesen. Dies sind kurze, für die entsprechende DNA-Sequenz synthetisierte, komplementäre Oligonukleotide. Die Sonde besteht aus zwei Teilen, dem Anker-Teil und der eigentlichen Detektionssonde. Diese werden zusätzlich in den PCR-Ansatz gegeben und binden spezifisch innerhalb der zu amplifizierenden Sequenz. Der erste Teil der Sonde ist am 3'-Ende (Fluorescein), der zweite Teil am 5'-Ende (LightCycler Red 640 oder Red 705) mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert.

Die Sonden binden räumlich sehr nahe beieinander auf dem synthetisierten DNA-Strang: Zwischen den Oligonukleotiden sollte maximal ein Abstand von 5 Basenpaaren bestehen. Nur so ist gewährleistet, dass die Fluoreszenz-Teile nahe genug beieinander liegen. Zur Detektion strahlt der LightCycler am Ende jeder Annealingphase mit Hilfe einer LED Licht einer bestimmten Wellenlänge in die Proben-Kapillare ein. Damit wird der Fluoreszenz-Farbstoff des Ankerteils

energetisch auf ein höheres Niveau gehoben und strahlt nun seinerseits diese Energie in Form von Licht mit einer größeren Wellenlänge (grün) ab. Dieses wiederum kann den Farbstoff des zweiten Sondenteils zur Fluoreszenz anregen. Dieser emittiert nun rotes Licht, das vom LightCycler gemessen werden kann. Dieser Energie-Transfer nennt sich FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer).

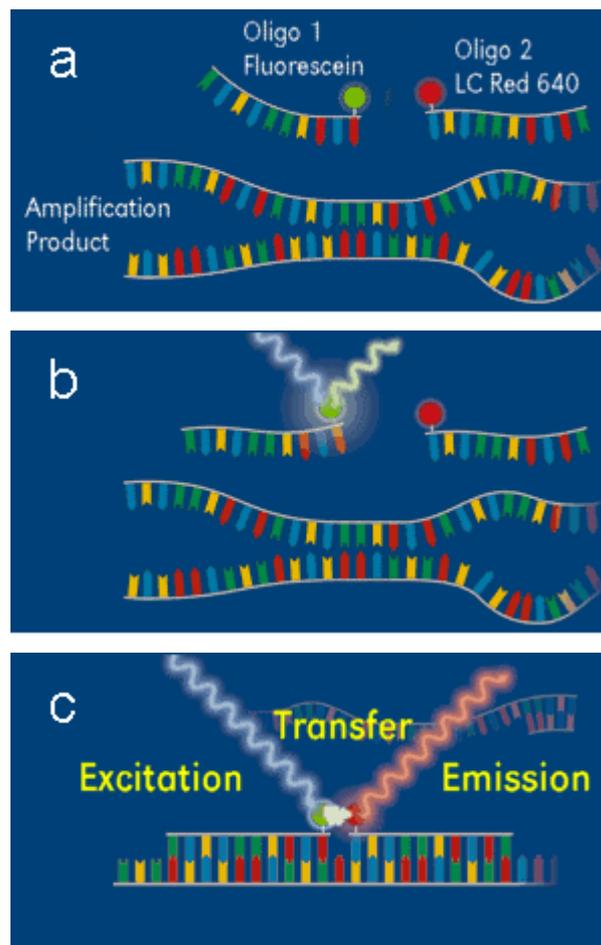


Abb. 3: Markierung der Sonden (a), DNA mit ungebundenen Sonden (b), FRET (c) ¹

Mit freundlicher Genehmigung durch Dr. M. Klose, Roche, Mannheim.

Nur wenn beide Sonden-Anteile auf die entsprechende DNA-Sequenz hybridisieren und die Farbmarkierungen benachbart liegen, kommt es zum FRET und der LightCycler kann die Intensität der abgestrahlten Fluoreszenz messen. Diese Fluoreszenz ist zur amplifizierten DNA-Menge proportional ¹.

3.1.6 Mutationsanalyse im LightCycler

Durch die Sequenz-spezifische Sonde hat die LightCycler-Technologie einen weiteren Vorteil: Man kann mit ihr ohne großen Aufwand Punktmutationen innerhalb des Amplifikates nachweisen. Die Sonden werden so synthetisiert, dass der Ort der Mutation unter der Detektionssonde zum liegen kommt. Die Sonde kann nun nicht mehr zu 100% an den DNA-Strang binden (siehe Abb. 4b).

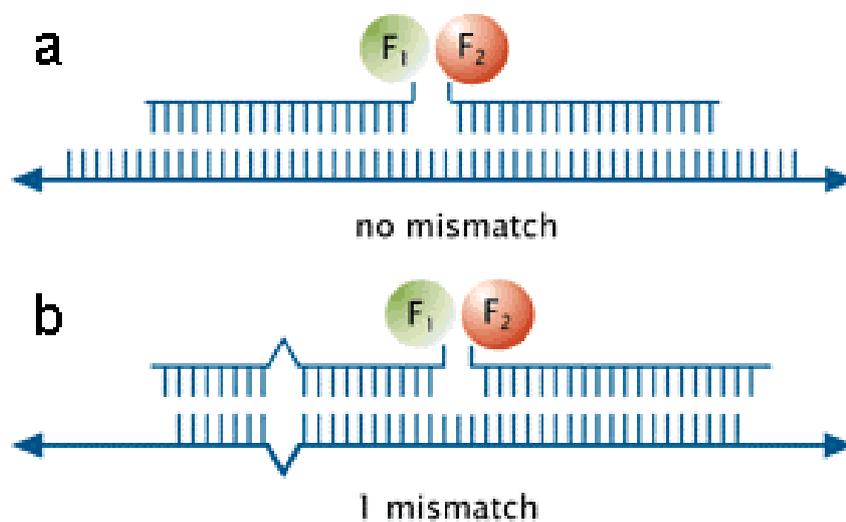


Abb. 4: DNA-Sequenz und Sonde ohne (a) und mit (b) mismatch¹

Mit freundlicher Genehmigung durch Dr. M. Klose, Roche, Mannheim.

Am Ende der Amplifikation beginnt der LightCycler mit einem speziellen Schmelzprogramm: Die Proben werden auf eine Temperatur von ca. 40°C heruntergekühlt. So ist gewährleistet, dass die Sonde an die amplifizierte DNA bindet. Die exakte Bindungstemperatur ist abhängig von der Annealing-Temperatur der Oligonukleotide und kann von Sonde zu Sonde variieren, liegt in jedem Fall aber über 40°C. Anschließend werden die Proben mit einem linearen Temperaturanstieg von 0,05°C - 0,5°C pro Sekunde (sog. *slope*) unter kontinuierlicher Messung der Fluoreszenz auf ca. 90°C erwärmt. Da am Anfang alle Sonden gebunden sind, ist das Fluoreszenz-Signal groß. Bei einer produktspezifischen Temperatur kommt es zum Fluoreszenzabfall. Dies

bedeutet, dass nun der Detektionsteil der Sonde vom Produkt abgeschmolzen wurde (im Weiteren als „Schmelzpunkt“ bezeichnet) und kein FRET mehr stattfindet. Im Falle einer Punktmutation kann, wie oben beschrieben, die Sonde nicht zu 100% binden. Dies äußert sich in einem früheren Abfall der Fluoreszenz.

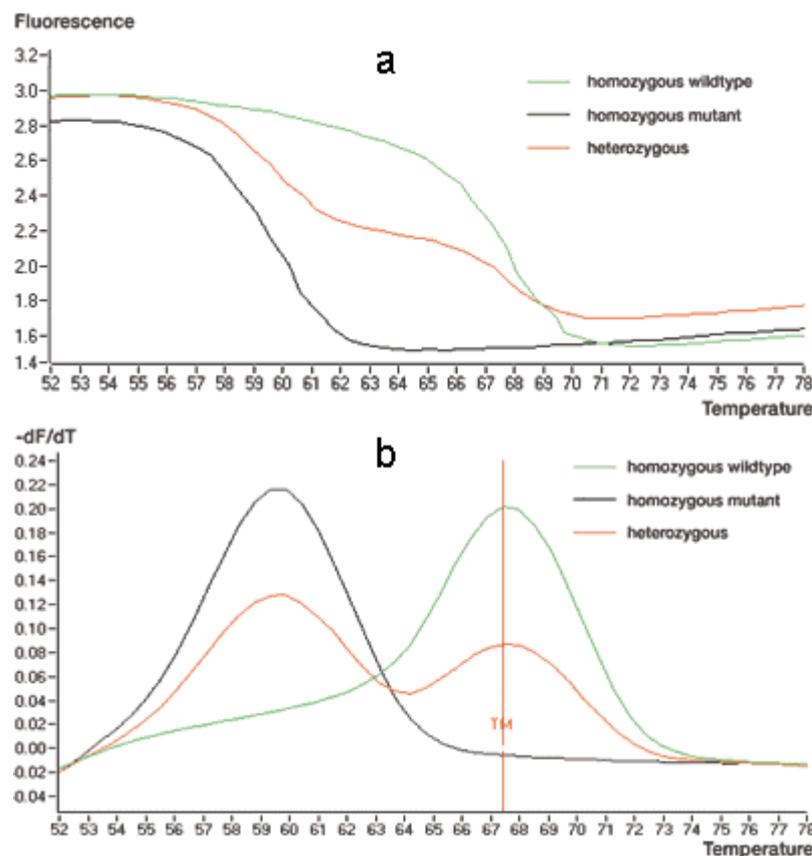


Abb. 5: Fluoreszenzkurve (a) und erste negative Ableitung (Schmelzkurve, b)

x-Achsen: Temp. in °C, y-Achsen: Fluoreszenz, bzw. erste negative Ableitung nach Temp. ¹

Mit freundlicher Genehmigung durch Dr. M. Klose, Roche, Mannheim.

Mit Hilfe des Analyseprogramms lassen sich sowohl die Fluoreszenzkurven mit den spezifischen Fluoreszenzabfällen als auch die Schmelzkurven darstellen (siehe Abb. 5). Um die spezifischen Schmelzpunkte besser kenntlich zu machen, bildet das Analyseprogramm die erste negative Ableitung nach der Temperatur der Fluoreszenzkurve. Alle Wendepunkte dieser Kurve werden entsprechend zu einem Maximum oder Minimum transformiert. Die Maxima stellen die Genotyp-spezifischen Schmelzpunkte dar. Die homozygoten

Genotypen zeigen je ein Maximum bei spezifischen Temperaturen für den Wildtyp oder die Mutante. Der heterozygote Genotyp zeigt eine charakteristische Kurve mit zwei Maxima, da das PCR-Amplifikat zu gleichen Teilen DNA des Wildtyps und der Mutation enthält. Es kommt daher beim Schmelzen der Produkte zu einem zweizeitigen Abfall der Fluoreszenz.

Durch eine Variation der oben erwähnten *slope* kann ein verändertes Bild der Schmelzkurve erzielt werden. Je niedriger der Temperaturanstieg pro Sekunde ist, desto genauer wird der Verlauf der Fluoreszenzmessung abgebildet. Häufig wird bei einer zu niedrigen Wahl zu viel „Hintergrundrauschen“ miterfasst, so dass es im Zuge der Auswertung unmöglich wird die relevanten *peaks* der Kurve zu unterscheiden.

Im Gegensatz hierzu, wird bei einer zu hohen Temperatureinstellung nur noch ein großer und breiter *peak* ausgegeben. Das Gerät kann nicht mehr den wichtigen zwischenzeitlichen Fluoreszenzabfall bei einem heterozygoten Genotyp registrieren.

Durch mehrmaliges Schmelzen der gleichen Kapillaren kann mit verschiedenen *slope*-Temperatur-Einstellungen in einem Testlauf ein optimales Ergebnis erzielt werden. Die *peaks* dürfen nicht zu breit sein und die Kurve darf nicht von zu großem Hintergrundrauschen überlagert sein. Die optimalen Einstellungen aus dem Testlauf können dann in das Experiment übernommen werden.

3.2 Durchführung der Experimente

3.2.1 Experimente mit dem LightCycler

Die Reaktion fand in Glaskapillaren statt, die ein Volumen von 20 μ l aufnehmen konnten. Die Kapillaren wurden in einem Kühlblock vorbereitet; 2 μ l zu analysierende DNA und 8 μ l Wasser (steril, PCR grade) wurden vorgelegt. Ebenso wurde eine Negativ-Kontrolle mit 10 μ l Wasser vorbereitet.

Das LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes Reaktionsgemisch (im folgenden Mastermix genannt) musste unter keimarmen Bedingungen

(Mundschutz, sterile Handschuhe, Kleidungsüberwurf) unter einer Sterilbank pipettiert werden. Der Mastermix bestand aus Primern, Detektionssonden und aus dem „LC FastStart DNA Master Hybridizations Probes Kit“, der Taq-Polymerase, $MgCl_2$, H_2O und dNTPs enthielt. Die Taq-Polymerase enthielt bereits eine Konzentration von 10 mM $MgCl_2$, auf die gewünschte Endkonzentration wurde mit der 25 mM $MgCl_2$ -Stammlösung eingestellt. Bei dem verwendeten Enzym handelt es sich um eine sogenannte „hot start“-Polymerase, bei der das Reaktionszentrum durch einen Inhibitor blockiert ist. Dieser schmilzt durch eine Vorinkubation bei 95°C ab. Somit wird eine unspezifische Amplifikation vor Beginn der PCR vermieden.

Mit dem Mastermix wurden die Kapillaren auf 20 µl aufgefüllt. Sie wurden mit einem Plastikstopfen verschlossen, ins LightCycler-Karussell eingesetzt und die Reaktionsmischung mit Hilfe der LightCycler Carousel Centrifuge herunterzentrifugiert. Anschließend wurden die Kapillaren im Karussell in den LightCycler überführt, das Gerät geschlossen und das jeweilige Programm gestartet.

3.2.1.1 Analyse einer Punktmutation im Gen der Methylentetrahydrofolatreduktase an der Basenposition 677, Cytosin → Thymin

- Der Mastermix für einen Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Tab. 5: Mastermix für MTHFR C677T

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
Primer 1 (5 μ M)	1,0 μ l	0,25 μ M
Primer 2 (5 μ M)	1,0 μ l	0,25 μ M
Sonde 1 (4,5 μ M)	1,5 μ l	0,3375 μ M
Sonde 2 (4,5 μ M)	1,5 μ l	0,3375 μ M
MgCl ₂ (25 mM)	2,4 μ l	4 mM
H ₂ O (PCR grade)	0,6 μ l	-
Taq-Polymerase (10 X)	2,0 μ l	1 X

- Die PCR wurde im LightCycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Tab. 6: Programmeinstellung MTHFR C677T

Dauer	Temp.	Vorgang	Zyklen
9 min	95°C	Vorinkubation	
9 sec	95°C	Strangauftrennung	45
15 sec	54°C	Annealingphase der Primer	
25 sec	72°C	Elongation	
20 sec	95°C	Schmelzkurvenanalyse <i>slope: 0,2°C/sec</i>	
20 sec	40°C		
0 sec	95°C		
3 min	40°C	Kühlung des Gerätes	

Die Sonden zur Analyse der Punktmutation in der MTHFR an der Basenposition 677 waren wildtypspezifisch. Dies bedeutet, dass die Sonden bei Patienten, die keine Mutation an der Basenposition 677 aufweisen, also das Wildtyp-Allel besitzen, zu 100% an ihre Zielsequenz binden können. Bei Patienten die eine Mutation in der Zielsequenz haben, kommt eine komplementäre Basenpaarbindung nicht zustande, die Sonde kann nicht so stabil an ihre

Zielsequenz binden. Die Sonde löst sich daher bei niedrigeren Schmelztemperaturen und es wird ein früherer Fluoreszenzabfall detektiert. Heterozygote Patienten weisen sowohl den Schmelzpunkt der Mutation, als auch den des Wildtyps auf.

3.2.1.2 Analyse der Punktmutation im Gen der Methylentetrahydrofolatreduktase an der Basenposition 1298, Adenosin → Cytosin

Beim Versuch der Etablierung des Assays zur Analyse der Punktmutation an der Basenposition 1298 in der Methylentetrahydrofolatreduktase stellte sich das Problem dar, dass ein ausgeprägter *hook*-Effekt auftrat. Im Quantifikationsfenster der LightCycler Data Analysis Software ließ sich dies am Fehlen der Plateau-Phase gegen Ende der Amplifikation erkennen. Normalerweise folgt auf die Log-Phase eine Plateau-Phase, beim *hook*-Effekt folgt der Log-Phase ein *peak* mit anschließendem Abfall der Fluoreszenz (siehe Abb. 6).

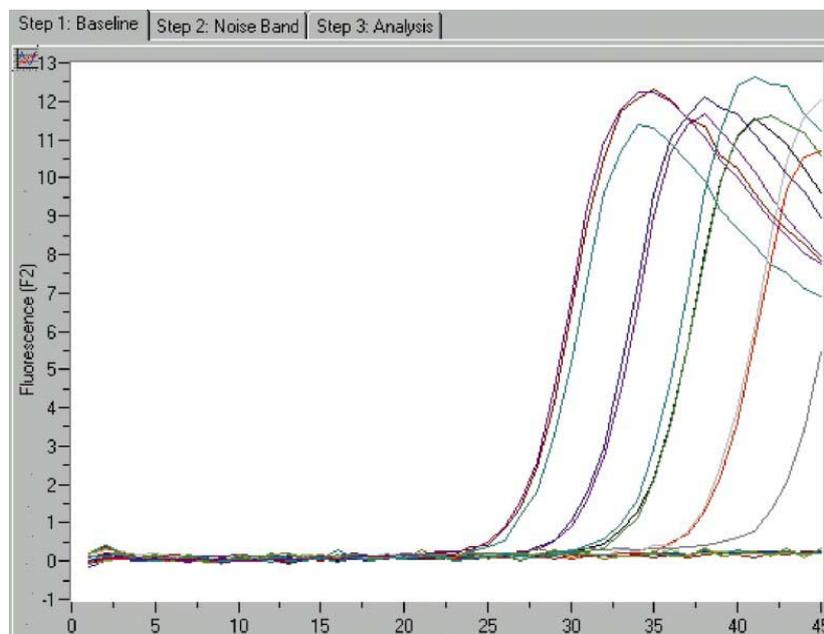


Abb. 6: hook-Effekt, x-Achse: Anzahl der PCR-Zyklen, y-Achse: Fluoreszenz (F2) ¹

Mit freundlicher Genehmigung durch Dr. M. Klose, Roche, Mannheim.

Der *hook*-Effekt ist ein Detektionsphänomen. Er wird durch das konkurrierende Bindungsverhalten der Einzelstränge und der Sonden mit ihrer Zielsequenz verursacht. Die PCR vervielfältigt beide Stränge der Ziel-DNA. Wenn nun am Ende der PCR-Phase die Produktmenge hoch ist, lagern sich die Einzelstränge schneller wieder zusammen als die Sonden an ihre Zielstruktur binden können. Es kommt zum *hook*-Effekt.

Der *hook*-Effekt hat keinen Einfluss auf die Quantifikation, jedoch auf die Schmelzkurvenanalyse. Dieser Effekt tritt besonders bei hohen Magnesiumchlorid-Konzentrationen und bei hohen Anfangskonzentrationen an Proben-DNA auf. Hier ist es sehr schwer nur durch Veränderung der *slope*-Temperatur eine optimale Schmelzkurve zu erhalten, daher muss zuerst die Magnesiumchlorid-Konzentration gesenkt werden. Durch einen Titrationslauf mit verschiedenen $MgCl_2$ -Konzentrationen kann die optimale Einstellung erreicht werden. Eine Magnesiumchlorid-Konzentration von 2,5 mM hatte sich als beste Einstellung erwiesen.

Die Zahl der Amplifikationszyklen sollte ebenfalls soweit gesenkt werden, dass die Schmelzkurvenanalyse noch in der Log-Phase beginnt, da hier der *hook*-Effekt noch keine Rolle spielt.

Der nächste Schritt in der Optimierung der Schmelzkurvenanalyse stellt eine sogenannte asymmetrische PCR dar. Durch unterschiedliche Konzentrationen der Primer im Mastermix werden während des PCR-Vorganges unterschiedliche Mengen der jeweiligen Stränge synthetisiert. Gibt man nun den Primer, der am nicht Sonden-bindenden Strang bindet, in einer höheren Konzentration hinzu, so wird dieser Strang in der absoluten Menge weniger synthetisiert. Absolut steht somit mehr des Stranges zur Verfügung, der die Sonden bindet; der *hook*-Effekt fällt geringer aus.

Lässt sich auch durch eine asymmetrische PCR nicht der gewünschte Erfolg erzielen muss eine Verdünnungsreihe der Proben-DNA in Zehnerpotenzen erstellt werden, da bei geringerer Menge der DNA zu Beginn der PCR der *hook*-Effekt geringer ausfällt.

- Aus vorhergehenden Versuchen ergaben sich folgende Konzentrationen für den Mastermix:

Tab. 7: Mastermix für MTHFR A1298C (einfacher Ansatz)

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
Primer 1, rückwärts (5 µM)	2,0 µl	0,5 µM
Primer 2, vorwärts (5 µM)	0,4 µl	0,1 µM
Sonde 1 (4,5 µM)	1,5 µl	0,3375 µM
Sonde 2 (4,5 µM)	1,5 µl	0,3375 µM
MgCl ₂ (25 mM)	1,2 µl	2,5 mM
H ₂ O (PCR grade)	1,4 µl	-
Taq-Polymerase (10 X)	2,0 µl	1 X

- Programmierung des LightCycler:

Tab. 8: Programmeinstellung MTHFR A1298C

Dauer	Temp.	Vorgang	Zyklen
10 min	95°C	Vorinkubation	
5 sec	94°C	Strangauftrennung	40
10 sec	60°C	Annealingphase der Primer	
6 sec	72°C	Elongation	
30 sec	72°C	Schmelzkurvenanalyse <i>slope: 0,1°C/sec</i>	
20 sec	95°C		
30 sec	40°C		
0 sec	85°C		
30 sec	30°C	Kühlung	

Die Sonden zur Analyse der Mutation MTHFR C1298A waren mutationsspezifisch, d.h. die Sonden banden zu 100% an die mutierte Zielsequenz.

3.2.1.3 Analyse einer Punktmutation im Gen des reduzierten Folat-Transporters an der Basenposition 80; Guanodin → Adenosin

- Zusammensetzung des Mastermix:

Tab. 9: Mastermix für RFC G80A (einfacher Ansatz)

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
Primer 1, vorwärts (5 µM)	1,5 µl	0,375 µM
Primer 2, rückwärts (5 µM)	0,5 µl	0,125 µM
Sonde 1 (3 µM)	1,0 µl	0,15 µM
Sonde 2 (3 µM)	1,0 µl	0,15 µM
MgCl ₂ (25 mM)	1,2 µl	2,5 mM
H ₂ O (PCR grade)	2,8 µl	-
Taq-Polymerase (10 X)	2,0 µl	1 X

- Programmierung des LightCyclers:

Tab. 10: Programmeinstellung RFC G80A

Dauer	Temp.	Vorgang	Zyklen
10 min	95°C	Vorinkubation	
5 sec	95°C	Strangauftrennung	40
10 sec	60°C	Annealingphase der Primer	
5 sec	72°C	Elongation	
20 sec	95°C	Schmelzkurvenanalyse <i>slope: 0,2°C/sec</i>	
120 sec	40°C		
0 sec	90°C		
30 sec	30°C	Kühlung	

3.2.2 Nachweis des 28 bp *tandem/triplet repeat* in der 5'-Promotor-Region der Thymidylat-Synthase

Zum Nachweis des 28 bp *tandem/triplet repeat* wurde eine konventionelle PCR mit dem PCR-Cycler „GeneAmp 2400“ von Perkin Elmer durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden anschließend in einem 4%-igen hochauflösenden Agarose-Gel aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht.

- Die PCR lief unter folgenden Bedingungen ab:

Tab. 11: PCR-Bedingungen für 28 bp *tandem/triplet repeat* in der TS

Dauer	Temp.	Vorgang	Zyklen
5 min	95°C	Vorinkubation	
1 min	94°C	Denaturierung	30
1 min	60°C	Annealing	
2 min	72°C	Elongation	
5 min	72°C	Nachinkubation	
Abkühlen und Lagerung bei 4°C			

- Der Mastermix für die PCR setzte sich folgendermaßen zusammen:

Tab. 12: Mastermix für 28 bp *tandem/triplet repeat* in der TS (einfacher Ansatz)

Reagenz	Volumen	Endkonzentration in 50 µl
PCR Master Mix (2X)	25 µl	1X
Primer HTS 1, 1:10 (7,03 pmol/µl)	1 µl	0,1406 pmol
Primer HTS 2 N, 1:10 (1,25 pmol/µl)	1 µl	0,025 pmol
DMSO 99,5%	5 µl	-
H ₂ O (PCR grade)	8 µl	-

Der Mastermix wurde zu 10 µl DNA hinzugegeben, die ebenfalls 1:10 verdünnt war, somit ergab sich ein Reaktionsvolumen von 50 µl. Sowohl die Primer als auch die Proben-DNA waren mit sterilem Wasser (PCR grade) verdünnt. Erst durch die Zugabe von 10% DMSO (99,5%) zum Mastermix konnten spezifische Banden erzeugt werden.

3.2.3 Nachweis der 6 bp Deletion in der 3'-UTR der Thymidylat-Synthase

- Die PCR lief unter folgenden Bedingungen ab:

Tab. 13: PCR-Bedingungen für 6 bp Deletion in der 3'-UTR der TS

Dauer	Temp.	Vorgang	Zyklen
5 min	94°C	Vorinkubation	
30 sec	94°C	Denaturierung	30
45 sec	58°C	Annealing	
45 sec	72°C	Elongation	
5 min	72°C	Nachinkubation	
Abkühlen und Lagerung bei 4°C			

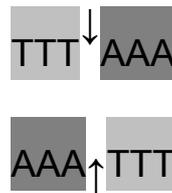
- Zusammensetzung des Mastermix:

Tab. 14: Mastermix für die 6 bp Deletion in der 3'-UTR der TS (einfacher Ansatz)

Reagenz	Volumen	Endkonzentration in 50 µl
PCR Master Mix (2X)	25 µl	1X
Primer TS 1, 1:10 (7,48 pmol/µl)	1 µl	0,1946 pmol
Primer TS 2 N, 1:10 (4,72 pmol/µl)	1 µl	0,0944 pmol
H ₂ O (PCR grade)	13 µl	-

Der Mastermix wurde zu 10 µl Proben-DNA, die 1:10 mit Wasser verdünnt war, hinzugegeben. Somit ergab sich ein Reaktionsvolumen von 50 µl.

Sind die 6 Basenpaare im PCR-Produkt nicht deletiert entsteht eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Dra* I. Dieses Enzym stammt aus dem Bakterium *Deinococcus radiophilus* und schneidet die folgende Sequenz an der durch Pfeile markierten Stelle:



Der Enzymverdau fand unter folgenden Bedingungen statt: 4 µl der amplifizierten DNA (Endkonzentration im Ansatz ca. 1-2 µg/25 µl) wurden mit 21 µl von folgendem Mastermix 2 Stunden lang bei 37°C in einem Thermoblock inkubiert:

Tab. 15: Mastermix für den Restriktionsenzymverdau mit *Dra* I

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
Restriktionsenzym <i>Dra</i> I	0,1 µl	1 U
SuRE/Cut Buffer M (10X)	2,5 µl	-
Wasser	18,4 µl	-

Nach dem Enzymverdau wurden 20 µl mit 5 µl Gel *loading buffer* gemischt und in einem 2%-igen hoch auflösenden Agarose-Gel aufgetrennt. Es wurde das doppelte Probenvolumen in ein dickeres Gel (150 ml Puffer und 3 g Agarose) eingesetzt um mehr DNA im Gel auftrennen zu können. So konnte unter UV-Licht eine stärkere Fluoreszenz der Banden erreicht werden.

3.3 Statistische Berechnungen

Die Überlebenszeitanalysen in dieser Arbeit wurden mit der Kaplan-Meier Methode erstellt, da nicht für alle Patienten identische Beobachtungszeiträume vorlagen. Das Entscheidende dieser Methode ist, dass die Ereignisse die Beobachtungsintervalle definieren, und dass diese Intervalle zeitlich variabel sind. Ein neues Intervall wird durch den Tod eines Patienten vorgegeben. Für jedes Intervall wird die bedingte Wahrscheinlichkeit berechnet, dass der Patient das Zeitintervall überlebt. Aus dem Produkt dieser bedingten Wahrscheinlichkeiten errechnet sich die Gesamtwahrscheinlichkeit einen bestimmten Zeitpunkt zu überleben. Die Kaplan-Meier Methode ist hilfreich beim Ablesen von spezifischen Überlebensraten und -zeiten ¹³⁹.

Für Gruppenvergleiche in der Überlebenszeitanalyse ist der Log-Rank-Test das Standardverfahren. Mit diesem nichtparametrischen Test lässt sich statistisch überprüfen, ob das Mortalitätsrisiko in zwei oder mehr Gruppen verschieden ist. Wenn die Ereignisraten in den Gruppen proportional sind, hat der Log-Rank-Test die größte *Power* einen vorhandenen Unterschied zu entdecken, da er alle Ereignisse über den gesamten Verlauf gleich wertet ¹⁴⁰.

Wie die Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse ist auch die Cox-Regression eine Methode zum Modellieren von Daten, welche in Gegenwart zensierter Fälle die Zeit bis zum Eintreten des Ereignisses angeben. Sie wird verwendet, wenn der Effekt mehrerer Einflussvariablen auf eine Zielvariable (Überlebenszeit) gleichzeitig untersucht werden soll. Dazu wird eine *Hazard*-Funktion in Abhängigkeit der Einflussvariablen betrachtet. Gleichzeitig wird für die anderen Variablen des Modells adjustiert. Mit Hilfe der Regressionskoeffizienten lassen sich dann adjustierte *hazard ratios* als Maß für die Stärke des Zusammenhangs berechnen ¹⁴¹.

Die Analysen zur Toxizität wurden auf verschiedene Arten durchgeführt, da die Daten unterschiedlich skaliert waren. Es lagen sowohl nominale, ordinale als auch quantitative Daten vor. Die statistischen Test mussten daher an das vorliegende Skalenniveau angeglichen werden. Für Tests, in denen nominale oder ordinale Daten analysiert wurden, wurden $r \times c$ Kontingenztabellen (KT)

gebildet. Für jede einzelne Zelle der Tabelle wurden die Häufigkeiten mit Hilfe der Spalten- und Zeilensummen berechnet. Der anschließende *likelihood ratio* χ^2 Test zeigte, ob signifikante Unterschiede in den Häufigkeitsverteilungen in der Kontingenztabelle vorlagen. 2×2 Kontingenztabelle wurden zusätzlich mit einem zweiseitigen *Fisher's Exact Test* überprüft.

Die Betrachtung einer KT wird durch die Korrespondenzanalyse (KA) vereinfacht. Die KA ist eine graphische Technik um ähnliche Verteilungsmuster in den Spalten und Zeilen einer Häufigkeitstabelle sichtbar zu machen. Jeder Spalte und Zeile wird ein Punkt zugewiesen. Zeigen Spalten oder Zeilen ähnliche Profile, so liegen ihre Punkte in der Korrespondenzanalyse nahe beieinander.

Für Daten aus unabhängigen Stichproben, die ordinal oder quantitativ skaliert waren, wurde der *Wilcoxon* Rangsummentest (für 2 Gruppen auf der x-Achse) oder der *Kruskal-Wallis*-Test (bei mehr als 2 Gruppen) durchgeführt. Bei 3 Gruppen wurde ein *oneway*-Test mit einer χ^2 -Verteilung angewandt, bei 2 Gruppen wurde zusätzlich durch einen *2-sample* Test mit einer Normal-Verteilung getestet. Wenn möglich wurde anschließend noch ein *Student's t* Test zum paarweisen Vergleich der Durchschnitte durchgeführt.

Alle Analysen wurden mit JMP 5.1 erstellt.

Bei dieser Arbeit wurde die methodische Beratung des Instituts für Medizinische Biometrie der Universität Tübingen in Anspruch genommen.

In dieser Arbeit wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit 1. Art auf $\alpha=0,05$ (tolerierbares Signifikanzniveau) festgelegt. Dies entspricht 5% Irrtumswahrscheinlichkeit bei 95% Sicherheit.

4 Ergebnisse

4.1 Auswertung der molekularbiologischen Experimente

4.1.1 Experimente im LightCycler

4.1.1.1 SNP MTHFR C677T

Für die Analyse des SNP MTHFR C677T wurde eine wildtypspezifische Sonde eingesetzt.

Patienten mit dem TT-Genotyp konnte ein Schmelzpunkt von ca. 53,6°C und dem CC-Genotyp von ca. 62,2°C zugeordnet werden (siehe Abb. 7). Die Temperaturdifferenz der beiden Maxima betrug ca. 8,6°C. Die Kurven heterozygoter Patienten (MTHFR 677CT) wiesen beide Maxima auf.

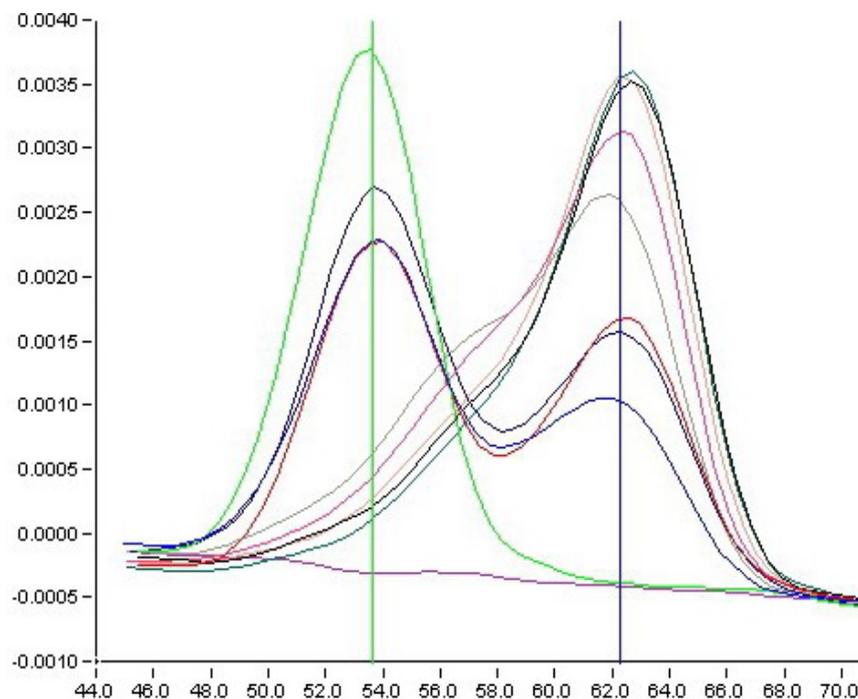


Abb. 7: Schmelzkurvenanalyse des SNP MTHFR C677T,
exemplarisch von 9 Patienten (1 Patient homozygot TT, 3 heterozygot CT, 5 homozygot CC).
x-Achse: Temperatur in °C, y-Achse: Fluoreszenz $-d(F2/F1)/dT$, grüner Zeiger: ca. 53,6°C
(Mutation), blauer Zeiger: ca. 62,2°C (Wildtyp)

4.1.1.2 SNP MTHFR A1298C

Im Falle des SNP MTHFR A1298C wurden mutationsspezifische Sonden eingesetzt. Dies bedeutet, dass das erste Temperaturmaximum der Schmelzkurve (bei ca. 57,6°C) dem Wildtyp, das zweite Maximum (bei ca. 63,5°C) der Mutation entsprach. Die Temperaturdifferenz der beiden Maxima betrug ca. 5,9°C. Eine Kurve mit beiden Maxima zeigte der heterozygote Genotyp, d.h. MTHFR 1298CA.

4.1.1.3 SNP RFC G80A

Zur Analyse dieser Punktmutation wurden wildtypspezifische Sonden verwendet: Das erste Maximum bei ca. 56,9°C entsprach der homozygoten Mutation (RFC 80AA). Das zweite Maximum bei ca. 68,9°C entsprach dem Wildtyp (RFC 80GG). Die Temperaturdifferenz der beiden Maxima betrug ca. 12°C. Das Auftreten beider Maxima bedeutete auch hier wieder, dass der Patient einen heterozygoten Genotyp besaß, d.h. RFC 80GA.

4.1.2 Analyse des TS 28 bp *tandem/triplet repeat*

Nach dem Auftrennen der PCR-Produkte mit Hilfe eines Agarose-Gels konnten Banden verschiedener Länge den 2-, 3- und 4-fachen Wiederholungen der 28 bp langen Sequenz zugeordnet werden.

Tab. 16: Zuordnung der Fragmentlänge zum Alleltyp des 28 bp *tandem/triplet repeat* der TS (2R \triangleq zweifach, 3R \triangleq dreifach, 4R \triangleq vierfach, bp \triangleq Basenpaare)

Fragmentlänge	Anzahl der Wiederholung (R) / Allel
212 bp	2R
240 bp	3R
268 bp	4R

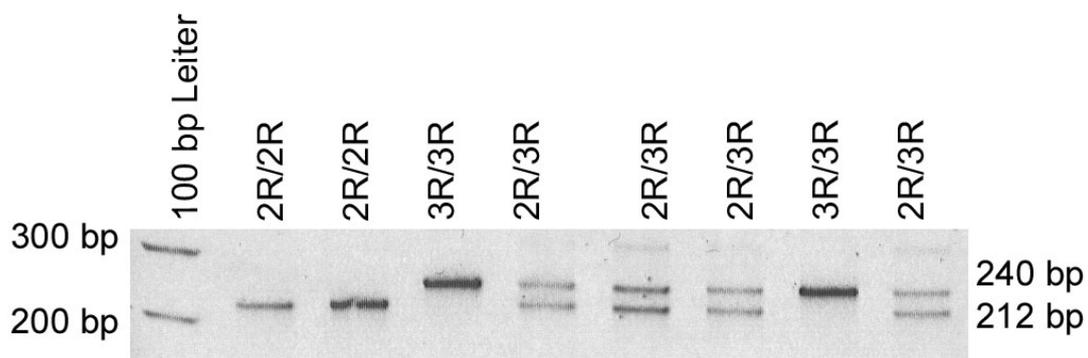


Abb. 8: Auftrennung der 212/240/268 bp langen Fragmente im Agarose-Gel.

links: 100 bp Molekulargewichtsmarker, rechts: Länge der Fragmente, oben: Genotyp bzw. Anzahl der Wiederholungen (tandem/triplet; R), heterozygoter Mutationsstatus: Bande 5, 6, 7, 9

4.1.3 RFLP in der TS: Nachweis der 6 bp Deletion

Zum Nachweis der 6 bp langen Deletion in der 3'-UTR der Thymidylat-Synthase wurde mit dem PCR-Produkt ein Restriktionsenzym-Verdau durchgeführt: Lag die Deletion nicht vor, so ergab sich für das Enzym *Dra* I eine Schnittstelle; es entstanden Fragmente mit 70 bp und 88 bp Länge.

Tab. 17: Zuordnung der Fragmente des RFLP zum Genotyp der 6 bp Deletion in der 3'-UTR der TS

(- \triangle Vorliegen der Deletion, + \triangle Fehlen der Deletion, bp \triangle Basenpaare)

Genotyp	Fragmentgröße			
	70 bp	88 bp	152 bp	evtl. 158 bp
+6 bp / +6 bp	70 bp	88 bp	-	evtl. 158 bp
+6 bp / -6 bp	70 bp	88 bp	152 bp	evtl. 158 bp
-6 bp / -6 bp	-	-	152 bp	-

Das Fragment der Größe 158 bp entstand durch einen nicht vollständigen Aufschluss der Proben-DNA durch das Restriktionsenzym. Das Fragment der Länge 70 bp wurde im Gel nicht aufgetrennt. Das Fragment mit der Deletion wies die Schnittstelle nicht auf und hatte somit eine Länge 152 bp. Durch die Auftrennung der Fragmente der Größe 88 bp und 152 bp ließ sich der Genotyp jedoch verlässlich bestimmen.

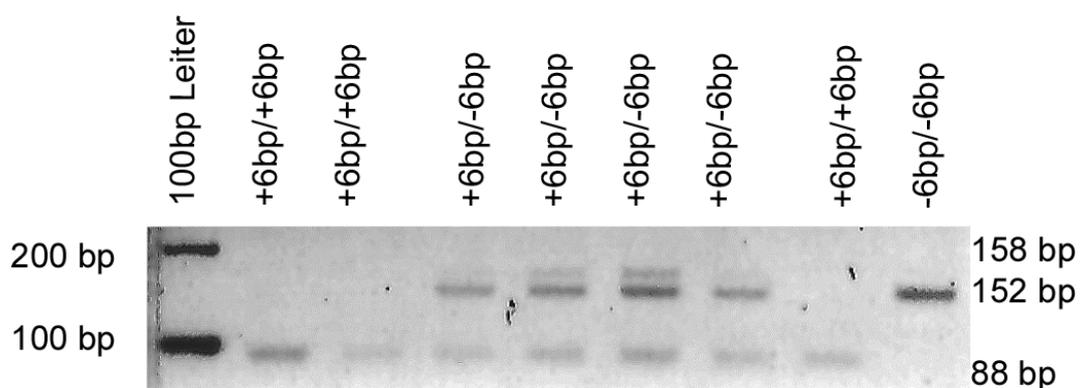


Abb. 9: RFLP-Analyse der 88/152/158 bp langen PCR-Produkte nach *Dra*I Verdau.

links: 100 bp Molekulargewichtsmarkern, rechts: Größe der DNA-Fragmente,

oben: Zuordnung Bande - Genotyp

4.2 Epidemiologie

4.2.1 Beobachtete und erwartete Allelfrequenzen nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Für jeden der fünf untersuchten Polymorphismen erfolgte eine Aufstellung über die Anzahl, den prozentualen Anteil der jeweiligen Genotypen und die Häufigkeit der jeweiligen Allele. Daraus wurde mit Hilfe der Summe der Anzahl beider Allele (A und a) die Allelfrequenz (q) für das mutierte Allel (a) nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Anzahl (a)} / (\text{Anzahl (A)} + \text{Anzahl (a)}) = \text{Allelfrequenz (q)}$$

(A: Wildtyp-Allel, a: mutiertes Allel, q: Allelfrequenz des mutierten Allels)

Zusätzlich wurde die Verteilung, sowie die Anzahl der jeweiligen Genotypen, die nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht zu erwarten wäre, berechnet (Spalte 7 und 8 in Tabelle 18):

$$p^2 + 2pq + q^2 \text{ und } p + q = 1$$

(p: Allelfrequenz des Wildtyp-Allels, q: Allelfrequenz des mutierten Allels)

Tab. 18: Auswertung der Anzahl der beobachteten und erwarteten Genotypen nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. (n \triangleq Anzahl, KI \triangleq Konfidenzintervall, 2R \triangleq zweifach, 3R \triangleq dreifach, [‡] Aufgrund der Rundung erreicht die Summe der Werte nicht genau 100% bzw. 150 Patienten.)

MTHFR C677T							
Genotyp	n	%	Anzahl Allel		Allelfrequenz T (95% KI)	erwartet	
			C	T		% Genotyp	n
CC	68	44,44	136	0	0,35 (0,30 - 0,41)	42,29	64,71
CT	63	41,18	63	63		45,48	69,58
TT	22	14,38	0	44		12,23	18,71
gesamt	153	100	199	107		100	153

MTHFR A1298C							
Genotyp	n	%	Anzahl Allel		Allelfrequenz C (95% KI)	erwartet	
			A	C		% Genotyp	n
AA	54	35,29	108	0	0,39 (0,33 - 0,44)	37,75	57,75
AC	80	52,29	80	80		47,38	72,5
CC	19	12,42	0	38		14,87	22,75
gesamt	153	100	188	118		100	153
RFC G80A							
Genotyp	n	%	Anzahl Allel		Allelfrequenz A (95% KI)	erwartet	
			G	A		% Genotyp	n
GG	52	33,77	104	0	0,42 (0,36 - 0,47)	34,16	52,6
GA	76	49,35	76	76		48,57	74,8
AA	26	16,88	0	52		17,27	26,6
gesamt	154	100	180	128		100	154
TS 28 bp tandem/triple repeat in 5'-UTR							
Genotyp	n	%	Anzahl Allel		Allelfrequenz 2R (95% KI) 3R (95% KI)	erwartet	
			2R	3R		% Genotyp	n
2R/2R	30	20	60	0	0,45 (0,40 - 0,51)	20,55	30,83
2R/3R	76	50,67	76	76		49,56	74,35
3R/3R	44	29,33	0	88	0,55 (0,49 - 0,60)	29,88	44,83
gesamt	150	100	136	164		99,99 [‡]	150,01 [‡]
TS 6 bp Deletion in 3'-UTR							
Genotyp	n	%	Anzahl Allel		Allelfrequenz -6 (95% KI)	erwartet	
			+6	-6		% Genotyp	n
+6/+6	63	42	126	0	0,34 (0,29 - 0,40)	43,56	65,34
+6/-6	72	48	72	72		44,88	67,32
-6/-6	15	10	0	30		11,56	17,34
gesamt	150	100	198	102		100	150

Keine der beobachteten Genotypenverteilungen divergierte statistisch signifikant von der zu erwartenden Verteilung nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Von den 151 Patienten, die auf den TS 28 bp *repeat*-Polymorphismus untersucht wurden, wies eine Patientin den Genotyp 3R/4R auf.

Sie wurde von der Aufstellung nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, den Analysen zum Überleben und den Auswirkungen der Genotypen auf die Toxizität von MTX ausgenommen, um einer statistischen Verzerrung vorzubeugen. Über die Frequenz des 4R-Allels in kaukasischen Populationen liegen in der Literatur nur sehr wenige Informationen vor^{68,103,114}. Häufiger wurde über die Ausprägung in afrikanischen und asiatischen Populationen berichtet^{77,78,118}.

In die Auswertung der Genotypen nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht konnten mehr Patienten als in die Auswertung der Überlebenszeit und der Toxizität einbezogen werden. Für das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht spielt es keine Rolle wie die Patienten behandelt wurden, so dass auch Patienten, die *off-study* therapiert wurden, mitzählten.

4.2.2 Charakterisierung des Patientenkollektivs

Von 143 Patienten, die zu Toxizität, *Outcome* und Überleben evaluiert werden konnten, waren 77 männlich (53,8%) und 60 weiblich (42%). Von 6 Patienten war das Geschlecht unbekannt. Das Verhältnis von Männern zu Frauen in der Studie betrug somit 1,3:1.

Von 22 Patienten konnte das Geburtsdatum und von 24 Patienten das Aufnahmedatum nicht ermittelt werden. Das mittlere Alter bei Aufnahme (n=102) war $60,76 \pm 1,15$ Jahre (95% KI= 58,48-63,03); bei den männlichen Patienten (n=55): $59,43 \pm 1,48$ Jahre (95% KI= 56,45-62,40); bei den weiblichen Patienten (n=47): $62,32 \pm 1,77$ Jahre (95% KI= 58,75-65,88). Der jüngste männliche Patient war 29 Jahre, der älteste 75 Jahre alt. Die jüngste Patientin war 26 Jahre, die älteste 80 Jahre alt.

Von 117 (81,8%) Patienten ist bekannt, dass sie insgesamt 466 Zyklen Methotrexat erhielten. Sowohl bei den Frauen (n=53), als auch bei den

Männern (n=64) war die mediane Zyklusanzahl 4 (25% Quantil: 2; 75% Quantil: 6). Insgesamt konnten 100 Patienten (69,9%) auf Toxizitätserscheinungen untersucht werden.

Die Auswertung basiert auf das *follow-up* vom November 2005.

4.2.3 Risikohaplotyp und Risikoindex

Als positiver Risikohaplotyp wurde das Vorhandensein eines der folgenden Genotypen definiert: MTHFR 677TT, MTHFR 1298CC, RFC 80AA oder 80GA, TS 6 bp Deletion -6/-6 oder TS 28 bp *repeats* 3R3R. Von 142 Patienten zeigten 115 einen positiven und 27 einen negativen Risikohaplotyp. Der Risikoindex ist ein kumulativer Wert der Anzahl der Genotypen, die zum positiven Risikohaplotyp zählen. Er wurde zur besseren Differenzierung des Risikohaplotyps eingeführt. Minimal konnte ein Wert von 0, maximal von 5 erreicht werden. Der Median des Risikoindex lag bei 1 (25% Quartile: 1; 75% Quartile: 2), mit einer *range* von 0 bis 4.

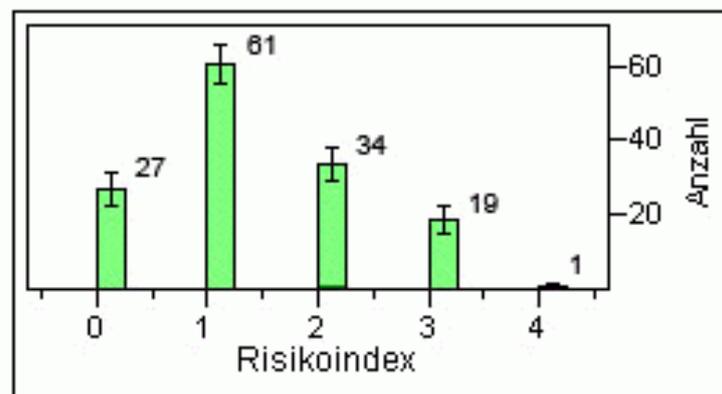


Abb. 10: Verteilung der Summen im Risikoindex. (n=142)

4.2.4 Prädisposition für ein primäres ZNS-Lymphom

Um herauszufinden, ob ein bestimmter Genotyp mit dem für ein PCNSL prädisponiert, wurde jeweils die Genotypfrequenz des vorliegenden Kollektivs mit derer zahlreicher gesunder Kontrollgruppen verglichen. Dafür wurden mittels ausführlicher Literaturrecherche zahlreiche Vergleichstudien zu den jeweiligen Polymorphismen bei anderen Krankheitsbildern identifiziert und die Genotypfrequenz der beschriebenen gesunden Kontrollgruppen zum Vergleich herangezogen.

Tab. 19: Vergleich der Genotypenfrequenz der Studienpopulation mit der Genotypenfrequenz gesunder Kontrollgruppen aus der Literatur

(Nr. Lvz. \triangle Nummer im Literaturverzeichnis, Anzahl \triangle Größe des Kollektivs, ref. \triangle Studienpopulation, # \triangle signifikant. Für deutsche Studien und Studien mit signifikanter Differenz wurde in Klammern noch der prozentuale Anteil der Allelhäufigkeiten angegeben.

Autoren / Studie	Jahr	Herkunft Kontrollgruppe	Nr. Lvz.	Anzahl Genotypausprägung		Anzahl	p (χ^2)
MTHFR C677T				CC/CT (%)	TT (%)		
G-PCNSL-SG-1		Deutschland		131 (85,6%)	22 (14,4%)	153	ref.
Botto & Yang	2000	Deutschland	7	237 (92,2%)	20 (7,8%)	257	0,033#
Drogan et al.	2004	Deutschland	24	333 (93%)	25 (7%)	358	0,008#
Zhang et al.	2004	Deutschland	136	222 (86,7%)	34 (13,3%)	256	0,755
Lightfoot et al.	2005	UK	70	672	83	755	0,232
Skibola et. al	1999	UK	107	100	14	114	0,619
Skibola et al.	1999	UK	107	326	43	369	0,391
Wiemels et al.	2001	UK	132	168	32	200	0,675
Skibola et al.	2004	USA	105	638	84	722	0,345
Matsuo et al.	2001	Japan	80	207	36	243	0,905
Gemmati et al.	2004	Italien	35	206	51	257	0,162
Niclot et al.	2006	Frankreich	85	180	24	204	0,466
Ulrich et al.	2002	USA	114	518 (95,6%)	24 (4,4%)	542	<0,001#
MTHFR A1298C				AA/AC (%)	CC (%)		
G-PCNSL-SG-1		Deutschland		134 (87,6%)	19 (12,4%)	153	ref.
Robien & Ulrich	2003	Deutschland	91	1283 (89,4%)	152 (10,6%)	1435	0,489
Lightfoot et al.	2005	UK	70	678	77	755	0,489
Gemmati et al.	2004	Italien	35	236	21	257	0,161
Matsuo et al.	2001	Japan	80	234 (96,3%)	9 (3,7%)	243	<0,001#
Skibola et al.	2004	USA	105	651	71	722	0,339
Wiemels et al.	2001	UK	132	176	23	199	0,895
Skibola et al.	1999	UK	107	103	11	114	0,479
Skibola et al.	1999	UK	107	322	40	362	0,656
Niclot et al.	2006	Frankreich	85	183	15	198	0,128
RFC G80A				GG/GA (%)	AA (%)		
G-PCNSL-SG-1		Deutschland		128 (83,1%)	26 (16,9%)	154	ref.

Drogan et al.	2004	Deutschland	24	269 (82,3%)	58 (17,7%)	327	0,818
Skibola et al.	2004	USA	105	597	132	729	0,719
Lightfoot et al.	2005	UK	70	632	123	755	0,857
Ulrich et al.	2005	USA	117	1561	401	1962	0,29
TS 28 bp tandem/triplet repeat in 5'-UTR				2R2R/2R3R (%)	3R3R (%)		
G-PCNSL-SG-1		Deutschland		106 (70,7%)	44 (29,3%)	150	ref.
Niclot et al.	2006	Frankreich	85	164 (81,2%)	38 (18,8%)	202	0,021#
Lightfoot et al.	2005	UK	70	545	205	650	0,617
Skibola et al.	2004	USA	105	504	209	613	1,0
Skibola et al.	2002	UK	106	58 (90,6%)	8 (12,5%)	64	0,006#
Chen et al.	2003	USA	12	322	132	454	0,952
Shi et al.	2005	USA	103	786	351	1137	0,701
Zhang et al.	2004	China	135	120 (35%)	223 (65%)	343	<0,001#
Graziano et al.	2004	Italien	40	105	31	136	0,209
Ulrich et al.	2002	USA	114	456	163	619	0,457
TS 6 bp deletion in 3'-UTR				+6+6/+6-6 (%)	-6-6 (%)		
G-PCNSL-SG-1		Deutschland		135 (90%)	15 (10%)	150	ref.
Lightfoot et al.	2005	UK	70	697	58	755	0,341
Skibola et al.	2004	USA	105	645	82	727	0,649
Ulrich et al.	2005	USA	117	1747	215	1962	0,72
Shi et al.	2005	USA	103	1008	132	1140	0,567
Chen et al.	2003	USA	12	392	62	454	0,244
Zhang et al.	2004	China	135	189 (54,3%)	159 (45,7%)	348	<0,001#
Graziano et al.	2004	Italien	40	121	18	139	0,431
Ulrich et al.	2002	USA	114	563	62	625	1,0

Die in dieser Arbeit ermittelte Genotypenfrequenz des SNP MTHFR C677T unterschied sich signifikant von den Frequenzen der deutschen Kontrollgruppe von Botto & Yang und Drogan *et al.* und von der US-amerikanischen Gruppe, die von Ulrich *et al.* beschrieben wurde. Beim zusammenfassenden Vergleich der Kontrollgruppe deutscher Herkunft mit dem SNP MTHFR C677T ergab sich folgendes Bild: CC/CT 792 (90,9%), TT 79 (9,1%), total 871, $p(\chi^2)$ 0,042 #.

Für die ermittelte Genotypenfrequenz des SNP MTHFR A1298C konnte kein signifikanter Unterschied zu den deutschen Kontrollgruppen gefunden werden. Nur die japanische Kontrollgruppe aus der Studie von Matsuo *et al.* zeigte einen signifikanten Unterschied in der Verteilung der Genotyphäufigkeiten.

Die Verteilung der Genotypen in dieser Arbeit für den SNP RFC G80A zeigte im Vergleich zu den Kontrollgruppen keinen statistisch signifikanten Unterschied, auch nicht zur einzigen deutschen Kontrollgruppe aus der Studie von Drogan *et al.*

Die chinesische Kontrollgruppe aus der Studie von Zhang *et al.* zeigte einen signifikanten Unterschied in der Verteilung des *tandem/triplet repeats* in der 5'-UTR der TS. Ebenso eine französische Population von Niclot *et al.* und eine britische von Skibola *et al.*

Die 6 bp Deletion in der 3'-UTR der TS wurde in keiner Studie mit deutscher Kontrollgruppe erfasst. Allerdings zeigte das chinesische Kollektiv aus der Studie von Zhang *et al.* eine signifikant-unterschiedliche Verteilung der Genotypenhäufigkeiten.

4.3 Auswirkung der Polymorphismen auf das *Outcome*

Von 143 Patienten konnten zum Abschluss der Auswertungen 113 (79%) bezüglich des *Outcome* analysiert werden. 47 Patienten (41,6%) zeigten eine komplette Remission (CR), 24 (21,2%) eine partielle Remission (PR). 32 Patienten (26,3%) litten unter einer progredienten Erkrankung (PD) und 10 Patienten (8,8%) hatten ein *stable disease* (SD).

Im Bezug auf die fünf untersuchten Genpolymorphismen konnte kein Zusammenhang mit dem *Outcome* nach der HD-MTX-Therapie gefunden werden.

4.4 Auswirkung der Mutationen auf overall survival und progression free survival

Das *follow up* fand im ersten Jahr alle 3 Monate statt, im zweiten Jahr im 4-Monatsintervall und im 3. Jahr halbjährlich. Bei diesen Untersuchungen wurde die Remissionsbeurteilung vorgenommen. Die Ergebnisse wurden in der Studiendokumentation für jeden Patienten niedergelegt. Die progressionsfreie Überlebenszeit (PFS) wurde ab Therapiebeginn bis zum Progress, Tod oder letzten *follow up* (im Folgenden *event* genannt) gerechnet. Die Überlebensdauer (OAS) wurde ab dem Zeitpunkt der Diagnosestellung bis zum Tod oder letzten *follow up* (im Folgenden ebenfalls *event* genannt) gerechnet¹⁰⁹.

Zur Untersuchung, ob die einzelnen Mutationen im Folsäure-Stoffwechsel die Überlebenszeit einerseits im OAS oder andererseits im PFS beeinflussen, und ob sich die verschiedenen Genotypen in der Remissionsdauer signifikant unterscheiden, wurden der Log-Rank- und Wilcoxon-Test für jede der Kaplan-Meier-Kurven durchgeführt.

4.4.1 Beobachtungszeiträume

Im OAS wurden 119 Patienten im Mittel 17,7 Monate beobachtet (Standard-Abweichung: 15,12 Monate, Standard-Fehler: 1,39 Monate, 95% KI= 14,95-20,45) beobachtet. Der kürzeste Zeitraum betrug 0,5 Monate, der längste 61,9 Monate.

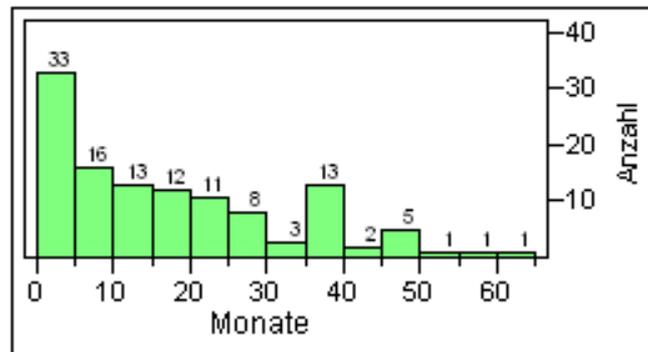


Abb. 11: Verteilung der Beobachtungszeiträume im OAS.

x-Achse: Zeit in Monaten, y-Achse: Anzahl der Patienten

Im PFS wurden 107 Patienten im Mittel 13,66 Monate beobachtet (Standard-Abweichung: 13,25 Monate, Standard-Fehler: 1,28 Monate, 95% KI= 11,12-16,20). Der kürzeste Zeitraum betrug 0,5 Monate, der längste 52,3 Monate.

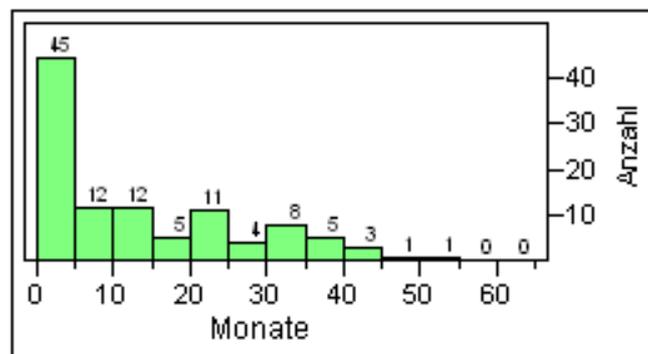


Abb. 12: Verteilung der Beobachtungszeiträume im PFS.

x-Achse: Zeit in Monaten, y-Achse: Anzahl der Patienten

4.4.2 Überlebenszeitanalyse aller Patienten für OAS und PFS

Bei der Überlebenszeitanalyse zum *Overall survival* konnten 119 Patienten ausgewertet werden, 52 konnte ein *event* zugeordnet werden, Daten von 67 Patienten wurden zensiert. Das mittlere Überleben betrug $30,96 \pm 2,36$ Monate (Median 28,4 Monate, 95% KI= 19,1-55).

Im Vergleich hierzu betrug die Überlebenszeit im *Progression free Survival* im Mittel $19,51 \pm 2,00$ Monate (Median 11,5 Monate, 95% KI= 5,8-21,3). Es wurden 107 Patienten untersucht, 72 mit einem *event*, Daten von 35 wurden zensiert.

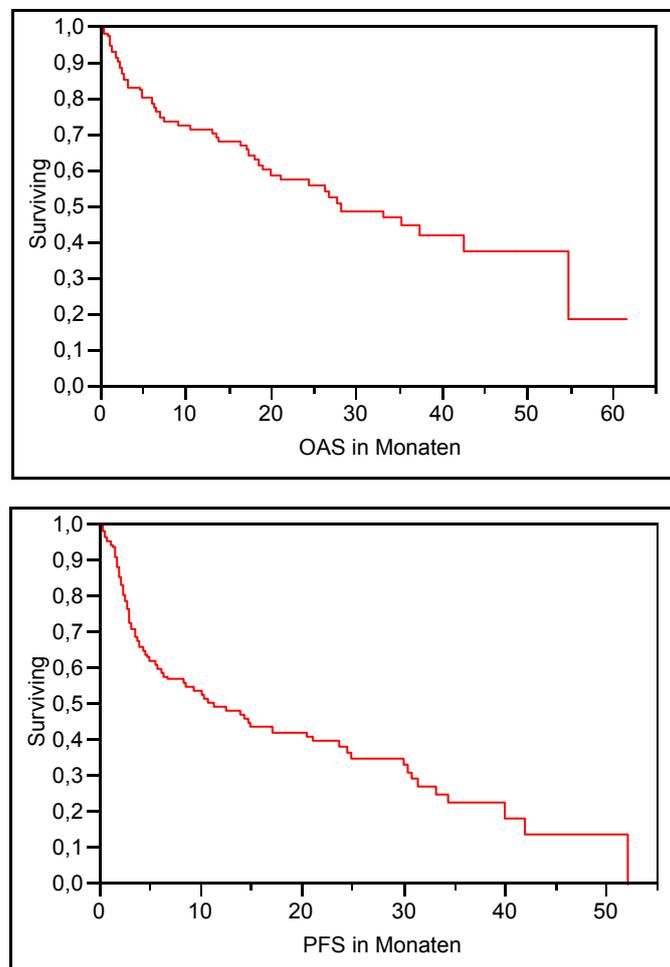


Abb. 13: Kaplan-Meier Darstellung für OAS und PFS aller Patienten

x-Achse: Zeit in Monaten; y-Achse: kum. Überleben

4.4.2.1 OAS, PFS, Risikohaplotyp und Risikoindex

Die Analyse bezüglich eines Zusammenhanges zwischen dem Risikohaplotyp und dem OAS zeigte für die Gruppen:

- „Negativ“: $16,1 \pm 3,4$ Monate, 95% KI=9,1-23,1;
- „Positiv“: $18,1 \pm 1,5$ Monate, 95% KI= 15,1-21,1.

Ein signifikanter Unterschied im Student's t-Test konnte nicht gezeigt werden ($p > 0,05$).

Im PFS zeigten sich folgende Ergebnisse für die beiden Gruppen:

- „Negativ“: $16,2 \pm 3,3$ Monate, 95% KI= 9,4-23,1;
- „Positiv“: $13,0 \pm 1,4$ Monate, 95% KI= 10,3-15,8.

Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Ausprägungen des Risikohaplotyps ($p > 0,05$).

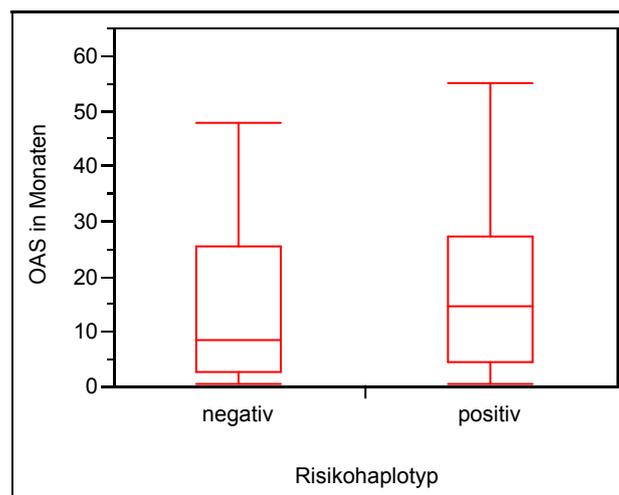


Abb. 14: Risikohaplotyp und OAS. $p > 0,05$.

x-Achse: Risikohaplotyp, y-Achse: OAS in Monaten

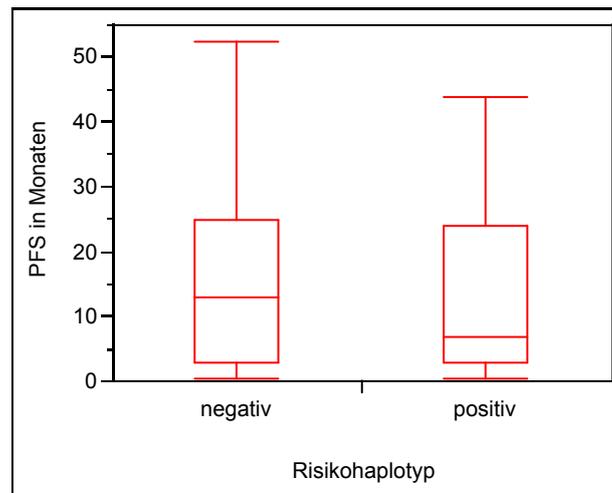


Abb. 15: Risikohaplotyp und PFS. $p > 0,05$.

x-Achse: Risikohaplotyp, y-Achse: PFS in Monaten

Der Risikoindex verhielt sich in den Analysen zu OAS und PFS ähnlich. Es konnten keine relevanten Zusammenhänge gefunden werden. Tendenziell zeigte sich, dass mit zunehmendem Risikoindex die Zeiten sowohl im OAS als auch im PFS abnahmen bzw. konstant blieben, allerdings nicht signifikant.

4.4.3 Überlebenszeitanalyse für den SNP MTHFR C677T

Für Patienten, die bezüglich des SNP MTHFR C677T untersucht wurden (siehe Tab. 20), bewegten sich die mittleren Überlebenszeit im OAS zwischen 23 (CT) und 33 Monaten (TT), im PFS zwischen 14 (TT) und 20 Monaten (CT).

Tab. 20: SNP MTHFR C677T: mittlere Überlebenszeiten im OAS und PFS in Monaten.

(zens. \triangle Anzahl an Patienten mit zensierten Daten, event \triangle Anzahl an Patienten mit einem event, Sf \triangle Standardfehler)

Genotyp	OAS			PFS		
	event	zens.	mittl. Überleben ± Sf	event	zens.	mittl. Überleben ± Sf
CC	25	30	30,92±3,50	34	17	16,21±1,98
CT	23	26	23,49±2,33	30	14	20,65±3,22
TT	4	11	33,00±5,54	8	4	14,63±4,02
gesamt	52	67	30,96±2,36	72	35	19,51±2,00

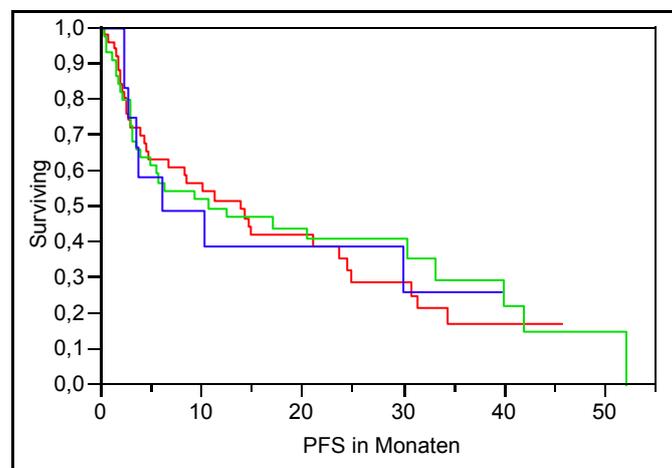
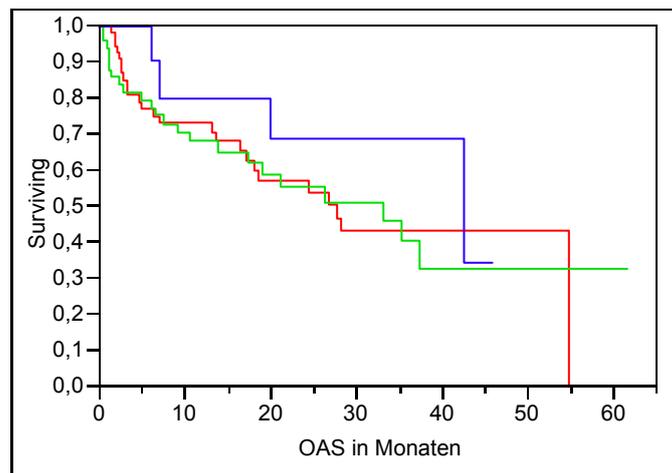


Abb. 16: SNP MTHFR C677T: Kaplan-Meier Darstellung von OAS und PFS. $p > 0,05$.

x-Achse: Zeit in Monaten, y-Achse: kum. Überleben (rot: CC, grün: CT, blau: TT)

Die Hypothese, dass sich die Kaplan-Meier-Überlebensfunktionen für die analysierten Genotypen im OAS und PFS signifikant unterscheiden, konnte weder der Log-Rank- noch der Wilcoxon-Test bestätigen.

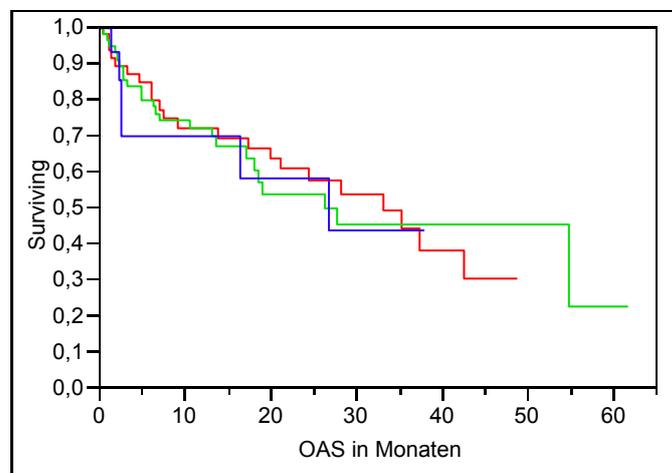
4.4.4 Überlebenszeitanalyse für den SNP MTHFR A1298C

Für Patienten mit dem SNP MTHFR A1298C reichte das mittlere Überleben (siehe Tab. 21) im OAS von 18 (CC) über 27 (AA) bis 31 Monate (AC), im PFS von 16 (CC) über 18 (AA) bis 20 Monate (AC).

Tab. 21: SNP MTHFR A1298C: mittlere Überlebenszeiten im OAS und PFS in Monaten.

(zens. \triangleq Anzahl an Patienten mit zensierten Daten, event \triangleq Anzahl an Patienten mit einem event, Sf \triangleq Standardfehler)

Genotyp	OAS			PFS		
	event	zens.	mittl. Überleben \pm Sf	event	zens.	mittl. Überleben \pm Sf
AA	22	25	27,12 \pm 2,63	30	12	18,63 \pm 2,61
AC	24	33	31,39 \pm 3,64	34	18	20,62 \pm 3,21
CC	6	9	18,30 \pm 3,41	8	5	16,49 \pm 4,00
gesamt	52	67	30,96 \pm 2,36	72	35	19,51 \pm 2,00



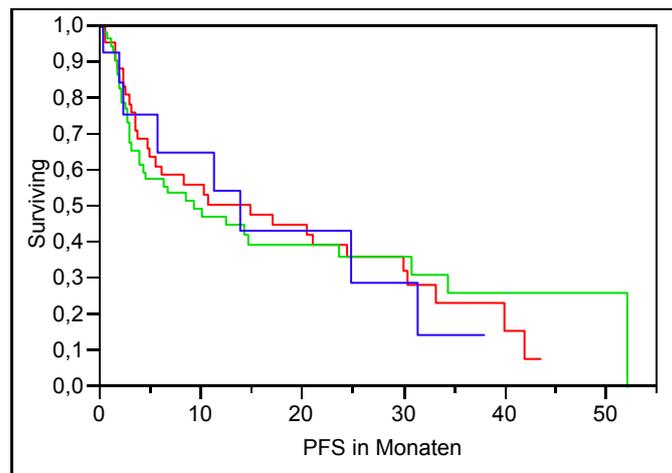


Abb. 17: SNP MTHFR A1298C: Kaplan-Meier Darstellung von OAS und PFS. $p > 0,05$.

x-Achse: Zeit in Monaten, y-Achse: kum. Überleben (rot: AA, grün: CA, blau: CC)

Die Kaplan-Maier-Funktionen ließen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen erkennen. Dies bestätigten der Log-Rank- und der Wilcoxon-Test.

4.4.5 Überlebenszeitanalyse für den SNP RFC G80A

Die mittlere Überlebenszeit von Patienten mit dem SNP RFC G80A (siehe Tab. 22) bewegte sich im OAS zwischen 22 (GG) und 35 Monaten (AA), im PFS zwischen 17 (AA und GA) und 19 Monaten (GG).

Tab. 22: SNP RFC G80A: mittlere Überlebenszeiten im OAS und PFS in Monaten.

(zens. \triangle Anzahl an Patienten mit zensierten Daten, event \triangle Anzahl an Patienten mit einem event, Sf \triangle Standardfehler)

Genotyp	OAS			PFS		
	event	zens.	mittl. Überleben ± Sf	event	zens.	mittl. Überleben ± Sf
GG	19	13	22,14±2,46	26	9	19,72±3,36
GA	24	33	26,00±2,57	34	17	17,84±2,52
AA	9	21	35,15±5,59	12	9	17,97±3,33
gesamt	52	67	30,96±2,36	72	35	19,51±2,00

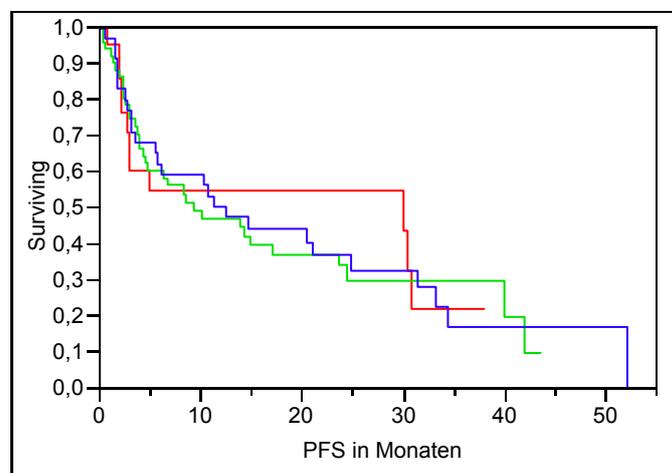
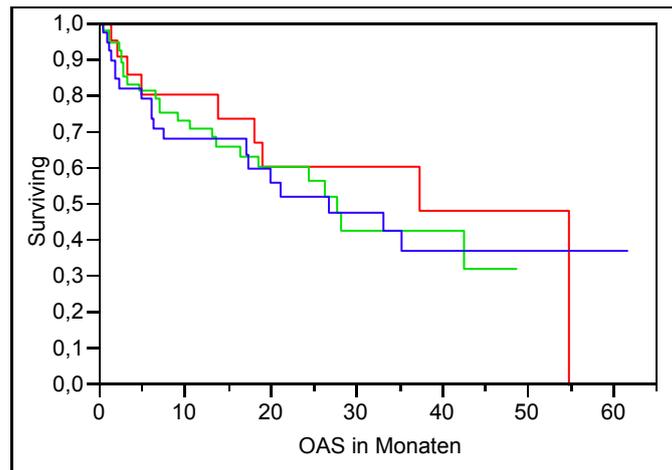


Abb. 18: SNP RFC G80A: Kaplan-Meier Darstellung von OAS und PFS. $p > 0,05$.

x-Achse: Zeit in Monaten, y-Achse: kum. Überleben (rot: AA, grün: GA, blau: GG)

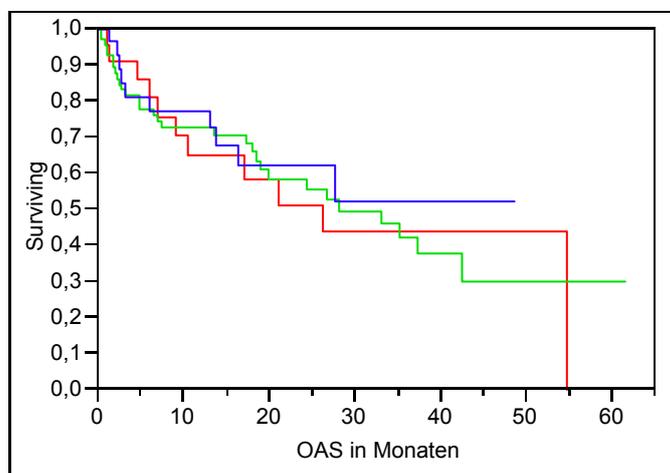
Die Kaplan-Meier-Kurven ließen erkennen, dass sich die Überlebensfunktionen weder im OAS noch im PFS statistisch signifikant voneinander unterschieden. Sowohl der Log-Rank- als auch der Wilcoxon-Test konnte dies bestätigen.

4.4.6 Überlebenszeitanalyse des 28 bp *tandem/triplet repeat* in der TS

In der Auswertung der Patientendaten bezüglich des 28 bp *tandem/triplet repeat* in der TS (siehe Tab. 23) zeigten sich im OAS mittlere Überlebenszeiten von 20 (3R3R) bis 30 Monaten (2R2R). Im PFS hatten die Patienten mittlere Überlebenszeiten von 15 (3R3R) bis 21 Monate (2R2R).

Tab. 23: TS 28 bp *tandem/triplet repeat*: mittlere Überlebenszeiten im OAS und PFS in Monaten. (zens. \triangleq Anzahl an Patienten mit zensierten Daten, event \triangleq Anzahl an Patienten mit einem event, Sf \triangleq Standardfehler)

Genotyp	OAS			PFS		
	event	zens.	mittl. Überleben \pm Sf	event	zens.	mittl. Überleben \pm Sf
2R2R	11	11	30,73 \pm 5,57	13	7	21,14 \pm 4,02
2R3R	30	36	26,12 \pm 2,29	40	20	19,64 \pm 2,82
3R3R	10	19	20,26 \pm 2,21	18	7	15,54 \pm 3,08
gesamt	51	66	30,89 \pm 2,38	71	34	19,31 \pm 2,00



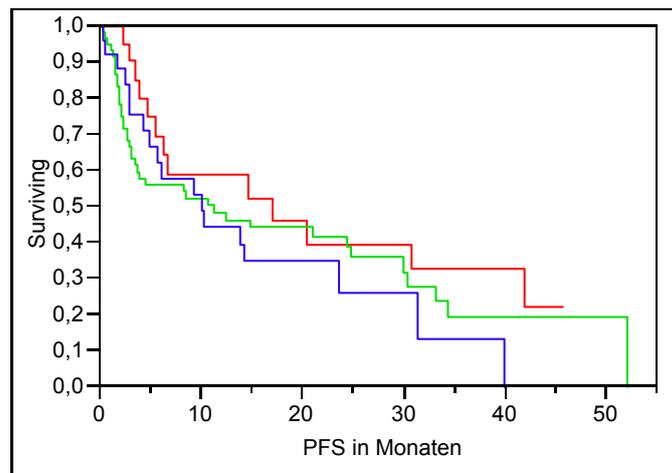


Abb. 19: TS 6 bp tandem/triplet repeat : Kaplan-Meier Darstellung von OAS und PFS.

p>0,05. x-Achse: Zeit in Monaten, y-Achse: kum. Überleben

(rot: 2R2R, grün: 2R3R, blau: 3R3R)

Die Hypothese, dass sich die Kaplan-Meier-Überlebensfunktionen für die analysierten Genotypen im OAS und PFS signifikant unterscheiden, konnte weder der Log-Rank- noch der Wilcoxon-Test bestätigen.

4.4.7 Überlebenszeitanalyse des TS 6 bp Deletions-Polymorphismus

Im OAS bewegte sich die Überlebenszeit für Patienten, die bezüglich der 6 bp Deletion in der TS untersucht wurden (siehe Tab. 24) zwischen 26 (-6/-6 und +6/-6) und 28 Monaten (+6/+6). Im PFS wurden mittlere Überlebenszeiten zwischen 16 (+6/-6) und 20 Monaten (+6/+6) errechnet.

Tab. 24: TS 6 bp Deletion: mittlere Überlebenszeiten im OAS und PFS in Monaten.

(zens. \triangle Anzahl an Patienten mit zensierten Daten, event \triangle Anzahl an Patienten mit einem event, Sf \triangle Standardfehler)

Genotyp	OAS			PFS		
	event	zens.	mittl. Überleben ± Sf	event	zens.	mittl. Überleben ± Sf
-6/-6	2	8	26,41±1,95	6	4	19,35±4,66
+6/-6	30	28	26,49±3,31	34	16	16,94±2,30
+6/+6	18	30	28,59±2,81	30	14	20,25±3,30
gesamt	50	66	31,11±2,40	70	34	19,46±2,01

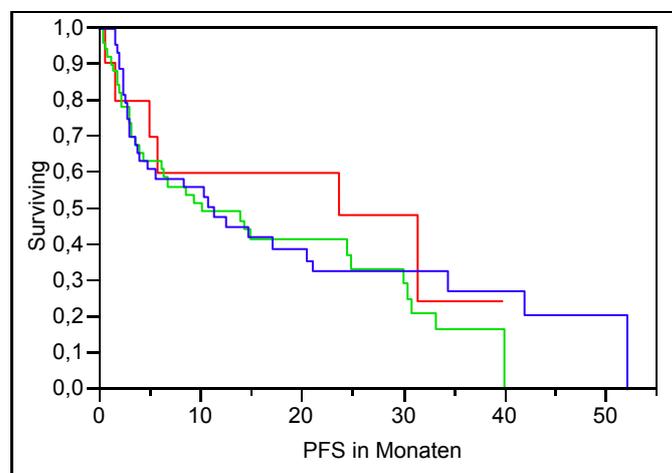
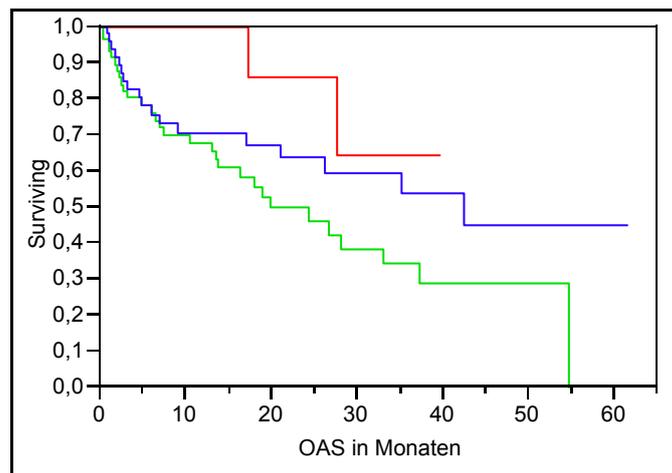


Abb. 20: TS 6 bp Deletion: Kaplan-Meier Darstellung von OAS und PFS. $p=0,08$; $p>0,05$.

x-Achse: Zeit in Monaten, y-Achse: kum. Überleben (rot: -6/-6, grün: +6/-6, blau: +6/+6)

Die Kaplan-Maier-Kurven deuteten darauf hin, dass sich die Überlebensfunktionen im OAS statistisch signifikant voneinander unterscheiden: Aber sowohl der Log-Rank- als auch der Wilcoxon-Test konnten dies nicht mit $p<0,05$ bestätigen. Allerdings blieben sie mit $p=0,08$ (Log-Rank)

und $p=0,1$ (Wilcoxon) mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von nur 10% ($p \leq 0,1$) behaftet.

Beim PFS zeigte sich kein signifikanter statistischer Zusammenhang zwischen den Überlebensfunktionen und den drei Genotypen des TS 6 bp Deletions-Polymorphismus.

4.5 Cox-Regression

In die Cox-Regression zum OAS wurden 116 Patienten eingeschlossen, 50 hatten ein *event*, von 66 lagen zensierte Daten vor. In der Regression zum PFS wurden 104 Patienten analysiert, 70 mit einem *event* und 34 mit zensierten Daten.

Als Parameter wurden folgende Genotypen berücksichtigt: MTHFR 677 CC/CT/TT; MTHFR 1298 AA/AC/CC; RFC 80 GG/GA/AA; TS 28 bp *repeats* 2R2R/2R3R/3R3R; TS 6 bp Deletion +6+6/+6-6/-6-6.

Beim Test des Gesamtmodells konnte das Signifikanzniveau ($p < 0,05$) nicht unterschritten werden: OAS $p=0,47$; PFS $p=0,98$. Die Irrtumswahrscheinlichkeiten der einzelnen Parameter im Test konnten ebenfalls das geforderte Signifikanzniveau nicht unterschreiten.

4.6 Auswirkung der Mutationen auf die Toxizität von MTX

Die toxischen Nebenwirkungen wurden in folgenden Kategorien erfasst: Anämie, Leukopenie, Granulopenie, Thrombopenie und nicht-hämatologische Nebenwirkungen. In die weitere Auswertung wurde jeweils der höchste Wert aus den oben genannten hämatologischen und der nicht-hämatologischen Kategorien einbezogen. Zusätzlich wurde der höchste Wert aus allen oben genannten Kategorien ermittelt (im Weiteren als „schwerste dokumentierte Nebenwirkung“ bezeichnet). Da die Patienten eine unterschiedliche Anzahl an

MTX-Zyklen erhielten, wurde nur die jeweils schwerste Nebenwirkung je Kategorie über alle Zyklen ermittelt und in die Auswertung einbezogen.

Zur Auswertung der Korrelation von Toxizität und Genotyp wurden entweder $r \times c$ Kontingenztafeln (KT) gebildet oder der *Wilcoxon / Kruskal-Wallis Test* angewendet.

Im Folgenden werden häufig Nebenwirkungen der WHO-Grade 0, I und II zu „leichten“ und der WHO-Grade III und IV zu „schweren“ Nebenwirkungen mit Bedarf der Intervention zusammengefasst.

Die 100 Patienten, die in die vorliegenden Analysen zur Toxizität einbezogen werden konnten, wurden mit insgesamt 466 Zyklen Methotrexat behandelt. Es ergab sich folgende Verteilung der Nebenwirkungen nach WHO-Graduierung:

- Anämie: n=100; Mittelwert $0,8 \pm 0,1$; 95% KI= 0,6-1,0
- Leukopenie: n=100; Mittelwert $1,1 \pm 0,1$; 95% KI= 0,9-1,3
- Granulopenie: n=95; Mittelwert $1,2 \pm 0,1$; 95% KI= 1,0-1,3
- Thrombopenie: n=100; Mittelwert $0,8 \pm 0,1$; 95% KI= 0,6-1,1
- maximale nicht-hämatologische Nebenwirkung:
n=94; Mittelwert $1,8 \pm 0,1$; 95% KI= 1,6-2,1
- schwerste dokumentierte Nebenwirkung:
n=100; Mittelwert $2,3 \pm 0,1$; 95% KI= 2,0-2,5.

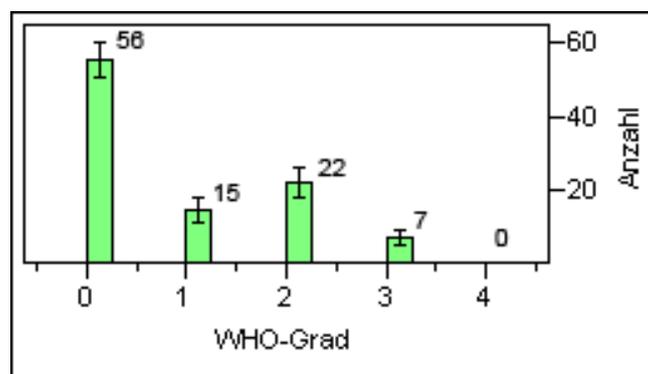


Abb. 21: Verteilung der Schweregrade: „Anämie“. (n=100)

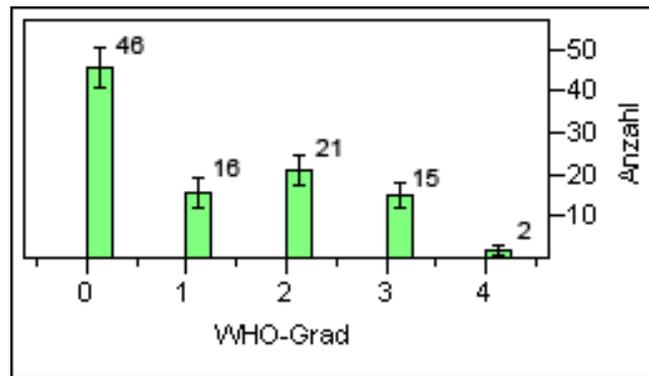


Abb. 22: Verteilung der Schweregrade: „Leukopenie“. (n=100)

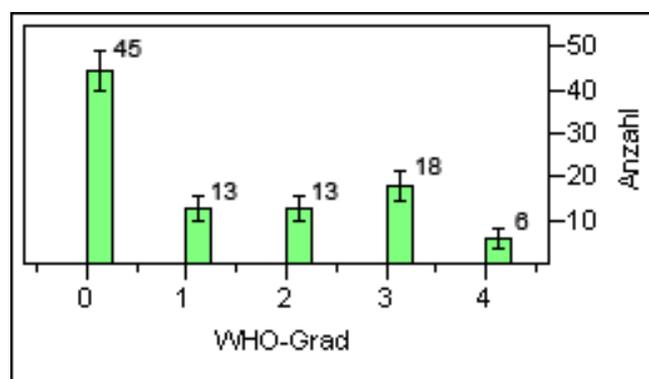


Abb. 23: Verteilung der Schweregrade: „Granulopenie“. (n=95)

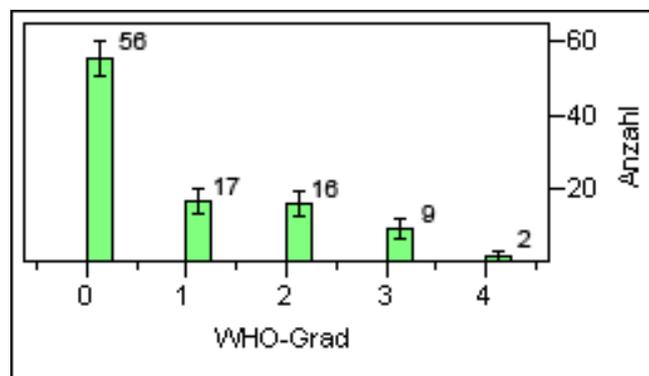


Abb. 24: Verteilung der Schweregrade: „Thrombopenie“. (n=100)

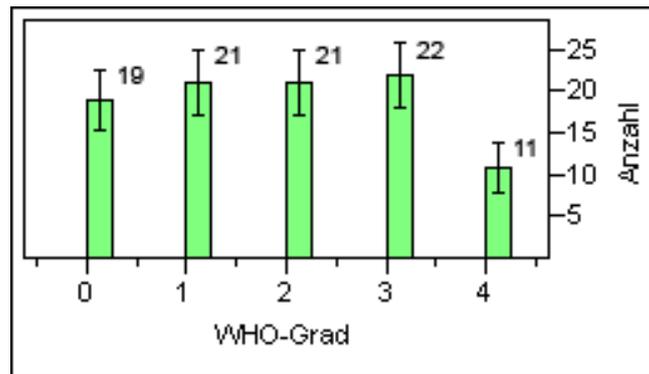


Abb. 25: Verteilung der Schweregrade: „max. nicht-hämatol. Nebenwirkung“ (n=94)

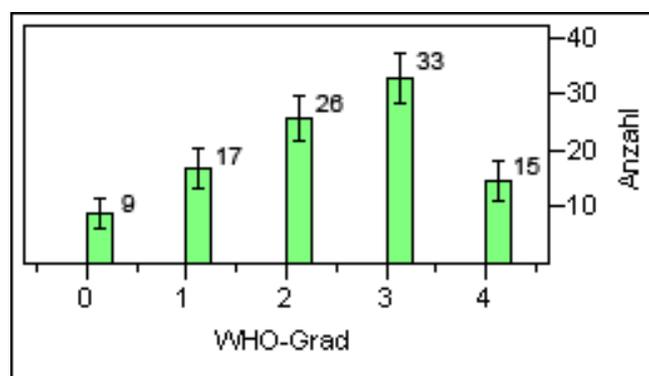


Abb. 26: Verteilung der Schweregrade: „schwerste dokument. Nebenwirkung“ (n=100)

Eine schwere Granulopenie erlitten 25,3%, eine schwere Leukopenie 17% und eine schwere Thrombopenie 11% der Studienteilnehmer. Weiterhin musste kein Patient eine Grad IV Anämie erleiden. 35,1% der Patienten litten unter schweren (Grad III/IV) nicht-hämatologischen Nebenwirkung. 48% der schwersten dokumentierten Nebenwirkungen hatten den Schweregrad III/IV nach WHO.

Es zeigte sich, dass 71 von 466 verabreichten Zyklen MTX eine toxische Nebenwirkung vom Grad III (15,2%) und 21 Zyklen eine toxische Nebenwirkung vom Grad IV (4,5%) hervorriefen. Insgesamt bedeutet dies, dass 92 Zyklen MTX eine schwere (Akut-) Nebenwirkung hervorriefen mit einem Anteil an der Gesamtsumme aller Zyklen von 19,7%.

Die statistischen Auswertungen konnten keine Assoziation des Hämoglobinwerts und der Thrombozytenzahl mit einem bestimmten Genotyp der fünf untersuchten Mutationen aufzeigen.

4.6.1 Schwerste dokumentierte Nebenwirkung

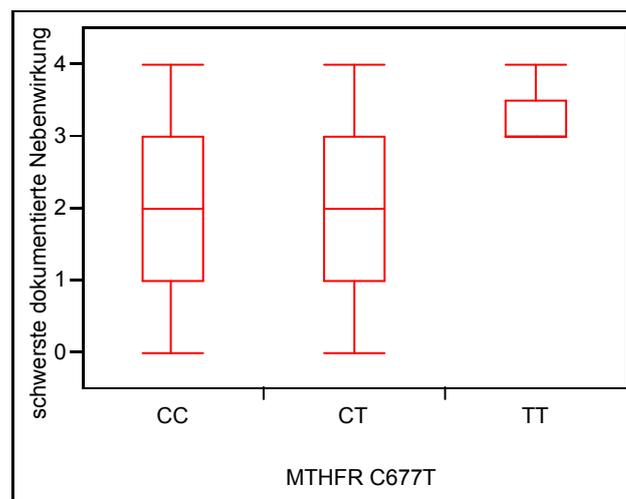


Abb. 27: Boxplot MTHFR C677T und schwerste dokumentierte Nebenwirkung. $p=0,018$

Bei Betrachtung des SNP MTHFR C677T zeigte sich vom CC-/CT- zum TT-Genotyp eine deutliche Verschiebung der schwersten dokumentierten Nebenwirkung in Richtung Grad III und IV. Der Mittelwert des CC-Genotyps lag bei $2,07 \pm 0,17$ ($n=45$, 95% KI 1,73-2,41), der des CT-Genotyps bei $2,61 \pm 0,18$ ($n=42$, 95% KI 1,91-2,61). Beim TT-Genotyp hingegen lag der Mittelwert bei $3,08 \pm 0,32$ ($n=13$, 95% KI 2,45-3,71) (siehe Abb. 27).

Diese Verschiebung bestätigte auch der *Kruskal-Wallis*-Test. Er zeigte einen signifikanten Unterschied in der Verteilung der Rangsummen über die drei Genotypen ($p=0,018$). Beim Vergleich der Mittelwerte mit dem *Student's t* Test zeigte sich ebenfalls eine signifikante Differenz (TT vs. CC, $p=0,006$; TT vs. CT, $p=0,028$).

Bei Kompression der Nebenwirkungsgrade auf zwei klinisch relevante Gruppen (Grad 0/I/II ohne Bedarf der Intervention und Grad III/IV mit Bedarf der Intervention) zeigten sich folgende Auffälligkeiten:

- 96,16% der Patienten mit einer Grad 0/I/II Nebenwirkung gehörten zum CC- oder CT-Genotyp.
- Patienten mit dem TT-Genotyp erlitten zu 84,62% eine Grad III/IV Nebenwirkung und nur zu 15,38% eine Grad 0/I/II Nebenwirkung.

Mit dem *likelihood ratio* Test konnte eine signifikant unterschiedliche Verteilung der Anzahl der Patienten je Genotyp in den Kategorien „leichte“ und „schwere“ Nebenwirkungen (siehe Tab. 25) bewiesen werden ($p=0,009$).

Tab. 25: Kontingenztabelle MTHFR C677T und schwerste dokumentierte Nebenwirkung (klin. Einteilung); *likelihood ratio* Test, $\chi^2=9,51$, $p=0,009$.

Anzahl Total % Spalte % Zeile %	Grad 0/I/II	Grad III/IV	
CC	28 28,00 53,85 62,22	17 17,00 35,42 37,78	45 45,00
CT	22 22,00 42,31 52,38	20 20,00 41,67 47,62	42 42,00
TT	2 2,00 3,85 15,38	11 11,00 22,92 84,62	13 13,00
	52 52,00	48 48,00	100

Auch bei Unterteilung der Genotypen nach funktionellen Gesichtspunkten in eine Gruppe mit mehr als 50% Enzymaktivität (CC und CT) und in eine zweite Gruppe mit weniger als 50% Enzymaktivität (TT) ließ sich erkennen, dass Patienten mit dem TT-Genotyp schwerere Nebenwirkungen erleiden mussten. So lag der Mittelwert der ersten Gruppe bei $2,16 \pm 0,12$ ($n=87$, 95% KI 1,92-2,40), der der zweiten Gruppe bei $3,08 \pm 0,32$ ($n=13$, 95% KI 2,45-3,71).

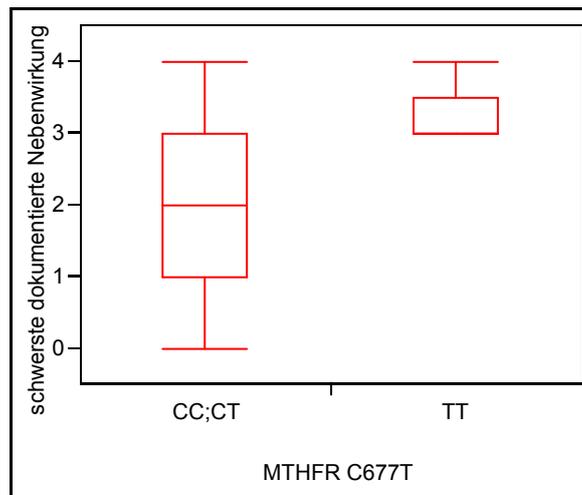


Abb. 28: Boxplot MTHFR C677T (funktionelle Aufteilung) und schwerste dokumentierte Nebenwirkung. $p=0,007$

Der *Wilcoxon* Test zeigte, dass sich die Rangsummen signifikant zwischen den beiden Gruppen unterschieden (*2-sample* Test, $p=0,007$).

Bei Kombination der klinischen Kategorisierung der Nebenwirkungen und funktioneller Aufteilung der Genotypen des SNP MTHFR C677T zeigte sich wieder die enge Assoziation des TT-Genotyps mit den schweren Nebenwirkungen. Der *likelihood ratio* Test zeigte dies mit $\chi^2=8,65$ und $p=0,003$. In *Fisher's Exact* Test war die Wahrscheinlichkeit für den TT-Genotyp signifikant höher eine schwere Nebenwirkung zu erleiden als für die anderen Genotypen ($p=0,006$).

Die anderen Polymorphismen zeigten, jeder einzeln betrachtet, keinen statistisch signifikanten Zusammenhang mit der schwersten dokumentierten Nebenwirkung.

Der Risikoindex zeigte einen linearen Zusammenhang mit der schwersten dokumentierten Nebenwirkung. Mit steigendem Summenwert des Index stieg auch die Wahrscheinlichkeit schwerere Nebenwirkungen zu erleiden. Die *linear fit* Analyse zeigte einen linearen Zusammenhang mit $R^2=0,06$ ($p=0,017$).

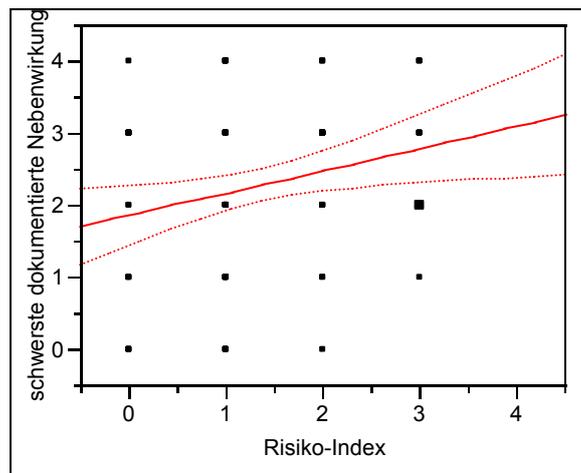


Abb. 29: Linear Fit Analyse von schwerster dokumentierter Nebenwirkung und Risikoindex. $p=0,017$

Der Wert für die schwerste dokumentierte Nebenwirkung (SDN) setzte sich wie folgt zusammen:

$$\text{SDN} = 1,82 (\pm 0,21) + 0,33 (\pm 0,13) \times \text{Risikoindex.}$$

4.6.2 Granulopenie

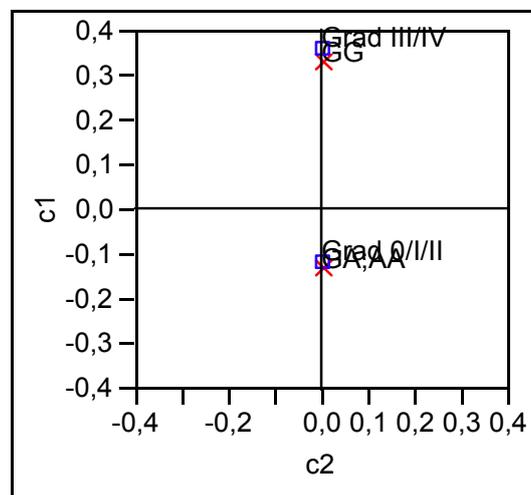
Bei Betrachtung der einzelnen Genotypen des RFC G80A zeigte sich zunächst keine Korrelation mit den Granulozytenzahlen. Wurden die Genotypen aber ähnlich funktionell wie beim SNP MTHFR C677T in eine Gruppe, bestehend aus dem Wildtyp, und in eine zweite Gruppe, bestehend aus den Genotypen mit einem oder zwei mutierten Allelen, unterteilt, so zeigte sich, dass Patienten mit dem Wildtyp signifikant häufiger von einer schweren Granulopenie betroffen waren.

Die Kontingenztafel mit der klinischen Einteilung der Nebenwirkungen zeigte folgenden Sachverhalt:

- 80,6% der Patienten mit mindestens einem A-Allel erlitten nur eine Grad 0/I/II Granulopenie.
- Analog zeigte auch die Korrespondenzanalyse (KA) eine starke Assoziation des GG-Genotyps mit der schweren Granulopenie.

Tab. 26: Kontingenztabelle RFC G80A (funktionelle Einteilung) und Granulopenie (klinische Einteilung), $p=0,047$

Anzahl Total % Spalte % Zeile %	Grad 0/I/II	Grad III/IV	
GA;AA	54 56,84 76,06 80,60	13 13,68 54,17 19,40	67 70,53
GG	17 17,89 23,94 60,71	11 11,58 45,83 39,29	28 29,47
	71 74,74	24 25,26	95



- ✗ RFC G80A (funktionell)
- Granulopenie (klinisch)

Abb. 30: Korrespondenzanalyse RFC G80A und Granulopenie

Mit dem *likelihood ratio* Test konnte eine signifikant unterschiedliche Verteilung der Anzahl der Patienten je Genotyp in den Kategorien „leichte“ und „schwere“ Nebenwirkungen (siehe Tab. 26) bewiesen werden ($\chi^2=3,94$, $p=0,047$). *Fisher's Exact* Test zeigte, dass die Wahrscheinlichkeit für Patienten mit dem GG-Genotyp größer war an einer Grad III/IV Nebenwirkung zu leiden als für die anderen beiden Genotypen ($p=0,04$).

Die gleiche Analyse für den TS 28 bp *tandem/triplet repeat* zeigte ein ähnliches Ergebnis, verfehlte allerdings knapp das geforderte Signifikanzniveau: *Fisher's Exact* Test zeigte, dass die Wahrscheinlichkeit für Patienten mit dem homozygoten 3R3R-Genotyp tendenziell größer war eine Grad III/IV Nebenwirkung zu erleiden als für die Patienten der anderen beiden Genotypen ($p=0,07$).

Die hier nicht aufgeführten Mutationen zeigten keinen Zusammenhang mit dem Auftreten einer Granulopenie.

Bei Betrachtung des Risikohaplotyps zeigte sich folgendes:

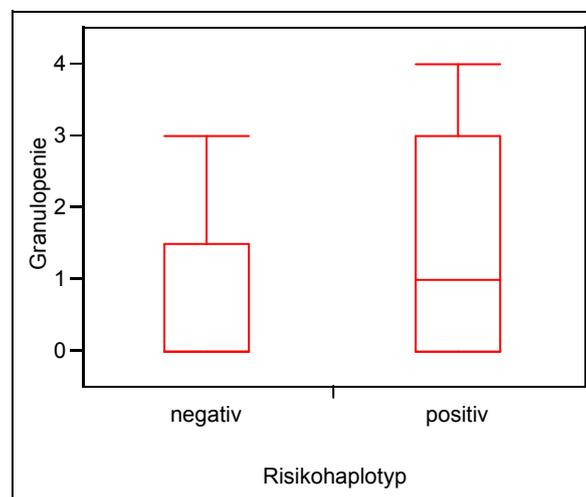


Abb. 31: Boxplot Risikohaplotyp und Granulopenie. $p=0,04$

Die Rangsummen der beiden Ausprägungen des Risikohaplotyps unterschieden sich im *Wilcoxon* Test signifikant: $p=0,04$. Der positive

Risikohaplotyp war mit dem Auftreten einer höhergradigen Granulopenie verknüpft als der negative.

4.6.3 Leukopenie

Die Auswertung der Kontingenztabelle zeigte eine Assoziation des GG-Genotyps des SNP RFC G80A mit der Grad III/IV Nebenwirkung.

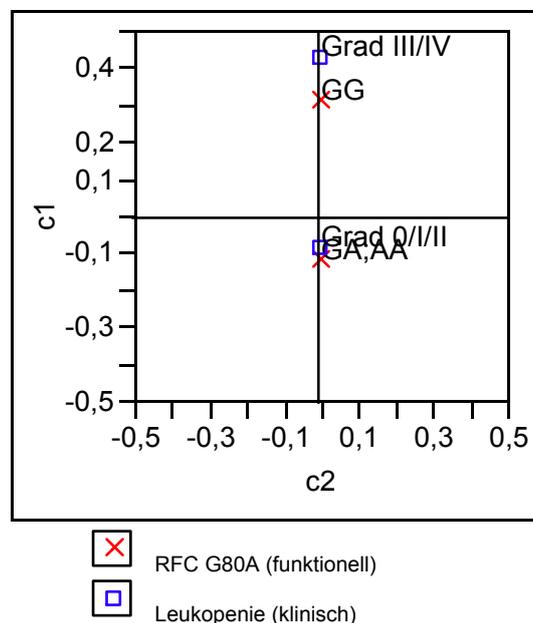


Abb. 32: Korrespondenzanalyse RFC G80A und Leukopenie. $p=0,06$

Die Kontingenztabelle (klinische und funktionelle Einteilung) zeigte eine Tendenz zur Assoziation des GG-Genotyps mit dem Auftreten schwerer Leukopenie:

- 47,06% der Patienten mit einer interventionsbedürftigen Nebenwirkung gehörten zum GG-Genotyp.
- 75,9% der Patienten mit einer leichten Nebenwirkung gehörten zu den Genotypen mit mindestens einem mutierten Allel.

Allerdings erreichte diese Tendenz im *likelihood ratio* Test nicht ganz das geforderte Signifikanzniveau ($p=0,06$). Dies ließ sich auch gut in *Fisher's Exact*

Test nachvollziehen: Das Risiko für den GG-Genotypen, eine Grad III/IV Nebenwirkung zu erleiden, war tendenziell größer als für die anderen beiden Genotypen ($p=0,06$).

Tab. 27: Kontingenztabelle RFC G80A (funktionelle Einteilung) und Leukopenie (klinische Einteilung). $p=0,06$

Anzahl Total % Spalte % Zeile %	Grad 0/I/II	Grad III/IV	
GA;AA	63 63,00 75,90 87,50	9 9,00 52,94 12,50	72 72,00
GG	20 20,00 24,10 71,43	8 8,00 47,06 28,57	28 28,00
	83 83,00	17 17,00	100

Die hier nicht erwähnten Mutationen wiesen keine Assoziation mit der Leukopenie auf.

4.6.4 Maximale nicht-hämatologische Nebenwirkung

Bei den nicht-hämatologischen Nebenwirkungen beobachtet man beim AA-Genotyp des SNP RFC G80A ein häufigeres Auftreten von schweren Nebenwirkungen. Im *Kruskal-Wallis* Test unterschieden sich die drei Genotypen des SNP RFC G80A signifikant ($p=0,05$) voneinander. Die Rangsummen des AA-Genotyps tendierten zu den höheren Toxizitäten als die der anderen beiden Genotypen.

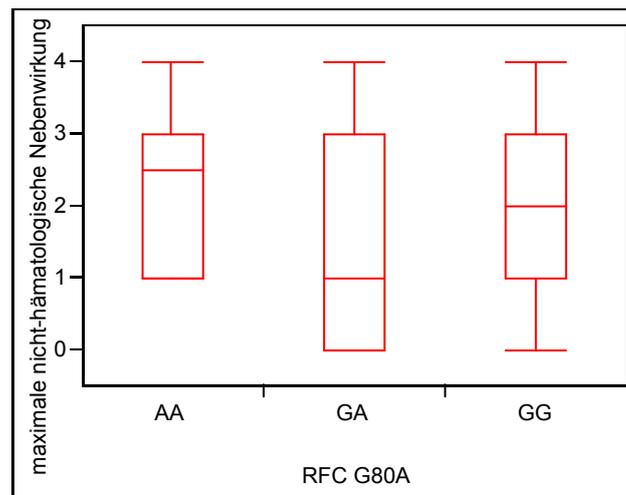


Abb. 33: Boxplot RFC G80A und maximale nicht-hämatologische Nebenwirkung. $p=0,05$

Im *Student's t* Test zeigte sich, dass sich nur die Mediane der beiden Genotypen AA und GA signifikant voneinander unterscheiden ($p=0,015$). Zwischen den beiden anderen Kombinationen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Ein Trend zu höheren Nebenwirkungsgraden ließ sich beim MTHFR 677 TT-Genotyp erkennen. Dieser war allerdings nur grenzwertig signifikant ($p=0,06$).

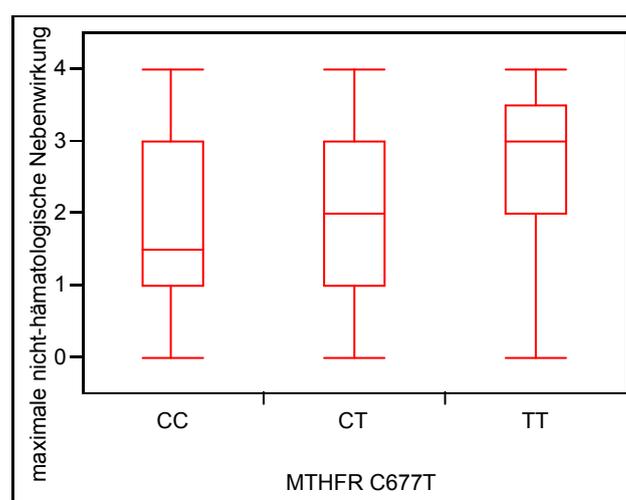


Abb. 34: Boxplot MTHFR C677T und maximale nicht-hämatologische Nebenwirkung. $p=0,06$

Nach klinischer Einteilung der Nebenwirkungen ließ sich eine Assoziation des MTHFR 677 TT-Genotyps mit dem Schweregrad III/IV erkennen.

- 69,23% der Patienten mit dem TT-Genotyp erlitten eine Grad III/IV Nebenwirkung.
- 93,44% der Patienten mit einer leichten Nebenwirkung (Grad 0/I/II) gehörten zum CC- oder CT-Genotyp.

Mit dem *likelihood ratio* Test konnte eine signifikant unterschiedliche Verteilung der Anzahl der Patienten je Genotyp in den Kategorien „leichte“ und „schwere“ Nebenwirkungen (siehe Tab. 28) bewiesen werden ($\chi^2=7,84$, $p=0,02$).

Tab. 28: Kontingenztabelle MTHFR C677T und maximale nicht-hämatologische Nebenwirkung (klinisch). $p=0,02$

Anzahl Total % Spalte % Zeile %	Grad 0/I/II	Grad III/IV	
CC	31 32,98 50,82 73,81	11 11,70 33,33 26,19	42 44,68
CT	26 27,66 42,62 66,67	13 13,83 39,39 33,33	39 41,49
TT	4 4,26 6,56 30,77	9 9,57 27,27 69,23	13 13,83
	61 64,89	33 35,11	94

Auch der graphischen Aufarbeitung der Kontingenztabelle konnte diese Assoziation entnommen werden: Die Punkte für die Genotypen CC, CT und den Grad 0/I/II lagen sehr dicht beieinander. Die Assoziation des TT-Genotyps mit den Nebenwirkungen des Grades III/IV erwies sich als nicht so stark.

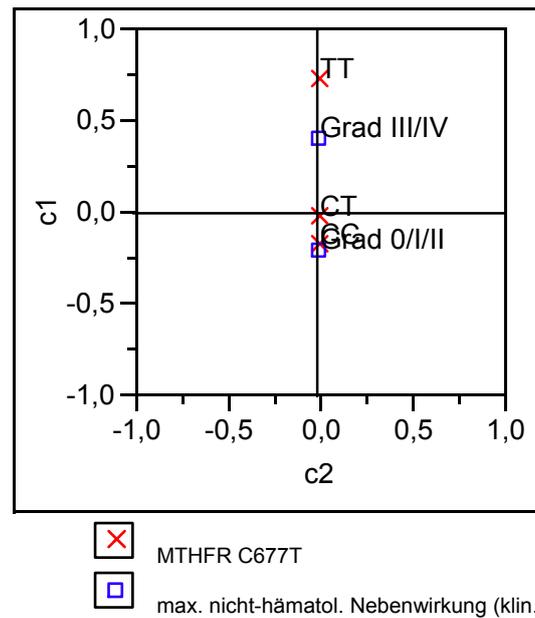


Abb. 35: Korrespondenzanalyse MTHFR C677T und maximale nicht-hämatologische Nebenwirkung (klinische Einteilung)

Die funktionelle Einteilung des SNP MTHFR C677T (CC und CT vs. TT) zeigte, dass sich die Rangsummen im *Wilcoxon* Test signifikant unterschieden. Patienten mit dem TT-Genotyp erlitten häufiger eine schwere Nebenwirkung (°III/IV) als Patienten der anderen Genotypen. Der *2-sample* Test bestätigte dies mit $p=0,02$.

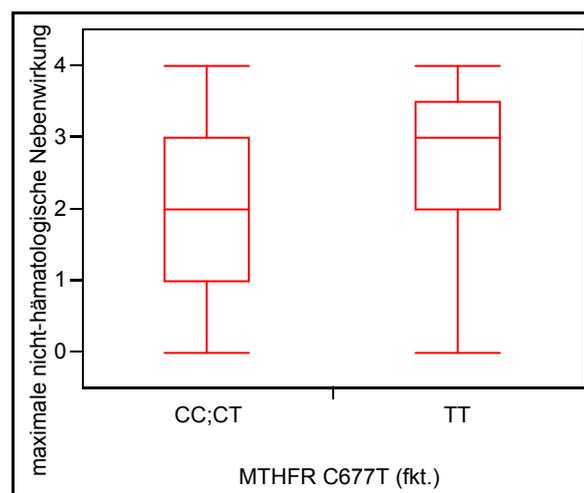


Abb. 36: Boxplot MTHFR C677T (funktionelle Einteilung) und maximale nicht-hämatologische Nebenwirkung. $p=0,02$

Nach klinischer Einteilung der Nebenwirkungen und funktioneller Einteilung der MTHFR C677T Genotypen ergab sich ein ähnlicher Sachverhalt, wie er schon oben - ohne funktionelle Unterteilung (siehe Tab. 28) - erkennbar war: CC und CT sind mit dem Auftreten der leichten Nebenwirkungen assoziiert, während der TT-Genotyp mit den schweren Nebenwirkungen verknüpft ist.

Mit dem *likelihood ratio* Test konnte eine signifikant unterschiedliche Verteilung der Anzahl der Patienten je Genotyp in den Kategorien „leichte“ und „schwere“ Nebenwirkungen in der 2×2 Kontingenztabelle ($p=0,007$, siehe Tab. 29) bewiesen werden.

Fisher's Exact Test zeigte, dass die Wahrscheinlichkeit eine Grad III/IV Nebenwirkung zu erleiden für den TT-Genotypen signifikant größer war als für die Gruppe der beiden anderen Genotypen ($p=0,008$).

Tab. 29: Kontingenztabelle MTHFR C677T (funktionelle Einteilung) und maximale nicht-hämatologische Nebenwirkung (klinische Einteilung). $p=0,007$

Anzahl Total % Spalte % Zeile %	Grad 0/I/II	Grad III/IV	
CC;CT	57 60,64 93,44 70,37	24 25,53 72,73 29,63	81 86,17
TT	4 4,26 6,56 30,77	9 9,57 27,27 69,23	13 13,83
	61 64,89	33 35,11	94

Wiederum ließ sich dies auch aus der Korrespondenzanalyse entnehmen:

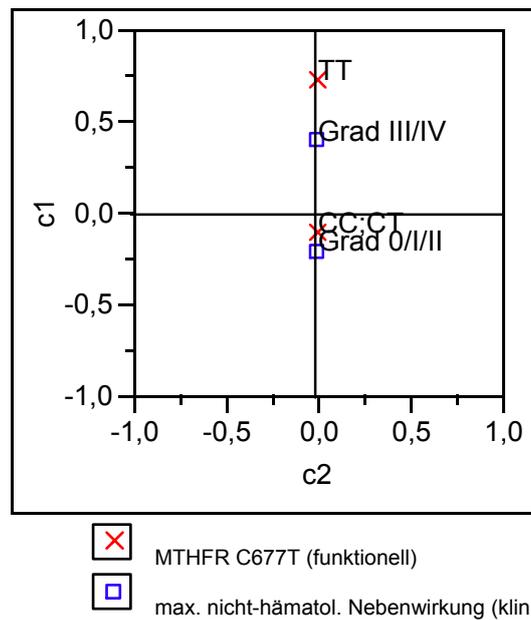


Abb. 37: Korrespondenzanalyse MTHFR C677T (funktionelle Einteilung) und max. nicht-hämatologische Nebenwirkung (klinische Einteilung)

In der Analyse des TS 28 bp *tandem/triplet repeat* zeigte sich eine Tendenz einer Verschiebung in Richtung der schwereren Nebenwirkungen bei Vorliegen mindestens eines 3R-Allels. Hier konnte dennoch kein signifikanter Unterschied bestätigt werden (siehe Abb. 38).

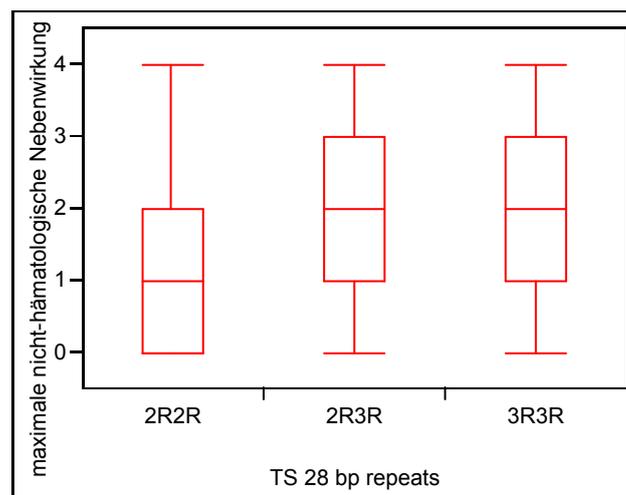


Abb. 38: Boxplot TS 28 bp *tandem/triplet repeat* und maximale nicht-hämatologische Nebenwirkung. $p=0,10$

Nach funktioneller Aufteilung des TS 28 bp *tandem/triplet repeat* und klinischer Unterteilung der Nebenwirkungen ließ die Korrespondenzanalyse eine Assoziation der Grad III/IV Nebenwirkung mit dem 3R3R-Genotypen erkennen (siehe Abb. 39). Die leichten Nebenwirkungen waren mit dem 2R2R- und 2R3R-Genotyp assoziiert. Allerdings konnten weder der *likelihood ratio*, noch *Fisher's Exact* Test einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen nachweisen.

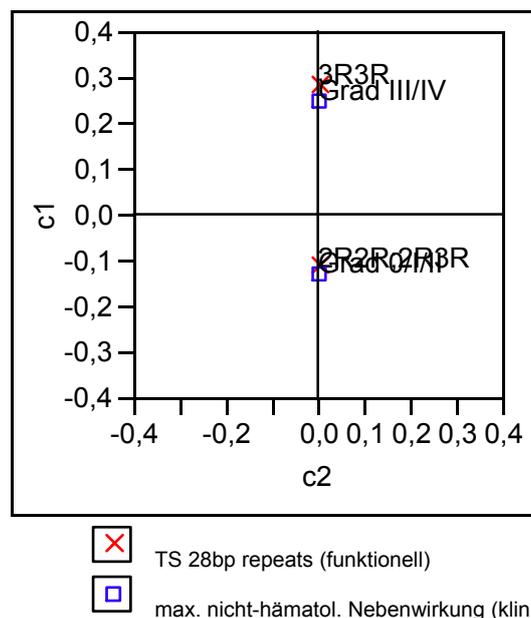


Abb. 39: Korrespondenzanalyse TS 28 bp *tandem/triplet repeat* und maximale nicht-hämatologische Nebenwirkung (klinische Einteilung). $p > 0,05$

Die hier nicht erwähnten Polymorphismen zeigten keinen Zusammenhang mit der maximalen nicht-hämatologischen Nebenwirkung.

Die *linear fit* Analyse der maximalen nicht-hämatologischen Nebenwirkung und dem Risikoindex zeigte einen linearen Zusammenhang. Mit ansteigendem Summenwert des Index stieg auch die Schwere der nicht-hämatologischen Nebenwirkungen. Es ergab sich ein R^2 von 0,05 ($p = 0,04$).

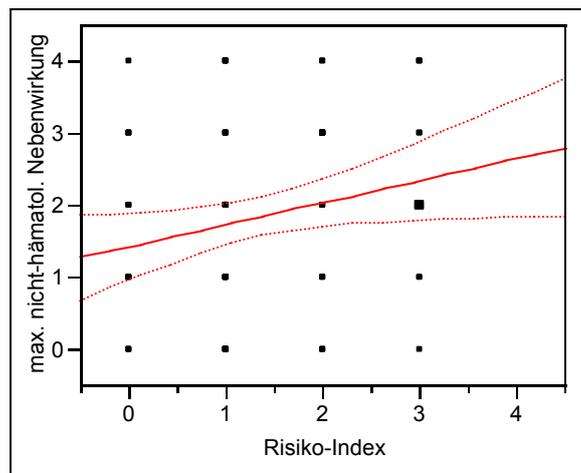


Abb. 40: linear fit Analyse von maximaler nicht-hämatologischer Nebenwirkung und Risikoindex. ($p=0,04$)

Der Wert für die maximale nicht-hämatologische Nebenwirkung (MNN) setzte sich wie folgt zusammen:

$$\text{MNN} = 1,43 (\pm 0,24) + 0,30 (\pm 0,15) \times \text{Risikoindex.}$$

5 Diskussion

In den letzten Jahren ist für primäre Non-Hodgkin-Lymphome des zentralen Nervensystems (PCNSL) eine steigende Inzidenz beobachtet worden⁸⁷. Bei ca. 0,5 Neuerkrankungen pro Jahr und 100.000 Einwohnern treten in Deutschland ungefähr 400 Neuerkrankungen auf. Histologisch handelt es sich um diffus-großzellige Lymphome der B-Zell-Reihe⁴⁶. Therapeutisch werden sowohl die Ganzhirnbestrahlung, als auch Methotrexat-enthaltende Chemotherapien eingesetzt. Durch diese werden 5-Jahres-Überlebensraten von 19 – 35% erreicht.

Methotrexat wird zur Therapie der rheumatoiden Arthritis, des systemischen Lupus erythematodes, der Psoriasis und von Malignomen wie Lymphomen, Mammakarzinomen oder Leukämien eingesetzt. Häufig ist Methotrexat mit schwerwiegenden Nebenwirkungen verbunden. Die Patienten leiden oft an oraler Mukositis, Alopezie, Übelkeit, Erbrechen und besonders an der akuten Myelosuppression, die die komplikationsreichste Nebenwirkung darstellt.

Methotrexat ist ein Folsäureantagonist und wird wie Folsäure verstoffwechselt. Mechanismen der Resistenz von Tumorgewebe gegenüber Folsäureantagonisten sind für den Erfolg einer Chemotherapie bedeutsam. Mutationen in Genen des Folsäurestoffwechsels sind bekannt und sind zum Teil mit einer veränderten Enzymfunktion, veränderter Überlebenszeit und mit Nebenwirkungen der Therapeutika assoziiert. Sehr wichtig ist die Assoziation von Polymorphismen mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf, beziehungsweise erhöhter Toxizität einer Methotrexat-Therapie. Ließe sich das Ansprechen auf die HD-MTX-Therapie mit dem Nachweis eines oder mehrerer Polymorphismen in Enzymen des Folsäurestoffwechsels vorhersagen, so könnte es evtl. zukünftig möglich sein für jeden Patienten nach Genotypisierung eine angepasste Therapie zu entwickeln.

5.1 Diskussion der Methodik

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bei 154 Patienten mit primärem ZNS-Lymphom fünf Polymorphismen in drei Genen des Folsäurestoffwechsels analysiert. Für zwei Polymorphismen in der Methylentetrahydrofolatreduktase und den Polymorphismus im reduzierten Folat-Carrierprotein wurden Protokolle zur Analyse mit Hilfe der LightCycler®-Technologie entwickelt.

Die beiden anderen Mutationen in der Thymidylat-Synthase wurden mittels konventioneller PCR, Restriktionsenzym-Verdau und Agarose-Gel-Elektrophorese nachgewiesen.

Andere Autoren analysierten die Mutation in der MTHFR hauptsächlich mittels konventioneller PCR, Restriktionsenzym-Verdau und anschließender RFLP-Analyse in einem Agarose-Gel^{6,11,34,35,66,80,83,132}. Ein Nachteil dieser Methode ist einerseits der hohe Zeitaufwand von ca. 270 Minuten für 24 Proben, und dass durch die vielen aufeinander folgenden Arbeitsschritte die Gefahr der Verschleppung von Kontaminationen besteht, die die genetischen Analysen stören können. Auch unspezifische PCR-Produkte können zum Misslingen der Genotypisierung beitragen. Andererseits zeigt die häufige Anwendung der Versuchsprotokolle in der Literatur, dass die mit der Methode erzielten Resultate valide und reproduzierbar sind.

Der LightCycler ist ein in sich geschlossenes System. In den Reaktionskapillaren kann die Amplifikation und Genotypisierung - ohne manuelle Weiterverarbeitung des PCR-Produkts - erfolgen. Dies spart Zeit und minimiert die Gefahr einer Kontamination³. Durch die Schmelzkurvenanalyse im LightCycler lassen sich Punktmutationen schnell und ohne großen Aufwand detektieren. Die Produktamplifikation kann in *real time* am Monitor mitverfolgt werden und die anschließende Schmelzkurvenanalyse ebenfalls direkt ausgewertet werden. Das Genotypisieren von 31 Proben dauert nur ca. 50 Minuten.

Itoga *et al.* zeigten, dass die Resultate einer Genotypisierung mittels Schmelzkurvenanalyse, SNaPshot Analyse, DHPLC Analyse und einer PCR-

SSCP Analyse identisch waren⁵⁶. Gleiches zeigte Zhang *et al.* beim Vergleich mit der oben beschriebenen konventionellen Methode¹³⁶.

Durch die unterschiedlichen Schmelzpunkte der sondengebundenen DNA mit und ohne Mutation kann eine zuverlässige Aussage über den vorliegenden Genotyp gemacht werden. In den Versuchen zeigte sich eine Temperaturdifferenz der Maxima in den Schmelzkurven von 5,9°C (MTHFR A1298C) über 8,6°C (MTHFR C677T) bis 12°C (RFC G80A). Man kann davon ausgehen, dass bei Differenzen größer als 5°C eindeutig eine Mutation vorliegt³. Die Analyse der Schmelzpunkte war eindeutig und reproduzierbar.

Etienne *et al.* konnten durch den Einsatz verschiedener *Hybridization Probes* sogar beide Polymorphismen der MTHFR in einem Ansatz analysieren^{27,28}.

In Vorversuchen wurde die Erfahrung gemacht, dass entgegen der Meinung von Aslanidis *et al.* das Aufbereiten der Proben-DNA von entscheidender Bedeutung sein kann³: Extrahierte DNA aus Tumorpräparaten, die in Paraffin eingebettet waren, ließ sich im LightCycler® nicht amplifizieren. In dem relativ geringen Reaktionsvolumen schienen Verunreinigungen, entweder von der Fixierung oder aus der Extraktion, eine spezifische Reaktion zu unterbinden.

Die Notwendigkeit zur Genotypisierung speziell auf jeden Polymorphismus angepasste *Hybridization Probes* verwenden zu müssen ist sicher kostenintensiver als die Standardmethode mittels konventioneller PCR. Bei kleinen Fallzahlen überwiegen aber sicher der zeitliche Vorteil und der einfache Versuchsaufbau.

Die Polymorphismen im Gen der Thymidylat-Synthase wurden anhand der in der Literatur beschriebenen Protokolle analysiert. Nicht nur für den 28 bp *tandem/triplet repeat*⁵¹, sondern auch für die 6 bp Deletion¹¹⁵ wurden sowohl die Primer-Sequenzen als auch die Parameter für die PCR übernommen. Nach der PCR erfolgte entweder gleich die Auftrennung im Agarose-Gel oder zuvor noch ein Restriktionsenzym-Verdau mittels *Dra I* (6 bp Deletion). Die in der Literatur beschriebenen Resultate konnten vollständig reproduziert werden: Mit den Parametern der PCR ließen sich spezifische Amplifikate erzeugen, in der Gel-Elektrophorese konnten die Banden eindeutig zugeordnet werden.

Anders als bei Punktmutationen, kann man zur Untersuchung größerer Mutationen die Schmelzkurvenanalyse des LightCyclers nicht einsetzen. So konnte in den vorliegenden Fällen weder für die Deletion, noch für die 28 bp Wiederholungen in der TS spezifische Sonden hergestellt werden. Alternativ hätte man die Mutationen nach der Amplifikation sequenzieren lassen müssen. Man hätte so ohne zusätzlichen Aufwand eine weitere in der Literatur beschriebene Punktmutation innerhalb der 28 bp Wiederholungen^{37,59,65,68,74,76,135} analysieren und in die Korrelation mit einbeziehen können. Auf der anderen Seite ist die Sequenzierung im Vergleich zur Standardmethode deutlich kostenintensiver.

Allgemein einschränkend muss angemerkt werden, dass sämtliche Analysen an Blutproben der Patienten erfolgten und nicht direkt an Tumor- oder Biopsiepräparaten. Davon ausgehend, dass „normale“ genomische DNA den genetischen Hintergrund für die toxischen Nebenwirkungen darstellt, so stellt die Tumor-DNA den genetische Hintergrund für das therapeutische Ansprechen^{68,113,118} dar. Mutationen in Tumor-DNA könnten daher Auswirkungen auf den Erfolg einer Therapie haben. In diesem Zusammenhang könnte auch eine Expressionsanalyse der Proteine des Folatzyklus im „normalen“ und Tumorgewebe hilfreich sein⁶⁹. Anhand derer könnte auf die Verstoffwechslung von Methotrexat und dessen Metaboliten geschlossen werden und so wiederum Aussagen über eine Wirksamkeit bzw. eine eventuelle Resistenz getroffen werden.

Um das therapeutische Ansprechen, bzw. das Ansprechen des Tumors auf die Therapie zu untersuchen, hätte der Mutationsstaus der Tumor-DNA bestimmt werden und mit den Zeiten im OAS und PFS korreliert werden können.

Exemplarisch sollte anhand von 25 in Paraffin eingebetteten Tumorbiopsien versucht werden den Mutationsstatus der Tumor-DNA zu bestimmen. Allerdings ließ sich die extrahierte DNA nicht im LightCycler amplifizieren. Es traten massiv Artefakte auf. Vermutlich inhibierten Rückstände der Paraffineinbettung oder der Substanzen zur DNA-Extraktion die PCR.

5.2 Epidemiologie

Das untersuchte Patientenkollektiv zeigte hinsichtlich Alter und Geschlechterverhältnis keine statistisch signifikante Abweichung von publizierten epidemiologischen Daten^{5,29,43,46,49,63,84,87,88,97,98,109}.

Das Geschlechter-Verhältnis von 1,3:1 (♂:♀) entsprach dem von Batchelor und Loeffler angegebenen Verhältnis von 1,2-1,7:1⁵. Ebenfalls konnte bestätigt werden, dass der Erkrankungsgipfel im 5. bis 7. Lebensjahrzehnt liegt⁹⁷: Über 80% der Studienteilnehmer gehörten bei Studienaufnahme zu diesem Altersabschnitt (mittleres Alter bei Studieneinschluss: 60,76 Jahre).

5.3 Allelfrequenzen bei Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen

Für jeden der fünf untersuchten Polymorphismen wurde eine individuelle Aufstellung über die Häufigkeiten der Genotypen erstellt. Mit diesen Häufigkeiten wurde unter Zuhilfenahme des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts eine „erwartete Verteilung“ der Genotypen errechnet. Zusätzlich wurde jeweils die Allelfrequenz und das zugehörige 95% Konfidenzintervall für die Mutation berechnet.

Die Häufigkeiten der homozygot mutierten Genotypen wurden weiterhin mit verschiedenen in der Literatur beschriebenen Kontrollgruppen verglichen^{12,35,40,70,85,103,105,106,107,114,117,132}. Diese setzten sich vornehmlich aus US-amerikanischen und europäischen Populationen zusammen, darunter auch 5 deutsche Gruppen^{7,24,81,91,136}, beinhalteten aber auch eine japanische⁸⁰ und eine chinesische Population¹³⁵. Bei US-amerikanischen Kontrollgruppe wurden nur kaukasische Probanden berücksichtigt. Für die Mutationen in der TS konnten leider keine adäquaten deutschen Kontrollgruppen gefunden werden.

Da keine Fall-Kontroll-Studie vorliegt und der χ^2 -Test nicht mit Bonferroni-Korrektur für multiples Testen durchgeführt wurde, hat der vorliegende Vergleich jedoch nur explorativen Charakter.

Den SNP MTHFR C677T betreffend, konnte eine statistisch signifikante Assoziation des TT-Genotyps mit dem Auftreten eines PCNSL festgestellt werden. In zwei von drei deutschen Kontrollgruppen war der TT-Genotyp signifikant seltener vertreten. Auch bei kombinierter Betrachtung der deutschen Kontrollgruppen konnte dies bestätigt werden. Ebenso zeigte der Vergleich mit einer großen US-amerikanischen Kontrollgruppe den gleichen Sachverhalt hoch-signifikant an. Somit kann proklamiert werden, dass der MTHFR TT-Genotyp einen Risikofaktor für ein PCNSL darstellt. Während Niclot *et al.* bei einer französischen Population keine Assoziation feststellen konnten⁸⁵, stehen die Ergebnisse dieser Arbeit in Einklang mit den Ergebnissen von Skibola *et al.*, die 2004 zeigten, dass Patienten mit dem TT-Genotyp ein erhöhtes Risiko besitzen an einem Lymphom zu erkranken¹⁰⁵.

Die untersuchten Patienten der G-PCNSL-SG-1 Studie unterschieden sich im SNP MTHFR A1298C nur von einer japanischen Kontrollgruppe signifikant. Der CC-Genotyp war in der PCNSL-Gruppe häufiger anzutreffen. Allerdings divergiert die C-Allel-Frequenz extrem: Für Japaner wird eine Frequenz von 0,19, für Deutsche von 0,30 - 0,33 angegeben, d.h. in einer deutschen Population kommt das C-Allel ca. 1,7-fach häufiger vor. Die Patienten der vorliegenden Studie konnten daher nicht mit der japanischen Kontrollgruppe verglichen werden.

Linnebank *et al.* untersuchten bei 31 deutschen PCNSL-Patienten (alle vom DLBCL-Subtyp) und 142 Kontrollpersonen, ob unter anderem die Polymorphismen der MTHFR die Suszeptibilität für die Erkrankungen verändern. Weder MTHFR C677T noch A1298C zeigte eine signifikante Assoziation mit der Erkrankung⁷³.

Der SNP RFC G80A zeigte in der Verteilung der Genotypen keinen Unterschied zu den Kontrollgruppen, weder zur deutschen und britischen, noch zu der sehr großen US-amerikanischen Kontrollgruppe mit über 1900 Probanden. Man kann davon ausgehen, dass diese Punktmutation keine schützenden oder prädisponierenden Faktor für ein PCNSL darstellt. Die von Lightfoot *et al.* beobachtete Assoziation des AA-Genotyps mit einem erhöhten Risiko für ein NHL konnte für das PCNSL nicht bestätigt werden⁷⁰.

Wie oben schon erwähnt, gab es für die Mutation der TS keine adäquaten deutschen Kontrollgruppen.

Für den Deletions-Polymorphismus der 3'-UTR zeigte sich ein signifikanter Unterschied zur chinesischen Kontrollgruppe von Zhang *et al.*¹³⁵. Personen ohne die Deletion, gleich ob homo- oder heterozygot, hätten demnach ein höheres Risiko an einem PCNSL zu erkranken. Ähnlich zu japanischen Kontrollgruppen unterscheiden sich die Allelfrequenzen in kaukasischen und chinesischen Bevölkerungsgruppen so stark, dass sich ein Vergleich verbietet¹¹⁸. Das Ergebnis von Skibola *et al.*, dass die homozygote Deletion einen schützenden Faktor für ein NHL darstellt¹⁰⁵, konnte an dem für das PCNSL untersuchte Kollektiv nicht nachvollzogen werden.

Beim *tandem/triplet repeat* Polymorphismus der TS zeigte sich wieder ein signifikanter Unterschied zur chinesischen Kontrollgruppe¹³⁵ (G-PCNSL-SG1 71% 2R2R/2R3R, 29% 3R3R vs. Zhang *et al.* 35% 2R2R/2R3R, 65% 3R3R). Im Gegensatz dazu zeigte sich beim Vergleich der PCNSL-Gruppe mit einer französischen und einer britischen Population ein umgekehrtes Verhältnis. Patienten, die homozygot für den *triplet repeat* sind, waren häufiger in der PCNSL-Gruppe vertreten. Unter Vernachlässigung der chinesischen Kontrollgruppe (s. o.) stellte der 3R3R-Genotyp somit in der untersuchten Population einen prädisponierenden Faktor für ein PCNSL dar. Damit konnte das Ergebnis von Niclot *et al.* bestätigt werden. In ihrer Studie war der 3R3R-Genotyp ebenfalls mit einem erhöhten Risiko für die Erkrankung an einem NHL assoziiert⁸⁵.

Abgesehen vom SNP MTHFR C677T und dem *tandem/triplet repeat* der TS entsprechen die Ergebnisse dieser Arbeit den Ergebnissen von Lightfoot *et al.*, die keinen Zusammenhang der Polymorphismen mit dem Erkrankungsrisiko für ein NHL finden konnten⁷⁰.

Alles in allem dürfen die vorliegenden Resultate aber nur als Hinweise gewertet werden. Zunächst muss darauf hingewiesen werden, dass, wie schon erwähnt, die vorliegende Studie keine Fall-Kontroll-Studie darstellt. Für die Kontrollgruppen aus der Literatur lagen häufig keine Informationen über Geschlecht oder Alter vor. In einer Fall-Kontroll-Studie hätten diese Störfaktoren durch eine *matched pairs* Technik eliminiert werden können.

Weiterhin muss beachtet werden, dass bei den Polymorphismen der TS eine entsprechende deutsche Kontrollgruppe fehlte, die Kontrollpopulationen häufig nur aus wenigen Teilnehmern bestanden und auch die Studienpopulation schon aus epidemiologischen Gründen nur sehr klein war.

Auffallend war außerdem, dass es innerhalb der Kontrollgruppen, deren Patienten ja alle kaukasischer Herkunft waren, unterschiedliche Erkrankungsrisiken gab. Dies könnte daran gelegen haben, dass es Unterschiede in den zirkulierenden Folsäurepools gibt. Basierend auf einer nordamerikanischen Studie, haben Ulrich *et al.* berichtet, dass der 3R3R-Genotyp, abhängig von der Folsäureaufnahme, sowohl mit einem erniedrigten als auch erhöhten Erkrankungsrisiko für ein kolorektales Karzinom vergesellschaftet ist¹¹⁴. Aus diesem Grund wäre es angebracht, nachfolgende Studien, die sich mit den Genen des Folsäurestoffwechsels beschäftigen, immer vor dem Hintergrund der Folsäureaufnahme und auch des Serumfolsäurespiegels zu betrachten⁷⁰.

Sehr interessant scheint der Sachverhalt, dass selbst innerhalb der Gruppe der hämatologischen Erkrankungen einzelne Polymorphismen einen entgegengesetzten Effekt haben können. So prädisponieren viele der oben genannten Polymorphismen zwar für ein Lymphom außerhalb des zentralen

Nervensystems, stellen aber andererseits gleichzeitig einen schützenden Faktor für eine Leukämie dar: Skibola *et al.* konnten zeigen, dass erwachsene Probanden mit dem MTHFR 677 TT-Genotyp ein 4,3-fach reduziertes Risiko und mit dem MTHFR 1298 CC-Genotyp ein 14-fach reduziertes Risiko besitzen an einer ALL zu erkranken¹⁰⁷. Wiemels *et al.* zeigten, dass Kinder mit dem MTHFR 677 CT- und TT-Genotyp ein signifikant erniedrigtes Risiko haben an einer Leukämie mit MLL *Rearrangement* zu erkranken als Kinder des Wildtyps. Der MTHFR 1298 CC-Genotyp senkt signifikant bei Kindern das Risiko für eine hyperdiploide Leukämie¹³².

5.4 Polymorphismen und deren Auswirkung auf die Überlebenszeit und das *Outcome*

5.4.1 Cox-Regression

In der Cox-Regression wird der Effekt mehrerer Einflussgrößen auf eine Zielvariable, im vorliegenden Fall auf die Überlebenszeiten im OAS und PFS, untersucht.

Allgemein kann gesagt werden, dass das Cox-Modell eine Schätzung des Therapieeffekts auf die Überlebenszeit liefert, adjustiert für die anderen Einflussgrößen des Regressionsmodells¹⁴¹. Zu Beginn jeder Analyse wird das Gesamtmodell mit und ohne Kovariaten analysiert. Nur bei einem signifikanten Unterschied in diesen beiden Testreihen gibt es eine relevante Differenz der Kovariaten.

Die beiden vorliegenden Analysen zu OAS und PFS erwiesen sich ohne signifikante Differenz im Gesamtmodelltest. Eine weitere Betrachtung des Modells unterblieb aus diesem Grund.

5.4.2 Methylentetrahydrofolatreduktase

In den letzten Jahren sind mehrere Studien veröffentlicht worden, in denen Polymorphismen in Genen des Folatstoffwechsels mit der Effektivität von Methotrexat korreliert wurden. Ein großer Teil derer beschäftigte sich mit der Therapie der rheumatoiden Arthritis. Als Maß der Effektivität wurden häufig die Höhe der benötigten MTX-Dosis, die Veränderungen des CRP und der Blutsenkungsgeschwindigkeit, als Marker für die entzündliche Aktivität, und die Anzahl der geschwollenen Gelenke vor und nach Therapie betrachtet.

Im Allgemeinen werden bei der Therapie der RA nur sehr geringe Mengen MTX eingesetzt, meistens zwischen 5 und 20 mg pro Woche.

Es wurde gezeigt, dass Patienten mit dem 1298 C-Allel signifikant niedrigere Dosen an MTX benötigen als Patienten ohne dieses Allel ¹²⁰. Bei Patienten mit einer seronegativen juvenilen Polyarthritid ließ sich ähnliches zeigen: Das 1298 C-Allel war mit niedrigeren CRP-Werten assoziiert als das 1298 A-Allel ⁹⁹. Für den SNP C677T konnte kein Zusammenhang mit der Effektivität einer Therapie mit MTX bei rheumatoider Arthritis bestätigt werden ^{66,120}.

Auch bei der Behandlung hämatologischer Erkrankungen wird MTX eingesetzt: Kinder, die an einer ALL erkrankt waren, hatten nach einer MTX-haltigen Therapie ein erhöhtes Rückfall-Risiko, wenn sie den MTHFR 677 TT-Genotyp besaßen ($\chi^2 = 4,38$; $p = 0,036$), ebenso hatten sie ein erniedrigtes rückfallfreies Überleben (*RFS*) im 10. Jahr nach Erkrankungsbeginn (TT: 66,6% vs. CC: 78,9%). Auch mit einer Cox- Regressionsanalyse konnte für den mutierten Genotyp ein erhöhtes Risiko für einen Rückfall nachgewiesen werden. Für den SNP MTHFR A1298C bestand keine Assoziation mit einem Rückfall ².

In der Studie von Seidemann *et al.* stellte der MTHFR C677T Genotyp hingegen keinen Risikofaktor für einen Rückfall dar ¹⁰¹.

Die zwei Polymorphismen der MTHFR wurden schon in vielen Arbeiten untersucht und in Beziehung zu der Effektivität von Methotrexat gesetzt. Häufig zeigten sich widersprüchliche Ergebnisse bei verschiedenen Tumorentitäten und therapeutischen Ansätzen. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte weder ein Zusammenhang mit dem *Outcome* noch ein signifikanter Zusammenhang

zwischen den Polymorphismen der MTHFR und dem OAS und PFS als Ausdruck der Effektivität einer Chemotherapie mit MTX gefunden werden.

5.4.3 Reduziertes Folat-Carrierprotein

MTX wird zum überwiegenden Anteil über das reduzierte Folat-Carrierprotein in die Zelle aufgenommen^{38,118}. Nur intrazelluläres MTX kann über die Inhibition von Enzymen, die wichtige Bausteine für die DNA-Synthese liefern, zytotoxisch wirken³⁹. Faktoren, die die Aufnahme von MTX in die Zelle beeinflussen, wie zum Beispiel die Anzahl der Transportproteine, die in der Zellmembran exprimiert werden oder ein Defekt in diesen Transportproteinen, können das Ansprechen auf eine Chemotherapie beeinflussen.

In der ersten Transmembrandomäne, in der sich auch der SNP RFC G80A befindet, kommen Mutationen vor, die eine Resistenz gegenüber Folsäureantagonisten bedingen. Diese Mutationen können den Transporter-Substrat-Komplex und/oder die Transporteraffinitäten verändern¹³⁸.

Die Verteilung der mittleren Überlebenszeiten im OAS über die drei Genotypen des SNP RFC G80A zeigte nur eine Tendenz zu höheren Überlebenszeiten vom GG- hin zum AA-Genotyp. Das PFS ließ keinen deutlichen Trend erkennen. Auch das *Outcome* zeigte keinen signifikanten Zusammenhang mit dem SNP. Somit kann davon ausgegangen werden, dass bei Patienten mit einem PCNSL, die mit HD-MTX therapiert werden, der Polymorphismus im reduzierten Folat-Carrierprotein keinen Einfluss auf die Effektivität gemessen an der Überlebenszeit und das *Outcome* dieser Therapie hat.

Gorlick *et al.* analysierten die RFC Expression in Blasten von Patienten mit einem ALL-Rezidiv nach MTX-Therapie. Bei 71% der Blasten stellten sie einen mangelhaften MTX-Transport über die Zellmembran fest. In 6 von 9 dieser Zellen konnten sie eine erniedrigte RFC Expression beobachten³⁸.

Einen ähnlichen Sachverhalt beobachteten Levy *et al.*: Sie untersuchten 40 Kinder mit einer neu diagnostizierten ALL. Kinder mit einer niedrigeren RFC Expression zeigten im Vergleich zu den anderen Kindern ein geringeres *EFS*

und als weiteren Marker für ein schlechteres *Outcome* eine hohe *PCNA*-Expression (*proliferating nuclear cell antigen*). Ein gestörter MTX-Transport war in dieser Studie eindeutig mit einer erniedrigten RFC-RNA Expression vergesellschaftet⁶⁹.

Guo *et al.* zeigten beim Osteosarkom, dass eine niedrige RFC Expression mit schlechterem Ansprechen auf eine Chemotherapie assoziiert ist⁴².

Yang *et al.* beobachteten den Einfluss des RFC G80A Polymorphismus auf das Ansprechen einer präoperativen, MTX-enhaltenden Chemotherapie ebenfalls bei Patienten mit Osteosarkom: Ein Einfluss konnte nicht festgestellt werden¹³⁴.

Dies wurde auch von Whetstone *et al.* bestätigt, die herausfanden, dass der SNP die Transporteigenschaften des Carrierproteins für MTX nicht ändert¹³¹.

Im Gegensatz dazu fanden aber Laverdière *et al.* heraus, dass Patienten mit einer ALL und dem RFC 80 A-Allel ein signifikant niedrigeres *EFS* hatten als die anderen Patienten. Zusätzlich konnten sie zeigen, dass diese Patienten auch höhere MTX Plasmaspiegel aufwiesen als die anderen. Allerdings konnten sie keinen Zusammenhang zwischen *Outcome* und dem MTX-Spiegel nachweisen⁶⁷.

Alles in Allem lässt die Datenlage vermuten, dass Patienten mit dem 80AA Genotyp zu höheren Folat- und MTX-Plasmaspiegeln tendieren als Patienten der anderen beiden Genotypen.

Für eine mangelhafte RFC Expression in menschlichen Tumorzelllinien wird die Methylierung einer CpG-Insel in der Promoter-Region verantwortlich gemacht, da diese in MTX-sensitiven Tumorzelllinien nicht gefunden werden kann¹³³. Patienten, deren PCNSL mit HD-MTX therapiert wurde und deren RFC-Promotor methyliert war, wiesen eine geringe Anzahl an kompletten Remissionen (*CR*), ein schlechteres *EFS* und OAS als Patienten ohne Methylierung des Promotors auf³⁰.

Aus diesen Gründen wäre es interessant die MTX-Plasmaspiegel der Patienten der vorliegenden Arbeit mit deren *Outcome* und dem RFC-Status zu korrelieren.

5.4.4 Thymidylat-Synthase

Die Thymidylat-Synthase war schon oft Gegenstand von Untersuchungen, die sich mit den Auswirkungen von Genpolymorphismen auf das *Outcome* einer Chemotherapie mit 5-FU beschäftigten. Im Zusammenhang mit MTX wurde die TS bisher relativ selten untersucht. Die TS kann im Gegensatz zur DHFR nicht direkt durch MTX gehemmt werden, sondern nur über den Umweg der MTX-Polyglutamate^{82,118}.

Krajinovic *et al.* konnten 2002 zeigen, dass Kinder, die an einer ALL erkrankt waren, mit 4 g/m² MTX behandelt wurden und homozygot für die 3R waren, in der Gruppe mit einem Rückfall überrepräsentiert waren. Homozygote Patienten (3R3R) hatten ein höheres Rückfall-Risiko (OR 4,1; 95% CI= 1,9-9,0; p=0,001). Sie erklärten dies mit einer Überexpression der TS, die durch den homozygoten 3R Mutationsstatus verursacht wird^{54,58}. Fehlinhibition des Zielenzyms (TS) ist häufig mit einer Enzymüberexpression vergesellschaftet⁶⁴.

Ähnliches beobachteten Iacopetta *et al.* bei Patienten mit kolorektalem Karzinom, die mit 5-FU behandelt wurden. Homozygotie für 3R der TS war mit einem kürzeren Überleben assoziiert⁵⁴.

Villafranca *et al.* und Marsh *et al.* zeigten ebenfalls, dass ein mehrfaches Vorhandensein der 28 bp mit einer erhöhten TS Expression und einer erniedrigten Sensitivität für MTX und 5-FU verknüpft war^{79,125}.

Zusammenfassend scheint die 3R-Homozygotie bei mehreren Krankheitsbildern einen negativen Einfluss auf den Krankheitsverlauf zu haben. In der G-PCNSL-SG-1-Studie dagegen zeigte der 28 bp *tandem/triplet repeat* Polymorphismus keine Auswirkung auf das Gesamtüberleben (OAS), das progressionsfreie Überleben (PFS) und das *Outcome* der Patienten. Er scheint daher bei dieser Erkrankung keine Rolle zu spielen.

Uchida *et al.* berichteten, dass der Verlust der Heterozygotie am TS 28 bp *tandem/triplet* Locus in Tumorzellen bei Patienten mit kolorektalem Karzinom unter Fluoropyrimidin-Therapie das Ansprechen des Tumors und die Überlebensrate beeinflusst: Tumorzellen heterozygoter Patienten (2R/3R)

zeigten entweder einen 2R/loss- oder einen 3R/loss-Genotyp am TS-Lokus auf dem Chromosomen 18. 80% (8/10) der Patienten mit dem 2R/loss-Genotyp sprachen im Vergleich zu 14% (1/7) der Patienten mit dem 3R/loss-Genotyp auf die Therapie mit Flouropirimidinen an. Das gleiche Bild zeigte sich in der Analyse der Überlebenszeiten (333 Tage vs. 203 Tage). Uchida *et al.* zeigten damit, dass einerseits ein Erfolg einer Therapie mit 5-FU vom Genotyp beeinflusst wird und andererseits, dass die 3-fache Wiederholung der Sequenz eine negative Determinante für das *Outcome* darstellt¹¹³.

In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu erfahren in welchem Ausmaß ein Verlust der Heterozygotie bei PCNSL vorkommt, und ob dieser Verlust einen Einfluss auf das *Outcome* der Erkrankung darstellt.

Innerhalb des *tandem/triplet repeat* Polymorphismus (*VNTR*) befindet sich im zwölften Nukleotid der zweiten Wiederholung eine Punktmutation^{37,65,68,76}. Kawakami *et al.* konnten durch ein Heteroduplex-Produkt bei einer Gel-Elektrophorese in einem hochauflösenden Agarose-Gel beweisen, dass sich innerhalb der Wiederholungen ein SNP befindet, der Guanodin durch Cytosin (G → C) ersetzt^{59,76}. In einer Funktionsanalyse zeigte sich, dass die 3G Sequenz mit einer 3 bis 4-fach erhöhten Translationseffizienz^{58,76} im Vergleich zu den anderen verknüpft ist. Patienten mit einem kolorektalen Karzinom und der 3G Sequenz zeigten ein schlechtes Ansprechen auf eine Therapie mit 5-FU⁵⁹. In der Studie von Kawakami *et al.* zeigte sich der *VNTR* aber alleine als insuffizient für die Vorhersage des klinischen *Outcome*. Erst die Kombination mit dem SNP konnte die prädiktive Qualität verbessern⁵⁹.

Bezüglich einer Therapie mit MTX gibt es noch keine Studien inwieweit der SNP innerhalb des *VNTR* diese Therapie, deren *Outcome* und Nebenwirkungen beeinflussen kann. Daher wäre es interessant in einer weiteren Untersuchung den SNP in der *VNTR* zu sequenzieren und mit dem *Outcome* und der Toxizität einer HD-MTX-Therapie bei Patienten mit PCNSL zu korrelieren.

Der zweite analysierte Polymorphismus im Gen der Thymidylat-Synthase war bei den Patienten, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, nicht mit dem *Outcome*, aber tendenziell mit einem besseren Gesamtüberleben

assoziiert. Personen, die homozygot für den Deletions-Polymorphismus in der 3'-UTR waren (-6/-6), zeigten ein längeres Gesamtüberleben (OAS). Allerdings verfehlte diese Analyse ($p=0,08$) knapp das geforderte Signifikanzniveau ($p<0,05$). Daher sollte die beobachtete Tendenz nochmals an einer größeren Studienpopulation überprüft werden. Im Hinblick auf das PFS konnte keine Assoziation mit der 6 bp Deletion in der 3'-UTR gefunden werden.

Hinweise für einen protektiven Einfluss der -6-Homozygotie zeigten sich auch bei Krajnovic *et al.* bei der Untersuchung einer Gruppe von Kindern mit ALL im Jahr 2005: Zwar korrelierte der Deletions-Polymorphismus nicht mit dem rückfallfreien Überleben (RFS), betrachtete man jedoch den Polymorphismus in Rahmen einer Haplotypen-Analyse zusammen mit dem 28 bp *tandem/triplet repeat* Polymorphismus, so konnte gezeigt werden, dass Homozygotie für das deletierte Allel in der 3'-UTR (-6/-6) den für ein schlechteres EFS prädisponierenden Effekt der 3R Variante reduzierte^{64,65}.

5.5 Polymorphismen und deren Auswirkung auf die Toxizität von Methotrexat

5.5.1 Kombiniertes Risikohaplotyp

In der vorliegenden Arbeit wurde ein kombinierter Risikohaplotyp konstruiert. Er definiert sich über das Vorliegen von mindestens einer von fünf funktionell relevanten Genmutationen, die den Folsäure-Zyklus und damit die Metabolisierung von MTX beeinflussen könnten. Das Vorhandensein des TT-Genotyps des SNP MTHFR C677T, oder des CC-Genotyps des SNP MTHFR A1298C, oder mindestens einer Kopie des A-Allels des SNP RFC G80A, also GA oder AA, oder der homozygoten 6 bp Deletion in der 3'-UTR der TS oder der homozygoten *triplet repeat* in der 5'-UTR der TS war ausschlaggebend für die Zuordnung zum Risikohaplotyp.

Dieses Vorgehen ähnelte dem von Linnebank *et al.* Sie konstruierten einen Risikohaplotyp für Polymorphismen im Folsäure- und Methioninstoffwechsel bei

Patienten mit einem PCNSL. Der Risikohaplotyp umfasste folgende Punktmutationen: MTHFR C677T, MTHFR A1298C, Methionin-Synthase MTR A2756G und Transcobalmin 2 TC2 C776G. Sie zeigten, dass der kombinierte Risikohaplotyp mit einem erhöhten relativen Risiko (RR=4,7) für Veränderungen in der weißen Substanz des Gehirns nach einer MTX-haltigen Chemotherapie zur Behandlung eines PCNSL korreliert. Ursächlich dafür scheint zu sein, dass MTX die Bildung von 5,10-Methylen tetrahydrofolat verhindert und somit nicht nur in den Folsäurestoffwechsel, sondern auch in den Methioninstoffwechsel eingreift. Methionin und seine aktive Form SAM sind essentiell für die Myelinisierung des ZNS⁷².

Ähnlich wie bei der positiven Korrelation von Risikohaplotyp und Veränderungen in der weißen Substanz des Gehirns in der Arbeit von Linnebank *et al.*, konnte auch in dieser Arbeit eine Assoziation von Vorhandensein des Risikohaplotyps und dem Auftreten von Nebenwirkungen nachgewiesen werden. So zeigte sich in der Auswertung eine signifikante Korrelation eines positiven Risikohaplotyps mit dem Auftreten einer ausgeprägten Granulopenie.

Allerdings muss dahingehend auch auf ein widersprüchliches Ergebnis hingewiesen werden. In einem Fall korrelierte ein positiver Risikohaplotyp negativ mit dem Auftreten schwerer Granulopenie: Bei alleiniger Betrachtung von Patienten mit mindestens einem A-Allel des RFC G80A Polymorphismus (Risikohaplotyp positiv) zeigten diese bezüglich der Granulozyten weniger Nebenwirkungen als Patienten mit dem RFC 80GG Genotyp (Risikohaplotyp negativ).

Trotzdem stellte der Risikohaplotyp in dieser Arbeit einen guten prädiktiven Parameter für eine durch die HD-MTX-Therapie verursachte Granulopenie beim PCNSL dar. Um den Risikohaplotyp als globalen prädiktiven Parameter für Neutropenie oder Agranulozytose zu etablieren, müsste dieser noch in einem größeren Kollektiv und bei anderen Tumorentitäten, die ebenfalls mit MTX behandelt werden, getestet werden.

Die Betrachtung des Risikohaplotyps könnte sich besonders zur Abschätzung des individuellen Risikos eines Patienten für Nebenwirkungen vor Beginn einer Therapie mit hochdosiertem MTX eignen, da in die Bewertung alle untersuchten Polymorphismen einfließen.

Zu beachten ist aber, dass sich die Wirkungen zweier Polymorphismen unter Umständen gegenseitig eliminieren können. Um dem Rechnung zu tragen, wurden die Polymorphismen in dieser Arbeit unter besonderer Beachtung der funktionellen Eigenschaften der Genotypen analysiert.

5.5.2 Risikoindex

Zur besseren Risikodifferenzierung wurde ein Risikoindex (RI) erstellt. Hierzu wurde jedem Genotypen, der zum positiven Risikohaplotyp gehörte, ein Punkt zugeordnet. Für jeden Patienten wurden dann die Indexpunkte summiert. Maximal konnten somit bei fünf unterschiedlichen Polymorphismen fünf Punkte erreicht werden.

Weisman *et al.* konstruierten einen ähnlichen Index für Patienten mit rheumatoider Arthritis, die mit niedrig dosiertem MTX behandelt wurden. In ihren Index flossen folgende Genotypen ein und wurden mit einem Punkt bewertet: MTHFR 677TT, TS 2R2R, ATIC (Aminoimidazol-Ribonukleotid Transformylase) 347GG und SHMT1 (Serin Hydroxymethyltransferase 1) 1420CC. Der RI bewegte sich zwischen 0 und 3 (Median: 1). Ein Index von 3 war im Vergleich zum Index von 0 mit einer 7-fach erhöhten Wahrscheinlichkeit assoziiert eine Nebenwirkung zu erleiden. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wurde allerdings die TS mit dem 2R2R-Genotyp einbezogen¹²⁸. In der Literatur ist jedoch der TS 3R3R-Genotyp mit einer Tendenz zu höheren Plasma-Homocystein-Spiegeln¹¹², die das Auftreten von Nebenwirkungen begünstigen^{122,123} assoziiert. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb der 3R3R-Genotyp in den Risikohaplotyp und den Risikoindex einbezogen.

Dem Risikoindex konnte eine signifikante Korrelation mit klinisch wichtigen Parametern, wie der schwersten dokumentierten Nebenwirkung und der maximalen nicht-hämatologischen Nebenwirkung, nachgewiesen werden.

In Regressions-Analysen zeigt der R^2 -Wert den Zusammenhang zwischen den beiden linearen Variablen. In den vorliegenden Fällen konnte für die schwerste dokumentierte Nebenwirkung ein R^2 -Wert von 0,06 und für die maximale nicht-hämatol. Nebenwirkung von 0,05 berechnet werden. Ein R^2 -Wert von 1 bedeutet, dass der eine Parameter zu 100% von dem anderen Parameter abhängig ist. Ein Wert von 0 zeigt die völlige Unabhängigkeit beider Variablen. Obwohl diese Werte eher gegen 0, als gegen 1 tendieren, konnte ein signifikanter Zusammenhang gezeigt werden. Mit steigendem Index konnte eine Zunahme der Schweregrade in den beiden Kategorien verzeichnet werden.

Eine signifikante Korrelation des RI mit den Zeiten im OAS und/oder PFS ließ sich jedoch nicht feststellen.

Im Vergleich zum Risikohaplotyp weist der RI einige Stärken auf:

- Die durchgeführten statistischen Tests haben auf Grund der kontinuierlichen Abstufung des RI und der damit verbundenen höheren Datenqualität mehr statistische *Power*.
- Der RI ist problemlos erweiterbar: Zusätzliche Faktoren können ohne Weiteres mit einbezogen werden. Diesen könnte je nach Gewicht auch eine höhere Punktzahl zugewiesen werden.
- Weiterhin wäre es möglich einen Grenzwert zu definieren, der markiert, ab welchem Indexwert ein zu hohes Risiko für klinisch-relevante Nebenwirkungen besteht.

Damit ist der RI als globaler Parameter für das Auftreten von Nebenwirkungen bei einer Therapie mit hochdosiertem MTX geeignet. Auf der anderen Seite muss aber beachtet werden, dass die Nebenwirkungen offensichtlich auch von anderen Parametern als dem Vorhandensein der fünf relevanten Polymorphismen beeinflusst werden, da die R^2 -Werte unerwartet niedrig ausfielen.

5.5.3 Auswirkungen der Polymorphismen in der Methylentetrahydrofolatreduktase auf die Toxizität von MTX

Der SNP C677T in der Methylentetrahydrofolatreduktase führt bei den homozygoten Mutationsträgern (677TT) zu einer Verringerung der Enzymaktivität auf ca. 30% verglichen mit dem Wildtyp. Dies ist mit einer Erhöhung des Serum-Homocysteins, einer Absenkung der Serumfolsäure und einem Anstieg der Leberenzyme verbunden¹³⁰. Im Rahmen einer Behandlung mit Methotrexat verstärkt sich dieser Sachverhalt. MTX inhibiert die Dihydrofolatreduktase, damit kommt es zum Anstieg von Dihydrofolat auf Kosten der anderen Folat-Pools in der Zelle, vor allem 5-Methyl-Tetrahydrofolat sinkt. Konsekutiv kommt es zum Anstieg von Homocystein, da es nicht zu Methionin remethyliert werden kann. Weiterhin kommt es zum Mangel an SAM, einem Methylgruppendonor. Dies wirkt sich in einer verminderten DNA-Methylierung aus. Sowohl die Purin- als auch die Pyrimidin-Synthese nimmt durch den Mangel an 5-Methyl-THF ab. Die Toxizität einer MTX-haltigen Chemotherapie wird hauptsächlich den hohen Spiegeln an Homocystein zugeschrieben^{122,123}. Obwohl die DHFR der Hauptangriffspunkt von MTX ist, korreliert die Toxizität mit der Ausprägung der Polymorphismen in der MTHFR^{118,119}.

Bei der statistischen Auswertung der vorliegenden Ergebnisse zeigte sich folgendes Bild: Der C677T Polymorphismus in der MTHFR war hochsignifikant mit der schwersten dokumentierten Nebenwirkung verknüpft. Patienten mit dem TT-Genotyp litten an schwereren Nebenwirkungen als die beiden anderen Genotypen. Dieser Sachverhalt verdeutlichte sich noch mehr, wenn die Genotypen nach der Enzymaktivität funktionell gruppiert wurden: Patienten mit den Genotypen, die kein oder nur ein T-Allel besaßen, litten unter weniger Nebenwirkungen, als Patienten mit zwei T-Allelen ($p=0,007$). Wenn man die Schweregrade der Nebenwirkungen in zwei klinische Gruppen unterteilte, nämlich in Grad 0/I/II und Grad III/IV mit Bedarf der Intervention, ergab sich das selbe Bild.

Zu einem ähnlichen Schluss kamen Toffoli *et al.* beim Ovarialkarzinom: 77% der Patienten mit dem TT-Genotyp erlitten eine Grad III/IV Nebenwirkung im Vergleich zu 5,9% bzw. 7,7% (CT bzw. CC). Ebenso wiesen sie eine niedrigere Thrombozytenzahl und eine höhere Homocystein-Konzentration im Blut auf ¹¹⁰. In einer Fallstudie berichteten sie über fünf Patientinnen mit Mammakarzinom, die auf die Therapie mit Methotrexat, Cyclophosphamid und 5-FU eine Grad IV Leukopenie erlitten hatten. Bei der Genotypisierung stellte sich heraus, dass alle Patientinnen zum MTHFR 677 TT-Genotyp gehörten ¹¹¹. Ulrich *et al.* zeigten, dass im Vergleich Patienten mit dem TT-Genotyp nach MTX-Gabe einen höheren oralen Mucositis-Index (OMI) und eine langsamere Erholung der Thrombozytenzahl aufweisen als Patienten mit 677CC oder CT ¹¹⁹.

Bezüglich der Thrombozytenzahl konnte im vorliegenden Patientenkollektiv keine Assoziation mit dem Polymorphismus festgestellt werden. Ein Grund hierfür könnte sein, dass in der G-PCNSL-SG1-Studie Methotrexat hochdosiert nur alle 14 Tage verabreicht und nach 24 Stunden mit Folsäure antagonisiert wird ¹⁰⁹. In den oben genannten Studien wird MTX niedrigdosiert und teilweise über mehrere Wochen verabreicht, so dass MTX über einen längeren Zeitraum auf das Knochenmark wirken konnte und so eine verzögerte Erholung der Thrombozytenzahl verursacht haben könnte. Warum dies ausschließlich die Thrombopoese und nicht die anderen Zelllinien betrifft, bleibt unklar.

Bei der Auswertung der Nebenwirkungen wurde der OMI nicht gesondert betrachtet. Alle nicht-hämatologischen Nebenwirkungen wurden zu einem Parameter zusammengefasst: „maximale nicht-hämatologische Nebenwirkung“. Auch dieser korrelierte signifikant mit dem SNP MTHFR C677T. Der Trend wies für den TT-Genotyp zur schwereren Nebenwirkung. Fast 70% der Patienten mit dem TT-Genotyp erlitten eine Grad III/IV Nebenwirkung, im Vergleich dazu litten 93,44% der Patienten mit dem C- oder CT-Genotyp an einer Grad 0/II Nebenwirkung. Auch die funktionelle Einteilung nach der Enzymaktivität konnte dies bestätigen.

Die Kategorie „maximale nicht-hämatologische Nebenwirkung“ umfasste sowohl Parameter unterschiedlicher Organsysteme wie Magen-/Darmtrakt, Herz, Nervensystem Lunge und Niere als auch Körperfunktionen wie Fieber und

Allergie. In einer weiteren Auswertung wäre es interessant diese Punkte einzeln zu betrachten. Es gilt herauszufinden, ob die Assoziation mit dem SNP MTHFR C677T nur zufällig durch die Zusammenfassung der jeweiligen höchsten Toxizität in den oben genannten Punkten entstand, oder ob es einzelne Parameter gab, wie zum Beispiel „Mukositis“ oder „Alveolitis“, die für die signifikante Verknüpfung verantwortlich zu machen sind.

Obwohl auch der SNP MTHFR A1298C zu einer Veränderung der Enzymaktivität führt^{121,127}, lässt sich bei alleiniger Betrachtung keine Veränderung der Homocystein-Konzentration erkennen^{10,121}. In Kombination mit dem SNP C677T macht sich aber ein Anstieg der Homocystein-Konzentration, ein erniedrigter Plasmafolsäure-Spiegel und ein niedrigerer Anteil an methylierter genomischer DNA bemerkbar^{34,83,121}.

Veränderungen im intrazellulären Folsäure-*Pool*, die durch Polymorphismen in der MTHFR entstehen, können zu einer erhöhten Toxizität bei Patienten, die mit Folsäureantagonisten behandelt werden, führen⁸².

Es gibt mehrere Arbeiten, die zeigen, dass der SNP MTHFR A1298C nicht mit der Toxizität einer MTX-Therapie assoziiert ist: Kumagai *et al.* und Urano *et al.* zeigten dies bei der RA^{66,120}, Schmelting *et al.* bei der juvenilen idiopathischen Arthritis⁹⁹ und Aplenc *et al.* bei ALL². Herrlinger K. *et al.* fanden heraus, dass Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und dem MTHFR 1298 CC-Genotyp eher an Nebenwirkungen einer MTX-Therapie litten, als Patienten des Wildtyps⁴⁴. Ganz im Gegensatz hierzu konnten Berkun *et al.* zeigen, dass der 1298 CC-Genotyp sogar mit einer Reduktion der toxischen Nebenwirkungen einer MTX-Therapie assoziiert war⁶.

Alles in allem muss aber darauf aufmerksam gemacht werden, dass die oben genannten Studien bei Krankheiten durchgeführt wurden, die im Vergleich zum PCNSL mit nur relativ geringen Mengen an Methotrexat therapiert werden und somit meistens kein Leucovorin-*Rescue* erforderlich ist.

In den Untersuchungen über den SNP MTHFR A1298C zur Toxizität der HD-MTX-Therapie bei Patienten mit einem PCNSL konnten keine signifikanten Zusammenhänge bestätigt werden. In keinem der untersuchten Parameter,

weder hämatologisch noch nicht-hämatologisch, konnte eine Assoziation mit dem Polymorphismus nachgewiesen werden. Dies entspricht den Ergebnissen der meisten oben genannten Arbeiten über die MTX-Toxizität beim SNP MTHFR A1298C.

Ein Grund hierfür könnte das schnell durchgeführte Leucovorin-*Rescue* sein. 24 Stunden nach der MTX-Infusion wurde alle 6 Stunden 25 mg Folsäure (ein Derivat der Folsäure) verabreicht bis die MTX-Konzentration im Serum auf unter 0,1µM gesunken war. Damit lässt sich die akute Toxizität von Methotrexat verringern, vor allem die Nieren- und Knochenmarkstoxizität. Auch das Risiko des Auftretens einer Mukositis wird verringert. Der aktive Metabolit der Folsäure in der Zelle ist 5-Methyl-THF⁶¹. Die Therapie mit MTX senkt den Spiegel von 5-Methyl-THF, konsekutiv kommt es zum Anstieg von Homocystein. Als Nebeneffekt der Folsäure-Therapie ist die Senkung der Homocystein-Konzentration zu beobachten, die für die Nebenwirkungen verantwortlich gemacht wird. Eine niedrige Rate an Nebenwirkungen konnte Herrlinger U. *et al.* schon in der Vorgängerstudie (NOA-03) beobachten: Eine Grad IV Nebenwirkung wurde nur in 3 (1,7%) von 179 Zyklen Methotrexat und bei 3 von 37 Patienten (8,1%) beobachtet. Sie begründeten dies mit dem frühen Einsetzen des Leucovorin-*Rescues*⁴⁸.

Ein weiterer Grund könnte sein, dass die Mutation nur in der regulatorischen Domäne des Enzyms liegt, im Gegensatz zum SNP MTHFR C677T, der zu einem Aminosäureaustausch in der katalytischen Domäne des Enzyms führt⁹¹. Bei alleiniger Betrachtung des A1298C Polymorphismus reicht die Veränderung der Enzymfunktion nicht aus um eine Assoziation mit der Toxizität erkennen zu lassen. Erst die Kombination mit dem C677T Polymorphismus, der die Enzymfunktion wesentlich mehr beeinträchtigt, kann auf eine Assoziation mit höherer Toxizität schließen lassen^{44,52,120}. Aus diesem Grund sollte in Zukunft die beiden Mutationen der MTHFR in Kombination betrachtet werden.

5.5.3.1 Vorliegen des MTHFR 677T-1298C Haplotyps

Der Haplotyp beschreibt die Abfolge bestimmter Allele, die durch mehrere SNP an einer polymorphen Stelle auf einem einzelnen Chromosomen definiert sind.

Urano *et al.* beschrieben, dass in ihrer Studienpopulation der MTHFR Haplotyp 677T-1298C nicht vorgekommen sei¹²⁰. Auch andere Arbeitsgruppen haben dieses Phänomen beobachtet^{13,23,121,127}. Urano begründet den Sachverhalt damit, dass im Verlauf der Evolution Individuen mit diesem Haplotyp nicht überlebt haben können, da die - durch die beiden in *cis*, d.h. auf dem gleichen Chromosomen gelegenen Mutationen - reduzierte Enzymaktivität nicht zum Überleben ausgereicht habe¹²⁰.

Im Gegensatz dazu konnte im vorliegenden Patientenkollektiv der MTHFR Haplotyp 677T-1298C zwölf Mal nachgewiesen werden: 7 Patienten mit 677TT und 1298AC, drei Patienten mit 677CT und 1298CC und ein Patient mit dem doppelten homozygoten Status 677TT und 1298CC.

Auch Aplenc *et al.* konnten den 677T-1298C Haplotyp bei 15 Patienten in ihrem Studienkollektiv von 520 Kindern mit einer ALL nachweisen², Herrlinger K. *et al.* bei einem Patienten mit einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung⁴⁴. Bei Chen *et al.* zeigten drei Patienten den Haplotyp an einem Locus, kein Patient zeigte die Mutationen an beiden Loci. Die beiden Loci standen im *linkage disequilibrium*^{13,23,52,91,120}. Sie erklärten das seltene Auftreten der Mutationen an beiden Loci dadurch, dass die beiden Mutationen wohl unabhängig auf zwei verschiedenen Chromosomen entstanden seien. Durch die kurze Distanz zwischen den beiden Loci (2,1 kb)⁹¹ habe keine Rekombination stattgefunden¹³.

Die oben beschriebene Evolutionstheorie ist als unwahrscheinlich zu erachten, da im untersuchten Kollektiv der Haplotyp bei 7,7% der Patienten (4,2% aller MTHFR Allele) auftrat. Das Vorliegen eines schwer überlebensfähigen Phänotyps ist somit nicht sehr wahrscheinlich.

Weiterhin muss beachtet werden, dass die Patientenkollektive nicht immer die gleiche ethnische Herkunft haben: Urano *et al.* berufen sich zum Beispiel auf

ein rein japanisches Kollektiv, das schon auf Grund der verschiedenen Allelfrequenzen in den entsprechenden Polymorphismen nicht mit einem kaukasischen zu vergleichen ist (siehe auch Kapitel 4.3 Allelfrequenzen bei Patienten und im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen).

5.5.4 Auswirkungen des G80A Polymorphismus im reduzierten Folat-Carrierprotein auf die Toxizität von Methotrexat

Die Aufnahme von Methotrexat in die Zelle läuft einerseits über das hochaffine, reduzierte Folat-Carrierprotein, andererseits kann MTX über einen Folsäurerezeptor endozytotisch aufgenommen werden, allerdings in weitaus geringerem Maß als über das RFC. Das RFC ist der dominierende Transportweg für MTX ¹¹⁸, auch in malignen Zellen ³⁸. Eine geringere Aufnahme in die Zelle kann durch eine Reduktion der in der Zellwand exprimierten Menge des RFC oder durch eine Funktionseinschränkung des Enzyms erklärt werden. Eine geringere zelluläre Aufnahme führt zu einem höheren Plasmaspiegel an Methotrexat ³⁹. Dies könnte wiederum mit schweren Toxizitätserscheinungen verknüpft sein, da MTX so länger und vor allem in höherer Dosis auf Zellen wirken kann, die keine Therapie benötigen.

Bei Patienten des RFC 80 GG-Genotyps zeigte sich ein Trend zu höheren Homocystein-Konzentrationen, wenn sie gleichzeitig den MTHFR 677 TT-Genotyp besaßen, im Vergleich zu den AA- und GA-Genotypen ¹¹.

Bei den Untersuchungen des SNP RFC G80A zur Toxizität fiel auf, dass dieser Polymorphismus die meisten Assoziationen mit den betrachteten Parametern aufwies. Der GG-Genotyp ließ bei den Leukozyten einen Trend (nicht signifikant) zu einer höheren Nebenwirkungsrate erkennen: Ca. 75% der Patienten mit einer Grad 0/I/II Nebenwirkung hatten mindestens ein A-Allel, knapp 50% der Patienten mit einer interventionsbedürftigen Nebenwirkung Grad III/IV gehörten zum Wildtyp (GG). Eine ähnliche Assoziation zeigte sich auch bei der Granulopenie: Die Wahrscheinlichkeit, dass Patienten mit dem

GG-Genotyp eine Grad III/IV Granulopenie erlitten, war signifikant höher, als für die beiden anderen Genotypen mit mindestens einem A-Allel ($p=0,04$).

Bei der maximalen nicht-hämatologischen Nebenwirkung zeigte sich ein anderes Bild: Der Schweregrad der Nebenwirkung war nicht so konsequent über die Genotypen verteilt wie bisher, also ansteigend vom Wildtyp zur Mutation oder umgekehrt. Patienten mit dem AA-Genotyp zeigten die schwersten Nebenwirkungen gefolgt von Patienten des GG-Genotyps. Patienten mit dem heterozygoten Mutationsstatus wiesen die niedrigen Schweregrade auf. Es konnte allerdings nur ein signifikanter Unterschied zwischen dem AA- und GA Genotyp nachgewiesen werden.

Prinzipiell ist festzuhalten, dass der RFC 80GG-Genotyp mit der schwereren hämatologischen Nebenwirkung assoziiert ist, während der RFC 80AA-Genotyp mit der schwereren nicht-hämatologischen Nebenwirkung verknüpft ist.

Die Allelfrequenz dieses Polymorphismus variiert zwischen verschiedenen Volksgruppen, sodass sowohl das G- als auch das A-Allel als Wildtyp betrachtet werden kann⁸⁹. Dies könnte auch in Zusammenhang mit gegensätzlichen Assoziationen der beiden homozygoten Genotypen und den Nebenwirkungen gebracht werden.

Bisher wurden nur vier Studien zur Beurteilung der Toxizität einer MTX-haltigen Therapie in Abhängigkeit des SNP RFC G80A durchgeführt:

Shimasaki *et al.* untersuchten den RFC Polymorphismus im Zusammenhang einer HD-MTX-Therapie (3 g/m^2) bei Kinder mit einer ALL oder einem Lymphom. Die Studie zeigte mit steigender Anzahl der G-Allele eine Tendenz zu Erbrechen des Grades 2 oder höher (gelegentliches Erbrechen bis hin zu schwerst-behandelbarem Erbrechen). Ein Erklärungsversuch ist, dass das RFC-Protein stark in Ependymzellen der Hirnventrikel exprimiert wird und so unter Umständen durch den Polymorphismus der Spiegel von MTX und Folsäure im Liquor verändert wird¹⁰⁴. Wie oben schon erwähnt, zeigte sich in der vorliegenden Arbeit, dass die nicht-hämatologischen Nebenwirkungen, zu denen auch das Erbrechen zählt, positiv mit dem RFC 80 AA-Genotyp korrelierten.

Kishi *et al.* untersuchten 53 Kinder mit akuter lymphatischer Leukämie auf MTX-abhängige Neurotoxizität. In diesem Zusammenhang legten sie vor allem Wert auf epileptische Anfälle. Sie vermuteten, dass die Neurotoxizität durch Hyperhomocysteinämie verursacht wird. Sie konnten aber keinen signifikanten Unterschied im Homocysteinspiegel oder in der Toxizität bezüglich der Ausprägungen des SNP RFC G80A feststellen, obwohl eine ähnliche MTX-Dosis ($2,5 \text{ g/m}^2$ bis 5 g/m^2 über 24 Stunden) wie in der G-PCNSL-SG-1-Studie verabreicht wurde⁶¹. Die Infusionsgeschwindigkeit und das Leucovorin-Rescue unterschieden sich aber von der vorliegenden Studie, außerdem wurde Methotrexat zusätzlich intrathekal verabreicht. Patienten der PCNSL-SG-1-Studie bekamen nur eine 4-stündige MTX-Infusion und 25 mg Folsäure erstmals 24 h nach MTX-Gabe und alle weitere 6 h bis die MTX-Konzentration im Serum unter $0,1 \text{ }\mu\text{M}$ abgefallen ist, im Vergleich zu 24 h und 10-15 mg Folsäure nach 44 Stunden^{61,109}.

Comandone *et al.* zeigten bei erwachsenen Patienten mit einem Osteosarkom, die mit HD-MTX (12 g/m^2) therapiert wurden, dass die Toxizität der Therapie mit der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC_{MTX}) korreliert. Hohe AUC-Werte führen zu schweren Nebenwirkungen¹⁵. Die AUC_{MTX} korreliert wiederum streng mit der Infusionsrate (in $\text{mg/m}^2 \text{ h}$) von MTX³¹. Eine schnelle Gabe der Dosis kann so zu einer größeren AUC_{MTX} führen, was wiederum mit Nebenwirkungen verbunden sein könnte.

Ferreri *et al.* konnten dies jedoch beim PCNSL widerlegen³¹. Wie bei den Polymorphismen der MTHFR schon erwähnt, könnte auch hier das notwendige Leucovorin-Rescue den Effekt einer Hyperhomocysteinämie überdecken und so Toxizitätserscheinungen abschwächen⁶¹.

Herrlinger K. *et al.* untersuchten Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Auch sie mussten feststellen, dass es keine signifikanten Zusammenhänge zwischen dem Polymorphismus im Folat-Carrierprotein und MTX-abhängigen Nebenwirkungen gab. Allerdings erhielten die Patienten niedrigere Dosen an MTX (mediane Wochendosis 20 mg) als Patienten zur Behandlung eines PCNSL⁴⁴.

Wessels *et al.* konnten ebenfalls keinen Zusammenhang bei der Behandlung der rheumatoiden Arthritis mit MTX feststellen¹³⁰.

5.5.5 Auswirkungen der Polymorphismen der Thymidylat-Synthase auf die Toxizität einer HD-MTX-Therapie

Die Thymidylat-Synthase katalysiert die Konversion von Desoxyuridinmonophosphat zu Desoxythymidinmonophosphat und ist damit die einzige *de novo* Quelle für intrazelluläres Thymidylat für die DNA-Synthese.

Nach dem Eintritt von MTX in die Tumorzelle wird es durch die Tetrahydrofolylpolyglutamat-Synthase weiter verstoffwechselt. Die Polyglutamatderivate von Methotrexat werden länger in der Zelle zurückgehalten und können somit länger auf den Zellstoffwechsel wirken. Daher sind die Menge an akkumulierten MTX-Polyglutamaten und die Kettenlänge dieser Polyglutamate wichtige Determinanten der Zytotoxizität³⁹. Die Polyglutamatderivate blockieren ihrerseits weitere Enzyme des Folsäurestoffwechsels, darunter auch die Thymidylat-Synthase und die MTHFR¹¹⁸. Enzyminhibition resultiert in einer Depletion von Desoxythymidintriphosphaten und daraus folgenden Chromosomenbrüchen und Zelltod.

Da die Thymidylat-Synthase den Hauptangriffspunkt von 5-FU darstellt^{68,94}, gibt es keine Studien darüber, inwieweit die beiden Mutationen die Toxizität einer MTX-haltigen Therapie beeinflussen.

Lecomte *et al.* zeigten für Patienten, die an einem kolorektalen Karzinom litten, das mit 5-FU behandelt wurde, dass der Polymorphismus in der Promoterregion der TS mit ansteigender Zahl der 28 bp *repeats* einerseits mit einer erhöhten TS Expression^{51,58,59,68} und andererseits mit einer erhöhten Nebenwirkungsrate einhergeht. Als Nebenwirkungen erfasste die Studie sowohl Zytopenien, Mukositis, Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoe⁶⁸.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der 28 bp *tandem/triplet repeat* Polymorphismus mit der maximalen nicht-hämatologischen

Nebenwirkung korrelierte. Der Wilcoxon Test zeigte einen Trend, dass mit zunehmender Zahl der Wiederholungen der Schweregrad der Nebenwirkungen anstieg ($p=0,10$). Nach Zusammenfassung des 2R2R- und 2R3R-Genotyps und klinisch-relevanter Unterteilung der Nebenwirkungen (0/I/II vs. III/IV) zeigte sich eine Assoziation des 3R3R-Genotyps mit dem Grad III/IV. Auch in der Kategorie „Granulopenie“ zeigte sich ein ähnlicher Trend: Das Risiko des 3R3R-Genotyps eine schwerere Granulopenie erleiden zu müssen war erhöht ($p=0,07$).

In gewissem Sinn bestätigt die Studie von Lecomte *et al.* die vorliegenden Erkenntnisse. Je öfter die 28 bp Wiederholung ausgeprägt ist, desto wahrscheinlicher wird es, dass der behandelte Patient an schweren Nebenwirkungen leiden muss. Obwohl Lecomte dies nicht für MTX gezeigt hat, sondern für 5-FU, kann man von einer gewissen Übereinstimmung sprechen. MTX hemmt zwar nicht wie 5-FU direkt die TS, aber die in der Zelle gebildeten MTX-Polyglutamate wirken auf die Thymidylat-Synthase^{82,118}.

Für die 6 bp Deletion in der 3'-UTR der TS konnten keine Assoziationen mit der Toxizität einer hochdosierten MTX-Therapie nachgewiesen werden. Obwohl Patienten ohne die 6 bp Deletion eine erhöhte TS mRNA Expression zeigten und dies mit einem erhöhten Risiko für Toxizitätserscheinungen einhergeht, konnten auch Lecomte *et al.* keine Assoziation mit dem Polymorphismus nachweisen⁶⁸.

5.6 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit konnten wichtige Mutationen in Genen des Folsäurestoffwechsels, die für Nebenwirkungen einer HD-MTX-Therapie bei Patienten mit einem PCNSL verantwortlich sind, identifiziert werden. Ebenso konnten Genotypen bestimmt werden, die mit der Erkrankung korrelieren.

Die eingesetzten Methoden zur Analyse der Mutationen erwiesen sich für den gegebenen Probenumfang als kostengünstig und effizient. Die Genotypisierung war reproduzierbar und eindeutig.

Sollte in Zukunft die Analyse auf weitere Polymorphismen (SNP oder Insertion und Deletion) und/oder auf eine größere Anzahl an Patienten im Zusammenhang mit der Erkrankung ausgedehnt werden, so sollte eine Analyse mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie oder Pyrosequencing[®] erwogen werden. Diese Techniken ermöglichen einen hohen Probendurchsatz innerhalb kurzer Zeit und überzeugen deshalb auf Grund ihres Kosten-Nutzen-Faktors.

Allgemein lässt sich mit dieser Arbeit zeigen, dass über die Analyse von Genpolymorphismen in genomischer DNA Aussagen zum funktionellen Einfluss dieser möglich sind.

Der Vergleich der Genotypenfrequenzen des Studienkollektivs mit den Genotypenfrequenzen gesunder Kontrollpopulationen aus anderen Vergleichsstudien zeigte, dass sowohl der MTHFR 677 TT-Genotyp, als auch die 3R3R-Variante der 28bp-Wiederholungen in der TS mit dem Risiko für ein PCNSL korrelieren. Damit ist die vorliegende Arbeit die erste, die einen solchen Zusammenhang, wie er schon bei anderen hämatologischen Erkrankungen beschrieben wurde, bestätigen kann.

Im Gegensatz dazu beeinflussten die untersuchten Polymorphismen weder die Überlebenszeit im OAS noch im PFS. Dies bestätigte auch die multivariate Cox-Regression.

Bemerkenswert war die Inzidenz höhergradiger (Akut-)Nebenwirkungen im Gesamtkollektiv: Ca. 20% der 466 verabreichten Zyklen HD-MTX verursachten eine Grad III/IV Nebenwirkung. Die Inzidenz einer schweren nicht-hämatologischen Nebenwirkung (Grad III/IV) bei den 100 analysierten Patienten war 30%, die kumulative Inzidenz irgendeiner schweren Nebenwirkung war 48%.

Wie schon in vorausgehenden Studien bei anderen Erkrankungen konnte eine eindeutige Assoziation des SNP MTHFR C677T mit Nebenwirkungen einer Therapie mit Methotrexat nachgewiesen werden: Patienten mit dem TT-Genotyp zeigten sowohl die schwerwiegendere nicht-hämatologische Nebenwirkung als auch eine höhere „schwerste dokumentierte Nebenwirkung“. Damit konnte die Wichtigkeit der Mutation MTHFR C677T bestätigt werden. Erstmals ist es gelungen, die Assoziation von Akuttoxizität bei HD-MTX und MTHFR-Polymorphismus zu bestätigen.

Die anderen Mutationen zeigten allenfalls marginale Auswirkungen auf die Toxizität, so zum Beispiel der Anstieg der Granulozytotoxizität unter dem GG-Genotyp des SNP RFC G80A.

Der kumulative Risikoindex, bei dem für das Vorhandensein einer Mutation (MTHFR 677TT, MTHFR 1298CC, RFC 80AA oder 80GA, TS 6 bp Deletion -6/-6 oder TS 28 bp *repeats* 3R3R) ein bestimmter Punktwert vergeben wurde, zeigte eine positive Korrelation mit der schwersten dokumentierten Nebenwirkung und der maximalen nicht-hämatologischen Nebenwirkung. Diese Ergebnisse sollten zur weiteren Validierung an einer größeren Studienpopulation überprüft werden. Hier stellt sicher die geringe Inzidenz des PCNSL bei immunkompetenten Patienten das entscheidende Hindernis dar.

Nicht alle untersuchten Polymorphismen waren prädiktiv für die in der Studie erfassten Nebenwirkungen, trotzdem besteht die Möglichkeit der prospektiven Identifikation von Individuen mit besonders hohem Risiko für schwere Nebenwirkungen einer Therapie mit HD-MTX. Nach der oben schon beschriebenen Überprüfung der Verhältnisse an einer größeren Population und einer eventuellen Erweiterung der Parameter besteht die Perspektive einer maßgeschneiderten (*tailor-made*), intensivierten Therapie mit Dosisanpassung oder entsprechenden Supportivmaßnahmen.

Um das therapeutische Ansprechen, bzw. das Ansprechen des Tumors auf die Therapie zu untersuchen, wäre es sicher interessant gewesen auch den Mutationsstatus der Tumor-DNA zu bestimmen und mit den Zeiten im OAS und PFS zu korrelieren. Wenn man davon ausgeht, dass die „normale“ genomische DNA den genetischen Hintergrund für die toxischen Nebenwirkungen darstellt

(wie in der vorliegenden Arbeit ansatzweise gezeigt werden konnte), so wäre die Tumor-DNA der genetische Hintergrund für das therapeutische Ansprechen^{68,113,118}. Mutationen in Tumor-DNA könnten dann Auswirkungen auf den Erfolg einer Therapie haben. In diesem Zusammenhang könnte auch eine Expressionsanalyse der Proteine des Folatzyklus im „normalen“ und Tumorgewebe erwogen werden⁶⁹.

In der vorliegenden Arbeit wurden Enzyme, die für die Aufnahme von Folsäure oder Methotrexat oder für den unmittelbaren Stoffwechsel im Folsäurezyklus verantwortlich sind, untersucht. Auch Enzyme, die für den Efflux von Stoffwechselprodukten von Methotrexat aus der Zelle verantwortlich sind, könnten einen Einfluss auf die Nebenwirkungen einer Therapie haben. Daher sollten in einer weiteren Untersuchung sowohl diese als auch sogenannte *multi-drug-resistance-related* Proteine untersucht werden und mit den Parametern zu Überleben und Toxizität korreliert werden. Weiterhin könnten zusätzliche Polymorphismen, die direkten Einfluss auf den Stoffwechsel haben und in der Literatur schon bei anderen Erkrankungen beschrieben sind, untersucht werden, wie zum Beispiel der SNP MTHFR G1793A^{52,91,118,126}, der SNP in der ersten Wiederholung⁷¹ oder in der zweiten Wiederholung^{37,58,59,65,68,76} der 28 bp der VNTR der TS, die SNP der DHFR^{118,130}, die BCL-6 Expression⁵ oder Cyclin D1 (CCDN1 A870G)^{19,39}. Wie von Weisman *et al.* und anderen beschrieben, könnte auch der Risikoindex noch um folgende SNP erweitert werden: ATIC C347G, SHMT1 C1420T und AICAR^{52,118,128}.

Zur genaueren Evaluation der Toxizität sollten in Zukunft weitere Parameter erhoben werden: Die Menge des verabreichten Leucovorins könnte Rückschlüsse auf die Metabolisierung von Methotrexat erlauben, da das *Rescue* an den MTX-Spiegel angepasst erfolgt. Leucovorin ist dafür bekannt, dass es schwerwiegende Nebenwirkungen von Methotrexat lindern bzw. verhindern kann^{6,32,104,120,124,126}. In der vorliegenden Arbeit könnten so auch die erfassten Toxizitäten verzerrt worden sein. Eine Stratifikation nach erhaltener Leucovorin-Dosis oder nach gemessenem Leucovorin-Spiegel hätte dies verhindern können.

Die Messung des Homocystein-Spiegels könnte ein weiterer Parameter für die Erfassung der Toxizität sein. Erhöhte Werte, die einerseits durch die Therapie mit MTX und andererseits durch die Mutationen der MTHFR hervorgerufen werden, sind unter anderem mit Neurotoxizität⁶¹, gastrointestinalen und anderen Nebenwirkungen verknüpft¹¹⁰. Auch hier besteht die Möglichkeit, dass das *Rescue* mit Leucovorin die Nebenwirkungen einer Therapie mit Methotrexat abschwächt, da es einen schnellen Abfall des Homocystein-Spiegels verursacht^{61,122}.

In diesem Zusammenhang wäre auch die Messung der Folsäurespiegel in Serum und Zelle interessant, da diese ebenfalls unmittelbar von der Therapie mit MTX und Leucovorin beeinflusst werden⁹¹.

Zukünftig sollte in Studien, die die Toxizität als messbaren Parameter betrachten, auch der MTX-Plasmaspiegel gemessen werden, da die AUC_{MTX} (Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve) eng mit den schweren Nebenwirkungen korreliert¹⁵.

Zusammenfassend zeigen diese Überlegungen, dass durch Pharmakogenetik, therapeutisches *Drug-monitoring* und die Messung von Metaboliten-Spiegeln eine Behandlung mit MTX für den einzelnen Patienten optimiert werden kann. Weiterhin zeigt sich, dass Mutationen in Enzymen des Folsäurezyklus mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für ein PCNSL korrelieren.

6 Zusammenfassung

Das primäre ZNS-Lymphom ist eine seltene Form eines hoch malignen, extranodalen Non-Hodgkin-Lymphoms. Nicht nur bei immunsupprimierten, sondern auch bei immunkompetenten Patienten stieg die Inzidenz in den letzten Jahrzehnten.

Der Folsäureantagonist Methotrexat in hohen Dosen ($>4 \text{ g/m}^2$) ist eines der wirksamsten Chemotherapeutika beim PCNSL. Allerdings sind toxische Nebenwirkungen von Methotrexat häufig der therapielimitierende Faktor. In der Literatur ist beschrieben, dass Mutationen in Genen, die für die Enzyme des Folsäurestoffwechsels kodieren, für diese Nebenwirkungen verantwortlich sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden fünf der häufigsten Mutationen in Genen des Folsäurestoffwechsels untersucht: Die SNP C677T und A1298C im Gen der Methylentetrahydrofolatreduktase, der SNP RFC G80A im Gen des reduzierten Folat-Carrierproteins, sowie eine 6 bp lange Deletion und eine sich mehrfach wiederholende 28 bp lange Sequenz im Gen der Thymidylat-Synthase.

Die Punktmutationen in der MTHFR und im RFC wurden mittels Schmelzkurvenanalyse im LightCycler[®] nachgewiesen, der 28 bp *tandem/triplet repeat* der TS wurde mittels konventioneller PCR und Agarose Gel-Elektrophorese, die 6 bp Deletion der TS wurde mit konventioneller PCR, Restriktionsenzymverdau durch *Dra* I und Agarose Gel-Elektrophorese nachgewiesen.

Die Mutationen wurden sowohl mit der Überlebenszeit der Patienten als auch mit der Ausprägung von Nebenwirkungen in hämatologischen und nicht-hämatologischen Parametern korreliert. Die Allelfrequenzen wurden mit in der Literatur beschriebenen gesunden Referenzpopulationen verglichen, ob ein bestimmter Genotyp der oben genannten Mutationen für ein PCNSL prädisponiert.

Beim Vergleich der Allelfrequenzen der Patienten mit denen gesunder Vergleichspopulationen zeigte sich, dass der TT-Genotyp des SNP MTHFR C677T bei Patienten kaukasischer Herkunft für das PCNSL prädisponiert. Damit konnte erstmals beim PCNSL eine Prädisposition durch diese Punktmutation gezeigt werden, anderen Arbeitsgruppen war dies schon bei Lymphomen außerhalb des ZNS gelungen. Weiterhin zeigte sich, dass die homozygote Variante des *triplet repeat* (3R3R) der TS ebenfalls einen Risikofaktor für ein PCNSL darstellt. Dies ist der erstmalige Nachweis dieser Eigenschaft.

Auf das *Outcome* der Patienten, so wie auf die Überlebenszeit, die im *Overall* und *Progression free Survival* gemessen wurde, zeigten die untersuchten Mutationen keine Auswirkung.

Die Nebenwirkungen wurden in 4 hämatologischen (Hämoglobin, Granulozyten, Leukozyten, Thrombozyten) und zwei globalen Kategorien (max. nicht-hämatologische und schwerste dokumentierte Nebenwirkung) nach der WHO-Skala (Grad 0 bis IV) mit jedem verabreichten Zyklus erfasst.

Die Evaluation der Toxizitätsdaten zeigte, dass 92 von 466 Zyklen (ca. 20%) Methotrexat höhergradige (°III/IV) toxische Nebenwirkungen bei den Patienten hervorriefen.

Hinsichtlich der schwersten dokumentierten Nebenwirkung zeigten Patienten mit dem TT-Genotyp des SNP MTHFR C677T deutlich schwerere Nebenwirkungen ($p=0,007$). Dies steht in Einklang mit Toffoli *et al.*, die dies bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom¹⁰ nachweisen konnten. Der TT-Genotyp korrelierte auch signifikant mit den nicht-hämatologischen Nebenwirkungen; Patient mit beiden T-Allelen litten unter den schwerwiegenden Nebenwirkungen ($p=0,007$).

Wie zahlreiche andere, konnte auch die vorliegende Arbeit keinen Zusammenhang des SNP MTHFR A1298C mit den Nebenwirkungen einer Therapie mit HD-MTX herstellen.

Patienten mit dem GG-Genotyp im SNP RFC G80A hatten eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit eine Grad III/IV Granulopenie zu erleiden als Patienten mit mindestens einem A-Allel ($p=0,04$). Der AA-Genotyp tendierte allerdings zu höheren nicht-hämatologischen Nebenwirkungen.

Diese Arbeit zeigte weiterhin, dass kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Polymorphismen der Thymidylat-Synthase und den Nebenwirkungen einer HD-MTX Therapie zur Behandlung eines PCNSL besteht. Es ließ sich jedoch eine Tendenz zu höheren nicht-hämatologischen Nebenwirkungen beim 3R3R-Genotyp des 28 bp *tandem/triplet repeat* der TS entsprechend der Studie von Lecomte *et al.* feststellen⁶⁸.

Auf Grund ihrer zentralen Rolle im Folsäurestoffwechsel und ihrer prädisponierenden Eigenschaften für toxische Nebenwirkungen bei der Hochdosis-Methotrexat Behandlung ist anzunehmen, dass die untersuchten SNP MTHFR C677T und RFC G80A auch in der Zukunft eine große Rolle spielen werden. Sollten sich die Ergebnisse dieser Arbeit bei einem größeren Patientenkollektiv reproduzieren lassen, könnte dies zum Anlass genommen werden, ein Mutationsscreening für eine individuelle Therapie mit HD-MTX einzuführen. Dies könnte dazu beitragen, Patienten vor schwerwiegenden Nebenwirkungen zu bewahren.

7 Literaturverzeichnis

1. <http://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/LightCycler/system.jsp>
2. Aplenc, R., Thompson, J., Han, P., La, M., Zhao, H., Lange, B., Rebbeck, T. (2005)
Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms and Therapy Response in Pediatric Lymphoblastic Leukemia
Cancer Res, 65: 2482-2487
3. Aslanidis, C., Schmitz, G. (2001)
High-Speed Methylenetetrahydrofolate Reductase C→T 677 Mutation Detection on the LightCycler
Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications, 83-88, (Springer Verlag, Berlin)
4. Batchelor, T., Carson, K., O'Neill, A., Grossman, S. A., Alavi, J., New, P., Hochberg, F., Priet, R. (2003)
Treatment of Primary CNS Lymphoma With Methotrexate and Deferred Radiotherapy: A Report of NABTT 96-07
J Clin Oncol, 21: 1044-1049
5. Batchelor, T., Loeffler, J. S. (2006)
Primary CNS Lymphoma
J Clin Oncol, 24: 1281-1288
6. Berkun, Y., Levartovsky, D., Rubinow, A., Orbach, H., Amar, S., Grenader, T., Abou Atta, I., Mevorach, D., Friedman, G., Ben-Yehuda, A. (2004)
Methotrexate related adverse effects in patients with rheumatoid arthritis are associated with the A1298C polymorphism of the MTHFR gene
Ann Rheum Dis, 63: 1227-1231
7. Botto, L. D., Yang, Q. (2000)
5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Variants and Congenital Anomalies: A HuGE Review
Am J Epidemiol, 151: 862-877
8. Brown, K. S., Kluijtmans, L. A. J., Young, I. S., McNulty, H., Mitchell, L. E., Yarnell, J. W. G., Woodside, J. V., Boreham, C. A., McMaster, D., Murray, L., Strain, J. J., Whitehead, A. S. (2004)
The thymidilate synthase tandem repeat polymorphism is not associated with homocysteine concentrations in healthy young subjects
Hum Genet, 114: 182-185

9. Bühring, U., Herrlinger, U., Krings, T., Thiex, R., Weller, M., Kuker, W. (2001)
MRI features of primary central nervous system lymphomas at presentation
Neurology, 57: 393-396
10. Chango, A., Boisson, F., Barbé, F., Quilliot, D., Droesch, S., Pfister, M., Fillon-Emerly, N., Lambert, D., Frémont, S., Rosenblatt, D. S., Nicolas, J. P. (2000)
The effect of 677->T and 1298A->C mutations on plasma homocysteine and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase activity in healthy subjects
Br J Nutr, 83: 593-596
11. Chango, A., Emery-Fillon, N., Potier de Courcy, G., Lambert, D., Pfister, M., Rosenblatt, D. S., Nicolas, J.-P. (2000)
A Polymorphism (80G->A) in the Reduced Folate Carrier Gene and Its Associations with Folate Status and Homocysteinemia
Mol Genet Metab, 70: 310-315
12. Chen, J., Hunter, D. J., Stampfer, M. J., Kyte, C., Chan, W., Wetmur, J. G., Mosig, R., Selhub, J., Ma, J. (2003)
Polymorphism in the Thymidilate Synthase Promotor Enhancer Region Modifies the Risk and Survival of Colorectal Cancer
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 12: 958-962
13. Chen, J., Ma, J., Stampfer, M. J., Palomeque, C., Selhub, J., Hunter, D. J. (2002)
Linkage disequilibrium between the 677C>T and 1298A>C polymorphisms in human methylenetetrahydrofolate reductase gene and their contributions to risk of colorectal cancer
Pharmacogenetics, 12: 339-342
14. Chiusolo, P., Reddicono, G., Casorelli, I., Sorà, F., Annino, L., Leone, G., Sica, S. (2002)
Preponderance of methylenetetrahydrofolate reductase C677T homozygosity among leukemia patients tolerant to methotrexate
Ann Oncol, 13: 1915-1918
15. Comandone, A., Passera, R., Boglione, A., Tagini, V., Ferrari, S., Cattel, L. (2005)
High dose methotrexate in adult patients with osteosarcoma: Clinical and pharmacokinetic results
Acta Oncol, 44: 406-411
16. Commins, D. L. (2006)
Pathology of primary central nervous system lymphoma
Neurosurg Focus, 21: E2 1-10

17. Corboy, J. R., Garl, P. J., Kleinschmidt-DeMasters, B. K. (1998)
Human herpesvirus 8 DNA in CNS lymphomas from patients with and without AIDS
Neurology, 50: 335-340
18. Costea, I., Moghrabi, A., Krajinovic, M. (2003)
The influence of cyclin D1 (CCND1) 870A>G polymorphism and CCND1-thymidylate synthase (TS) gene-gene interaction on the outcome of childhood acute lymphoblastic leukaemia
Pharmacogenetics, 13: 577-580
19. Costea, I., Moghrabi, A., Laverdière, C., Graziani, A., Krajinovic, M. (2006)
Folate cycle gene variants and chemotherapy toxicity in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia
Haematologica, 91: 1113-1116
20. de Jonge, R., Hooijberg, J. H., Van Zelst, B. D., Jansen, G., van Zantwijk, C. H., Kaspers, G. J. L., Peters, G. J., Ravindranath, Y., Pieters, R., Lindemans, J. (2005)
Effect of polymorphisms in folate-related genes on in-vitro methotrexate sensitivity in pediatric acute lymphoblastic leukemia
Blood, 106: 717-720
21. Deangelis, L. M., Yahalom, J., Thaler, H. T., Kher, U. (1992)
Combined modality therapy for primary CNS lymphoma
J Clin Oncol, 10: 635-643
22. Dervieux, T., Furst, D., Lein, D. O., Capps, R., Smith, K., Walsh, M., Kremer, J. (2004)
Polyglutamation of Methotrexate With Common Polymorphisms in Reduced Folate Carrier, Aminoimidazole Carboxamide Ribonucleotide Transformylase, and Thymidilate Synthase Are Associated With Methotrexate Effects in Rheumatoid Arthritis
Arthritis Rheum, 50: 2766-2774
23. Devlin, A. M., Clarke, R., Birks, J., Evans, J. G., Halsted, C. H. (2006)
Interactions among polymorphisms in folate-metabolizing genes and serum homocysteine concentrations in a healthy elderly population
Am J Clin Nutr, 83: 708-13
24. Drogan, D., Klipstein-Grobusch, K., Wans, S., Luley, C., Boeing, H., Dierkes, J. (2004)
Plasma folate as marker of folate status in epidemiological studies: the European Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam study
Br J Nutr, 92: 489-496

25. Eichler, A., Batchelor, T. (2006)
Primary central nervous system lymphoma: presentation, diagnosis, and staging
Neurosurg Focus, 21: E16 1-9
26. Elder, J. B., Chen, T. C. (2006)
Surgical interventions for primary central nervous system lymphoma
Neurosurg Focus, 21: E13 1-8
27. Etienne, M.-C., Formento, J.-L., Chazal, M., Francoual, M., Magné, N., Formento, P., Bourgeon, A., Seitz, J.-F., Delpero, J.-R., Letoublon, C., Pezet, D., Milano, G. (2004)
Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and response to fluorouracil-based treatment in advanced colorectal cancer patients
Pharmacogenetics, 14: 785-792
28. Etienne, M.-C., Formento, J.-L., Laurent-Puig, P., Formento, P., Cheradame, S., Fischel, J.-L., Milano, G. (2004)
Thymidilate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: relationships with 5-fluorouracil sensitivity
Br J Cancer, 90: 526-534
29. Feiden, W., Milutinovic, S. (2002)
Primäre ZNS-Lymphome
Pathologe, 23: 284-291
30. Ferreri, A. J. M., Dell'Oro, S., Capello, D., Ponzoni, M., Iuzzolino, P., Rossi, D., Pasini, F., Ambrosetti, A., Orvieto, E., Ferrarese, F., Arrigoni, G., Foppoli, F., Reni, M., Gaidano, G. (2004)
Aberrant methylation in the promoter region of the reduced folate carrier gene is a potential mechanism of resistance to methotrexate in primary central nervous system lymphomas
Br J Haematol, 126: 657-664
31. Ferreri, A. J. M., Guerra, E., Regazzi, M., Ambrosetti, A., Pivnik, A., Gubkin, A., Calderoni, A., Spina, M., Brandes, A., Ferrarese, F., Rognone, A., Govi, S., Dell'Oro, S., Locatelli, M., Villa, E., Reni, M. (2004)
Area under the curve of methotrexate and creatinine clearance are outcome-determining factors in primary CNS lymphomas
Br J Cancer, 90: 353-358
32. Flombaum, C., Meyers, P. (1999)
High-Dose Leucovorin as Sole Therapy for Methotrexate Toxicity
J Clin Oncol, 17: 1589-1594

33. Friso, S., Choi, S.-W., Girelli, D., Mason, J. B., Dolnikowski, G. G., Bagley, P. J., Olivieri, O., Jacques, P. F., Rosenberg, I. H., Corrocher, R., Selhub, J. (2002)
A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status
Proc Natl Acad Sci, 99: 5606-5611
34. Friso, S., Girelli, D., Trabetti, E., Olivieri, O., Guarini, P., Pignatti, P. E., Corrocher, R., Choi, S.-W. (2005)
The MTHFR 1298A>C Polymorphism and Genomic DNA Methylation in Human Leukocytes
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 14: 938-943
35. Gemmati, D., Ongaro, A., Scapoli, G. L., Della Porta, M., Tognazzo, S., Serino, M. L., Di Bona, E., Rodeghiero, F., Gilli, G., Reverberi, R., Caruso, A., Pasello, M., Pellati, A., De Mattei, M. (2004)
Common Gene Polymorphisms in the Metabolic Folate and Methylation Pathway and the Risk of Acute Lymphoblastic Leukemia and non-Hodgkin's Lymphoma in Adults
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 13: 787-794
36. Go, J. L., Lee, S. C., Kim, P. E. (2006)
Imaging of primary central nervous system lymphoma
Neurosurg Focus, 21: E4 1-6
37. Goekkurt, E., Hoehn, S., Wolschke, C., Wittmer, C., Stueber, C., Hossfeld, D. K., Stoeilmacher, J. (30-1-2006)
Polymorphisms of glutathione S-transferases (GST) and thymidylate synthase (TS)--novel predictors for response and survival in gastric cancer patients
Br J Cancer, 94: 281-286
38. Gorlick, R., Goker, E., Trippett, T., Steinherz, P., Elisseyeff, Y., Mazumdar, M., Flintoff, W. F., Bertino, J. R. (1997)
Defective Transport Is a Common Mechanism of Acquired Methotrexate Resistance in Acute Lymphocytic Leukemia and Is Associated With Decreased Reduced Folate Carrier Expression
Blood, 89: 1013-1018
39. Gorlick, R., Goker, E., Trippett, T., Waltham, M., Banerjee, D., Bertino, J. R. (1996)
Intrinsic and aquired resistance to Methotrexate in acute leukemia
N Engl J Med, 335: 1041-1048

40. Graziano, F., Kawakami, K., Watanabe, G., Ruzzo, A., Humar, B., Santini, D., Catalano, V., Ficarelli, R., Merriman, T., Panunzi, S., Testa, E., Cascinu, S., Bearzi, I., Tonini, G., Magnani, M. (2004)
Association of thymidilate synthase polymorphisms with gastric cancer susceptibility
Int J Cancer, 112: 1010-1014
41. Guha-Thakurta, N., Damek, D., Pollack, C., Hochberg, F. H. (1999)
Intravenous methotrexate as initial treatment for primary central nervous system lymphoma: response to therapy and quality of life of patients
J Neurooncol, 43: 259-268
42. Guo, W., Healy, J. H., Ladanyi, M., Huvos, A., Bertino, J. R., Gorlick, R. (1999)
Mechanisms of Methotrexate Resistance in Osteosarcoma
Clin Cancer Res, 5: 621-627
43. Hahn, J.-M. (2003)
ZNS-Lymphom
Checkliste Innere Medizin, 4. Auflage, 589-593, (Georg Thieme Verlag, Stuttgart)
44. Herrlinger, K. R., Fraser Cummings, J. R., Barnado, M. C. N. M., Schwab, M., Ahmad, T., Jewell, D. P. (2005)
The pharmacogenetics of methotrexate in inflammatory bowel disease
Pharmacogenetics and Genomics, 15: 705-711
45. Herrlinger, U. (1999)
Primary CNS lymphoma: findings outside the brain
J Neurooncol, 43: 227-230
46. Herrlinger, U., Plasswilm, L., Deckert, M., Küker, W., Thiel, E. (2003)
Primäre ZNS-Lymphome
Onkologe, 9: 739-745
47. Herrlinger, U., Schabet, M., Bitzer, M., Petersen, D., Krauseneck, P. (1999)
Primary central nervous system lymphoma: from clinical presentation to diagnosis
J Neurooncol, 43: 219-226
48. Herrlinger, U., Schabet, M., Brugger, W., Kortmann, R.-D., Küker, W., Deckert, M., Engel, C., Schmeck-Lindenau, H.-J., Mergenthaler, H.-G., Krauseneck, P., Benöhr, C., Meisner, C., Wiestler, O. D., Dichgans, J., Kanz, L., Bamberg, M., Weller, M. (2002)
German Cancer Society Neuro-Oncology Working Group NOA-03 Multicenter Trial in Single-Agent High-Dose Methotrexate for Primary Central Nervous System Lymphoma
Ann Neurol, 51: 247-252

49. Herter, F., Dornoff, W., Schmieder, A. (2006)
PCNSL
Onkologie 2004/05 Interdisziplinäre Empfehlungen zur Therapie, 13.
Auflage, 68-70, (W. Zuckerschwerdt Verlag GmbH, München)
50. Hochberg, F. H., Miller, G., Schooley, R. T., Hirsch, M. S., Feorino, P.,
Henle, W. (1983)
Central-nervous-system lymphoma related to Epstein-Barr virus
N Engl J Med, 309: 745-748
51. Horie, N., Aiba, H., Oguro, K., Hojo, H., Takeishi, K. (1995)
Functional Analysis and DNA Polymorphism of the Tandemly Repeated
Sequences in the 5'-terminal Regulatory Region of the Human Gene for
Thymidilate Synthase
Cell Struct Funct, 20: 191-197
52. Hughes, L. B., Beasley, T. M., Patel, H., Tiwari, H. K., Morgan, S. L.,
Baggott, J. E., Saag, K. G., McNicholl, J., Moreland, L. W., Alarcón, G. S.,
Bridges Jr, S. L. (2006)
Racial/Ethnic Differences in Allel Frequencies of Single Nucleotide
Polymorphisms in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene and
Their Influence on Response to Methotrexate in Rheumatoid Arthritis
Ann Rheum Dis, 65: 1213-1218
53. Hunt, M. A., Jahnke, K., Murillo, T. P., Neuwelt, E. A. (2006)
Distinguishing primary central nervous system lymphoma from other
central nervous system diseases: a neurosurgical perspective on
diagnostic dilemmas and approaches
Neurosurg Focus, 21: E3 1-7
54. Iacopetta, B., Grieu, F., Joseph, D., Elsaleh, H. (2001)
A polymorphism in the enhancer region of the thymidilate synthase
promoter influences the survival of colorectal cancer patients treated with
5-fluorouracil
Br J Cancer, 85: 827-830
55. Isotalo, P. A., Wells, G. A., Donnelly, J. G. (2000)
Neonatal and Fetal Methylenetetrahydrofolate Reductase Genetic
Polymorphisms: An Examination of C677T and A1298C Mutations
Am J Hum Genet, 67: 986-990
56. Itoga, S., Nanmoku, T., Uchimoto, T., Sunaga, M., Nezu, M., Tomonaga,
T., Harada, S., Nomura, F. (2004)
Comparative Analyses of Four Different Methods of Genotyping ALDH2
Alcohol Clin Exp Res, 28: 117S-122S
57. Kadoch, C., Treseler, P., Rubenstein, J. L. (2006)
Molecular pathogenesis of primary central nervous system lymphoma
Neurosurg Focus, 21: E1 1-10

58. Kawakami, K., Salonga, D., Park, J. M., Danenberg, K. D., Uetake, H., Brabender, J., Omura, K., Watanabe, G., Danenberg, P. V. (2001)
Different Lengths of a Polymorphic Repeat Sequence in the Thymidilate Synthase Gene Affect Translational Efficiency but Not Its Gene Eypression
Clin Cancer Res, 7: 4096-4101
59. Kawakami, K., Watanabe, G. (2003)
Identification and Functional Analysis of Single Nucleotide Polymorphism in the Tandem Repeat Sequence of *Thymidilate Synthase* Gene
Cancer Res, 63: 6004-6007
60. Kealy, C., Brown, K. S., Woodside, J. V., Young, I., Murray, L., Boreham, C. A., McNulty, H., Strain, J. J., McPartlin, J., Scott, J. M., Whitehead, A. S. (2005)
A common insertion/deletion polymorphism of the thymidilate synthase (*TYMS*) gene is a determinant of red blood cell folate and homocysteine concentrations
Hum Genet, 116: 347-353
61. Kishi, S., Griener, J., Cheng, C., Das, S., Cook, E. H., Pei, D., Hudson, M., Rubnitz, J., Sandlund, J. T., Pui, C.-H., Relling, M. V. (2003)
Homocysteine, Pharmacogenetics, and Neurotoxicity in Children With Leukemia
J Clin Oncol, 21: 3084-3091
62. Knop, S., Herrlinger, U., Löffler, J., Hebart, H. (2003)
Antrag auf Forschungsförderung im *fortune*-Programm (Kleinantrag):
Untersuchung zu genetischen Polymorphismen im Methotrexat-Stoffwechsel und -Transport bei Patienten mit primären ZNS-Lymphomen
63. Korfel, A., Thiel, E. (1999)
Primäre ZNS-Lymphome
Dt Ärztebl, 96: A-353-358
64. Krajinovic, M., Costea, I., Chiasson, S. (2002)
Polymorphism on the thymidilate synthase gene and outcome of acute lymphoblastic leukaemia
Lancet, 359: 1033-1034
65. Krajinovic, M., Costea, I., Primeau, M., Dulucq, S., Moghrabi, A. (2005)
Combining several polymorphisms of thymidylate synthase gene for pharmacogenetic analysis
Pharmacogenomics J, 5: 374-380

66. Kumagai, K., Hiyama, K., Oyama, T., Maeda, H., Kohno, N. (2003)
Polymorphisms in the thymidilate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase genes and sensitivity to the low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis
Int J Mol Med, 11: 593-600
67. Laverdière, C., Chiasson, S., Costea, I., Moghrabi, A., Krajinovic, M. (2002)
Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia
Blood, 100: 3832-3834
68. Lecomte, T., Ferraz, J.-M., Zinzindohoué, F., Lorient, M.-A., Tregouet, D.-A., Landi, B., Berger, A., Cugnenc, P.-H., Jian, R., Beaune, P., Laurent-Puig, P. (2004)
Thymidilate Synthase Gene Polymorphism Predicts Toxicity in Colorectal Cancer Patients Receiving 5-Fluorouracil-based Chemotherapy
Clin Cancer Res, 10: 5880-5888
69. Levy, A. S., Sather, H. N., Steinherz, P. G., Sowers, R., La, M., Moscow, J. A., Gaynon, P. S., Uckun, F. M., Bertino, J. R., Gorlick, R. (2003)
Reduced Folate Carrier and Dihydrofolate Reductase Expression in Acute Lymphocytic Leukemia May Predict Outcome: A Children's Cancer Group Study
J Pediatr Hematol Oncol, 25: 688-695
70. Lightfoot, T. J., Skibola, C. F., Willett, E. V., Skibola, D. R., Allan, J. M., Coppédé, F., Adamson, P. J., Morgan, G. J., Roman, E., Smith, M. T. (2005)
Risk of Non-Hodgkin Lymphoma Associated with Polymorphisms in Folate-Metabolizing Genes
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 14: 2999-3003
71. Lincz, L. F., Scorgie, F. E., Garg, M. B., Ackland, S. P. (1-5-2007)
Identification of a novel single nucleotide polymorphism in the first tandem repeat sequence of the thymidilate synthase 2R allele
Int J Cancer, 120: 1930-1934
72. Linnebank, M., Pels, H., Kleczar, N., Farmand, S., Fließbach, K., Urbach, H., Orlopp, K., Klockgether, T., Schmidt-Wolf, I. G. H., Schlegel, U. (2005)
MTX-induced white matter changes are associated with polymorphisms of methionine metabolism
Neurology, 64: 912-913

-
73. Linnebank, M., Schmidt, S., Kölsch, H., Linnebank, A., Heun, R., Schmidt-Wolf, I. G. H., Glasmacher, A., Fliessbach, K., Klockgether, T., Schlegel, U., Pels, H. (2004)
The methionine synthase polymorphism D919G alters susceptibility to primary central nervous system lymphoma
Br J Cancer, 90: 1969-1971
74. Mandola, M. V., Stoehlmacher, J., Muller-Weeks, S., Cesarone, G., Yu, M. C., Lenz, H.-J., Ladner, R. D. (2003)
A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of the thymidilate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity
Cancer Res, 63: 2898-2904
75. Mandola, M. V., Stoehlmacher, J., Zhang, W., Groshen, S., Yu, M. C., Iqbal, S., Lenz, H.-J., Ladner, R. D. (2004)
A 6bp polymorphism in the *thymidilate synthase* gene causes message instability and is associated with decreased intratumoral TS mRNA levels
Pharmacogenetics, 14: 319-327
76. Marcuello, E., Altés, A., Del Rio, E., César, A., Menoyo, A., Baiget, M. (2004)
Single nucleotide polymorphism in the 5' tandem repeat sequences of *thymidilate synthase* gen predicts for response to fluorouracil-based chemotherapy in advanced colorectal cancer patients
Int J Cancer, 112: 733-737
77. Marsh, S. (2005)
Thymidylate synthase pharmacogenetics
Invest New Drugs, 23: 533-537
78. Marsh, S., Ameyaw, M. M., Githang'a, J., Indalo, A., Ofori-Adjei, D., McLeod, H. L. (2000)
Novel thymidylate synthase enhancer region alleles in African populations
Hum Mutat, 16: 528-528
79. Marsh, S., McKay, J. A., Cassidy, J., McLeod, H. L. (2001)
Polymorphism in the thymidylate synthase promoter enhancer region in colorectal cancer.
Int J Oncol, 19: 383-386
80. Matsuo, K., Suzuki, R., Hamajima, N., Ogura, M., Kagami, Y., Taji, H., Kondoh, E., Maeda, S., Asakura, S., Kaba, S., Nakamura, S., Seto, M., Morishima, Y., Tajima, K. (2001)
Association between polymorphisms of folate- and methionine-metabolizing enzymes and susceptibility to malignant lymphoma
Blood, 97: 3205-3209

81. Meisel, C., Cascorbi, I., Gerloff, T., Stangl, V., Laule, M., Muller, J. M., Wernecke, K. D., Baumann, G., Roots, I., Stangl, K. (15-2-2001)
Identification of six methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genotypes resulting from common polymorphisms: impact on plasma homocysteine levels and development of coronary artery disease
Atherosclerosis, 154: 651-658
82. Nagasubramanian, R., Innocenti, F., Ratain, M. J. (2003)
Pharmacogenetics in cancer treatment
Annu Rev Med, 54: 437-52
83. Narayanan, S., McConnel, J., Little, J., Sharp, L., Piyathilake, C. J., Powers, H., Basten, G., Duthie, S. J. (2004)
Associations between Two Common Variants C677T and A1298C in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene and Measures of Folate Metabolism and DNA Stability (Strand Breaks, Misincorporated Uracil, and DNA Methylation Status) in Human Lymphocytes *In vivo*
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 13: 1436-1443
84. New, P. Z.
Primary Central Nervous System Lymphoma
http://www.baylorcme.org/neuro/presentations/new_lymphomas/presentation_text.cfm
85. Niclot, S., Pruvot, Q., Besson, C., Savoy, D., Macintyre, E., Salles, G., Brousse, N., Varet, B., Landais, P., Taupin, P., Junien, C., Baudry-Bluteau, D. (2006)
Implication of the folate-methionine metabolism pathways in susceptibility to follicular lymphomas
Blood, 108: 278-285
86. Omuro, A. M., Ben Porat, L. S., Panageas, K. S., Kim, A. K., Correa, D. D., Yahalom, J., Deangelis, L. M., Abrey, L. E. (2005)
Delayed neurotoxicity in primary central nervous system lymphoma
Arch Neurol, 62: 1595-1600
87. Plasswilm, L., Herrlinger, U., Korfel, A., Weller, M., Küker, W., Kanz, L., Bamberg, M. (2002)
Primary central nervous system (CNS) lymphoma in immunocompetent patients
Ann Hematol, 81: 415-423
88. Plotkin, S. R. (2005)
Update on primary central nervous system lymphoma
Curr Opin Neurol, 18: 645-653

89. Rady, P. L., Szucs, S., Matalon, R. K., Grady, J., Hudnall, S. D., Kellner, L. H., Nitowsky, H. (2001)
Genetic Polymorphism (G80A) of Reduced Folate Carrier Gene in Ethnic Populations
Mol Genet Metab, 73: 285-286
90. Reni, M., Ferreri, A. J. M., Garancini, M. P., Villa, E. (1997)
Therapeutic management of primary central nervous system lymphoma in immunocompetent patients: Results of a critical review of the literature
Ann Oncol, 8: 227-234
91. Robien, K., Ulrich, C. M. (2003)
5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms and Leukemia Risk: A HuGE Minireview
Am J Epidemiol, 157: 571-582
92. Roelcke, U., Leenders, K. L. (1999)
Positron emission tomography in patients with primary CNS lymphomas
J Neurooncol, 43: 231-236
93. Rubenstein, J. L., Fridlyand, J., Shen, A., Aldape, K., Ginzinger, D., Batchelor, T., Treseler, P., Berger, M., McDermott, M., Prados, M., Karch, J., Okada, C., Hyun, W., Parikh, S., Haqq, C., Shuman, M. (2006)
Gene Expression and Angiotropism in Primary CNS Lymphoma
Blood, 107: 3716-3723
94. Rustum, Y. M., Harstrick, A., Cao, S., Vanhoefer, U., Yin, M. B., Wilke, H., Seeber, S. (1997)
Thymidylate synthase inhibitors in cancer therapy: direct and indirect inhibitors
J Clin Oncol, 15: 389-400
95. Schabet, M. (1999)
Current developments in primary CNS lymphoma
J Neurooncol, 43: 197-198
96. Schabet, M. (1999)
Epidemiology of primary CNS lymphoma
J Neurooncol, 43: 199-201
97. Schlegel, U.
Interdisziplinäre Kurzgefasste Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft und ihrer Neuro-Onkologischen Arbeitsgemeinschaft (NOA): Primäre ZNS-Lymphome
<http://www.uni-duesseldorf.de/AWMF/II/032-046.htm>
98. Schlegel, U.
Leitlinie: Primäre ZNS- Lymphome
<http://www.neuroonkologie.de/main/material/leitpcnsl.pdf>

99. Schmeling, H., Biber, D., Heins, S., Horneff, G. (2005)
Influence of Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms on Efficacy and Toxicity of Methotrexate in Patients with Juvenile Idiopathic Arthritis
J Rheumatol, 32: 1832-1836
100. Schneider, J. A., Rees, D. C., Liu, Y.-T., Clegg, J. B. (1998)
Worldwide Distribution of a Common Methylenetetrahydrofolate Reductase Mutation
Am J Med Genet, 62: 1258-1260
101. Seidemann, K., Book, M., Zimmermann, M., Meyer, U., Welte, K., Stanulla, M., Reiter, A. (2006)
MTHFR 677 (C->T) polymorphism is not relevant for prognosis or therapy-associated toxicity in pediatric NHL: results from 484 patients of multicenter trial NHL-BFM 95
Ann Hematol, 85: 291-300
102. Sharp, L., Little, J. (2004)
Polymorphisms in Genes Involved in Folate Metabolism and Colorectal Neoplasia: A HuGE Review
Am J Epidemiol, 159: 423-443
103. Shi, Q., Zhang, Z., Neumann, A. S., Li, G., Spitz, M. R., Wei, Q. (2005)
Case-control analysis of thymidilate synthase polymorphisms and risk of lung cancer
Carcinogenesis, 26: 649-656
104. Shimasaki, N., Mori, T., Samejima, H., Sato, R., Shimada, H., Yahagi, N., Torii, C., Yoshihara, H., Tanigawara, Y., Takahashi, T., Kosaki, K. (2006)
Effects of Methylenetetrahydrofolate Reductase and Reduced Folate Carrier 1 Polymorphisms on High-Dose Methotrexate-Induced Toxicities in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia or Lymphoma
J Pediatr Hematol Oncol, 28: 64-68
105. Skibola, C. F., Forrest, M. S., Coppedé, F., Agana, L., Hubbard, A., Smith, M. T., Bracci, P. M., Holly, E. A. (2004)
Polymorphisms and haplotypes in folate-metabolizing genes and risk of non-Hodgkin lymphoma
Blood, 104: 2155-2162
106. Skibola, C. F., Smith, M. T., Hubbard, A., Shane, B., Roberts, A. C., Law, G. R., Rollinson, S., Roman, E., Cartwright, R. A., Morgan, G. J. (2002)
Polymorphisms in the thymidilate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and risk of adult acute lymphocytic leukemia
Blood, 99: 3786-3791

107. Skibola, C. F., Smith, M. T., Kane, E., Roman, E., Rollinson, S., Cartwright, R. A., Morgan, G. (1999)
Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults
Proc Natl Acad Sci, 96: 12810-12815
108. Smith, J. R., Brazier, R. M., Paoletti, S., Lipp, M., Ugucconi, M., Rosenbaum, J. (2003)
Expression of B-cell-attracting chemokine 1 (CXCL13) by malignant lymphocytes and vascular endothelium in primary central nervous system lymphoma
Blood, 101: 815-821
109. Thiel, E., Weller, M., Korfel, A., Herrlinger, U.
Studienprotokoll: Phase IV-Studie zum Stellenwert der Ganzhirnbestrahlung in der Primärtherapie primärer ZNS-Lymphome mit Hochdosis-Methotrexat G-PCNSL-SG-1
<http://www.medizin.fu-berlin.de/haema/pcnsl.htm>
110. Toffoli, G., Russo, A., Innocenti, F., Corona, G., Tumolo, S., Sartor, F., Mini, E., Boiocchi, M. (2003)
Effect of methylenetetrahydrofolate reductase 677C->T polymorphism on toxicity and homocysteine plasma level after chronic Methotrexate treatment of ovarian cancer patients
Int J Cancer, 103: 294-299
111. Toffoli, G., Veronesi, A., Boiocchi, M., Crivellari, D. (2000)
MTHFR gene polymorphism and severe toxicity during adjuvant treatment of early breast cancer with cyclophosphamide, methotrexate and fluorouracil (CMF)
Ann Oncol, 11: 373-375
112. Trinh, B. N., Ong, C.-N., Coetzee, G. A., Yu, M. C., Laird, P. W. (2002)
Thymidilate synthase: a novel genetic determinat of plasma homocysteine and folate levels
Hum Genet, 111: 299-302
113. Uchida, K., Hayashi, K., Kawakami, K., Schneider, S., Yochim, J. M., Kuramochi, H., Takasaki, K., Danenberg, K. D., Danenberg, P. V. (2004)
Loss of Heterozygosity at the Thymidilate Synthase (*TS*) Locus on Chromosome 18 Affects Tumor Response and Survival in Individuals Heterozygous for a 28-bp Polymorphism in the *TS* Gene
Clin Cancer Res, 10: 433-439
114. Ulrich, C. M., Bigler, J., Bostick, R., Fosdick, L., Potter, J. D. (2002)
Thymidilate Synthase Promotor Polymorphism, Interaction with Folate Intake, and Risk of Colorectal Adenomas
Cancer Res, 62: 3361-3364

115. Ulrich, C. M., Bigler, J., Velicer, C. M., Greene, E. A., Farin, F. M., Potter, J. D. (2000)
Searching Expressed Sequence Tag Databases: Discovery and Confirmation of a Common Polymorphism in the *Thymidilate Synthase* Gene
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 9: 1381-1385
116. Ulrich, C. M., Kampman, E., Bigler, J., Schwartz, S. M., Chen, C., Bostick, R., Fosdick, L., Beresford, S. A. A., Yasui, Y., Potter, J. D. (1999)
Colorectal Adenomas and the C677T MTHFR Polymorphism: Evidence for Gene-Environment Interaction?
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 8: 659-668
117. Ulrich, C. M., Potter, J. D. (2005)
Thymidilate synthase polymorphism and survival of colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil
Br J Cancer, 86: 1362-1366
118. Ulrich, C. M., Robien, K., Sparks, R. (2002)
Pharmacogenetics and folate metabolism - a promising direction
Pharmacogenomics, 3: 299-313
119. Ulrich, C. M., Yasui, Y., Storb, R., Schubert, M. M., Wagner, J. L., Bigler, J., Ariail, K. S., Keener, C. L., Li, S., Liu, H., Farin, F. M., Potter, J. D. (2001)
Pharmacogenetics of methotrexate: toxicity among marrow transplantation patients varies with the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism
Blood, 98: 231-234
120. Urano, W., Tanguchi, A., Yamanaka, H., Tanaka, E., Nakajima, H., Matsuda, Y., Akama, H., Kitamura, Y., Kamatani, N. (2002)
Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene were associated with both the efficacy and the toxicity of methotrexate used for the treatment of rheumatoid arthritis, as evidenced by single locus and haplotype analyses
Pharmacogenetics, 12: 183-190
121. van der Put, N. M. J., Gabreëls, F., Stevens, E. M. B., Smeitink, J. A. M., Trijbels, F. J. M., Eskes, T. K. A. B., van den Heuvel, L. P., Blom, H. J. (1998)
A Second Mutation in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene: An Additional Risk Factor for Neural-Tube Defects?
Am J Hum Genet, 62

122. van Ede, A. E., Laan, R. F. J. M., Blom, H. J., Boers, G. H. J., Haagsma, C. J., Thomas, C. M. G., de Boo, T. M., van de Putte, L. B. A. (2002)
Homocysteine and folate status in methotrexate-treated patients with rheumatoid arthritis
Rheumatology (Oxford), 41: 658-665
123. van Ede, A. E., Laan, R. F. J. M., Blom, H. J., De Abreu, R. A., van de Putte, L. B. A. (1998)
Methotrexate in rheumatoid arthritis: an update with focus on mechanism involved in toxicity
Semin Arthritis Rheum, 27: 277-292
124. van Ede, A. E., Laan, R. F. J. M., Blom, H. J., Huizinga, T. W. J., Haagsma, C. J., Giesendorf, B. A. J., de Boo, T. M., van de Putte, L. B. A. (2001)
The C677T Mutation in the Methylene-tetrahydrofolate Reductase Gene
Arthritis Rheum, 44: 2525-2530
125. Villafranca, E., Okruzhnov, Y., Dominguez, M. A., Garcia-Foncillas, J., Azinovic, I., Martinez, E. (2001)
Polymorphisms of the repeated sequences in the enhancer region of the thymidylate synthase gene promoter may predict downstaging after preoperative chemoradiation in rectal cancer
J Clin Oncol, 19: 1779-1786
126. Warren, R. B., Griffiths, C. E. M. (2005)
The potential of pharmacogenetics in optimizing the use of methotrexate for psoriasis
Br J Dermatol, 153: 869-873
127. Weisberg, I., Tran, P., Christensen, B., Sibani, S., Rozen, R. (1998)
A Second Genetic Polymorphism in Methylene-tetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Associated with Decreased Enzyme Activity
Mol Genet Metab, 64: 169-172
128. Weisman, M. H., Furst, D., Park, G. S., Kremer, J., Smith, K., Wallace, D. J., Caldwell, J. R., Dervieux, T. (2006)
Risk Genotypes in Folate-Dependent Enzymes and Their Association With Methotrexate-Related Side Effects in Rheumatoid Arthritis
Arthritis Rheum, 54: 607-612
129. Weller, M. (1999)
Glucocorticoid treatment of primary CNS lymphoma
J Neurooncol, 43: 237-239

130. Wessels, J. A. M., de Vries-Bouwstra, J. K., Heijmans, B. T., Slagboom, P. E., Goekoop-Ruiterman, Y. P. M., Allaart, C. F., Kerstens, P. J. S. M., van Zeben, D., Breedveld, F. C., Dijkmans, B. A. C., Huizinga, T. W. J., Guchelaar, H.-J. (2006)
Efficacy and Toxicity of Methotrexate in Early Rheumatoid Arthritis Are Associated With Single-Nucleotide Polymorphisms in Genes Coding for Folate Pathway Enzymes
Arthritis Rheum, 54: 1087-1095
131. Whetstine, J. R., Gifford, A. J., Witt, T., Liu, X. Y., Flatley, R. M., Norris, M., Haber, M., Taub, J. W., Ravindranath, Y., Matherly, L. H. (2001)
Single Nucleotide Polymorphisms in the Human Reduced Folate Carrier: Characterization of a High-Frequency G/A Variant at Position 80 and Transport Properties of the His²⁷ and Arg²⁷ Carriers
Clin Cancer Res, 7: 3416-3422
132. Wiemels, J. L., Smith, R. N., Taylor, G. M., Eden, O. B., Alexander, F. E., Greaves, M. F. (2001)
Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia
Proc Natl Acad Sci, 98: 4004-4009
133. Worm, J., Kirkin, A. F., Dzhandzhugazyan, K. N., Guldberg, P. (2001)
Methylation-dependent silencing of the reduced folate carrier gene in inherently methotrexate-resistant human breast cancer cells.
J Biol Chem, 276: 39990-40000
134. Yang, R. Y., Sowers, R., Mazza, B., Healy, J. H., Huvos, A., Grier, H., Bernstein, M., Beardsley, P., Krailo, M. D., Devidas, M., Bertino, J. R., Meyers, P. A., Gorlick, R. (2003)
Sequence Alterations in the Reduced Folate Carrier Are Observed in Osteosarcoma Tumor Samples
Clin Cancer Res, 9: 837-844
135. Zhang, J., Cui, Y., Kuang, G., Li, Y., Wang, N., Wang, R., Guo, W., Wen, D., Wei, L., Yu, F., Wang, S. (2004)
Association of the thymidilate synthase polymorphisms with esophageal squamous cell carcinoma and gastric cardiac adenocarcinoma
Carcinogenesis, 25: 2479-2485
136. Zhang, J., Zotz, R. B., Li, Y., Wang, R., Kiel, S., Schulz, W. A., Wen, D., Chen, Z., Zhang, L., Wang, S., Gabbert, H. E., Sarbia, M. (2004)
Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and predisposition towards esophageal squamous cell carcinoma in a German Caucasian and a northern Chinese population
J Cancer Res Clin Oncol, 130: 574-580

137. Zhao, R., Assaraf, Y. G., Goldman, I. D. (2005)
A Mutated Murine Reduced Folate Carrier (RFC1) with Increased Affinity for Folic Acid, Decreased Affinity for Methotrexate, and an Obligatory Anion Requirement for Transport Function
J Biol Chem, 273: 19065-19071
138. Zhao, R., Gao, F., Wang, P. J., Goldman, I. D. (1999)
Role of the Amino Acid 45 Residue in Reduced Folate Carrier Function and Ion-Dependent Transport as Characterized by Site-Directed Mutagenesis
Mol Pharmacol, 57: 317-323
139. Ziegler, A., Lange, S., Bender, R. (2002)
Überlebenszeitanalyse: Eigenschaften und Kaplan-Meier Methode
Dtsch Med Wochenschr, 127: T14-T16
140. Ziegler, A., Lange, S., Bender, R. (2004)
Überlebenszeitanalyse: Der Log-Rang-Test
Dtsch Med Wochenschr, 129: T4-T6
141. Ziegler, A., Lange, S., Bender, R. (2004)
Überlebenszeitanalyse: Die Cox-Regression
Dtsch Med Wochenschr, 129: T1-T3

8 Anhang

8.1 WHO-Empfehlung für die Graduierung akuter und subakuter Toxizität

	Grad 0	Grad I	Grad II	Grad III	Grad IV
Hämatologische Parameter					
Hämoglobin (g/l)	>110	95-109	80-94	65-79	<65
Leukozyten 1000/ μ l	>4,0	3,0-3,9	2,0-2,9	1,0-1,9	<1,0
Granulozyten 1000/ μ l	>2,0	1,5-1,9	1,0-1,4	0,5-0,9	<0,5
Thrombozyten 1000/ μ l	>100	75-99	50-74	25-49	<25

Andere Parameter sind: Magen/Darm (Bilirubin, Transaminasen,...), Niere (Kreatinin, Harnstoff,...), Lunge, *drug fever*, Allergie, Haut, Haare, Infektion, Herz und Nervensystem.

nach: WHO Handbook for reporting results of cancer treatment, No. 48 (1979), WHO Offset Publications, Geneva.

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Folsäuremetabolismus, DNA-Synthese und DNA-Methylierung.	8
Abb. 2: Flussdiagramm der Studie	21
Abb. 3: Markierung der Sonden, DNA mit ungebundenen Sonden, FRET	34
Abb. 4: DNA-Sequenz und Sonde ohne (a) und mit (b) <i>mismatch</i> ¹	35
Abb. 5: Fluoreszenzkurve und erste negative Ableitung (Schmelzkurve)	36
Abb. 6: hook-Effekt	40
Abb. 7: Schmelzkurvenanalyse des SNP MTHFR C677T	49
Abb. 8: Auftrennung der 212/240/268 bp langen Fragmente im Agarose-Gel.	51

Abb. 9: RFLP-Analyse der 88/152/158 bp langen PCR-Produkte nach <i>Dra</i> I Verdau.	52
Abb. 10: Verteilung der Summen im Risikoindex.	56
Abb. 11: Verteilung der Beobachtungszeiträume im OAS.	62
Abb. 12: Verteilung der Beobachtungszeiträume im PFS.	62
Abb. 13: Kaplan-Meier Darstellung für OAS und PFS aller Patienten	63
Abb. 14: Risikohaplotyp und OAS	64
Abb. 15: Risikohaplotyp und PFS	65
Abb. 16: SNP MTHFR C677T: Kaplan-Meier Darstellung von OAS und PFS.	66
Abb. 17: SNP MTHFR A1298C: Kaplan-Meier Darstellung von OAS und PFS.	68
Abb. 18: SNP RFC G80A: Kaplan-Meier Darstellung von OAS und PFS.	69
Abb. 19: TS 6 bp <i>tandem/triplet repeat</i> : Kaplan-Meier Darstellung von OAS und PFS.	71
Abb. 20: TS 6 bp Deletion: Kaplan-Meier Darstellung von OAS und PFS.	72
Abb. 21: Verteilung der Schweregrade: „Anämie“.	74
Abb. 22: Verteilung der Schweregrade: „Leukopenie“.	75
Abb. 23: Verteilung der Schweregrade: „Granulopenie“.	75
Abb. 24: Verteilung der Schweregrade: „Thrombopenie“.	75
Abb. 25: Verteilung der Schweregrade: „max. nicht-hämatol. Nebenwirkung“.	76
Abb. 26: Verteilung der Schweregrade: „schwerste dok. Nebenwirkung“.	76
Abb. 27: Boxplot MTHFR C677T und schwerste dok. Nebenwirkung.	77
Abb. 28: Boxplot MTHFR C677T und schwerste dok. Nebenwirkung.	79
Abb. 29: <i>Linear Fit</i> Analyse schwerste dok. Nebenwirkung und Risikoindex.	80
Abb. 30: Korrespondenzanalyse RFC G80A und Granulopenie.	81
Abb. 31: Boxplot Risikohaplotyp und Granulopenie.	82
Abb. 32: Korrespondenzanalyse RFC G80A und Leukopenie.	83
Abb. 33: Boxplot RFC G80A und max. nicht-hämatologische Nebenwirkung.	85
Abb. 34: Boxplot MTHFR C677T und maximale nicht-hämatologische Nebenwirkung.	85
Abb. 35: Korrespondenzanalyse MTHFR C677T und maximale nicht- hämatologische Nebenwirkung.	87

Abb. 36: Boxplot MTHFR C677T und maximale nicht-hämatologische Nebenwirkung.	87
Abb. 37: Korrespondenzanalyse MTHFR C677T und maximale nicht-hämatologische Nebenwirkung	89
Abb. 38: Boxplot TS 28 bp <i>tandem/triplet repeat</i> und maximale nicht-hämatologische Nebenwirkung	89
Abb. 39: Korrespondenzanalyse TS 28 bp <i>tandem/triplet repeat</i> und maximal nicht-hämatologische Nebenwirkung	90
Abb. 40: <i>linear fit</i> Analyse von maximaler nicht-hämatologischer Nebenwirkung und Risikoindex.	91

8.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Inhalt PCR Master Mix Kit	26
Tab. 2: Zusammensetzung der LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes	26
Tab. 3: Sequenzen der PCR-Primer	27
Tab. 4: Sequenzen der Sonden für die Mutationsanalyse im LightCycler	27
Tab. 5: Mastermix für MTHFR C677T	39
Tab. 6: Programmeinstellung MTHFR C677T	39
Tab. 7: Mastermix für MTHFR A1298C (einfacher Ansatz)	42
Tab. 8: Programmeinstellung MTHFR A1298C	42
Tab. 9: Mastermix für RFC G80A (einfacher Ansatz)	43
Tab. 10: Programmeinstellung RFC G80A	43
Tab. 11: PCR-Bedingungen für 28 bp <i>tandem/triplet repeat</i> in der TS	44
Tab. 12: Mastermix für 28 bp <i>tandem/triplet repeat</i> in der TS	44
Tab. 13: PCR-Bedingungen für 6 bp Deletion in der 3'-UTR der TS	45
Tab. 14: Mastermix für die 6 bp Deletion in der 3'-UTR der TS	45
Tab. 15: Mastermix für den Restriktionsenzymverdau mit <i>Dra I</i>	46

Tab. 16: Zuordnung der Fragmentlänge zum Alleltyp des 28 bp <i>tandem/triplet repeat</i> der TS	51
Tab. 17: Zuordnung der Fragmente des RFLP zum Genotyp der 6 bp Deletion in der 3'-UTR der TS	52
Tab. 18: Auswertung der Anzahl der beobachteten und erwarteten Genotypen nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.	53
Tab. 19: Vergleich der Genotypenfrequenz der Studienpopulation	57
Tab. 20: SNP MTHFR C677T: mittlere Überlebenszeiten im OAS und PFS in Monaten.	65
Tab. 21: SNP MTHFR A1298C: mittlere Überlebenszeiten im OAS und PFS in Monaten.	67
Tab. 22: SNP RFC G80A: mittlere Überlebenszeiten im OAS und PFS in Monaten.	68
Tab. 23: TS 28 bp <i>tandem/triplet repeat</i> : mittlere Überlebenszeiten im OAS und PFS in Monaten.	70
Tab. 24: TS 6 bp Deletion: mittlere Überlebenszeiten im OAS und PFS in Monaten.	71
Tab. 25: Kontingenztabelle MTHFR C677T und schwerste dokumentierte Nebenwirkung	78
Tab. 26: Kontingenztabelle RFC G80A	81
Tab. 27: Kontingenztabelle RFC G80A	84
Tab. 28: Kontingenztabelle MTHFR C677T und maximale nicht-hämatologische Nebenwirkung (klinisch)	86
Tab. 29: Kontingenztabelle MTHFR C677T	88

8.4 Abkürzungsverzeichnis und Übersetzungen

A	Adenosin
Abb.	Abbildung

AIDS	erworbenes Immunschwäche-Syndrom (<i>acquired immunodeficiency syndrom</i>)
ALL	akute lymphatische Leukämie
AraC	Cytarabin, 1- β -Arabinofuranosylcytosin
AUC	Fläche unter der Kurve (<i>area under the curve</i>)
bp	Basenpaar (<i>base pair</i>)
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
Ca	Karzinom
CD	Oberflächenmarker (<i>cluster of differentiation</i>)
CI	Konfidenzintervall (<i>confidence intervall</i>)
CR	komplette Remission (<i>complete remission</i>)
CRP	C-reaktives Protein
d	Tag (<i>dies</i>)
dATP	Desoxyadenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-Triphosphat
del	Deletion
dGTP	Desoxyguanosin-Triphosphat
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DLBCL	diffus großzelliges B-Zell-Lymphom (<i>diffuse large B-cell lymphoma</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
dUMP	Desoxyuridin-Monophosphat
dUTP	Desoxyuridin-Triphospaht
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFS	krankheitsfreies Überleben (<i>event free survival</i>)
EST	<i>expressed sequence tags</i>
et al.	und andere (<i>et alii</i>)
fkt.	funktionell
FL	Fluorescein

FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
g	Gramm
G	Guanosin
GVHD	Spender gegen Empfänger Reaktion (<i>GVHD</i>)
Gy	Gray
h	Stunde(n)
HD	Hochdosis
HHV-8	humanes Herpes-Virus-8
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
Insdel	Insertion und/oder Deletion
KA	Korrespondenzanalyse
kb	Kilobasen (1000 Basen)
klin.	klinisch
Kg	Kontrollgruppe, Kontrollgruppen
KOF	Körperoberfläche
KT	Kontingenztafel
LC	LightCycler®
LED	Leuchtdiode (<i>light emitting diode</i>)
loss	Verlust
m ²	Quadratmeter
MALDI-TOF	Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation-Flugzeit-Analyse (<i>matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight</i>)
mg	Milligramm
min	Minute(n)
mM	Millimolar
MMN	maximale nicht-hämatologische Nebenwirkung
Mon.	Monat, -e
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MTHFR	Methylentetrahydrofolatreduktase
MTX	Methotrexat

NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
nm	Nanometer
OAS	Überlebensdauer (<i>overall survival</i>)
OMI	oraler Mukositis-Index
OR	<i>odds ratio</i>
PCNSL	primäres ZNS-Lymphom
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PD	progrediente Erkrankung (<i>progressive disease</i>)
PFS	progressionsfreie Überlebenszeit (<i>progression free survival</i>)
PH	Phosphatende
PR	partielle Remission (<i>partial remission</i>)
R	Wiederholung (<i>repeat</i>)
RA	rheumatoide Arthritis
RFC	reduziertes Folat Carrierprotein
RFLP	Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus
RFS	rückfallfreies Überleben (<i>relapse free survival</i>)
RI	Risiko-Index
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT-PCR	<i>real-time</i> PCR
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SD	stabiler Krankheitszustand (<i>stable disease</i>)
SDN	schwerste dokumentierte Nebenwirkung
sec	Sekunde(n)
Sig.	Signifikanz
SNP	Punktmutation (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
Taq-Polymerase	Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
THF	Tetrahydrofolsäure
TS	Thymidylat-Synthase

U	<i>Unit</i>
UTR	untranslatierte Region (<i>untranslated region</i>)
UV	ultraviolett
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VNTR	Tandem-/Triplet Wiederholung (<i>variable number of tandem repeat</i>)
vs.	versus
WBRT	Ganzhirnbestrahlung (<i>whole brain radiotherapie</i>)
ZNS	zentrales Nervensystem
5-FU	5-Fluoruracil

Auszüge dieser Arbeit wurden als Abstract auf dem Kongress der ASH (American Society of Hematology) 2005 in Atlanta, USA und als Poster auf der Posterpräsentation des *fortune* Programms 2004 in Tübingen und auf dem Kongress der ASCO (American Society of Clinical Oncology) 2006 in Atlanta, USA vorgestellt.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. H. Hebart nicht nur für die freundliche Überlassung des Themas und die Möglichkeit in seinem Labor zu promovieren, sondern auch für die Unterstützung bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. rer. nat. J. Löffler danke ich für die engagierte fachliche Betreuung, die gute Atmosphäre im Labor und die Unterstützung bei allen Fragen und Problemen, die im Laufe der Zeit auftraten.

Bedanken möchte ich mich ganz besonders auch bei Herrn Dr. med. S Knop. Er war maßgeblich am Entstehen dieser Arbeit beteiligt. Danke für die gute Zusammenarbeit!

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. med. U. Herrlinger für die Bereitstellung der Daten und Patientenproben der G-PCNSL-SG-1 Studie bedanken. Ohne ihn wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Ebenso danke ich Frau G. von Kuerthy aus dem Labor der neurologischen Klinik für die Unterstützung bei der Archivierung der Patientenproben.

Mein Dank geht auch an das gesamte GvH-Laborteam, (Friederike, Marija, Ingrid, Ingeborg, Iwona, Uli, Ziad, Markus K., Florian, Markus M., Markus E) für die tolle Unterstützung, hilfreichen Tipps und gute Atmosphäre im Labor.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Mitdotorandinnen Kristina Storz und Nadine Schultze für die tolle Zusammenarbeit, das Korrigieren dieser Arbeit und die aufmunternden Worte bedanken.

Danke aber vor allem meinen Eltern für ihre Geduld, Unterstützung und Motivation während meines gesamten Studiums.

Lebenslauf
von
Markus Johannes Günther

- | | |
|------------|---|
| 12.08.1980 | Geburt in Ludwigsburg |
| 1987-1991 | Besuch der Grundschule in Leonberg-Warmbronn |
| 1991-2000 | Besuch des Albert-Schweitzer-Gymnasiums in Leonberg
Abschluss mit der allg. deutschen Hochschulreife |
| 2001-2007 | Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-
Universität Tübingen |
| 25.03.2003 | 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |
| 2006-2007 | Praktisches Jahr am Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart |
| 30.11.2007 | 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |