

**Methotrexat-induzierte Leukenzephalopathie  
bei Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie  
oder lymphoblastischem Non-Hodgkin-Lymphom  
in Abhängigkeit vom MTHFR-C677T-Status**

**Von der Medizinischen Fakultät  
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen  
zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Medizin  
genehmigte Dissertation**

**vorgelegt von  
Peter Deutz  
aus  
Aachen**

**Berichter: Herr Professor  
Dr. med. Rolf Mertens**

**Herr Universitätsprofessor  
Dr.med. Armin Thron**

**Tag der mündlichen Prüfung: 9. März 2009**

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar

# INHALT

<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
AKUTE LYMPHATISCHE LEUKÄMIE UND LYMPHOBLASTISCHE NON HODGKIN	
LYMPHOME.....	2
Häufigkeit.....	2
Pathogenese.....	3
Symptomatik.....	3
Prognose .....	3
Therapie.....	4
Radiatio.....	6
FOLSÄUREZYKLUS UND ANGRENZENDE STOFFWECHSELWEGE.....	7
METHYLENTETRAHYDROFOLAT-REDUKTASE (MTHFR) .....	12
Häufigkeit der C677T MTHFR Variante .....	15
Klinische Bedeutung .....	16
MTHFR- Assoziation mit verschiedenen Erkrankungen .....	19
MTHFR und Malignome.....	19
Pathogenese möglicher Folgen einer MTHFR-Mutation.....	21
METHOTREXAT .....	23
Chemische Struktur .....	23
Pharmakokinetik .....	25
Metabolisierung .....	25
Elimination .....	27
Wirkmechanismus .....	28
Klinische Anwendung .....	32
MTX-Toxizität.....	32
Neurotoxizität durch Methotrexat .....	33
Genese der Neurotoxizität .....	36
LEUKENZEPHALOPATHIE .....	40
MR-tomographische Veränderungen bei MTX-bedingter LEP .....	40
MR-Spektroskopie bei LEP .....	41
Histologische Veränderungen.....	41

<b>Methoden</b> .....	<b>42</b>
STATISTIK .....	42
Hardy-Weinberg-Gleichgewicht .....	42
Chi <sup>2</sup> und Fisher's exakter Test.....	43
MTHFR-C677T BESTIMMUNG.....	44
KRANIALE MAGNETRESONANZTOMOGRAPHIE.....	44
MR-SPEKTROSKOPIE .....	45
<b>Fragestellung und Hypothese</b> .....	<b>47</b>
<b>Patientenkollektiv</b> .....	<b>50</b>
<b>Ergebnisse</b> .....	<b>52</b>
MUTATIONSHÄUFIGKEIT .....	52
HÄUFIGKEIT DER TOXIZITÄTEN .....	53
HÄUFIGKEIT DER TOXIZITÄTEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM MTHFR-STATUS .....	54
HÄUFIGKEIT DER TOXIZITÄTEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM MTX-SPIEGEL .....	57
KLINISCHE PRÄSENTATION UND MRTOMOGRAPHIE / MRSPEKTROSKOPIE .....	61
Patient 20 , R.N. ....	61
Patient 12, K.M. ....	64
Patient 10, G.P. ....	64
Patient 11, G.M.....	66
Patient 5, D.A. ....	67
Patient 8, F.H.....	68
Patient 26, Ü.T.....	70
MAGNETRESONANZTOMOGRAPHIE .....	70
SPEKTROSKOPIE .....	70
<b>Diskussion</b> .....	<b>71</b>
SCHLEIMHAUT-, LEBER- UND HÄMATOTOXIZITÄT .....	73
SCHLEIMHAUT-, LEBER-, HÄMATOTOXIZITÄT UND ASSOZIATION ZUR MTHFR- C677T-MUTATION.....	73
LEUKENZEPHALOPATHIE UND ASSOZIATION ZUR MTHFR-C677T-MUTATION ....	79
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>83</b>

<b>Anhang</b> .....	<b>85</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>87</b>
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>88</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>108</b>
<b>Erklärung § 5 Abs.1 zur Datenaufbewahrung</b> .....	<b>109</b>
<b>Lebenslauf</b> .....	<b>110</b>

## VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

ADHS	Attention deficit hyperactivity syndrome
AICART	Aminoimidazol-Carboxamid-ribonucleotid-Transformylase
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
ALT	Alanin-Aminotransferase
AMP	Adenosin-Monophosphat
AST	Aspartat-Aminotransferase
ARA-C	Cytarabin
CI	confidence intervall
CRT	kranielle Radiotherapie
DHPR	Dihydro-Pteridin-Reduktase
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DTMP	Deoxy-Thymidin-Monophosphat
DUMP	Deoxy-Uracil-Monophosphat
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FGAR	Formyl-Glycinamid-Ribonukleotid
FICAR	Formamidoimidazol-Carboxamid-Ribonukleotid
FLAIR	fluid-attenuated inversion recovery
FPGS	Folsäure-Polyglutamatsynthetase
FPGS	Folyl-Polyglutamatsynthetase

GART	Glycinamid-Ribonukleotid-Transformylase
GMP	Guanosin-Monophosphat
HFR	humaner Folatrezeptor
i.th.	Intrathekal
i.v.	Intravenös
IMP	Inosin-Monophosphat
KM	Kontrastmittel
LEP	Leukenzephalopathie
MRD	minimal residual disease
MS	Methionin-Synthetase
MT	Methyltransferase
MTHFD	Methylen-Tetrahydrofolat-Dehydrogenase
MTHFR	Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase
MTX	Methotrexat
MTX-PG	MTX-Polyglutamat
NAA	N-Acetyl-Aspartat
NADP	Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NHL	Non Hodgkin Lymphom
OR	Odds ratio
PCR	Polymerase-Chain-Reaktion
RFC	Reduced Folate Carrier
SAH	S-Adenosyl- Homozystein
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SHMT	Serin-Hydroxy-Methyltransferase
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SVT	Sinusvenenthrombose
THB	Tetrahydro-Biopterin
THF	Tetrahydro-folat
TS	Thymidylat-Synthetase

# EINLEITUNG

Kinder, die wegen einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) oder eines lymphoblastischen Non Hodgkin Lymphoms (NHL) antineoplastisch mit Methotrexat (MTX) behandelt werden, reagieren mit unterschiedlich ausgeprägter Toxizität auf die hochdosierte Verabreichung dieses Folsäureantagonisten. Neben Leber, Knochenmark und Nieren ist das ZNS eines der typischerweise durch Nebenwirkungen betroffenen Organe. Klinisch können heftiges Erbrechen, Lethargie, Krampfanfälle oder auch Hemiparesen auftreten. MR-tomographisch finden sich Marklagerveränderungen, die als Leukenzephalopathie bezeichnet werden. Zwar ist die genaue Genese dieser Veränderungen nicht bekannt, doch werden sie im Wesentlichen auf die hochdosierte und intrathekale Gabe von MTX sowie die kraniale Bestrahlung zurückgeführt. Die Wirkung des MTX beruht auf dem Antagonismus zu Folsäure. MTX hemmt im Folsäurezyklus insbesondere die Dihydrofolatreduktase (DHFR) und führt zur Verarmung an Tetrahydrofolat (THF), dem zentralen Folsäure-Metaboliten. Methotrexat hemmt aber auch direkt oder indirekt mehrere andere Enzyme des Folsäurestoffwechsels u.a. die Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR). (Aplenc *et al.* 2005; Baggott *et al.* 1995; Blount *et al.* 1997; Broxson *et al.* 1989; Kim *et al.* 2007; Linnebank *et al.* 2005; Pierik *et al.* 2006).

Bestehen bei einem Patienten kongenitale Störungen des Folsäurestoffwechsels so könnten diese das Wirkprofil von MTX beeinflussen. So erscheint z.B. bei einer Kombination aus verminderter Funktion der MTHFR z.B. durch die Mutation C677T und MTX-Therapie eine ausgeprägtere Störung der Folsäurehomöostase mit unter Umständen erhöhter MTX-Toxizität wahrscheinlich. Solch eine erhöhte Toxizität wurde bereits von mehreren Autoren beschrieben (Chiusolo *et al.* 2002; Taub *et al.* 2002; Toffoli *et al.* 2000; Ulrich *et al.* 2001), andere konnten vermehrte Nebenwirkungen von MTX bei Patienten mit MTHFR-Mutation nicht nachweisen (Aplenc *et al.*; de Jonge *et al.*; Kishi *et al.*). Der Zusammenhang zwischen dem Auftreten von leukenzephalopathischen Veränderungen bei Hochdosis-MTX-Therapie und dann niedrig dosierter MTX-Dauertherapie mit dem

Vorliegen einer C677T-Mutation im MTHFR-Gen wurde bei pädiatrischen ALL-Patienten bisher unseres Wissens bis auf Einzelfallbeschreibungen (Strunk *et al.* 2003) nicht untersucht.

Leukenzephalopathische Veränderungen nach MTX-Therapie können ohne oder mit nur geringer klinischer Symptomatik auftreten, so dass sie gelegentlich bei unter anderer Indikation durchgeführten MRT's als Zufallsbefund diagnostiziert werden. So finden sich Marklagerveränderungen z.B. bei kranialen MRT's, die unter dem Verdacht einer Sinusvenenthrombose oder auch zum Ausschluss einer zerebralen leukämischen Beteiligung durchgeführt werden. Die genaue Häufigkeit solch asymptomatischer MR-Veränderungen ist nicht bekannt, in Studien werden Inzidenzen von 0-70% angegeben, abhängig insbesondere von Therapieregime und Untersuchungszeitpunkt (Reddick & al. 2005), so dass wir außerdem das Auftreten solcher Veränderungen in unserer Patientengruppe bestimmen wollten.

Wir führten eine retrospektive Analyse der Daten von Kindern, die zwischen 1990 und 1999 in der Universitätskinderklinik Aachen nach dem ALL-BFM Protokoll behandelt wurden, hinsichtlich akuter Toxizität anhand von klinischen Angaben und Laborwerten und hinsichtlich Spättoxizität anhand von kranialen MRT's nach mehrjährigem Intervall durch.

## ***AKUTE LYMPHATISCHE LEUKÄMIE UND LYMPHOBLASTISCHE NON HODGKIN LYMPHOME***

### ***Häufigkeit***

Akute lymphoblastische Leukämien (ALL) sind die häufigste Neoplasie im Kindesalter. Die Inzidenz beträgt 3,3 Erkrankungen/ 100.000 Einwohner unter 15 Jahren. Jungen sind 1,2 mal so häufig betroffen wie Mädchen, der Altersgipfel liegt zwischen dem 2. und 5. Lebensjahr. (Kaatsch *et al.* 1995) Lymphoblastische Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) sind der ALL eng verwandt und unterscheiden sich definitionsgemäß durch eine Knochenmarksinfiltration von unter 25%. An

Non-Hodgkin-Lymphomen erkranken etwa 0,8 von 100.000 Kindern im Jahr mit einem medianen Erkrankungsalter von 9,25 Jahren (Kaatsch & Spix 2002).

### ***Pathogenese***

Akute lymphoblastische Leukämien entstehen durch klonales Wachstum maligne entarteter Zellen, die aus den unterschiedlichen Differenzierungsstadien der hämatopoetischen Entwicklung der Lymphozyten hervorgehen. Sie sind charakterisiert durch unkontrollierte Proliferation und Akkumulation unreifer, morphologisch veränderter und funktionell gestörter Lymphozyten in Knochenmark, Blut, Lymphknoten und den parenchymatösen Organen wie Milz und Leber. Als wahrscheinlichste Ursache für die meisten Erkrankungen sind somatische Mutationen oder präexistente Keimbahnmutationen anzunehmen. Häufig liegen diese Veränderungen schon in utero vor und führen später u.U. in Verbindung mit anderen leukämogenen Faktoren zur Manifestation der Erkrankung. (Ford *et al.* 1998; Gale *et al.* 1997; Mori *et al.* 2002; Schrappe *et al.* 2006; Wiemels *et al.* 1999) Als solche kommen u.a. Strahlung, Infektionen, Chemikalien, Medikamente und nutritive Faktoren in Frage. (Greaves 1997; Schrappe *et al.* 2006)

### ***Symptomatik***

Auffällig wird die Erkrankung typischerweise mit Zeichen der Verdrängung der Hämatopoese durch Expansion des malignen Klon wie Blutungen, Anämie, Infektanfälligkeit und Knochenschmerzen oder durch Kompressionserscheinungen durch ein Lymphom, wie Ateminsuffizienz oder intestinale Passagestörung.

### ***Prognose***

Das gute Ansprechen auf die Polychemotherapie insbesondere mit Hoch-Dosis (HD)-MTX hat die Heilungschancen bei ALL im Kindesalter enorm erhöht. War die Fünfjahresüberlebensrate vor 1965 nur 5%, liegt sie jetzt zwischen 70% und 80%, für Subgruppen noch darüber (Reiter *et al.* 1992; Reiter *et al.* 2000; Reiter *et al.* 1999; Seidemann *et al.* 2006).

Ein wesentlicher Fortschritt liegt in der risikoadaptierten Therapie der Patienten. Das Alter, die Leukozytenzahl bei Diagnosestellung, der Immunphänotyp, sowie

das Vorliegen bestimmter chromosomaler Translokationen (BCR-ABL, MLL-Translokation u.a.) waren neben dem Therapieansprechen bis vor wenigen Jahren maßgeblich für die Entscheidung über die Intensität der Therapie. Inzwischen ist die Bestimmung des MRD-Status (minimal residual disease), d.h. das auf molekularer Ebene dokumentierte Ansprechen auf die Therapie, zuverlässiger, um eine prognostische Einschätzung und Therapiestratifizierung zu gewährleisten (Flohr *et al.* 2008; Schrappe 2003; van Dongen *et al.* 1998).

Als Marker der MRD-Diagnostik werden für jeden Leukämieklon spezifische Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptor Genrearrangements verwendet, womit eine Leukämiezelle unter zehntausend oder gar hunderttausend normalen Lymphozyten detektiert werden kann.

Mit diesen vergleichsweise guten Überlebenschancen rücken Langzeitfolgen der Therapie verstärkt in den Vordergrund. Insbesondere die Folgen der Strahlentherapie beeinträchtigen langfristig die Lebensqualität und führen zu Folgeerkrankungen (Langer *et al.* 1998), so dass hier eine deutliche Dosisreduktion und risikoadaptierte Indikation resultierte. Ähnliches wird für die Chemotherapie versucht, so dass prognostische Marker für das Risiko eines Rezidivs, wie die MRD-Diagnostik, und für die Therapietoxizität besondere Relevanz erlangen. Zu letzterem könnten auch angeborene Störungen im Folsäurehaushalt gehören, die zu veränderter Wirksamkeit oder Toxizität von MTX führen.

## **Therapie**

Nur eine relativ kleine Gruppe von Medikamenten kommt zur Therapie der ALL in Frage und die Behandlung wird erschwert durch die für viele der therapeutisch eingesetzten Substanzen schlechte Passierbarkeit der Bluthirnschranke und das deshalb früher häufig resultierende ZNS-Rezidiv (Bleyer 1988).

Erst durch die Einführung der Hochdosis-MTX-Therapie inklusive der intrathekalen Gaben konnte zusammen mit der kranialen Bestrahlung ein Durchbruch erreicht werden. Erkauft wurde diese deutliche Therapieverbesserung aber auch mit einer Zunahme neurotoxischer Nebenwirkungen und von Zweitmalignomen, letztere insbesondere durch die Bestrahlung.

Neben dem sowohl systemisch als auch intrathekal verabreichten Methotrexat und der zunehmend seltener eingesetzten kranialen Bestrahlung besitzt vor allem noch Cytarabin zentral-neurotoxisches Potential, allerdings in der Regel in höheren als den bei der ALL eingesetzten Dosen (Hoffman *et al.* 1993).

Die immunologische Differenzierung der Blasten von ALL und NHL ist teilweise identisch, so dass häufig die gleiche Behandlung zur Anwendung kommen kann. In Österreich, der Schweiz und Deutschland werden die Patienten überwiegend in den ALL-/ ALL-REZ-/ NHL-BFM-Therapiestudien der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) behandelt.

Die Therapie der ALL erfolgt risikoadaptiert anhand verschiedener Faktoren zu denen u.a. biologische Faktoren (z.B. BCR/ABL), insbesondere aber das Therapieansprechen gehören. Die individuelle Wirksamkeit der Therapie wird zu verschiedenen Zeitpunkten mit verschiedenen Methoden überprüft. Neben einem Ansprechen auf Prednison im peripheren Blutbild kommt besonders dem Remissionsnachweis an Tag 33 nach Therapiebeginn im Knochenmark und seit einigen Jahren der MRD-Diagnostik nach 5 und 12 Wochen eine große Bedeutung zu. Die Therapie gliedert sich außer im Hochrisikoprotokoll in die Induktionstherapie, die Konsolidierungstherapie und die Reinduktionstherapie.

Es werden jeweils mehrere Chemotherapeutika intravenös oder oral verabreicht sowie Methotrexat intrathekal, um eine zentralnervöse Aussaat zu behandeln und ein ZNS-Rezidiv zu verhindern. Induktions- und Reinduktionstherapie sind ähnlich aufgebaut und verwenden ähnliche Medikamente. In der ersten Phase kommen Prednison bzw. Dexamethason, Vincristin und Asparaginase sowie ein Anthrazyklin (Daunorubicin bzw. Doxorubicin) zum Einsatz. Die anschließende zweite Phase beinhaltet Cyclophosphamid, Cytarabin und Mercaptopurin, bzw. Thioguanin ein antimetabolisch wirksames Nukleosid-Analogon. Die auf die Induktionstherapie folgende Konsolidierungstherapie besteht aus der oralen Gabe von Mercaptopurin und der intrathekalen sowie hochdosierten intravenösen Gabe von MTX und dient insbesondere der Sanierung von Extrakompartimenten, wie Hoden und ZNS, neben dem Knochenmark typischen Lokalisationen eines Rezidivs.

Im Anschluss an die intensive Therapiephase folgt die orale Dauertherapie mit Mercaptopurin und oralem MTX bis zu einer Gesamttherapiedauer von 2 Jahren. Mercaptopurin wird hierbei täglich MTX einmal wöchentlich verabreicht.

Patienten mit bestimmten genetischen Veränderungen (BCR-ABL, MLL-Translokation) und solche mit schlechtem Ansprechen im Verlauf werden der Hochrisikogruppe zugerechnet und nach bestimmten Kriterien einer intensivierten Therapie oder falls möglich, einer allogenen Stammzelltransplantation mit einem HLA-identischen Geschwister oder einem passenden Fremdspender zugeführt.

Induktion		Extrakompartiment therapie	Reinduktions therapie	
Konsolidierung				
Prednison	Mercaptopurin	HD-MTX	Dexamethason	Thioguanin
Vincristin	Cytarabin	MTX i.th	Vincristin	Cytarabin
Daunorubicin	Cyclo-	Mercaptopurin	Doxorubicin	Cyclo-
Asparaginase	phosphamid		Asparaginase	phosphamid
MTX i.th	MTX i.th			MTX i.th
<b>9 Wochen</b>		<b>8 Wochen</b>	<b>8 Wochen</b>	
<b>Protokoll 1</b>		<b>Protokoll M</b>	<b>Protokoll 2</b>	
Im Anschluß: <b>Dauertherapie</b> mit Mercaptopurin täglich und MTX 1 x wöchentlich p.o. bis zu einer Gesamttherapiedauer von <b>2 Jahren</b>				

### **Medikamente und zeitlicher Ablauf der ALL-BFM-Therapie**

### **Radiatio**

Die Indikation zur kranialen Bestrahlung erfolgt risikoadaptiert, also bei manifestem ZNS-Befall, T-ALL und HR-Patienten, die Dosis wird altersangepasst mit niedrigeren Dosen unter 2 Jahren darüber randomisiert zwischen 12 und 18 Gy.



Folsäure ist in Form von Folat-Polyglutamaten besonders in grünem Gemüse, Leber, Getreide und einigen Früchten enthalten (Fodinger, Horl *et al.*). Nach Hydrolyse erfolgt die Resorption im proximalen Dünndarm, im Blut dann rasch die Reduktion zu Tetrahydrofolat (THF). Die Aufnahme von Folaten nach intrazellulär erfolgt bei hohen Konzentrationen durch passive Diffusion ansonsten durch Carrier-vermittelte Transportsysteme (Huennekens *et al.* 1992). Die zwei wichtigsten Transportsysteme sind der „Reduced Folate Carrier“ (RFC) und der Folat-Rezeptor (FR) auch „Membrane-Associated Folate Binding Protein“ (mFBP) genannt. Substrate für den RFC sind reduzierte Folate, insbesondere 5-Methyltetrahydrofolat (5-Methyl-THF) aber auch Folsäureantagonisten wie Methotrexat (Antony 1992; Hill *et al.* 1979; Westerhof *et al.* 1995).

Im Serum liegt Folsäure hauptsächlich in Form von 5-Methyl-THF vor (Gemmati *et al.* 2004), das im Körper ausschließlich durch die MTHFR-katalysierte Methylierung aus 5,10-Methylen-THF gebildet werden kann.

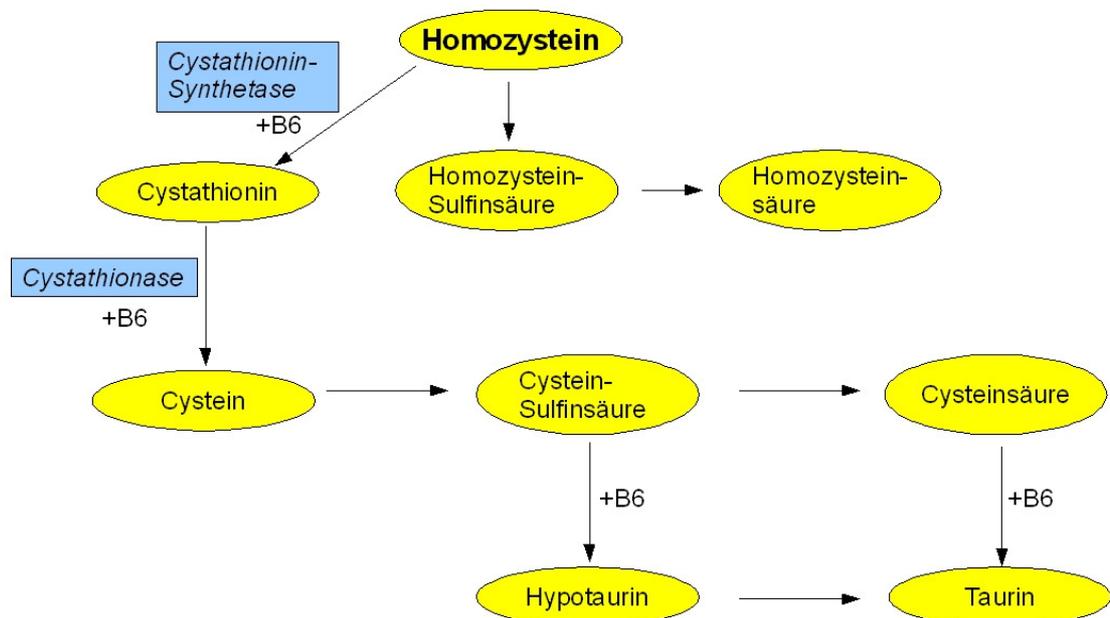
5-Methyl-THF dient dem zellulären Stoffwechsel als Methyl-Gruppen-Donor und als THF-Quelle. Aus THF wiederum entstehen mit verschiedenen C1-Einheiten eine Reihe weiterer Folate (5,10-Methylene-THF, 10-Formyl-THF), die unterschiedlichen intrazellulären Reaktionen u.a. der Purinsynthese als Coenzym dienen.

Ausgehend von THF katalysiert die **Serin-Hydroxy-Methyltransferase** (SHMT) reversibel unter Verwendung von Serin die Bildung von 5,10-Methylen-THF, hierbei entsteht Glycin (de Jonge *et al.* 2005). Die **Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase** (MTHFR) reduziert 5,10-Methylen-THF zu 5-Methyl-THF und konkurriert dabei mit der Thymidylat-Synthetase (TS) und der (SHMT) um das Substrat (5,10-Methylen-THF) (de Jonge *et al.* 2005; Stover 2004). Die **Thymidylat-Synthetase** (TS) setzt dUMP zu dTMP, einem notwendigen Baustein korrekter DNA-Synthese, um. Bei Folsäure-Mangel kommt es zum vermehrten Fehleinbau von Uracil statt Thymidin in DNA (Blount *et al.* 1997; Duthie & McMillan 1997), was bei der dann notwendigen Reparatur zu vermehrten Doppelstrangbrüchen führt (Duthie & Hawdon 1998). Das Produkt der TS, Dihydrofolat (DHF), wird durch die **Dihydrofolat-Reduktase** (DHFR) wieder zu THF reduziert. Das Produkt der MTHFR, 5-Methyl-THF, liefert die Methylgruppe für die von der **Methionin-**

**Synthetase** (MS) katalysierte Methylierung von Homozystein zu Methionin. Dabei wird die Methylgruppe vorübergehend auf Cobalamin (Vitamin B12) übertragen, einen Cofaktor der MS, der von der **Methionin-Synthetase-Reduktase** (MTRR) im aktiven Zustand stabilisiert wird. Besteht ein Cobalamin-Mangel führt dies zum „folate trapping“ da 5-Methyl-THF nicht - auch nicht über andere Reaktionen- zu THF regeneriert werden kann. Es entsteht ein funktioneller Folatmangel (Stanger *et al.* 2003).

Die wiedergewonnene essentielle Aminosäure Methionin kann in die Proteinsynthese eingehen oder fungiert in ihrer aktivierten Form, S-Adenosyl-Methionin (SAM), als wichtigster Methylgruppendonor bei Transmethylierungsreaktionen unter anderem von DNA, Proteinen, Neurotransmittern, Hormonen, Lipiden und Phospholipiden (Chiang *et al.* 1996).

Nach Übertragung der Methylgruppe auf einen Akzeptor durch die Methyltransferase (MT) entsteht via S-Adenosyl-Homozystein (SAH) wieder Homozystein. **Homozystein** kann entweder von der MS zu Methionin remethyliert oder in einer **Transsulfurierung** unter Cysteinbildung mit Übertragung der Schwefelgruppe auf Serin katabolisiert werden.

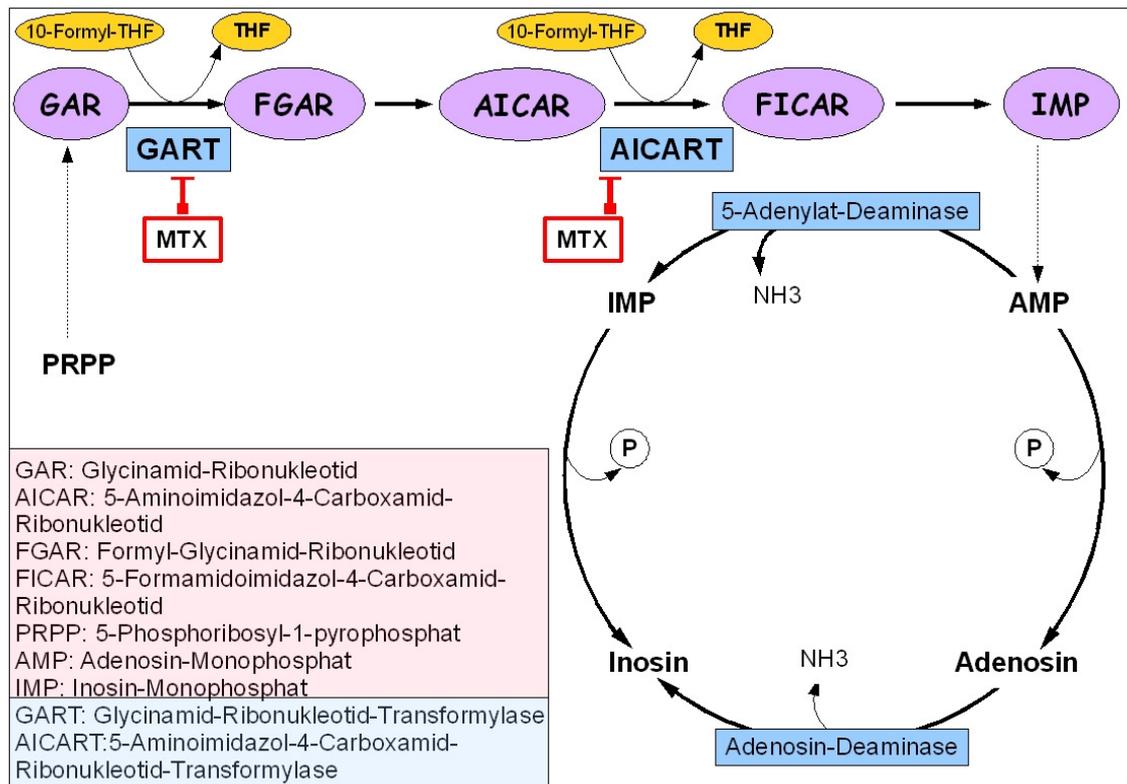


### **Homozysteinabbau**

Dazu wird Homozystein zunächst Vitamin B6 abhängig durch die **Cystathionin-Synthetase** zu Cystathionin und dann, ebenfalls Vitamin B6 abhängig, durch die **Cystathionase** zu Cystein umgesetzt, welches wiederum zu Cystein-Sulfin-Säure und Cysteinsäure oxidiert wird. Diese werden in Folge zu Hypotaurin und Taurin decarboxyliert. Analog kann Homozystein zu Homozystein-Sulfin-Säure und Homozystein-Säure oxidiert werden (Stanger *et al.* 2003; Vezmar *et al.* 2003; Vezmar S 2003). Extrazellulär im Plasma vorliegendes Homozystein wird zu Homozystein-Thiolacton und gemischten Disulfiden oxidiert. Hierbei anfallende Sauerstoffradikale sind hochreaktiv und werden wesentlich für die Toxizität von Homozystein verantwortlich gemacht. (Diaz-Arrastia 2000; Loscalzo 1996; Upchurch *et al.* 1997; Welch & Loscalzo 1998)

Die anfallenden schwefelhaltigen Aminosäuren sind als Strukturanaloga von Glutamat und Aspartat stark exzitatorisch wirksam (Curtis & Watkins 1963).

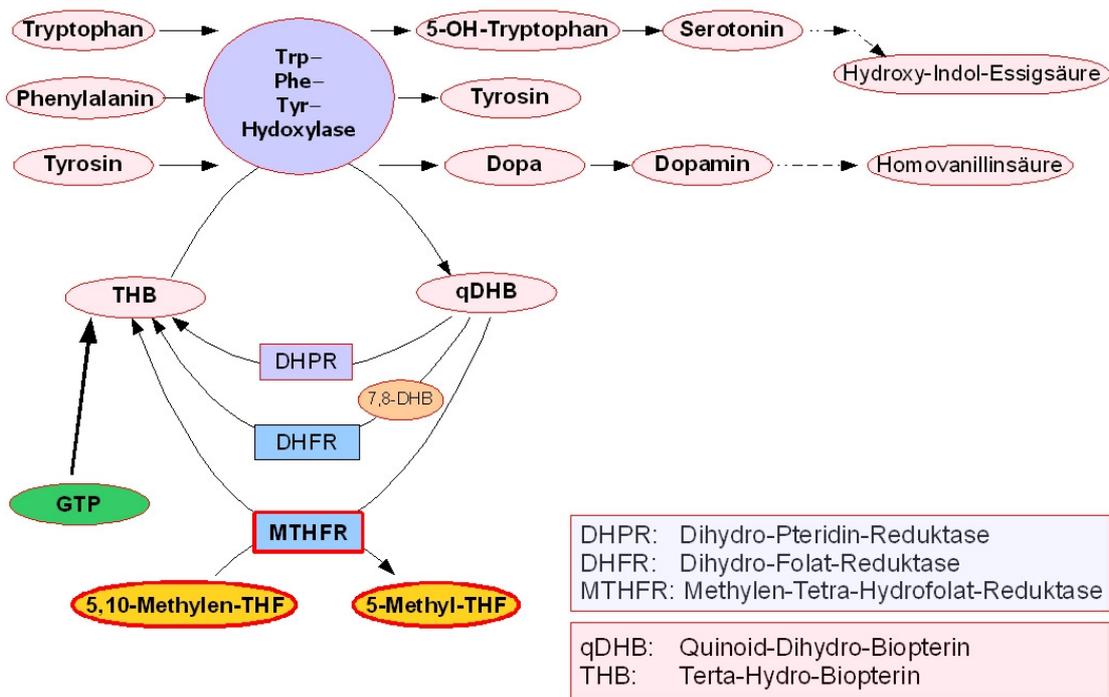
Die **Methylen-Tetrahydrofolat-Dehydrogenase** (MTHFD) katalysiert drei hintereinander geschaltete Reaktionen bei der stufenweisen Umwandlung von 5,10-Methylen-THF zu THF. Das hierbei entstehende 10-Formyl-THF dient als Coenzym der **Purinsynthese**.



### **Purinsynthese**

Es wird durch die **Glycinamid-Ribonukleotid-Transformylase** (GART) katalysierte Formyl-Glycinamid-Ribonukleotid-(FGAR) Bildung wieder zu THF umgesetzt und ist so an der **Purinsynthese** beteiligt. FGAR wird, erneut mit 10-Formyl-THF als Coenzym, durch die Aminoimidazol-Carboxamid-Ribonukleotid-Transformylase (AICART) zu Formamidoimidazol-Carboxamid-Ribonukleotid (FICAR) umgebaut, aus dem dann schließlich über Inosin-Monophosphat (IMP) Adenosin-Monophosphat (AMP) und Guanosin-Monophosphat (GMP) entstehen, die Purinbasen der DNA.

Ein weiterer angrenzender Stoffwechselweg ist der **Biopterin-Metabolismus**. Bei der Synthese der Neurotransmitter Serotonin, Dopamin und DOPA wird Tetrahydro-Biopterin (THB) für die Hydroxylierung von Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan benötigt. THB kann aus Quinoid-Dihydrobiopterin u.a. durch die DHFR und die MTHFR regeneriert werden, so dass Veränderungen im Folsäurestoffwechsel über die beteiligten Enzyme auch Auswirkungen auf die Bildung von Neurotransmitern haben können.



### ***Biopterin-Metabolismus und Biogene Amine***

## ***METHYLENTETRAHYDROFOLAT-REDUKTASE (MTHFR)***

Das MTHFR-Gen liegt auf Chromosom 1p36.3 und besteht aus 11 Exonen mit einer Größe zwischen 103 und 432 Basenpaaren (Goyette *et al.* 1995; Goyette *et al.* 1994).

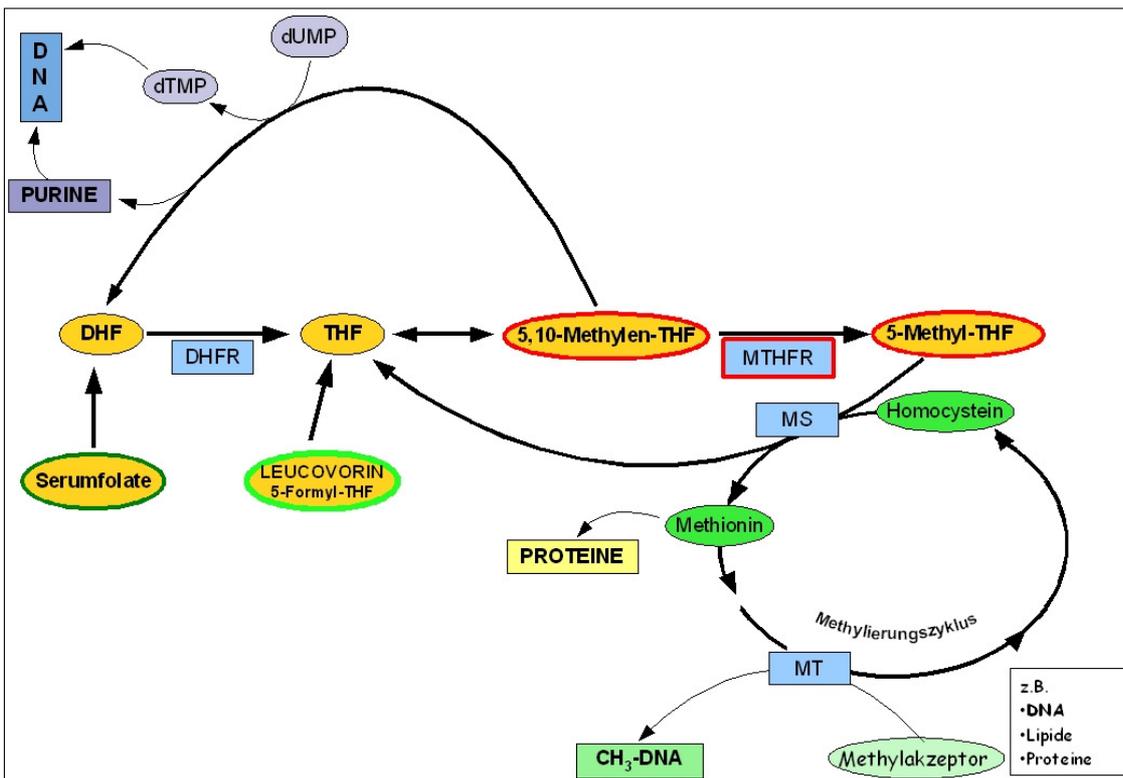
Die **Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase** (MTHFR) ist ein zytoplasmatisch lokalisiertes Enzym, mit 3 katalytischen Bindungsregionen jeweils für Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD), Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) und 5,10-Methylen-THF, das die irreversible Reduktion von 5,10-Methylen-THF zu 5-Methyl-THF, dem wichtigsten zirkulierenden Folat und Methylgruppen-Donor vieler Methylierungsreaktionen u.a. der Methioninsynthese aus Homozystein katalysiert (Fodinger *et al.* 2000). Sie konkurriert hierbei mit der Thymidylat-synthetase und der SHMT (Serin-Hydroxy-Methyltransferase) um das Substrat 5,10-Methylen-THF. (de Jonge *et al.* 2005; Stover 2004)

Die MTHFR katalysiert die einzige Reaktion der Zelle die 5-Methyl-THF generiert und ist damit ein Schlüsselenzym an der Schnittstelle von DNA-Synthese einerseits und Methylierungsreaktionen und Eiweißsynthese andererseits. Die MTHFR lenkt C1-Gruppen in Richtung Methylierungsreaktionen von z.B. Homozystein, DNA, Lipiden, Neurotransmittern und Eiweiß und entzieht sie der Nukleinsäuresynthese. Das Substrat der MTHFR, 5,10-Methylen-THF, ist wesentlich für die DNA-Synthese via Thymidylatsynthetase bzw. GART / AICARFT und die Balance des Nukleotid-Pools (Kyoung-Jin Sohn 2004; Sharp & Little 2004; Ueland *et al.* 2001; Wiemels *et al.* 2001).

Nach der Klonierung des Gens 1993 konnten mehrere Mutationen, die mit einer mehr oder weniger ausgeprägten Funktionseinschränkung des Enzyms einhergingen identifiziert werden (Fodinger *et al.* 2000; Goyette *et al.* 1994). Martin *et al.* (Martin *et al.* 2006) fanden bei systematischen Untersuchungen in verschiedenen ethnischen Gruppen insgesamt 65 Polymorphismen der MTHFR, wovon 11 zu einem nicht-synonymen single nucleotide polymorphism (SNP), also einem Austausch einer Base mit konsekutiv veränderter Aminosäuresequenz führten. Die am besten hinsichtlich ihrer Auswirkung untersuchte Mutation ist die 1994 durch Frosst identifizierte MTHFR-C677T-Mutation, eine Punktmutation im Nukleotid 677 des Exons 4, die zum Austausch von Alanin durch Valin (Ala222Val) in der katalytischen Region des Enzyms führt (Adams *et al.* 1996; Frosst *et al.* 1995; Marz *et al.* 2000)

Hieraus resultiert eine Erniedrigung der Enzymaktivität im homozygoten Status auf 30%, bei Heterozygoten auf 60% im Vergleich zum Wildtyp (Engbersen *et al.* 1995; Relling & Dervieux 2001)

Thermolabil wird die Variante genannt, weil *in vitro* ein Erhitzen von 37°C auf 46°C mit einem 70-prozentigem Aktivitätsverlust einhergeht, im Gegensatz zu 50% beim Wildtyp.



### Folsäurezyklus- Überblick

Die verminderte Enzymaktivität der C677T-mutierten MTHFR führt zum Anstieg des Substrates und lenkt damit 5,10-Methylen-THF in Richtung Purin-(via GART und AICART) und Pyrimidin-Synthese (via TS) und führt zu verminderter 5-Methyl-THF-Bildung und damit reduzierter Methylierungskapazität, was u.a. Hyperhomozysteinämie und eine Hypomethylierung der DNA bewirkt. (Castro *et al.* 2004; de Jonge *et al.* 2005; Friso & Choi 2002; Stern *et al.* 2000)

Das vermehrt anfallende 5,10-Methylen-THF steht der Thymidylatsynthetase zu Verfügung, so dass vermehrt dTMP aus dUMP entstehen kann, oder wird via 10-Formyl-THF in die Purinsynthese eingeschleust.

Der Einfluss der MTHFR-C677T-Mutation auf die Folatkonzentration im Körper wird unterschiedlich bewertet (Kyoung-Jin Sohn 2004). Während einige Untersucher bei Patienten mit der MTHFR-C677T-Mutation erniedrigte Serumfolatkonzentrationen fanden (Frosst *et al.* 1995; Jacques *et al.* 1996; Ma *et al.* 1997; Summers *et al.* 2008; van der Put *et al.* 1995) konnten andere keine Unterschiede zwischen den Genotypen feststellen (Chen *et al.* 2001). Möglicherweise wirkt sich die

MTHFR-Mutation unterschiedlich und gewebespezifisch auf die Folatkonzentrationen aus (Kyoung-Jin Sohn 2004).

Die Ursache der verminderten Enzymaktivität ist beim Menschen nicht endgültig geklärt, doch liegt der Polymorphismus bei *E. coli* an der Bindungsstelle für den MTHFR-Cofaktor FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid) und es zeigt sich eine reduzierte Bindung des Enzyms an seinen Cofaktor (Robien & Ulrich 2003; Yamada *et al.* 2001). Ein ähnlicher Mechanismus könnte beim menschlichen Enzym zum tragen kommen. (Goyette *et al.* 1995; Guenther *et al.* 1999). Andererseits wurde gezeigt, dass neben einer Änderung der Enzymkinetik auch eine verminderte Enzymkonzentration bei der Ala222Val Variante zur reduzierten Enzymaktivität beiträgt (Martin *et al.* 2006). Durch Substitution von Folsäure lässt sich die Funktion der defizienten MTHFR verbessern (Guenther *et al.* 1999; Pejchal *et al.* 2006) und Effekte einer homozygoten MTHFR-Mutation, wie z.B. eine Hyperhomozysteinämie und DNA-Hypomethylierung werden normalisiert (Castro *et al.* 2004; Chatzidakis *et al.* 2006). Gleichzeitig bedeutet dies, dass Auswirkungen einer verminderten MTHFR-Aktivität möglicherweise nur bei relativem Folatmangel evident werden (Frosst *et al.* 1995; Jacques *et al.* 1996; Malinow *et al.* 1997; Ueland *et al.* 2001).

### **Häufigkeit der C677T MTHFR Variante**

Der homozygote TT677-Genotyp variiert stark in seiner Häufigkeit innerhalb verschiedener ethnischer Populationen (0-32%). Am niedrigsten ist die Allelfrequenz in Afrika (Schneider *et al.* 1998). In Europa sind 4-26% der kaukasischen Bevölkerung homozygot für die MTHFR-C677T-Mutation, gut 40% sind heterozygot. Bei kaukasischen Einwohnern des nördlichen Mittelmeerraumes liegt die Häufigkeit am höchsten und nimmt in Europa nach Norden hin ab. In Spanien und Italien finden sich Homozygotenfrequenzen von ca. 10-25%, in Finnland von 4%. In der deutschen Bevölkerung wurden Häufigkeiten von ca. 10% homozygoter und bis zu 50% heterozygoter Merkmalsträger beschrieben (Botto & Yang 2000; Koch *et al.* 1998; Ogino & Wilson 2003; Reinhardt *et al.* 1998; Seidemann *et al.* 2006; Thirumaran *et al.*; Wilcken *et al.* 2003)

**MTHFR-Genfrequenzen**

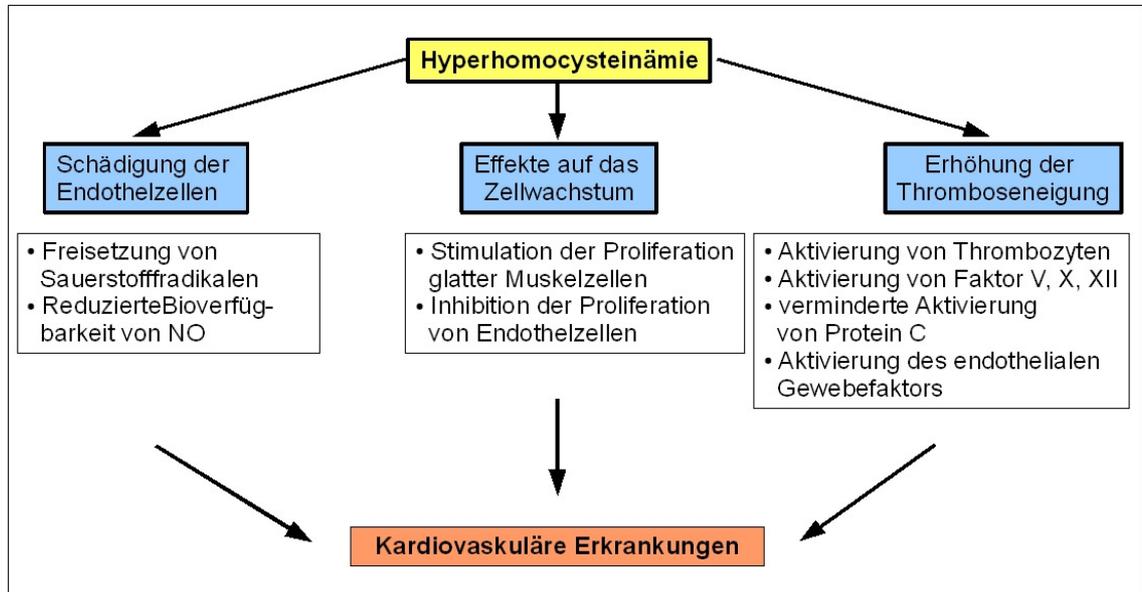
<b>CC</b>	<b>CT</b>	<b>TT</b>	<b>T-Allelfrequenz</b>	
47%	42%	10,7 %	31,7%	USA, Weiße (Wilcken <i>et al.</i> 2003)
52 %	42 %	6,4 %	27,4 %	Niederlande (Wilcken <i>et al.</i> 2003)
47,9 %	44,7 %	7,4 %	29,8 %	Großbritannien (Schneider JA 1998)
40 %	48 %	11,8 %	35,7 %	Frankreich (Wilcken <i>et al.</i> 2003)
48,6 %	40,1 %	11,3 %	31,4 %	Deutschland (Schnakenberg <i>et al.</i> 2005)
<b>41,4 %</b>	<b>47 %</b>	<b>11,5 %</b>	<b>35 %</b>	Deutschland (Thirumaran <i>et al.</i> 2005)
<b>46,7 %</b>	<b>50 %</b>	<b>3,3 %</b>	<b>29 %</b>	Eigene Daten

Die relative Häufigkeit der MTHFR C677T- Mutation legt nahe, dass sie einen evolutionären Selektionsvorteil darstellt (Fodinger *et al.* 2000). So stand das Substrat 5,10-Methylen-THF in Phasen geringer Nährstoffzufuhr bei reduzierter MTHFR-Enzymaktivität der lebenswichtigen Purin- und Thymidin-Synthese länger in ausreichender Menge zur Verfügung, so dass möglicherweise ein Überlebensvorteil resultierte.

***Klinische Bedeutung***

Die klinische Bedeutung einer reduzierten Funktion der MTHFR liegt bisher vor allem in der resultierenden Hyperhomozysteinämie, wobei heterozygote Träger in der Regel nicht durch eine erhöhte Konzentration an Homozystein auffallen. Homozygote Träger können signifikant höhere Homozystein-Serumwerte aufweisen als Träger der Heterozygoten- oder Wildtypkonstellation, insbesondere in Kombination mit geringer Folsäurezufuhr (Brattstrom *et al.* 1998; Frosst *et al.* 1995; Ueland *et al.* 2001).

Im Mittelpunkt des klinischen Interesses steht die **Hyperhomocysteinämie** v.a. wegen der ihr zugeschriebenen prothrombotischen Wirkungen und der resultierenden **kardiovaskulären und thrombotischen** Erkrankungen (Stanger *et al.* 2003).



#### **Mögliche Mechanismen der Atherogenität von Homozystein**

Daneben spielen aber auch **neurologische** Folgen eine wichtige Rolle (Diaz-Arrastia 2000), die insbesondere beim seltenen homozygoten Mangel der Cystathionin-Beta-Synthetase eindrücklich sind. Eine solche genetisch bedingte Störung der Transsulfurierung kann bei Mutationen des Chromosoms 21q22 (Cystathionin- $\beta$ -Synthase) zum Krankheitsbild der Homozystinurie führen, die in homozygoter Form mit deutlich erhöhten Homozysteinkonzentrationen in Serum und Urin einhergeht. Symptome sind mentale Retardierung und Krampfanfälle, Thrombosen bereits im Kindesalter, Linsenektopie, Skelettdeformierungen und Arteriosklerose. Aber auch bei Hyperhomocysteinämie aufgrund von Folsäure- oder Vitamin B12-Mangel sind neurologische Symptome wie Myelo- und Neuropathien, Demenz und Retardierung bekannt (Diaz-Arrastia 2000; Surtees *et al.* 1998; Wadia *et al.* 2000).

Die durch Homozystein ausgelösten **Pathomechanismen** sind vielfältig und erst teilweise aufgeklärt, doch könnte eine vermehrte Radikalbildung beim Ab-

bau von Homozystein grundlegend für die Vielzahl der gefundenen Effekte sein. Homozystein wird im Plasma zu Homozystein-Thiolacton und gemischten Disulfiden oxidiert unter gleichzeitiger Bildung verschiedener Peroxide, die wiederum mit Membranlipiden reagieren oder auch zu einer Aktivierung von Blutgerinnungsfaktoren führen können (Diaz-Arrastia 2000; Hirano *et al.* 1994; Jones *et al.* 1994; Kanani *et al.* 1999; Loscalzo 1996; Starkebaum & Harlan 1986; Upchurch *et al.* 1997).

Homozystein hat u.a. Einfluss auf oxidative Prozesse, auf die Bioverfügbarkeit von NO, auf das Gerinnungs- und Fibrinolyse-System, auf die Zellsynthese und -proliferation sowie die Bildung anderer schwefelhaltiger Aminosäuren (D'Angelo & Selhub 1997; Hertfelder *et al.* 2004). Homozystein führt zu einer Aktivierung von Thrombozyten, schädigt Endothelzellen und vermindert die Protein C-Aktivierung (Hertfelder *et al.* 2004). Der intrazelluläre Abbau von Homozystein erfolgt u.a. zu Cystein- und Homozysteinsäure, schwefelhaltigen Aminosäuren, die für ihre stark neuronal erregende Wirkung u.a. über Aminosäurerezeptoren wie NMDA (N-methyl-D-aspartat)-Rezeptoren bekannt sind und u.a. für die neurotoxische Wirkung der Hyperhomozysteinämie verantwortlich sein könnten (Curtis & Watkins 1963; Fodinger *et al.* 2000; Quinn *et al.* 1997; Sydow & Boger 2001; Vezmar *et al.* 2003).

Hyperhomozysteinämie wird also mit einer Vielzahl v.a. vaskulärer Erkrankungen in Verbindung gebracht (Kang *et al.* 1993; Refsum *et al.* 1998), doch ist dieser Zusammenhang in neuerer Zeit kontrovers diskutiert und wiederholt verworfen worden (Lewis *et al.* 2005; Lühmann 2007; Mooijaart *et al.* 2005; Reinhardt *et al.* 1998). Ein positiver Effekt einer Erniedrigung des Serumhomozysteins auf Mortalität oder mentale Leistungsfähigkeit konnte in großen Untersuchungen bisher nur zum Teil nachgewiesen werden, so dass die Hyperhomozysteinämie eher für eine Folge denn eine Ursache gehalten wurde (Bonna *et al.* 2006; de Craen *et al.* 2006; Mooijaart *et al.* 2005; Stott *et al.* 2005; The Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) 2 Investigators 2006). In anderen Untersuchungen scheint die Hyperhomozysteinämie auch kausal mit vaskulären Erkrankungen zusammenzuhängen und Folsäuresubstitution einen positiven Effekt auf die Morbidität zu haben (Spence *et al.* 2005; Wald *et al.* 2002).

## ***MTHFR- Assoziation mit verschiedenen Erkrankungen***

Brattström (Brattstrom *et al.* 1998) untersuchte 1997 die Häufigkeiten der C677T-MTHFR-Mutation bei Neugeborenen und über 80 Jahren alten Menschen. Er fand keinen signifikanten Unterschied und folgerte, dass die Mutation keinen entscheidenden Einfluss auf die Lebensdauer hat.

Relevanz zeigt die MTHFR-C677T-Mutation als Risikofaktor für Neuralrohrdefekte und andere Fehlbildungen bei Neugeborenen (Botto & Yang 2000; Finnell *et al.*; Ou *et al.* 1996; Papapetrou *et al.* 1996; Shaw *et al.* 1998; van der Put *et al.*; van der Put *et al.*; Wilcken 1997) sowie Schwangerschaftskomplikationen (Ray & Laskin 1999).

Viele andere Krankheiten, wie neuro-psychiatrische Erkrankungen auch bei Kindern (Dempster *et al.* 2007; Joober *et al.* 2000; Wei & Hemmings 1999; Yoo *et al.* 2000), chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Mahmud *et al.* 1999; Vecchi *et al.* 2000), Diabetes mellitus (Buysschaert *et al.* 2004; Errera *et al.* 2006; Tutuncu *et al.* 2005; Zintzaras *et al.* 2007) auch das Risiko für eine Trisomie 21 (Martinez-Frias 2008) oder Adipositas (Lewis *et al.* 2008) wurden auf einen möglichen Zusammenhang mit der MTHFR-C677T-Mutation untersucht. Die Ergebnisse sind oft widersprüchlich und lassen keine eindeutigen Aussagen zu.

Eine Untersuchung von Krull an Kindern legt einen Zusammenhang zwischen der MTHFR-C677T-Mutation und ADHS nach ALL-Therapie nahe (Krull *et al.* 2008).

## ***MTHFR und Malignome***

Darüber hinaus existieren zahlreiche Studien über den Zusammenhang der MTHFR-C677T-Mutation mit verschiedenen malignen Erkrankungen. Hierbei ergibt sich ein uneinheitliches Bild. Bei einigen Krebsarten scheint das Risiko eher verringert (Krajinovic *et al.* 2004; Marugame *et al.* 2003; Sharp & Little 2004), bei anderen erhöht oder unbeeinflusst (Krajinovic *et al.* 2004; KrajinovicLemieux-Blanchard *et al.* 2004). So scheint das **Kolonkarzinomrisiko** bei Vorliegen der Mutation bei ansonsten normalem Folsäurestatus verringert (Ma *et al.* 1997; Marugame *et al.* 2003), das Risiko eines **Mamma-oder Endometriumkarzinoms** erhöht oder unbeeinflusst (Justenhoven *et al.* 2005; Kotsopoulos *et al.* 2008; Piyathilake *et al.* 2000; Suzuki *et al.* 2008; Ueland *et al.* 2001).

Für **Meningeome und Gliome** scheint ein erhöhtes Erkrankungsrisiko, beim **Glioblastom** ein negativer Einfluss auf die Überlebensdauer vorzuliegen (Bethke *et al.* 2008; Linnebank *et al.* 2008).

Bei Kindern und Erwachsenen gab es Hinweise, dass Träger der Mutation ein reduziertes Risiko an einer **akuten lymphatischen Leukämie** zu erkranken aufweisen (Chatzidakis *et al.* 2006; Franco *et al.* 2001; Robien & Ulrich 2003; Skibola *et al.* 1999). Krajinovic konnte den protektiven Effekt der C677T-MTHFR-Mutation nachvollziehen, jedoch nur bei Patienten, die vor dem Beginn der öffentlich empfohlenen Folsäuresubstitution während der Schwangerschaft (in Canada 1996) geboren wurden (Krajinovic; Lamothe *et al.* 2004). Er folgerte, ein reduziertes Risiko durch die MTHFR-C677T-Mutation sei durch die Folatsubstitution aufgehoben worden. Diese Ergebnisse konnten durch Schnakenberg (Schnakenberg *et al.* 2005) am Patientengut der ALL-BFM 2000- Studie- also mit relativ großen Patientenzahlen- nicht nachvollzogen werden, auch nicht unter Berücksichtigung des Beginns der mütterlichen Folsäuresubstitution in Deutschland Mitte der 90er Jahre des zwanzigsten Jahrhundert (Thirumaran *et al.* 2005). Pereira (Pereira *et al.* 2006) führte 2006 eine Metaanalyse durch und konnte für das Risiko einer kindlichen ALL keine Assoziation zum C677T-MTHFR-Mutations-Status erkennen. Aplenc (Aplenc *et al.* 2005) zeigte 2005 retrospektiv bei einer relativ großen Gruppe pädiatrischer ALL Patienten ein erhöhtes **Rezidivrisiko** bei Vorliegen der C677T-MTHFR-Mutation, wohingegen Rocha (Rocha *et al.* 2005) in seiner prospektiven Arbeit bei kleineren Zahlen keinen Unterschied nachweisen konnte.

Hinweise auf niedrigere **Intelligenzquotienten** nach ALL-Therapie bei Vorliegen der C677T-MTHFR-Mutation ergabene sich nicht (Krajinovic *et al.* 2005).

Der Zusammenhang zwischen **NHL-Risiko und -Prognose** und MTHFR C677T-Mutation wird unterschiedlich bewertet: Stanulla (Stanulla M 2005) und Seidemann (Seidemann *et al.* 2006) konnten in der NHL-BFM-Studienpopulation keinen Zusammenhang, auch keine vermehrte Toxizität, feststellen, ebenso Gemmati *et al.* (Gemmati *et al.* 2004). Andere fanden ein reduziertes (Kim *et al.* 2008), wieder andere ein leicht erhöhtes Risiko für NHL beim Vorliegen der C677T-MTHFR-Mutation (Lee *et al.* 2007; Matsuo *et al.* 2001; Skibola *et al.* 2004) . Eine

Metaanalyse von Lee aus 2007 (Lee *et al.* 2007) zeigte mit grenzwertiger Signifikanz ein erhöhtes Risiko für ein NHL bei Vorliegen der C677T-MTHFR-Mutation.

Wurde die **Toxizität der Therapie je nach MTHFR-Status** betrachtet, fand sich bei einige Untersuchern eine vermehrte Rate therapiebedingter Nebenwirkungen bei MTHFR-C677T-homozygoten Patienten bei der Therapie maligner Erkrankungen mit MTX oder vermehrte Toxizität *in vitro*. (Chiusolo *et al.* 2002; Chiusolo *et al.* 2007; Shimasaki *et al.* 2008; Taub *et al.* 2002; Toffoli *et al.* 2000; Ulrich *et al.* 2001). Ranganathan fand lediglich eine Assoziation zu Alopezie unter MTX bei Afro-Amerikanern (Ranganathan *et al.* 2008).

Andere konnten keine Unterschiede nachweisen, insbesondere, wenn Hochdosis-MTX-Protokolle mit anschließendem Folsäurerescue benutzt wurden (Imanishi *et al.* 2007; Seidemann *et al.* 2006; Shimasaki *et al.* 2006). Kishi (Kishi *et al.* 2003) untersuchte die Homozysteinspiegel in Serum und Liquor von Kindern vor und nach HD-MTX bei ALL und fand signifikante Spiegelerhöhungen aber ohne Zusammenhang mit dem MTHFR-Status.

Neuerdings wurde die MTHFR auch als Zielenzym für neue zytotoxische Medikamente untersucht (Stankova *et al.* 2008; Sun *et al.* 2008).

### ***Pathogenese möglicher Folgen einer MTHFR-Mutation***

Die Pathogenese möglicher Effekte der MTHFR-C677T-Mutation beruht auf den resultierenden Veränderungen im Folatstoffwechsel, möglicherweise auch im Biopterinstoffwechsel. Verminderte Aktivität der MTHFR führt zu geringerer Bildung von 5-Methyl-THF und vermehrtem Anfall von 5,10-Methylen-THF. So werden der Methioninsynthese und anderen Methylierungsreaktionen, insbesondere der DNA-Methylierung, Methylgruppen entzogen, während sie vermehrt in die Thymidin- und Purinsynthese eingehen. Bleibt die Methioninsynthese aus, fällt **vermehrt Homozystein** an und führt zu den mit Hyperhomozysteinämie assoziierten Problemen.

Gleichzeitig entsteht weniger S-Adenosyl-Methionin, wesentlich u.a. für die DNA-Methylierung und somit eine Hypomethylierung der DNA (Friso *et al.* 2002).

Das Methylierungsmuster einer Zelle legt fest, welche Gene transkribiert werden, also aktiv sind und ist für jeden Zelltyp spezifisch. Veränderungen der DNA-Methylierung u.a. eine generelle Hypomethylierung sind ein typisches Merkmal maligne transformierter Zellen (Baylin *et al.* 2001; Castro *et al.* 2004; Esteller & Herman 2002; Jones & Laird 1999; Paz *et al.* 2002; Stern *et al.* 2000). Eine **DNA-Hypomethylierung** könnte zu Aktivierung von Protoonkogenen führen und eine reduzierte Methylierungskapazität der Zelle durch die reduzierte Aktivität der MTHFR auf diesem Wege zur Kanzerogenese beitragen (Kim 1999; Lee *et al.* 2007; Skibola *et al.* 2004; Ueland *et al.* 2001) .

Der andererseits vermehrte Anfall von 5,10-Methylen-THF führt zu vermehrter Bildung von Thymidin aus Uracil via Thymidylat-Synthetase und Purinsynthese. Solchermaßen „verbesserte“ DNA-Synthese führt zu weniger Fehleinbau von Uracil, das dann nicht sekundär in DNA-Reparaturvorgängen wieder herausgeschnitten und durch Thymidin ersetzt werden muß. Bei solchen Reparaturvorgängen entstehen sonst immer wieder Doppelstrangbrüche, die als mögliche Schlüsselereignisse in der Malignomentstehung angesehen werden (Blount & Ames 1995; Blount *et al.* 1997; Costea *et al.* 2006; Dianov *et al.* 1991; Gemmati *et al.* 2004; Seidemann *et al.* 2006). So könnte ein reduziertes Risiko der Malignomentstehung durch die MTHFR-C677T-Mutation erklärt werden.

Die MTHFR kann aus Quinoid-Dihydrobiopterin Tetrahydro-Biopterin, notwendig für die Biosynthese von Neurotransmittern, regenerieren, so dass eine Aktivitätsminderung auch hier Auswirkungen haben könnte.

Wurde die MTHFR und ihre Varianten bisher auch vor allem hinsichtlich ihres pathogenen Potentials untersucht, so muß bedacht werden, dass -fasst man alle MTHFR-Varianten zusammen- 80% aller Weißen eine Mutation, 40% sogar zwei tragen und dadurch die Definition eines „gesunden“ Wildtyps eigentlich irrelevant wird. Insbesondere häufige Polymorphismen der MTHFR stellen nicht eigentlich genetischen Defekte dar, sondern können je nach Lebenssituation des Individuums, Vor- und Nachteile zeigen, also etwa bei Nährstoffmangel ausreichende DNA-Synthese, damit Zellteilung und Gewebereparatur gewährleisten, bei reichhaltigem Nahrungsangebot aber Hyperhomozysteinämie und

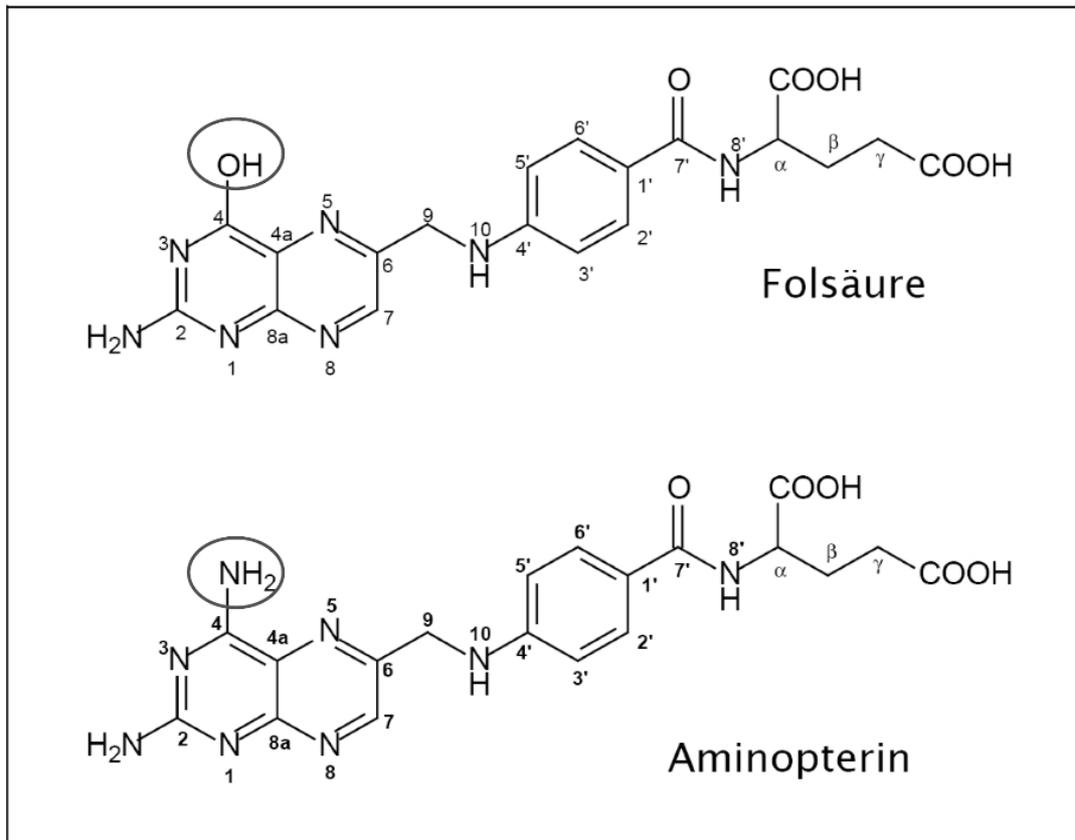
ihre Auswirkungen zur Folge haben (Ueland *et al.* 2001; Wiemels *et al.* 2001) oder im Falle einer Therapie mit Folsäureantagonisten zu verändertem Ansprechen führen.

## **METHOTREXAT**

Im Jahre 1948 berichtete Farber über den ersten erfolgreichen Einsatz des Folsäureantagonisten Aminopterin in der Behandlung der akuten lymphatischen Leukämie bei Kindern (Farber *et al.* 1948). Kurze Zeit später wurde mit Methotrexat (Aminopterin, MTX) ein weiterer Folsäureantagonist eingeführt. MTX verdrängte Aminopterin in der Therapie, da es sich als weniger toxisch erwies und wird seitdem zur Behandlung verschiedener maligner Erkrankungen, in der Rheumatologie und der Immunologie eingesetzt. Einen bedeutenden Wandel erlebte die MTX-Therapie, als Djerassi 1967 zeigen konnte, dass MTX in potentiell letalen Dosen appliziert werden kann, wenn danach der Pool reduzierter Folate durch die Gabe von Calciumfolinat (Leucovorin®) wieder aufgefüllt und damit die MTX-Wirkung antagonisiert wird (Leukovorinrescue) (Djerassi *et al.* 1967). Durch dieses Konzept konnte insbesondere die Behandlung der akuten lymphatischen Leukämie, von Non-Hodgkin-Lymphomen, Hirntumoren und Osteosarkomen entscheidend verbessert werden.

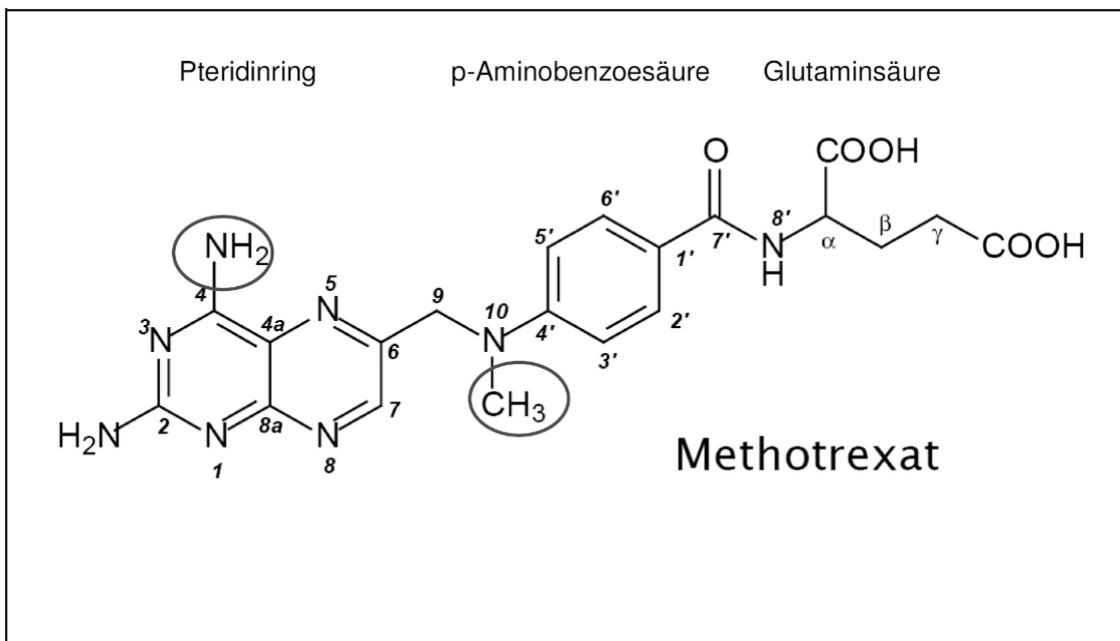
### **Chemische Struktur**

MTX besteht aus einem Pteridinring, p-Aminobenzoesäure und Glutaminsäure. Es unterscheidet sich von der natürlich vorkommenden Folsäure durch den Austausch der Hydroxy- gegen die Aminogruppe in Position 4 des Pteridinrings sowie eine N-Methylierung am p-Aminobenzoesäurerest.



**Chemische Struktur von Folsäure und Aminopterin.**

(Die strukturellen Unterschiede zu Folsäure sind gekennzeichnet.)



**Chemische Struktur von Methotrexat.**

(Die strukturellen Unterschiede zu Folsäure sind gekennzeichnet.)

## **Pharmakokinetik**

Die Wirksamkeit von MTX hängt im wesentlichen von der Konzentration und der Verweildauer in der Zelle ab (Calvert 1999). Die Aufnahme geschieht durch zwei verschiedene Mechanismen: MTX gelangt bei hohen Konzentrationen durch passive Diffusion ansonsten durch Carrier-vermittelte Transportsysteme in den Intrazellularraum. Die zwei wichtigsten Transportsysteme sind der „Reduced Folate Carrier“ (RFC) und der Folat-Rezeptor auch „Membrane-Associated Folate Binding Protein“ (mFBP) genannt. Substrate für den RFC sind reduzierte Folate, insbesondere 5-Methyltetrahydrofolat (5-Methyl-THF) und 5-Formyl-THF (Leucovorin) sowie Methotrexat. (Antony 1992; Hill *et al.* 1979; Huennekens *et al.* 1992; Kremer 2004; Matherly *et al.* 1995; Westerhof *et al.* 1995) Eine veränderte Expression des RFC kann die Zytotoxizität mindern und so zur Resistenzentwicklung gegen Folsäureantagonisten führen. (Jansen *et al.* 1998; Trippett *et al.* 1992).

Der Folatrezeptor (FR) besitzt eine deutlich höhere Affinität zu Folsäure als zu reduzierten Folaten und MTX so dass Folsäure vornehmlich über diesen Weg in die Zelle gelangt. Für die Pharmakokinetik von MTX spielt er deshalb nur eine untergeordnete Rolle (Kremer 2004). MTX passiert aufgrund seiner hohen Polarität nur sehr schlecht die Blut-Hirn-Schranke. Unter einer Dauerinfusion erreichen die MTX-Konzentrationen im Liquor nur 1-5 % der Steady-State-Konzentrationen im Serum. Zytotoxische Konzentrationen im Liquor werden daher nur erzielt, wenn MTX in hohen Dosen infundiert oder intrathekal verabreicht wird. (Lippens & Winograd 1988; Millot *et al.* 1994)

## **Metabolisierung**

### **Polyglutaminierung**

Intrazellulär werden an MTX, wie auch an die natürlich vorkommenden Folate, durch die **Folsäure-Polyglutamatsynthetase** (FPGS) bis zu sechs Glutaminsäurereste angehängt (Fry *et al.* 1982; Jolivet & Chabner 1983; Kremer 2004).

Die so entstehenden MTX-Polyglutamate (MTX-PG), sind die aktiven Metabolite des MTX. (Josting 1998). Die MTX-Polyglutamate (MTX-PG) können weder über

den RFC und den FR noch durch passive Diffusion die Zelle verlassen und verbleiben somit länger als MTX in der Zelle. Sie werden, wie die natürlich vorkommenden Folsäurepolyglutamate, aktiv in die Lysosomen der Zelle transportiert und dort gespeichert. Erst nach Abspaltung des Polyglutamatrestes durch die Folsäure-Polyglutamyl-Hydrolase (FPGH) kann MTX die Zelle wieder verlassen (Chen *et al.* 2002). Da die MTX-PG eine ähnlich hohe Affinität zur DHFR haben wie MTX, mit allerdings deutlich geringerer Dissoziationskonstante (Poser *et al.* 1981) und zudem Enzyme der Purinbiosynthese (AICARTF, GART) noch stärker hemmen als MTX, kommt ihnen eine große Bedeutung für die Zytotoxizität zu (Chu E 1996).

Die relative Selektivität der Antifolatwirkung auf maligne Zellen findet eine mögliche Erklärung in der geringeren Polyglutamatbildung in normalen Zellen im Vergleich zu malignen (Jolivet *et al.* 1985; Masson *et al.* 1996). Auch die gute Wirksamkeit von MTX bei der ALL beruht vermutlich zum Teil auf der vermehrten Expression der FPGS in Lymphoblasten im Vergleich zu myeloischen Zellen, so dass MTX länger in den Lymphoblasten verbleibt (Fabre *et al.* 1984; Longo *et al.* 1997; Skibola *et al.* 1999).

### **MTX-Abbau**

Der Abbau von MTX erfolgt über zwei Wege: Der Hauptmetabolit, 7-OH-Methotrexat (7-OH-MTX), wird durch unspezifische Aldehydoxidasen der Leber gebildet. Wegen der geringen Wasserlöslichkeit trägt 7-OH-MTX entscheidend zur Nephrotoxizität von MTX bei. Es wurde gezeigt, dass ein akutes Nierenversagen nach HD-MTX unter anderem auf ausgefallenes 7-OH-MTX in den Nierentubuli zurückzuführen ist. (Jacobs *et al.* 1976)

Einem weiteren Metaboliten, der 4-Deoxy-4-Amino-N10-Methylpteroinsäure (DAMPA), hauptsächlich von Darmbakterien durch Carboxypeptidase gebildet, wird klinisch weniger Bedeutung beigemessen, da sie nur zu einem geringen Prozentsatz entsteht (3-5 %) und eine wesentlich niedrigere Affinität zum Zielenzym, der Dihydrofolat-Reduktase (DHFR), besitzt als MTX (ca. 1/200 der MTX-Affinität) (Valerino *et al.* 1972). Relevanz erhält dieser Weg allerdings durch die Option rekombinante bakterielle Carboxypeptidase (CPDG2) therapeutisch

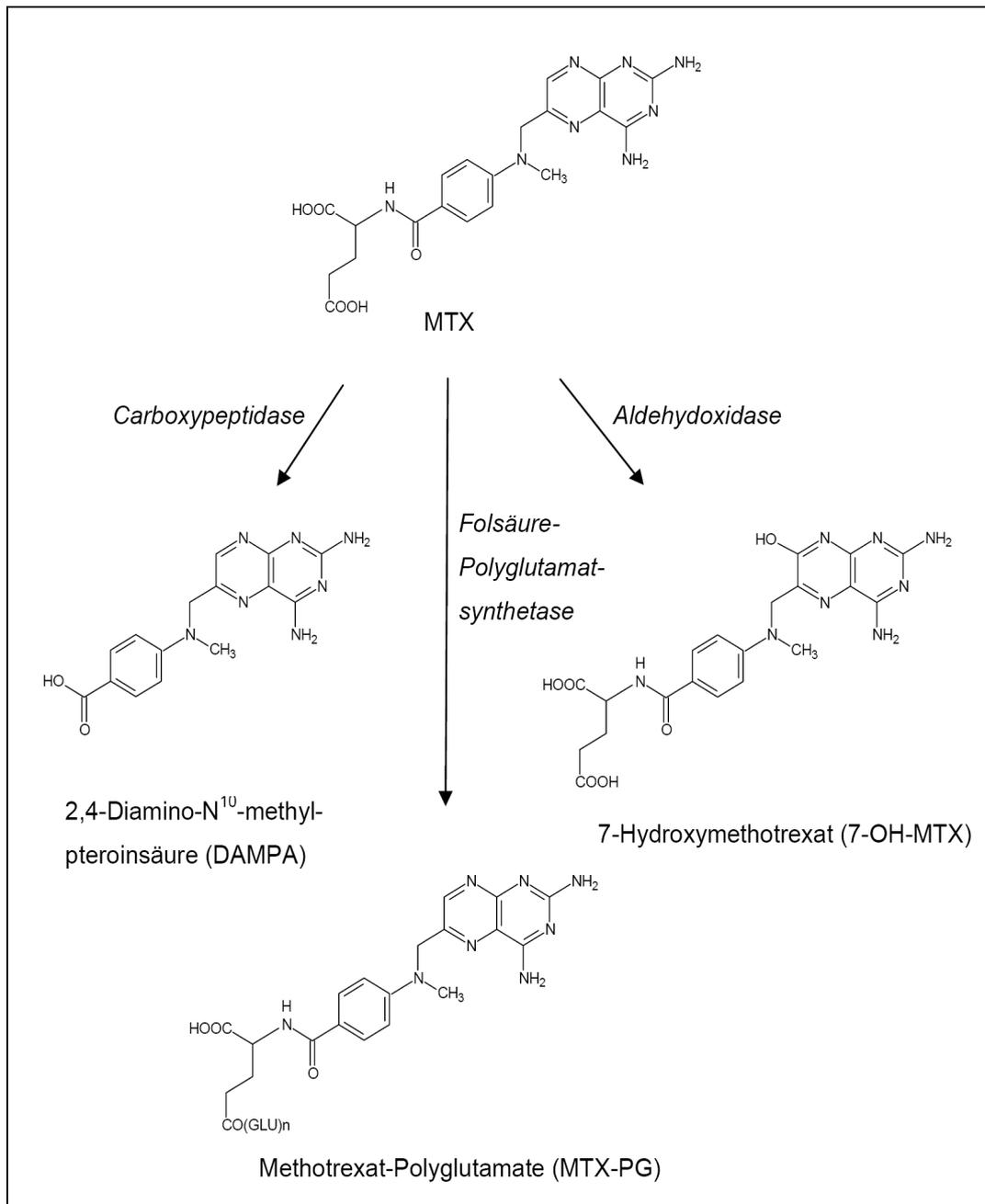
einzusetzen, um bei verzögerter MTX-Ausscheidung oder Überdosierung den Abbau wesentlich zu beschleunigen. CPDG2 ist hochwirksam und senkt den MTX-Spiegel innerhalb von 15 min um über 90%. Intrazellulär befindliches MTX wird nicht abgebaut, so dass weiterhin die Gabe von Leucovorin notwendig ist (Krause *et al.* 2002; Widemann & Adamson 2006).

### ***Elimination***

MTX wird hauptsächlich über die Nieren in unveränderter Form ausgeschieden. Die renale Elimination erfolgt zum Teil durch glomeruläre Filtration, zum Teil durch tubuläre Sekretion. Ein gewisser Teil wird auch tubulär rückresorbiert. Insgesamt ist die renale Clearance sehr variabel. Sie ist im Besonderen abhängig von der Hydrierung, dem Urin-Fluss und -pH-Wert, sowie einer eventuellen Komedikation. Nach intravenöser Gabe wird MTX aus dem Plasma biphasisch eliminiert. Auf eine Phase schneller Verteilung ( $t_{1/2} = 1,5-3,5$  h) folgt eine Phase, die durch die renale Elimination geprägt ist ( $t_{1/2} = 8,0-15,8$  h) (Huffman *et al.* 1973; Pratt *et al.* 1974)

Bei Vorliegen dritter Verteilungsräume (Ödeme, Aszites, Pleuraerguss) kann sich die Ausscheidung deutlich verzögern und zu erhöhter Toxizität führen (Gadener *et al.* 2006).

Nach intrathekalen Applikation erfolgt die Elimination aus dem zentralen Nervensystem durch Resorption von Liquor und über ein unspezifisches aktives Transportsystem im Plexus choroideus (Bode *et al.* 1980).



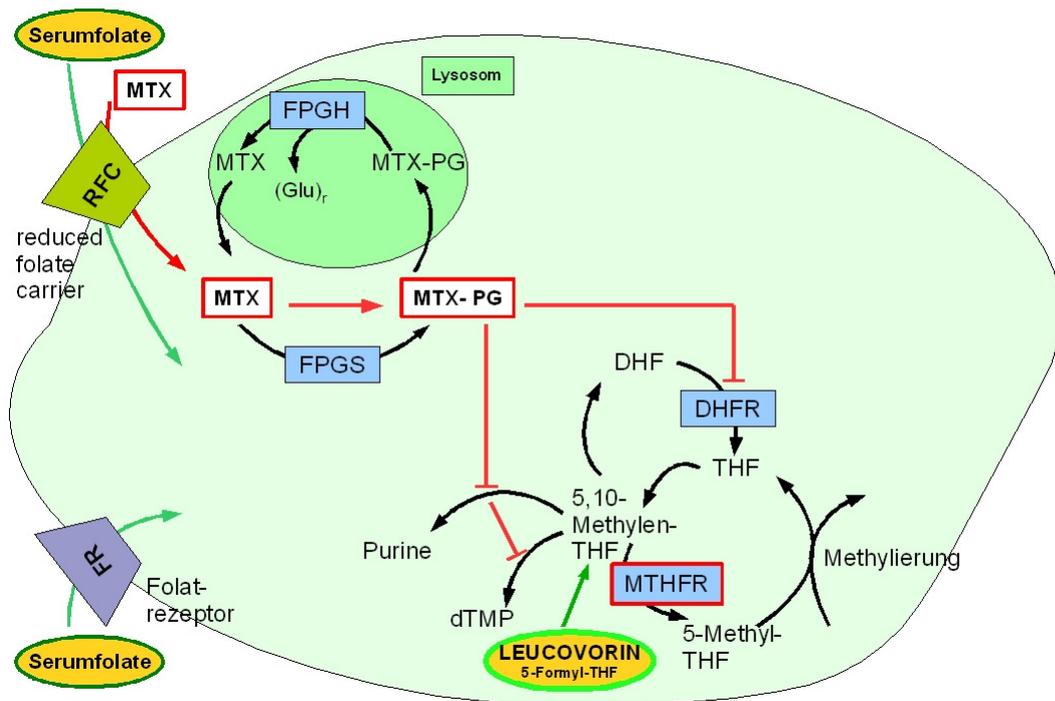
### **Metabolisierung von MTX**

### **Wirkmechanismus**

MTX ist ein Antimetabolit der Folsäure. Als solcher hemmt es verschiedene Enzyme im Folsäurestoffwechsel aber auch der Thymidin- (TS) und Purinbildung

(GART und AICARFT). Weiterhin sind die Methylierung von Homozystein und der Bioterinstoffwechsel (Matthews & Kaufman 1980) betroffen.

Die Wirkung von Methotrexat und seiner Polyglutamate (PG) beruht hauptsächlich auf der kompetitiven Hemmung der **Dihydrofolat-Reduktase (DHFR)**, was einen Mangel an reduzierten Folaten, die der Organismus v.a. zur Synthese von Purin- und Pyrimidinbasen benötigt, zur Folge hat.



### ***Intrazelluläre Wirkungsmechanismen von MTX und Rescue mit Leucovorin***

#### ***(5-Formyl-Tetrahydrofolat)***

#### ***Abkürzungen:***

MTX-PG: Methotrexat-Polyglutamate

FPGS: Foyl-Polyglutamatsynthetase

FPGH: Foyl-Polyglutamathydrolase

DHFR: Dihydrofolatreduktase

MTHFR: Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase

Dihydrofolat wird physiologischerweise mit NADPH als Coenzym zu Tetrahydrofolat (THF) reduziert. Bei einer Blockade der DHFR steigt die Konzentration von DHF, während Tetrahydrofolate (THF) wie 5,10-Methylen-Tetrahydrofolat, wel-

ches für die Thymidylat-Synthese benötigt wird und 10-Formyltetrahydrofolat, notwendig für die Purinsynthese, vermindert sind (Vezmar *et al.* 2003). Das akkumulierende DHF hemmt sowohl die Thymidylatsynthase als auch Enzyme der Purinsynthese.

Beim Transport nach intrazellulär und der anschließenden Polyglutaminierung konkurriert MTX mit 5-Methyl-THF. Dies hat zur Folge, dass 5-Methyl-THF weniger nach intrazellulär gelangt und andererseits, da weniger polyglutamyliert, rascher die Zelle wieder verlässt und somit die intrazelluläre Depletion an reduzierten Folaten zunimmt.

Weiterhin hemmen MTX-PG direkt die **Thymidylat-Synthetase (TS)**, die deoxy-Uridin-Monophosphat (dUMP) zu deoxy-Thymidin-Monophosphat (dTMP) umsetzt. Auch dies stellt eine Beeinträchtigung der DNA-Synthese dar. (Allegra *et al.* 1985; McGuire & Bertino 1981; Vezmar S 2003)

Der **Homozystein / Methionin-Stoffwechsel** wird ebenfalls durch die Hemmung der DHFR -direkt oder indirekt auch der MTHFR beeinflusst.

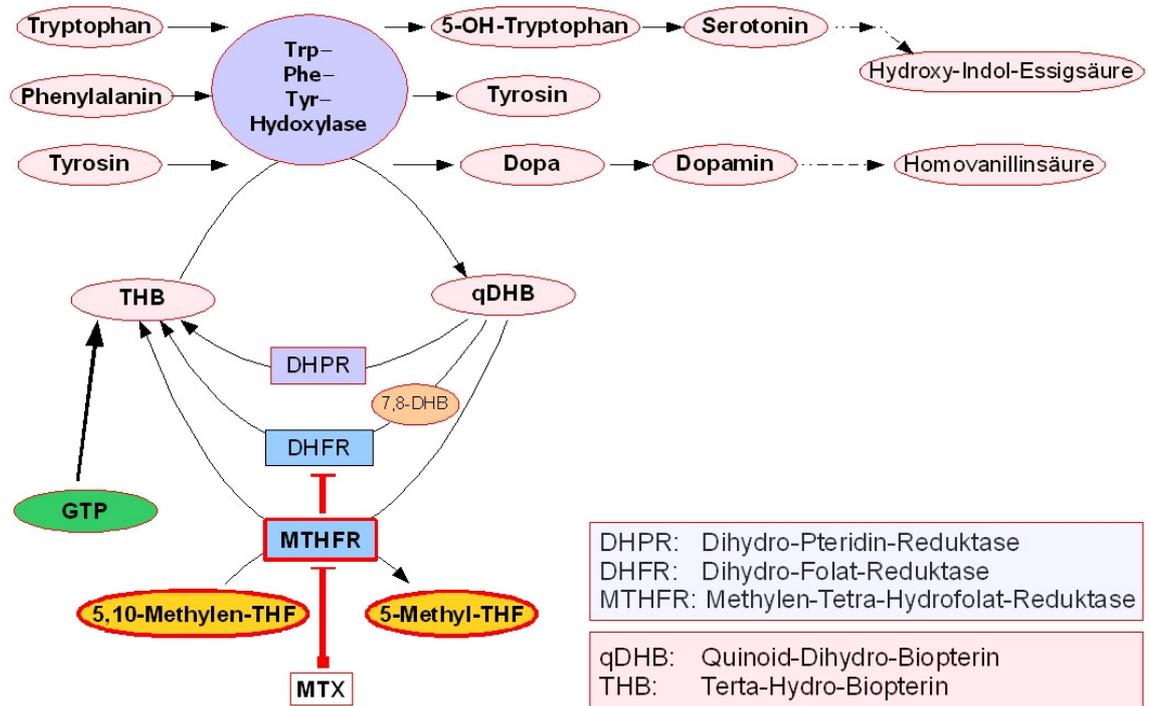
Ob MTX die **MTHFR** tatsächlich hemmt wird widersprüchlich beurteilt. Manche Autoren beschreiben eine Hemmung der MTHFR durch MTX (Aplenc *et al.* 2005; Baggott *et al.* 1986; Broxson *et al.* 1989; Kallianpur 2004; Kim *et al.* 2007; Linnebank 2005; Matthews & Haywood 1979; Pierik *et al.* 2006) andere verneinen sie (Dervieux *et al.* 2005; Dervieux *et al.* 2006; Ranganathan *et al.* 2004). Ob eine direkte Hemmung vorliegt, bleibt damit unklar, wegen des MTX-induzierten 5,10-Methylen-THF-Mangels liegt aber eine funktionelle Hemmung vor.

Die aus der Hemmung der Enzyme resultierenden verminderten 5-Methyl-THF-Spiegel beeinträchtigen die Remethylierung von Homozystein zu Methionin durch die Vitamin B<sub>12</sub>-abhängige Methionin-Synthetase. Homozystein fällt also vermehrt an und der Mangel an Methionin führt zu reduzierter Bildung von S-Adenosyl-Methionin (SAM), dem wichtigsten Methylgruppendonor der Zelle. SAM wird unter anderem für die Methylierung von DNA benötigt, so dass ein Mangel zu DNA-Hypomethylierung führen kann. Veränderungen der Methylierungsmuster der DNA werden u.a. mit der Pathogenese der Arteriosklerose und der Entstehung klonale Erkrankungen in Verbindung gebracht (Castro *et al.* 2003) (Andreassi & Botto 2003; Andreassi *et al.* 2003; Botto *et al.* 2003; Ross *et al.* 2001). Statt dessen steigt der Spiegel von SAH (S-Adenosylhomozystein), einem Hemm-

stoff von Methylierungsreaktionen. Vermehrt anfallendes Homozystein wird zu schwefelhaltigen Aminosäuren wie Homozysteinsäure und Cysteinsäure abgebaut.

Die **Purinsynthese** beeinträchtigen MTX und seine PG neben der Verminderung von 10-Formyl-THF auch durch Hemmung der Glycinamid-Ribonukleotid-Transformylase (GART) und der 5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-Ribonukleotid-Transformylase (AICARFT) (Allegra *et al.* 1986; Allegra *et al.* 1987; Baggott *et al.* 1986; Budzik *et al.* 2000; Cronstein 1997; Kremer 2004).

Schließlich hemmt MTX die Regeneration von **Tetrahydrobiopterin** (THB) aus Dihydrobiopterin, durch Mangel an 5-Methyl-THF und möglicherweise Hemmung der MTHFR und damit die Hydroxylierung von Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan und führt so zur Störung der Synthese biogener Amine und Neurotransmitter wie DOPA, Dopamin und Serotonin. (Craine *et al.* 1972; Matthews & Kaufman 1980; Millot *et al.* 1992)



### MTX-Wirkung im Biopterinstoffwechsel

## **Klinische Anwendung**

MTX in Dosen über 1000 mg/m<sup>2</sup>, intravenös verabreicht, mit nachfolgender Leucovorin-Rescue wird als Hochdosis-MTX-Therapie bezeichnet. Sie kommt insbesondere bei akuten lymphatischen Leukämien, Non-Hodgkin-Lymphomen und Osteosarkomen zum Einsatz. Um die Blut-Hirn-Schranke zu umgehen und dadurch höhere Konzentrationen im Liquor zu erreichen, wird MTX bei der ALL auch intrathekal verabreicht. So können mit reduzierter systemischer Toxizität 100 mal höherer ZNS-Konzentrationen im Vergleich zum Serum erreicht werden (Freeman *et al.* 1977; Pinkel & Woo 1994)

## **MTX-Toxizität**

MTX wird bei ordnungsgemäßer Anwendung insbesondere von Kindern auch in hohen Dosen relativ gut vertragen (Treon & Chabner 1996). Wahrscheinlich ist die terminale Phase der Elimination entscheidend für die Toxizität, da weniger das Überschreiten einer kritischen Schwellendosis, als vielmehr die zeitliche Dauer der Exposition gegenüber MTX für die Toxizität von entscheidender Bedeutung ist (Bleyer 1978; Josting 1998). Relevant ist neben ausreichender Hydrierung und Alkalisierung insbesondere eine MTX-Spiegel gesteuerte Leucovorin-Rescue. Aufgrund seiner hohen Proliferationsrate sind die Wechselgewebe der Schleimhäute und das Knochenmark die häufigsten Manifestationsorte für toxische Nebenwirkungen von MTX. Mundschleimhäute und gastrointestinale Epithelien sind besonders gegenüber niedrigen, prolongierten MTX-Konzentrationen sensibler als Vorläuferzellen des Knochenmarks. Diese größere Sensitivität beruht auf einer höheren Akkumulation von MTX in Schleimhäuten. Die Mukositis tritt drei bis sieben Tage nach Beginn der Gabe auf und geht einer potentiellen Myelosuppression voraus. Die HD-MTX-Therapie ist nephrotoxisch durch Ausfällen von MTX und seiner Metabolite bei saurem Urin-pH. Die renale Toxizität kann weitgehend durch ausreichende Hydrierung und Alkalisierung des Urins vermieden werden. Die Pathogenese der akuten Hepatopathie ist ebenso un-

klar wie die der Hauttoxizität. All diese unerwünschten Wirkungen sind in der Regel reversibel und führen selten zum Abbruch der Therapie. Die MTX-induzierte Neurotoxizität hingegen stellt, insbesondere dann, wenn sie einen chronischen Verlauf nimmt, eine ernsthafte Komplikation dar. (Bleyer 1988; Gadenner *et al.* 2006; Josting 1998; Mahoney *et al.* 1998)

### **Neurotoxizität durch Methotrexat**

Toxische Veränderungen durch MTX manifestieren sich häufig am ZNS und dort insbesondere an der weißen Substanz, so dass sie als Leukenzephalopathie bezeichnet werden (Shuper *et al.* 2000).

Die Symptomatik kann akut, kurz nach Therapie, subakut oder als Langzeitfolge z.T. mit Progression auftreten und mit neurologischen, psychiatrischen und kognitiven Problemen einhergehen.

**Die akute Form** der Neurotoxizität beginnt noch während oder einige Stunden nach der HD-MTX-Infusion und zeigt sich als Somnolenz, Müdigkeit, Verwirrtheit, Desorientiertheit oder als Krampfanfälle. Intrathekal verabreichtes MTX kann zu einer Arachnoiditis führen, die mit Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Fieber und Rückenschmerzen einhergehen kann. Laborchemisch kann eine Liquorpleozytose mit erhöhtem Eiweiß gefunden werden, z.T. auch erhöhter intrakranieller Druck.

Tage bis Wochen nach der MTX-Gabe kann sich die Neurotoxizität **subakut** mit Hemiparese, Ataxie, Schluckstörungen, Aphasie, Athetose, Krampfanfällen, Verwirrtheit und emotionalen Störungen darstellen. In der Regel sind die Symptome nach 2-3 Tagen spontan rückläufig.

Die **chronische** Form der Neurotoxizität tritt Monate bis Jahre nach MTX-Gabe auf. Sie kann mit kognitiven Störungen, Lernbehinderung und Intelligenzminde- rung einhergehen aber auch mit Somnolenz oder Agitiertheit, Krampfanfällen, Ataxie, Demenz, Dysphasie, Paresen und Sehstörungen einhergehen (Bleyer 1981; Josting 1998; Rollins *et al.* 2004; Shuper *et al.* 2000; Shuper *et al.* 2002; Vezmar *et al.* 2003). Aufmerksamkeit, Konzentrations- und Merkfähigkeit können deutlich vermindert sein (Brouwers *et al.* 1985; Fletcher & Copeland 1988; Langer *et al.* 1998). Die

Krampfanfälle treten meist sporadisch auf, nur eine Minderheit der Patienten entwickelt eine Epilepsie (Maytal *et al.* 1995).

#### Klinische Verlaufsformen der MTX-induzierten Neurotoxizität

Akut	Nach 1-2 Tagen	Schläfrigkeit, Verwirrtheit, Desorientiertheit, Krampfanfälle, chemische Arachnoiditis mit Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Fieber
Subakut	Nach Tagen bis Wochen	Enzephalopathie mit Hemiparese, Ataxie, Sprachstörung, Krampfanfällen, Verwirrtheit und affektiven Störungen Myelopathie mit Dysästhesien der Beine, Sensibilitätsstörungen, Paraplegie und Blasenfunktionsstörung
Chronisch	Nach Monaten, teilweise Jahren	Lern- und Gedächtnisstörungen, verminderter Intelligenzquotient, LEP mit Verwirrtheit, Somnolenz, Irritabilität, Krampfanfällen, Ataxie, Tetraparese, Dysphasie, Sehstörungen, Demenz, Koma, Tod

Die Leukenzephalopathie verläuft aber nicht selten auch nur **subklinisch**, d.h. ohne subjektive oder objektive Symptome und kann dann nur durch zerebrale Bildgebung erkannt werden. Sie kann über Monate bis Jahre rückläufig sein oder auch ganz verschwinden. Andererseits ist auch ein progressiver Verlauf bis hin zu Demenz, Koma und Tod möglich. Das Ausmaß der LEP nimmt mit

der MTX-Dosis und Häufigkeit der Verabreichung zu (Asato *et al.* 1992; Oka *et al.* 2003; Reddick & al. 2005; Shuper *et al.* 2000). Nach ausschließlich niedrig dosiertem MTX wurde keine LEP beobachtet (Inaba *et al.* 2008). Auch die Gabe bzw. Dosis des Leucovorin-Rescue hat einen Einfluss auf das Auftreten von Neurotoxizität (Mahoney *et al.* 1998). Risikofaktoren sind außerdem die intrathekale Gabe von MTX (Gowan *et al.* 2002), ein Alter über 10 Jahren (Dufourg *et al.* 2007) und ganz wesentlich die zusätzliche kraniale Bestrahlung (Matsumoto *et al.* 1995).

Die Angaben zur **Inzidenz der LEP** sind den multiplen Einflussfaktoren entsprechend, aufgrund der unterschiedlichen Therapieregime, der subklinischen Verläufe und der Veränderung bzw. Heilung im zeitlichen Verlauf recht unterschiedlich. Somit spielt auch der Zeitpunkt der Bildgebung eine wesentliche Rolle. So fand **Reddick** (Reddick & al. 2005) bei seiner Literaturübersicht bei nicht bestrahlten ALL-Patienten zu Beginn von Induktionstherapie und Konsolidierung keine LEP, im Verlauf der weiteren Therapie dann bei 18-76% und nach Therapie, wiederum in Abhängigkeit vom Abstand zum Therapieende, bei 5-53% eine LEP, bzw 16-69% falls bestrahlt wurde.

Die akute Form der Neurotoxizität tritt in 5-40% aller Patienten auf falls auch bestrahlt wurde (Bleyer 1981), sonst wird die Häufigkeit akuter LEP mit klinischer Symptomatik mit 3-15% angegeben. (Atra *et al.* 2004; Mahoney *et al.* 1998; Rubnitz *et al.* 1998)

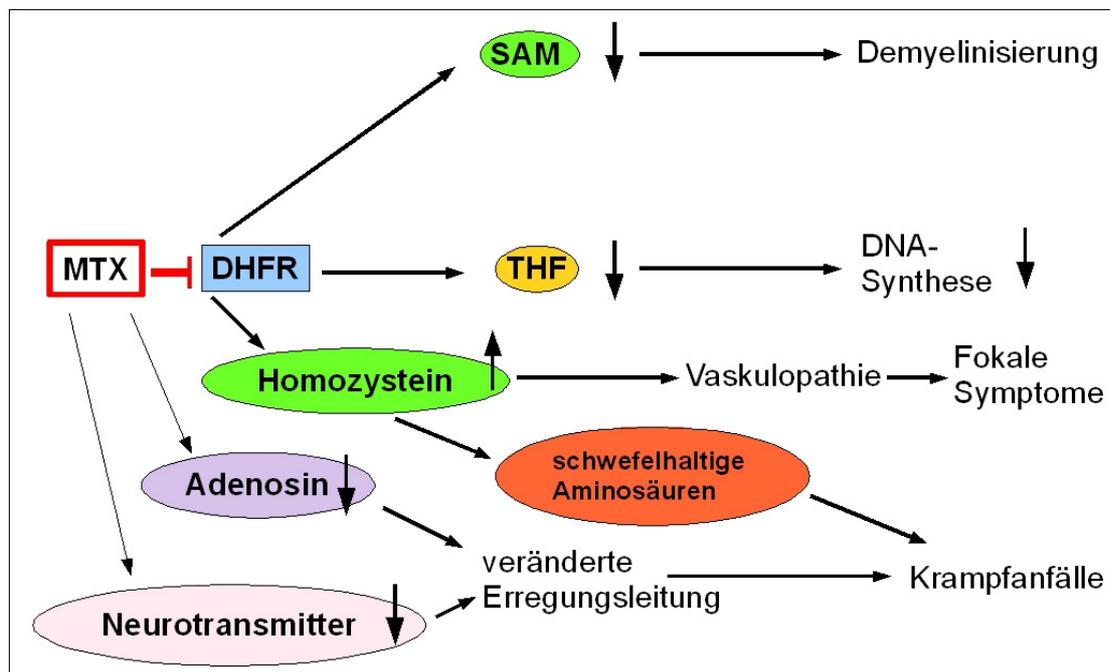
Eine Spätfolgenstudien am Patientengut der ALL-BFM Studie, also an Patienten, die mit dem gleichen MTX-Regime behandelt wurden wie unsere, zeigte nur bei 1 von 39 (2,5%) ohne Radiotherapie behandelten Patienten nach im mittel 7 Jahren noch Zeichen einer LEP, hingegen bei 25% falls zusätzlich zur HD-MTX-Therapie auch eine kraniale Bestrahlung erfolgt war (Langer *et al.* 1998). Ziareisen (Ziareisen *et al.* 2006) fand bei regelmäßig durchgeführten kranialen MRT bei 90 pädiatrischen ALL und non-B-NHL-Patienten ohne Bestrahlung bei 16,7% Zeichen MTX-assoziiierter Neurotoxizität. 60 % hiervon waren asymptomatisch, 40% zeigten Zeichen akuter Neurotoxizität.

Eine in unserer Klinik durchgeführte Studie fand bei 6 von 21 Kindern mit ALL/NHL, die *während* der Chemotherapie vor eventueller Bestrahlung regel-

mäßig auch ohne Symptomatik MR-tomographisch untersucht wurden, leukenzephalopathische Veränderungen, also bei ca. 25% (Rüttger-Janssen 2001).

### Genese der Neurotoxizität

Die Genese der Neurotoxizität ist noch in weiten Teilen unklar. Neben der Folatdepletion auch im ZNS (Surtees *et al.* 1998), werden vor allem MTX-induzierte Veränderungen im Bioterin- und Homozystein-Stoffwechsel als Folge der Hemmung des Folatstoffwechsels und die Störung des Adenosinabbaus angeschuldigt (Bernini *et al.* 1995; Fisher *et al.* 2005; Mahoney *et al.* 1998; Vezmar *et al.* 2003).



**MTX-Wirkungen und mögliche neurotoxische Folgen**

### **Interaktion mit dem Adenosinstoffwechsel**

Adenosin reguliert Perfusion und neuronale Erregbarkeit des ZNS über Adenosin-Rezeptoren (Vezmar *et al.* 2003). Durch Hemmung der AICAR-Transformylase durch MTX und Anstieg von AICAR, einem starken Inhibitor der Adenylat-Desaminase und der Adenosin-Desaminase, steigen die Spiegel von Adenosin und Adenylat (Cronstein *et al.* 1993). Symptome erhöhten Adenosins sind Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerzen, Somnolenz und Krampfanfälle (Kane *et al.* 1992). Bernini *et al.* zeigten, dass Patienten, die mit HDMTX therapiert wurden, erhöhte Adenosinkonzentrationen im Liquor aufwiesen und dass Symptome einer akuten Neurotoxizität durch die Gabe von Aminophyllin, einem Adenosin-Rezeptorantagonisten, abgeschwächt werden konnten (Bernini *et al.* 1995; Bleyer 1988). Auch Peyriere *et al.* konnten eine ausgeprägte akute Neurotoxizität mit Aminophyllin erfolgreich behandeln (Cronstein *et al.* 1993; Peyriere *et al.* 2001). Diese Daten deuten darauf hin, dass erhöhte Adenosinspiegel eine Rolle bei der Entstehung der MTX-bedingten Neurotoxizität spielen könnten (Vezmar *et al.* 2003).

### **Interaktion mit dem Biopterinstoffwechsel**

Tetrahydrobiopterin (THB) ist Cofaktor der Hydroxylierung von Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan und somit essentiell für die Biosynthese der Neurotransmitter Dopamin und Serotonin. Die enzymatisch katalysierte Wiedergewinnung von THB aus Dihydrobiopterin erfolgt über die Dihydrofolat-Reduktase (DHFR), die Methyltetrahydrofolatreduktase (MTHFR) oder die Dihydropteridinreduktase (DHPR). Methotrexat hemmt alle drei Wege der Rückgewinnung von THB: die Enzyme DHFR, DHPR und die MTHFR (Craine *et al.* 1972). THB kann bei vollständiger Blockade dieser drei Enzymsysteme nur über die Neusynthese aus Guanosintriphosphat (GTP) gebildet werden. Abelson *et al.* stellten bereits 1978 die Hypothese auf, dass ein MTX-induzierter Mangel an THB zur verminderten Synthese von Dopamin und Serotonin führt und die unzureichende Verfügbarkeit dieser Neurotransmitter für das klinische Bild der akuten bzw. subakuten Neurotoxizität verantwortlich ist (Abelson 1978). Diese Theorie konnte aber bis heute nicht belegt und klinisch relevante Veränderungen der

Neurotransmitter konnten bisher nicht schlüssig gezeigt werden (Vezmar *et al.* 2003).

***MTX-induzierte Stoffwechselstörungen, mögliche Pathomechanismen und Symptome***

	Liquorspiegel	mögliche Pathogenese	Symptome
<b>SAM</b> <b>SAH</b>	↓ ↑	Methylierungskapazität ↓ Demyelinisierung	Leukenzephalopathie Demenz
<b>Homozystein</b>	↑	direkt toxische Effekte auf das Gefäßendothel, Thrombophilie, oxidativer Stress	Zerebrovask. Probleme Mikroangiopathie fokale neurologische Defizite
<b>exzitatorische Aminosäuren</b>	↑	Exzitabilität, Zytotoxizität Neurodegeneration	Krampfanfälle Demenz
<b>Adenosin</b>	↑	Veränderter zerebraler Blutfluss Neuronale Erregbarkeit ↑	Übelkeit, Erbrechen, Lethargie Kopfschmerzen, Krampfanfälle
<b>THB</b>	↓ ?	gestörte Neurotransmitter-Biosynthese	affektive Störungen Krampfanfälle

**Interaktion mit dem Homozystein-Stoffwechsel**

MTX beeinflusst den Homozystein-Stoffwechsel durch eine Verminderung der 5-Methyl-THF-Konzentration (Quinn *et al.* 1997). So ist die Remethylierung zu Methionin gestört und es resultiert eine Hyperhomozysteinämie und eine Homozysteinerhöhung im Liquor (Becker *et al.* 2007; Surtees *et al.* 1998). Die multiplen Folgen und Pathomechanismen einer Hyperhomozysteinämie wurden bereits dargestellt. Grundlegend ist vermutlich erhöhter oxidativer Stress durch beim Homozysteinabbau entstehende Radikale und seine vielfältigen Folgen .

Erhöhte Homozystein- und Homozystein-Sulfininsäure- sowie erniedrigte 5-Methyl-THF-Folat- und SAM- Konzentrationen wurden sowohl im Plasma als auch im Liquor von mit HD-MTX behandelten Patienten gefunden und waren nach Gabe von 5-Formyl-THF (Leucovorin) reversibel. (Becker *et al.* 2007; Broxson *et al.* 1989; Kishi *et al.*; Refsum *et al.* 1989; Refsum *et al.* 1986; Refsum *et al.* 1991) Kishi *et al.* zeigten, dass Kinder, die im Rahmen einer Hochdosis-Chemotherapie mit MTX unter Krampfanfällen litten, tendentiell höhere Homozysteinkonzentrationen im Plasma aufwiesen als solche, die keine neurologischen Symptome zeigten (Kishi *et al.*). Dies führte zur Vermutung, Homozystein könne wesentlich an der Entstehung der neurologischen Symptome z.B. durch Induktion mikroangiopathischer Veränderungen beteiligt sein. Quinn *et al.* vermuteten, dass insbesondere die fokalen neurologischen Ausfälle, die man bei Patienten mit MTX-induzierter Neurotoxizität beobachtet, durch die gefäßschädigende Wirkung des Homozysteins verursacht werden (Quinn *et al.* 1997).

Andere favorisierten die Hypothese, Metabolite des Homozysteins seien für die neurotoxischen Wirkungen des MTX verantwortlich (Packer *et al.* 1983; Quinn *et al.* 1997; Quinn *et al.* 1998). Der Abbau von Homozystein erfolgt unter anderem zu Cystein- und Homozysteinsäure, schwefelhaltigen Aminosäuren, die für ihre stark neuronal erregende Wirkung u.a. über Aminosäurerezeptoren wie NMDA (N-methyl-D-aspartat)-Rezeptoren bekannt sind (Curras & Dingledine 1992; Curtis & Watkins 1963; Pullan *et al.* 1987). Solch vermehrte Erregung könnte zu Krampfanfällen und schließlich zum Zelltod führen (Bridges *et al.* 1992; Choi 1988; Meldrum & Garthwaite 1990) .

### **Mangel an S-Adenosyl-Methionin**

Die reduzierte Methylierungskapazität durch Mangel an S-Adenosyl-Methionin (SAM) ist ebenfalls Folge der MTX-Therapie und betrifft verschiedene Moleküle u.a. Nukleinsäuren, Eiweiße -wie Myelin-Proteine - und Phospholipide. Bei verschiedenen neuropsychiatrischen Erkrankungen wurde SAM im Liquor erniedrigt gemessen und vermutet, die hierbei vorkommende Demyelinisierung stehe mit dem Mangel an SAM in Zusammenhang (Bottiglieri & Hyland 1994; Hyland *et al.* 1988). Kishi *et al.* zeigten, dass zwei ALL-Patienten mit ausgeprägter Leuken-

zephalopathie einen deutlich niedrigeren SAM/SAH-Quotienten besaßen, als sieben ALL-Patienten, die klinisch unauffällig waren (Kishi *et al.* 2003).

Surtees *et al.* zeigten, dass unter einer HD-MTX-Therapie die Konzentrationen an SAM und Methionin im Liquor abfallen und dass die gemessenen SAM-Konzentrationen invers mit den Konzentrationen an MBP (Myelin basisches Protein), einem Marker für Demyelinisierung, korrelierten (Surtees *et al.* 1998; Surtees *et al.* 1991). Diese Studien legen nahe, dass ein MTX-induziertes Methylierungsdefizit zur Entwicklung leukenzephalopathischer Veränderungen durch MTX beiträgt.

Zusammenfassend bleibt also festzustellen, dass MTX verschiedene biochemische Stoffwechselwege beeinflusst: Ein Methylierungsdefizit durch vermindertes SAM, Erhöhung von Homozystein und infolge auch anderer schwefelhaltiger Aminosäuren sowie ein erhöhter Adenosin- und verminderter THB Spiegel könnten zu akuten, subakuten oder chronischen neurotoxischen Veränderungen durch MTX beitragen.

## ***LEUKENZEPHALOPATHIE***

Als Leukenzephalopathie (LEP) werden krankhafte Veränderungen der weissen Gehirns substanz bezeichnet. Sie sind ein typisches Zeichen MTX-bedingter Neurotoxizität.

### ***MR-tomographische Veränderungen bei MTX-bedingter LEP***

MR-tomographisch zeigen sich die Veränderungen typischerweise als Hyperintensitäten der weissen Substanz der Marklager in T2 gewichteten Aufnahmen (Asato *et al.* 1992; Fisher *et al.* 2005) oder FLAIR-Sequenzen, häufig periventrikulär, bei stärkerer Ausprägung auch bis an die graue Substanz heranreichend (Chan *et al.* 2006).

Ziereisen fand in seiner Untersuchung, dass besonders Patienten ohne neurologische Klinik solch typische MRT-Veränderungen zeigen, symptomatische Patienten hingegen zusätzlich weitere Veränderungen wie Hyperintensitäten

des supratentoriellen Kortex, der subkorticalen weißen Substanz, von Kortex und weißer Substanz des Kleinhirns und des Thalamus. Auch Hyperintensitäten der Basalganglien und des Corpus callosum, sowie computertomographisch Verkalkungen der Basalganglien wurden beschrieben (Ziereisen *et al.* 2006). Das Kontrastmittelverhalten der Herde ist unterschiedlich. In einem Teil der Fälle wird Kontrastmittelaufnahme berichtet, häufig nehmen die Herde aber kein Kontrastmittel auf. (Langer *et al.* 1998; Ohmoto *et al.* 1996; Shuper *et al.* 2002; Smith *et al.* 2005)

### ***MR-Spektroskopie bei LEP***

MR-spektroskopisch wurde bei Patienten nach HD-MTX-Theapie ein erhöhter Cholin/Kreatin-Quotient, als Hinweis auf Demyelinisierung und Gliose und ein erniedrigter N-Acetylaspartat/Kreatin Quotient, als Hinweis auf neuronale Schädigung beschrieben. Diese Veränderungen kamen unabhängig vom Vorliegen MR-tomographischer Zeichen einer LEP also auch bei MR-morphologisch unauffälligen Gehirn vor (Chan *et al.* 2001; Chu *et al.* 2003; Usenius *et al.* 1995; Waldrop *et al.* 1998).

### ***Histologische Veränderungen***

Histopathologisch gingen die Veränderungen mit diffusen nekrotisierenden Läsionen, Demyelinisierung und Schwellung der Axone mit vermehrter Flüssigkeitsansammlung in der Myelinscheide einher, im weiteren Verlauf mit reaktiver Gliose und Verkalkungen (Liu *et al.* 1978; Shuper *et al.* 2000).

Das Ausmaß und die Lokalisation der LEP korreliert nur schlecht mit der Schwere und Ausprägung der neurologischen Symptome, so dass die LEP nicht selten subklinisch oder nur mit milder Symptomatik verläuft und deshalb unbemerkt bleibt. (Oka *et al.* 2003; Paakko *et al.* 2000)

Auch wenn in aller Regel MTX für den Großteil neurologischer Symptomatik und leukenzephalopathischer Veränderungen verantwortlich gemacht wird, so werden die untersuchten Patienten doch meist mit multiplen zytotoxischen Substanzen behandelt, so dass auch diese als mögliche Ursachen für Neurotoxizi-

tät mitbedacht werden müssen. Insbesondere bei Cytarabin sind leukenzephalopathische Veränderungen ebenfalls beschrieben, allerdings eher in höheren als bei der ALL-Primärtherapie nach BFM verabreichten Dosen. (Fisher *et al.* 2005; Hoffman *et al.* 1993; Hwang *et al.* 1985; Hwang *et al.* 1986; Ochs 1989)

## METHODEN

Um die akut nach MTX-Gabe aufgetretene Toxizität zu ermitteln, wurden die Patientenakten und Arztbriefe retrospektiv bezüglich dokumentierter Mukositis, erhöhter Werte für AST, ALT oder Bilirubin als Zeichen von Lebertoxizität, Leukozytopenie als Zeichen von Myelotoxizität jeweils zu den Zeitpunkten nach HD-MTX-Gabe ausgewertet. Gewertet wurde -in Anlehnung an die Klassifikation nach NCI Common-Toxicity-Criteria -Modifikation nach SIOP (Riehm *et al.* 1995) - jeweils eine mindestens Grad 2 entsprechende Toxizität, d.h eine Erhöhung des Gesamtbilirubins um mindestens das 1,5-fache, eine Erhöhung der AST bzw. ALT um mehr als das 2,5-fache des altersentsprechenden Normwertes, eine Leukozytopenie unter 2000/  $\mu$ l oder schmerzhaft Ulzerationen oder Erythem der Mundschleimhaut.

## STATISTIK

### ***Hardy-Weinberg-Gleichgewicht***

In den Jahren 1908 und 1909 formulierten der englische Mathematiker Godfrey Harold Hardy und der deutsche Arzt Wilhelm Weinberg unabhängig voneinander ein Gesetz, das die Verteilung von Erbmerkmalen in Populationen beschreibt. In einer idealen Population bleiben die Allelfrequenz und die Allelverteilung, also die Häufigkeit von Homozygoten und Heterozygoten, über Generationen hinweg konstant, wenn sich die Population im Gleichgewicht befindet.

Voraussetzungen dafür sind Panmixie, keine Selektion, keine Genwanderungen und dass die Population sehr groß ist. Mit Hilfe des Hardy-Weinberg-Gesetzes kann die erwartete Häufigkeit der Allele berechnet werden. Bezeichnet man die Häufigkeit des Allels A mit  $p$  und die Häufigkeit des Allels B mit  $q$ , so gilt:  
 $p + q = 1$  (100 %).

In der nachfolgenden Generation erscheinen dann die Genotypen (AA, AB, BB) mit definierten Häufigkeiten:

Homozygot AA	$P \times p = p^2$
Heterozygot AB und BA	$p \times q + q \times p = 2pq$
Homozygot BB	$Q \times q = q^2$
zusammengefasst:	$p^2 + 2pq + q^2 = 1$

(Hardy 1908; Stern 1943)

### ***Chi<sup>2</sup> und Fisher's exakter Test***

Gegenstand des Chi<sup>2</sup>-Tests ist die Analyse von Häufigkeitsunterschieden von Merkmalen. Für den Vergleich der beobachteten mit der erwarteten Häufigkeit der MTHFR-C677T-Genotypen wurde der Chi<sup>2</sup>-Anpassungstest angewandt. Dieser Test prüft, ob eine beobachtete Verteilung mit einer theoretischen übereinstimmt. Als Nullhypothese wird die Gleichverteilung der Genotypen in Stichprobe und Grundgesamtheit formuliert. Bei einem  $p$ -Wert  $<0,05$  müsste die Nullhypothese verworfen werden. Es wird also überprüft, ob die beobachtete Verteilung mit einer theoretisch nach der Hardy-Weinberg-Formel erwarteten übereinstimmt.

Um die Toxizitäten der Patienten mit und ohne MTHFR-C677T-Mutation zu vergleichen, wurde der exakte Test nach Fisher angewendet und Werte von  $p < 0,05$  als signifikant angesehen. (Bender & Lange 2001; Bender *et al.* 2007; Lange & Bender 2007)

Als zusätzliches Maß für einen Zusammenhang zwischen MTHFR-Status und Toxizität wurde die Odds-Ratio als Verhältnis der Wahrscheinlichkeiten Toxizität bei Wildtyp oder Mutation zu entwickeln angegeben.

Kontinuierliche Parameter wurden durch Mittelwert und Standardabweichung beschrieben, kategorielle Daten durch die Angabe von absoluten und relativen Häufigkeiten.

Die statistische Berechnung wurde unter Verwendung des Programms „tables“ der Firma *quantitative skills* durchgeführt.

Da lediglich eine Patientin homozygot für MTHFR C677T war, wurde sie bei den statistischen Betrachtungen der Heterozygotengruppe zugeteilt. Dieses Vorgehen war einerseits nötig, um überhaupt statistisch vergleichbare Gruppen zu erhalten, andererseits weisen auch Heterozygote eine erniedrigte Aktivität der MTHFR auf, so dass Effekte im Folsäurestoffwechsel und Interaktionen mit der MTX-Therapie möglich sind.

## ***MTHFR-C677T BESTIMMUNG***

Die Bestimmung des Mutationsstatus an der Stelle 677 des MTHFR-Gens erfolgte aus EDTA-Blut durch eine PCR mit sequenzspezifischen fluoreszenzmarkierten Hybridisierungssonden und Schmelzpunktanalyse des Amplifikats (Gressner 1999) und wurde im Zentrallabor der Universitätsklinik Aachen durchgeführt.

## ***KRANIALE MAGNETRESONANZTOMOGRAPHIE***

Die Magnetresonanztomographie (MRT) erzeugt Schnittbilder des menschlichen Körpers aufgrund unterschiedlicher magnetischer Eigenschaften der Atomkerne, besonders der Wasserstoffatome. Diese werden mit elektromagnetischen Impulsen im Magnetfeld angeregt und das Zeitverhalten der Atomkerne bei Abgabe der Energie nach der Anregung gemessen. Die Dichteverteilung dieser Kerne im Gewebe, Flussgeschwindigkeit, Relaxationszeit und Anregungsparameter beeinflussen die Signale, die aus dem Körper empfangen und

in Bilder umgewandelt werden. Mit der MRT können ohne Röntgenstrahlenbelastung für den Patienten Abweichungen vom normalen Gewebe identifiziert werden. Der gute Weichgewebekontrast und folglich die hohe anatomische Auflösung sind besonders in der Neuroradiologie von Nutzen. Im Gegensatz zur kranialen Computertomographie sind in der kranialen MRT häufig schon kleinste Veränderungen des Hirnparenchyms nachweisbar. Sie ist somit eine hochempfindliche Methode zum Aufdecken von Läsionen der weißen und grauen Hirnsubstanz (Csernansky 2001). Ein Nachteil der Methode liegt in der relativ langen Untersuchungsdauer, so dass bis ins Schulkindalter häufig eine Sedierung notwendig ist.

Für die Darstellung unterschiedlicher Pathologien werden in der Regel mehrere MRT-Schnittbildsequenzen (T1, T2, FLAIR) mit einer unterschiedlichen Wichtung durchgeführt. Die T2-, besonders aber die FLAIR-Sequenzen, sind hierbei für das Auffinden und Darstellen von Marklagerläsionen besonders geeignet (Abe *et al.* 1998; Bakshi *et al.* 2001). Auch Marklagerveränderungen nach ALL-Therapie zeigen sich am deutlichsten in T2- und FLAIR-Sequenzen. (Fliessbach *et al.* 2003; Oka *et al.* 2003; Reddick & al. 2005; Sandoval *et al.* 2003; Shuper *et al.* 2002)

Die MRT-Untersuchungen im Verlauf nach mehreren Jahren erfolgten in der Regel mit 1,5 Tesla-Geräten (bei 2 Patienten 0,5 Tesla) und es wurden jeweils mindestens T2-gewichtete FLAIR-Sequenzen angefertigt -meistens auch T2 und T1 gewichtete Aufnahmen. Bei 7 Patienten wurde außerdem Kontrastmittel (Gadolinium) verabreicht.

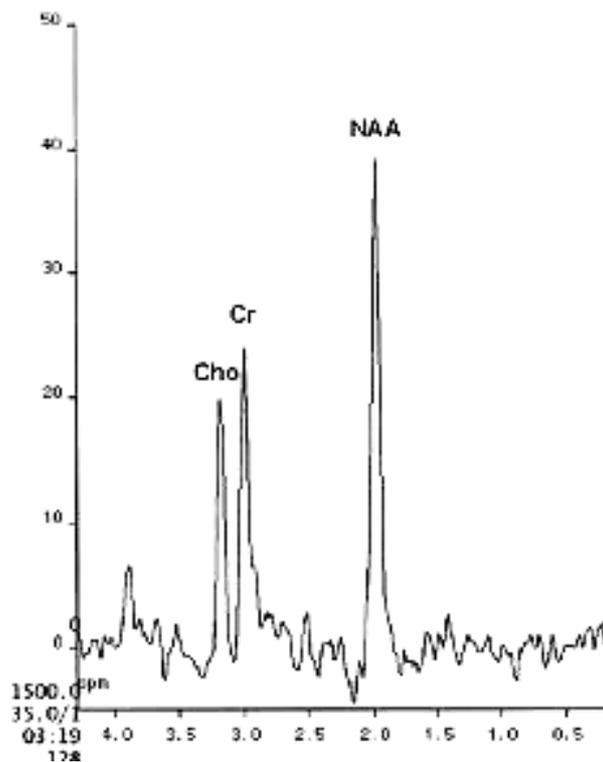
## **MR-SPEKTROSKOPIE**

Bei der Magnetresonanz-Spektroskopie (MRS) ist es möglich verschiedene Stoffwechselprodukte in vivo quantitativ im untersuchten Gewebe nachzuweisen. Die MRS wird besonders häufig in der Diagnostik von Ischämien, Tumoren, Epilepsien und andere neurologische Erkrankungen angewandt.

Bei der Spektroskopie des Gehirns wird N-Acetyl-Aspartat (NAA) als Marker neuronaler Struktur und Funktion angesehen. Cholinrhörungen werden typi-

scherweise bei demyelinisierenden Erkrankungen gefunden (Davie *et al.* 1994; Davies *et al.* 1995; Roser *et al.* 1995), und sind auch nach zerebraler Bestrahlung und ALL-Therapie bekannt (Chu *et al.* 2003; Esteve *et al.* 1998).

Kreatin gilt als Indikator für den zerebralen Energiestoffwechsel.



### **Normale Spektroskopie der weissen Substanz**

Verlust von Neuronen und deren Ersatz durch Gliazellen kann sich ebenfalls in NAA-Erniedrigung und Cholin-Erhöhung zeigen (Grossman *et al.* 1992).

Zur Beurteilung der Spektren werden üblicherweise die Quotienten der Metabolite gebildet also NAA/Kreatin und Cholin/Kreatin.

## FRAGESTELLUNG UND HYPOTHESE

- Lässt sich anhand von klinischen Kriterien, Laborwerten oder Magnetresonanz-Untersuchung des Gehirns eine erhöhte MTX-Toxizität akut oder als Spätfolge bei Patienten mit MTHFR-C677T-Mutation nachweisen ?
- Treten nach hochdosierter MTX-Therapie zur Behandlung einer ALL / eines lymphoblastischen NHL im Kindesalter auch bei klinisch unauffälligen Patienten gehäuft nur MR-tomographisch nachweisbare Veränderungen auf ?

Da sowohl MTX als auch Veränderungen der Aktivität der MTHFR Einfluss auf den Folsäurestoffwechsel haben (Fodinger *et al.* 2000; Josting 1998) könnte sich aus der Kombination beider Faktoren eine Abschwächung oder Verstärkung der Wirkung von MTX bzw. der C677T-MTHFR-Mutation ergeben. Während die Wirkungen, weniger auch die Wirkmechanismen, von Methotrexat relativ gut erforscht sind, stellt sich die Datenlage bei der MTHFR, insbesondere was die Veränderungen im Folsäurestoffwechsel und die Folgen für DNA-Synthese und -Methylierung angeht, wesentlich weniger klar dar.

Im Mittelpunkt des Interesses stand bisher die Frage, ob und wie eine verminderte MTHFR-Aktivität zu einem veränderten Malignomrisiko führen kann. Die Daten sind hierzu sehr uneinheitlich, Studien kommen auch bei gleichen Krebsarten zu unterschiedlichen Ergebnissen.

Viele Autoren sehen jedoch zwei prinzipielle Möglichkeiten, wie eine Aktivitätsänderung der MTHFR zu einem veränderten Krebsrisiko führen könnte (Costea *et al.*).

**Einererseits** führt die verminderte MTHFR-Aktivität über reduzierte Methionin-Bildung zu weniger S-Adenosyl-Methionin (SAM), dem wesentlichen Methylgruppenspendor der DNA Methylierung, (Friso *et al.*; Gemmati *et al.*; Han *et al.*; Stern *et al.* 2000) und damit zu Hypomethylierung der DNA und Hyperhomozysteinämie (Castro *et al.* 2004). Eine generelle Hypomethylierung der DNA ist aber ein typisches Merkmal maligne transformierter Zellen. (Paz *et al.* 2002) Eine DNA-Hypomethylierung könnte zu Aktivierung von Protoonkogenen führen und eine reduzierte Methylierungskapazität der Zelle auf diesem Wege zur Kanzerogenese beitragen. (Baylin *et al.* 2001; Castro *et al.* 2004; Duthie 1999; Esteller & Herman 2002; Gemmati *et al.* 2004; Kim 1999; Lee *et al.* 2007; Sharp & Little 2004; Stern *et al.* 2000; Ueland *et al.* 2001)

Andererseits kann es durch den vermehrten Anfall von 5,10-Methylen-THF zu einer verbesserten Thymidylatsynthese und damit zu weniger Doppelstrangbrüchen kommen (Blount & Ames 1995; Blount *et al.* 1997; Costea *et al.* 2006; Dianov *et al.* 1991; Gemmati *et al.* 2004; Seidemann *et al.* 2006) Solche Doppelstrangbrüche werden als mögliche Schlüsselereignisse in der Malignomentstehung angesehen (Seidemann *et al.* 2006). Eine optimierte DNA-Synthese mit reduzierter Uracilbildung könnte so einen mehrfach beschriebenen protektiven Effekt der C677T-MTHFR-Mutation beim Kolonkarzinom (Ma *et al.* 1997; Marugame *et al.* 2003; Sharp & Little 2004; Ulrich *et al.* 2005) oder der ALL bei Erwachsenen erklären (Gemmati *et al.*; Robien & Ulrich).

**Hypothesen zum kombinierten Einfluss** von Methotrexat und der C677T-MTHFR-Mutation gründen im einfachsten Fall auf der gleichsinnigen Wirkung auf die Methylierung von Homozystein und DNA (Toffoli *et al.*). Beide Einflussfaktoren führen zu einer Hypomethylierung der DNA (Frosst *et al.*; Morgan *et al.* 1998) und könnten so über eine veränderte Genregulation zu einer verstärkten Toxizität beitragen. Ein Anstieg von Homozystein aufgrund mangelnder Methylierung könnte über die verschiedenen Angriffspunkte toxisch wirken (s.o.). Komplexere Betrachtungen gehen von den verschiedenen Wirkmechanismen des MTX aus. MTX wirkt im Wesentlichen über die Hemmung der Dihydrofolat-Reduktase, erniedrigt damit den intrazellulären THF-Spiegel und beeinträchtigt so die Thymidylat- und Purinsynthese- damit den Aufbau von DNA und die Zellteilung durch Substratmangel und Produktstau (DHF). Direkt und mit gleichem Effekt

hemmt MTX die Thymidylatsynthetase und Enzyme der Purinsynthese (Seidemann *et al.* 2006). Der **intrazellulären THF-Verarmung** durch MTX könnte die MTHFR physiologischerweise mit der Umsetzung von 5,10-Methylen-THF zu 5-Methyl-THF, welches unabhängig von der DHFR in THF umgesetzt werden kann, entgegenwirken (Seidemann *et al.*, 2006). Kann dieser Kompensationsmechanismus aufgrund reduzierter MTHFR-Aktivität nicht greifen, könnte eine erhöhte Toxizität aber auch eine bessere Wirksamkeit der MTX-Therapie resultieren.

**Andererseits** führt die reduzierte MTHFR-Aktivität zu einem Anstieg des intrazellulären 5,10-Methylen-THF, welches unter MTX Einfluss eigentlich erniedrigt wird, so dass ein Anstieg desselben die MTX-Wirkung durch eine verbesserte DNA-Synthese beeinträchtigen könnte. (Gemmati *et al.*; Kyoung-Jin Sohn 2004). Ein vermehrter 5,10-Methylen-THF-Anfall könnte nämlich zu einer verbesserten Thymidylatbildung (dTMP) aus Deoxyuridylat (dUMP) führen und so zu einer geringeren Rate fehlerhaften Uracil-Einbaus in DNA. So entstünden weniger chromosomale Schäden durch Doppelstrangbrüche, die ansonsten während der DNA-Reparaturvorgänge mit Wiederherauschneiden des Uracils auftreten könnten (Blount & Ames 1995; Blount *et al.* 1997; Costea *et al.* 2003; Gemmati *et al.* 2004).

Wegen der Möglichkeit eines protektiven Effekts gegenüber malignen Erkrankungen einerseits und der andererseits im Falle einer Erkrankung erhöhten Toxizität und reduzierten MTX-Effektivität wurde für die MTHFR-C677T-Mutation der Begriff des „Judas-Allels“ vorgeschlagen (Gemmati *et al.* 2004; Gemmati *et al.* 2007).

## PATIENTENKOLLEKTIV

Untersucht wurden 31 Kinder, die zwischen 1990 und 1999 an einer ALL bzw. einem lymphoblastischem-NHL (mit identischer Therapie) erkrankten und in der Universitätskinderklinik Aachen nach dem ALL-BFM 90, bzw. 95 Protokoll behandelt wurden. Das Alter der Kinder lag zwischen 1 Jahr 7 Monaten und 14 Jahren und 9 Monaten, das Durchschnittsalter betrug 5,48 Jahre, 13 Mädchen, 18 Jungen. Bei 5 Kindern fand sich eine prä- B-, bei 22 eine common-ALL, bei 4 eine T-ALL/NHL. 23 Kinder wurden der mittleren Risikogruppe, 8 der Standard-Risikogruppe zugeordnet.

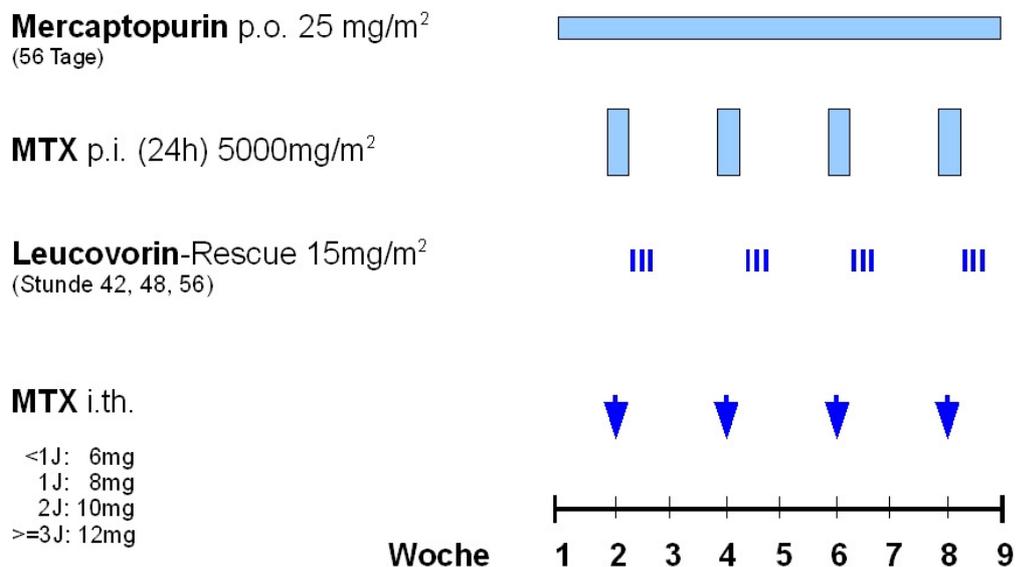
### Patientencharakteristika

Patienten insgesamt / mit MRT untersucht		31 / 23	
Alter bei HD- MTX-Beginn	Mittelwert	5,48 Jahre	
	Range	1,58 – 14,75	
	Standardabweichung	3,07	
Geschlecht	weiblich	13	(42%)
	männlich	18	(58%)
Risikogruppen	SR	8	(26%)
	MR	23	(74%)
Subtypen	CALL	22	(71%)
	Prä-B-ALL	5	(16%)
	T-ALL	2	(6,5%)
	T-NHL	2	(6,5%)
Anzahl der HD-MTX-Zyklen		124	
MTHFR-Genotyp	CC (Wildtyp)	14	(45%)
	TC (heterozygot)	16	(52%)
	TT (homozygot)	1	(3%)
bestrahlte Patienten		10	(32%)
Anzahl LEP der mit MRT untersuchten Pat.		7 / 23	(30,5%)

Das Intervall zwischen der Hochdosis-MTX Therapie und der Bildgebung betrug im Durchschnitt 8,63 Jahre (Range: 2,08 Jahre – 16,17 Jahre, Standardabweichung: 3,18). Von 56 infrage kommenden Patienten wurde schließlich bei 23 eine MRT angefertigt, bei diesen und weiteren 8, also insgesamt 31 Patienten wurde nach Aufklärung und Einverständnis der Eltern bzw. Patienten der MTHFR-Status erhoben. Die übrigen Patienten waren z.T. verzogen und der neue Wohnort konnte nicht ausfindig gemacht werden, andere lehnten MRT oder Blutentnahme ab oder meldeten sich nach mehrfachen Kontaktaufnahmen nicht zurück. MRT Untersuchungen im Verlauf wurden nur angefertigt, wenn hierzu aufgrund der Kooperationsfähigkeit der Patienten keine zusätzliche Narkose notwendig war.

Alle Patienten erhielten als Konsolidierungstherapie jeweils 4 Blöcke mit hochdosiertem MTX ( $5\text{g}/\text{m}^2$ ) intravenös über 24h und intrathekal altersabhängig 6-12 mg MTX alle 2 Wochen, jeweils gefolgt durch das Leucovorinrescue mit 15 mg Folsäure zu den Stunden 42, 48 und 56 nach MTX Beginn.

Täglich nahmen die Patienten außerdem  $25\text{mg}/\text{m}^2$  6-Mercaptopurin ein.



### **Protokoll M, ALL-BFM 2000**

10 Patienten erhielten protkollgemäß eine zerebrale Bestrahlung mit 12 bzw. 18 Gy (1 Patient). 7 der Bestrahlten wurden mittels MRT nachuntersucht.

## ERGEBNISSE

Ausgewertet wurden 31 Patienten. Alle wurden retrospektiv auf Zeichen der MTX-Toxizität während und nach den HD-MTX-Blöcken und die MTHFR-Mutation C677T untersucht. Es wurden pro Patient 4 HD-MTX-Blöcke verabreicht, also lagen insgesamt 124 Blöcke zur Auswertung vor. Bei 23 Patienten konnte nach Abschluß der Therapie ein kraniales MR durchgeführt werden. Bei 10 dieser Patienten lagen Vor-MR's vom Therapiebeginn und ggf. aus dem Therapieverlauf vor.

### **MUTATIONSHÄUFIGKEIT**

Die MTHFR-Mutation C677T trat bei 16 der 31 untersuchten Patienten in heterozygoter Ausprägung auf (51,6%), bei einer Patientin homozygot (3,2%). 14 Patienten wiesen den Wildtyp auf (45,2%).

#### **Genotyp-Häufigkeiten**

MTHFR-Genotyp	Anzahl Patienten	Erwartete Anzahl	Eingetretene Frequenz %	Erwartete Frequenz %	Allel-Häufigkeit C Wildtyp	Allel-Häufigkeit T Mutation
CC	14	15,6	45,2	50,4	28	0
CT	16	12,8	51,6	41,2	16	16
TT	1	2,6	3,2	8,4	0	2
Summe	31	31	100	100	44 = 71%	18 = 29%

Die Allelfrequenz für C ist somit (berechnet als Häufigkeit von CC + ½ Häufigkeit CT) 0,71 für T (Häufigkeit TT + ½ Häufigkeit CT) 0,29. Hierdurch ergeben sich nach Hardy-Weinberg die in der obigen Tabelle aufgeführten

theoretisch zu erwartenden Genotyphäufigkeiten. Mit einem p-Wert von 0,16 im Chi-Quadrat-Anpassungstest gibt es bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% keinen Hinweis darauf, dass die Genotyphäufigkeiten unserer Patienten signifikant von der theoretisch erwarteten Verteilung abweichen. Die untersuchte Gruppe befindet sich im Hardy-Weinberg-Equilibrium, die beobachteten Unterschiede sind zufälliger Natur.

**Vergleich der Häufigkeiten der MTHFR-Genotypen der untersuchten ALL-Population mit einer deutschen Vergleichspopulation aus Thirumaran et al. 2005. (Thirumaran et al. 2005)**

	eigene ALL-Pat.	%	Kontrollgruppe (Thirumaran <i>et al.</i> 2005)	%
CC	14	45%	600	41%
TT+CT	17	55%	848	59%

p= 0,71      OR: 1,16      95%-CI: 0,57 – 2,4

Die durch uns bestimmten Häufigkeiten der Genotypen der C677T-MTHFR-Mutation weichen nicht statistisch signifikant von einer der Literatur entnommenen deutschen Kontrollgruppe ab.

## ***HÄUFIGKEIT DER TOXIZITÄTEN***

Die häufigste Toxizität war hämatologischer Art: nach 44 von 124 MTX-Blöcken traten Leukozytenwerte unter 2000/ $\mu$ l auf (35%) gefolgt von Mukositis > 2° bei 20 von 124 Blöcken ( 16 %).

Bilirubin war nach 17 von 124 MTX-Blöcken um mindestens das 1,5fache , Transaminasen (GOT oder GPT) nach 15 von 124 Blöcken (12 %).

## **HÄUFIGKEIT DER TOXIZITÄTEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM MTHFR-STATUS**

### **Bilirubin - MTHFR**

	MTX-Blöcke bei MTHFRC667T-Patienten 17 Patienten, 68 Blöcke	%	MTX-Blöcke bei MTHFR Wildtyp Patienten, 14 Patienten, 56 Blöcke	%
Bilirubin erhöht, mind 2°	11	16%	6	11%
Bilirubin weniger erhöht	57	94%	50	89%

p : 0,44    OR: 1,61    95%-CI: 0,55 – 4,66

Bei insgesamt 56 an MTHFR-Wildtyp verabreichten MTX-Blöcken trat bei 6 ein mindestens um das 1,5 fache erhöhtes Gesamtbilirubin auf. Bei den 68 an Mutationsträger verabreichten Blöcken trat 11 mal eine solche Bilirubinerhöhung auf.

Zwischen den beiden Gruppen liegt kein signifikanter Unterschied vor.

### **Transaminasen (AST/ALT) - MTHFR**

	MTHFRC667T-MTX-Blöcke	%	MTHFR Wildtyp-MTX-Blöcke	%
AST/ALT erhöht, mind 2°	7	10%	6	11%
AST/ALT weniger erhöht	61	90%	50	89%

p : 1,    OR: 0,96,    95%-CI: 0,3 – 3,02

Bei insgesamt 56 an MTHFR-Wildtyp verabreichten MTX-Blöcken trat bei 6 eine mindestens um das 2,6 fache erhöhte AST oder ALT auf. Bei den 68 an Mutationsträger verabreichten Blöcken trat 7 mal eine solche Transaminasenerhöhung auf.

Zwischen den beiden Gruppen liegt kein signifikanter Unterschied vor.

### Leukozytopenie - MTHFR

Leukozytopenie	MTHFR C667T- MTX-Blöcke	%	MTHFR-Wildtyp- MTX-Blöcke	%
<2000	23	34	21	37,5
>2000	45	66	35	62,5

p : 0,71      OR: 0,85      95%-CI: 0,41 – 1,78

Bei insgesamt 56 an MTHFR-Wildtyp verabreichten MTX-Blöcken trat bei 21 eine Leukozytopenie von mindestens <2000/μl auf. Bei den 68 an Mutationsträger verabreichten Blöcken trat 23 mal eine solche Leukopenie auf. Zwischen den beiden Gruppen zeigt sich kein signifikanter Unterschied.

### Mukositis - MTHFR

Mukositis	MTHFR C667T- MTX-Blöcke	%	MTHFR Wildtyp- MTX-Blöcke	%
min. 2°	10	8,9	10	14
keine oder 1°	58	91,1	46	86

p : 0,63      OR: 0,79      95%-CI: 0,3 – 2,06

Bei insgesamt 56 an MTHFR-Wildtyp-Patienten verabreichten MTX-Blöcken trat bei 10 eine mindestens 2-gradige Mukositis auf. Bei den 68 an Mutationsträger verabreichten Blöcken trat 10 mal eine solche Mukositis auf.

Zwischen den beiden Gruppen liegt kein signifikanter Unterschied vor.

**Leukenzephalopathie - MTHFR**

	MTHFR C667T 13 untersuchte Patienten	%	MTHFR Wildtyp 10 untersuchte Patienten	%
LEP	3	23,1	4	40
Keine LEP	10	76,9	6	60

p: 0,65      OR:0,45      95%-CI: 0,074 – 2,74

Von den 23 mit cranialen MR nachuntersuchten Patienten zeigten 13 die MTHFR-Mutation. Von diesen wiesen 3 leukenzephalopathische Veränderungen auf. Von den 10 MR-tomographisch nachuntersuchten Patienten mit MTHFR-Wildtyp wiesen 4 leukencephalopathische Veränderungen auf. Mit einem p-Wert von 0,65 besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen Auftreten einer Leukenzephalopathie nach HD-MTX und dem MTHFR-Status.

**Gesamttoxizität- MTHFR**

	MTHFR C667T	%	MTHFR Wildtyp	%
Toxizität	54	19%	43	18,5%
Keine Toxizität	231	81%	191	81,5%

p= 0,91      OR= 1,04      95%-CI= 0,67 - 1,62

Fasst man alle Toxizitätsmerkmale zusammen, also Mukositis, Transaminasenanstieg, Hyperbilirubinämie, Leukozytopenie und Leukenzephalopathie, so ergibt sich eine bei Wildtyp und MTHFR-Mutationsträgern nahezu identische Häufigkeit. Entsprechend zeigt der p-Wert mit 0,651 mit Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%, dass kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Gesamttoxizität und MTHFR-Status besteht.

## ***HÄUFIGKEIT DER TOXIZITÄTEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM MTX-SPIEGEL***

### **Erhöhte MTX-Spiegel - Leukozytopenie**

Leukozyten	MTX-Spiegel erhöht n=19	%	MTX-Spiegel normal n=105	%
<2000/ $\mu$ l	12	63%	32	30%
> 2000/ $\mu$ l	7	37%	73	70%

p= 0,009    OR= 3,9    95%-CI= 1,4 -10,85

Bei 12 von 19 verabreichten MTX-Blöcken, die mit erhöhten MTX-Spiegeln einhergingen, trat infolge eine Leukozytopenie unter 2000 Leukozyten/ $\mu$ l auf. Nur bei 32 von 105 MTX-Blöcken, die ohne anschließende MTX-Spiegel-Erhöhung einhergingen, trat eine Leukozytopenie <2000/ $\mu$ l auf. Hier findet sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen erhöhten MTX-Spiegeln und dem Auftreten einer anschließenden Leukozytopenie.

### **Erhöhte MTX-Spiegel - Mukositis**

	MTX-Spiegel erhöht n=19	%	MTX-Spiegel normal n=105	%
Mukositis > 2°	9	47	11	10,5
Keine Mukositis oder 1°	10	53	94	89,5

p= 0,0004    OR= 7,7    95%-CI= 2,6 - 23

Bei 9 von 19 verabreichten MTX-Blöcken, die mit erhöhten MTX-Spiegeln einhergingen, trat infolge eine mindestens 2-gradige Mukositis auf. Nur bei 11

von 105 MTX-Blöcken, die ohne anschließende MTX-Spiegel-Erhöpfung einhergingen, trat eine solche Mukositis auf. Es findet sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen erhöhten MTX-Spiegeln und dem Auftreten einer anschließenden Mukositis.

### Erhöhte MTX-Spiegel - Bilirubin

MTX-Blöcke n=124	MTX-Spiegel erhöht n=19	%	MTX-Spiegel normal n= 105	%
Bilirubin erhöht auf min. 2fach	7	37	10	9,5
Bilirubin weniger erhöht	12	73	95	90,5

$p= 0,005$  OR= 5,5 95%-CI= 1,8 - 8,9

Bei 7 von 19 verabreichten MTX-Blöcken, die mit erhöhten MTX-Spiegeln einhergingen, trat infolge eine mindestens 2-gradige Bilirubinerhöhung auf. Nur bei 10 von 105 MTX-Blöcken, die ohne anschließende MTX-Spiegel-Erhöpfung einhergingen, trat eine solche Bilirubinerhöhung auf. Es findet sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen erhöhten MTX-Spiegeln und dem Auftreten einer anschließenden Hyperbilirubinämie.

### Erhöhte MTX-Spiegel - Transaminasen

MTX-Blöcke n=124	MTX-Spiegel erhöht n=19	%	MTX-Spiegel normal n= 105	%
AST/ALT erhöht, min. 2°	4	21	9	8,6
AST/ALT weniger erhöht	15	79	96	91,4

$p= 0,11$  OR= 2,8 95%-CI= 0,77 -10,4

Bei 4 von 19 verabreichten MTX-Blöcken, die mit erhöhten MTX-Spiegeln einhergingen, trat infolge eine mindestens 2.-gradige Transaminasenerhöhung auf. Nur bei 9 von 105 MTX-Blöcken, die ohne anschließende MTX-Spiegel-Erhöpfung einhergingen, trat eine solche Transaminasenerhöhung auf. Hierbei findet sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen erhöhten MTX-Spiegeln und dem Auftreten einer anschließenden Transaminasenerhöhung.

### Erhöhte MTX-Spiegel - Leukenzephalopathie

Pat. mit MRT n=23	MTX-Spiegel mind. 1x erhöht n=10	%	MTX-Spiegel normal n= 13	%
LEP	3	30	4	31
Keine LEP	7	70	9	69

p= 1, OR= 0,96 , 95%-CI= 0,16 - 5,8

Bei 3 von 10 mittels MRT nachuntersuchten Patienten, die mindestens einmal erhöhte MTX-Spiegel aufwiesen, zeigte sich im Verlauf eine Leukenzephalopathie. Bei 4 von 13 MR-tomographisch nachuntersuchten Patienten ohne MTX-Spiegel-Erhöpfung traten leukenzephalopathische Veränderungen auf. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen erhöhten MTX-Spiegeln und dem Auftreten einer Leukenzephalopathie findet sich nicht.

### MTX-Spiegel- MTHFR-Status

MTX-Blöcke N= 124	MTHFR C667 n=68	%	MTHFR-Wildtyp n=56	%
MTX-Spiegel erhöht	10	15	9	16
MTX-Spiegel normal	58	85	47	84

p= 1 OR= 0,9 95%-CI= 0,34 -2,34

Bei insgesamt 56 an MTHFR-Wildtyp-Patienten verabreichten MTX-Blöcken trat bei 9 eine Erhöhung der MTX-Spiegel auf. Bei den 68 an Mutationsträger verabreichten Blöcken trat 10 mal eine solche MTX-Spiegelerhöhung auf.

Zwischen den beiden Gruppen liegt kein signifikanter Unterschied vor. Erhöhte MTX-Spiegel traten in beiden Gruppen fast genau gleich häufig auf.

### LEP - Bestrahlung

Pat. mit MRT N=23	Radiatio n=7		Keine Radiatio n=16	
LEP	2		5	
Keine LEP	5		11	

$p= 1$ ,      OR= 0,88 ,      95%-CI= 0,13 - 6,2

Von den 23 mittels MRT nachuntersuchten Patienten waren 7 auch bestrahlt worden. 2 der Bestrahlten zeigten Zeichen einer LEP. 16 der MR-tomographisch nachuntersuchten Patienten waren nicht bestrahlt worden. Unter diesen fanden sich bei 5 Hinweise auf eine LEP. Es zeigt sich kein statistischer Zusammenhang zwischen LEP und Radiatio. Auch sind die beiden bestrahlten Patienten mit LEP Wildtypen für MTHFR.

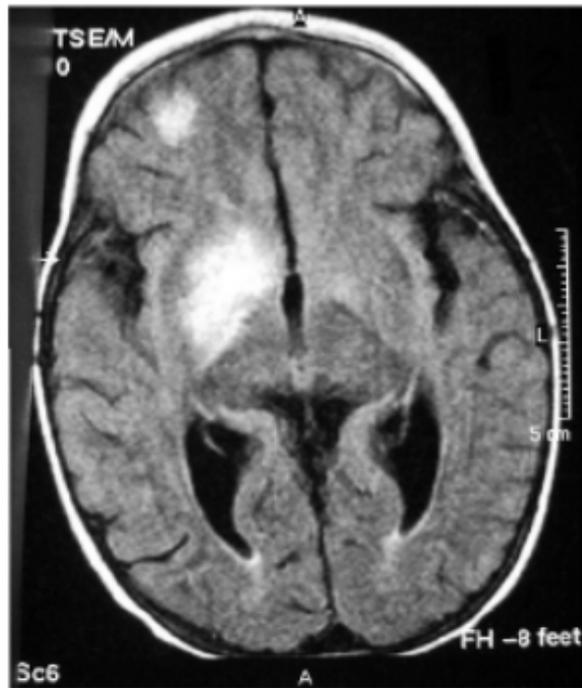
## ***KLINISCHE PRÄSENTATION UND MRTOMOGRAPHIE / MRSPEKTROSKOPIE***

### ***Patient 20 , R.N.***

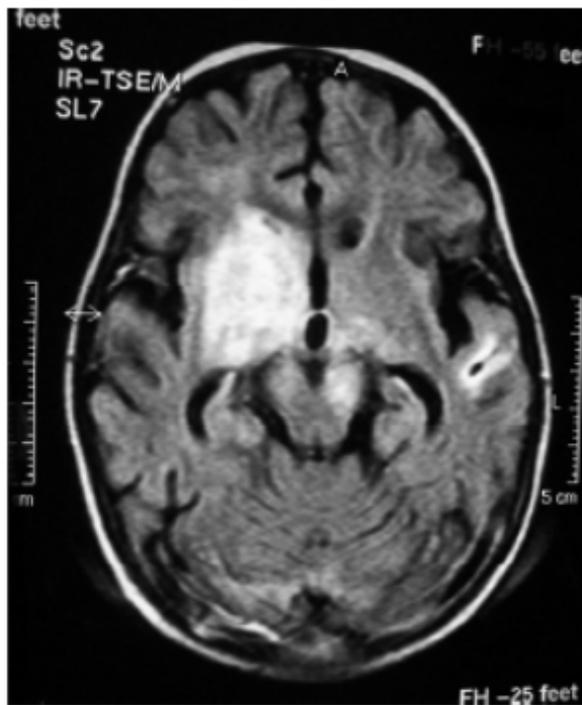
Im Alter von 2 Jahren 4 Monaten, ca. 10 Wochen nach der letzten hochdosierten intravenösen MTX-Gabe und 5 Tage nach der letzten intrathekalen MTX-Gabe fiel eine rasch zunehmende Parese von linker Gesichtshälfte, linkem Arm und Bein auf. Am Folgetag traten in zunehmender Häufigkeit auch dystone Bewegungsstörungen mit Zittern der Extremitäten, Zuckungen und tonischer Streckung von linkem Arm und Bein auf. Die Patientin war dabei wach, zeigte keine Aphasie aber fehlende Kopfkontrolle, eine linksseitige Abduzensparese und eine Schluckstörung. Im Verlauf der folgenden Wochen langsame Besserung der Dystonien sowie von Blickmotorik, Schlucken und Kopfkontrolle. Die Hemiparese links persistiert.

Im EEG fanden sich keine eindeutigen Krampfpotentiale. Vor Therapiebeginn zeigte sich ein unauffälliges craniales MRT.

Zu Beginn der neurologischen Symptomatik im MRT ausgeprägte Signalanhebungen im Bereich der rechten Stammganglien inklusive Kopf des Nucleus caudatus, rechts frontobasal kortikal, sowie rechts prä- und postzentral in kortikaler und subkortikaler Lokalisation. Linksseitig weniger deutliche Veränderungen im Temporallappen sowie im linken Hirnschenkel.



*Patient 20, MRT zu Beginn der neurologischen Symptomatik (FLAIR)*



*Patient 20, Verlauf nach 4 Wochen (FLAIR)*

Im Verlauf Zunahme insbesondere der Hyperintensitäten im Marklager des linken Crus cerebri bis in die linke Capsula interna. Die beschriebenen Veränderungen waren im T2-gewichteten und FLAIR-Bild hyperintens, T1-gewichtet hypointens und zeigen nach Kontrastmittel (KM)-Gabe eine diffuse Schrankenstörung. MR angiographisch waren die großen basalen cerebralen Arterien durchgängig. Keine Auffälligkeiten der großen venösen Blutleiter. Gegen eine Embolie sprach beidseitiger Befall, ein diffuser Befall kleiner Parenchymarterien erschien wahrscheinlich.

Im Verlauf nach 6 Monaten und einem Jahr deutliche Verkleinerung der hyperintensiven Areale in den rechten Basalganglien und der rechten Zentralregion sowie im linken Kapselknie und Hirnschenkel. Ein kleiner Substanzdefekt im rechten Linsenkern persistierte. Keine Kontrastmittelaufnahme mehr.



***Patient 20, Verlauf nach 2 Jahren (FLAIR)***

Nach 2 Jahren keine weitere wesentliche Rückbildung der Veränderungen mehr. Die Patientin wurde planmäßig nicht bestrahlt.

Die Patientin ist heterozygot für die MTHFR-C677T-Mutation und zeigte während der HD-MTX-Blöcke keine ausgeprägte Toxizität.

**Patient 12, K.M.**

Alter: 6 Jahre 11 Monate

Nach neurologisch unauffälligem Verlauf und unauffälliger initialer cranialer MRT zeigte der Patient einige Tage nach der letzten intrathekalen MTX-Gabe am Ende des Protokoll II eine passagere wenige Tage dauernde Hemiplegie rechts mit Aphasie. Sensibilitätsausfälle zeigten sich nicht und es kam spontan zur Restitutio ad integrum.

MR-tomographisch fanden sich bereits ca. 2 Wochen vor Auftreten klinischer Symptomatik unscharf umschriebene Signalanhebungen des supraventrikulären Marklagers sowie in Verlängerung der Vorder- und Hinterhörner in T2-gewichteten Aufnahmen als Hinweis auf eine beginnende LEP. Keine Schrankenstörung. Zum Zeitpunkt der Hemiplegie fanden sich periventrikuläre Signalabweichungen in der FLAIR-Sequenz. Keine Radiatio. Ca. 8 Jahre nach der neurologischen Symptomatik zeigte sich kein Nachweis einer fokalen Läsion in der FLAIR-Wichtung aber MR-spektroskopisch eine geringgradige Erhöhung von Cholin als Hinweis auf eine Schädigung der weißen Substanz bei regelrechter Konzentration des neuronalen Markers NAA.

Der Patient ist MTHFR-Wildtyp-Träger und zeigte keine ausgeprägte Schleimhaut-, Hämato-oder Hepatotoxizität während der HD-MTX-Blöcke.

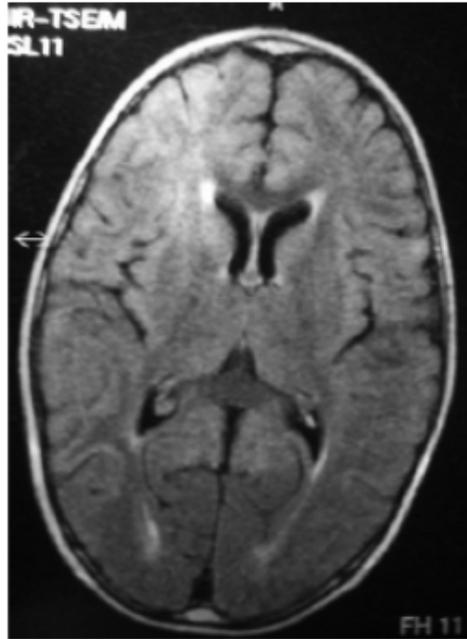
**Patient 10, G.P.**

Alter 3 Jahre

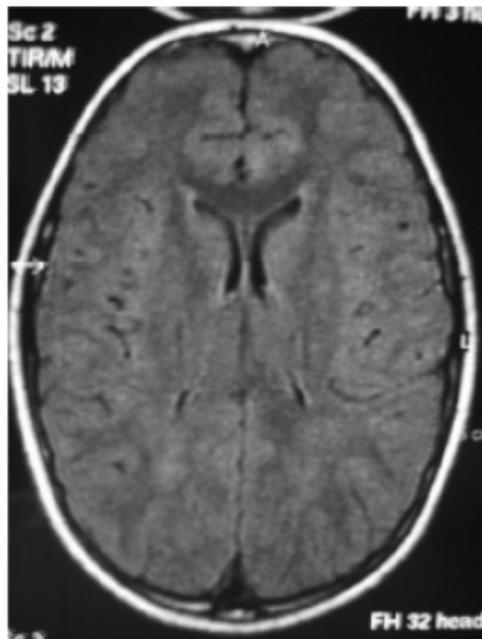
Der Patient zeigt während der gesamten Therapie und auch darüber hinaus keine neurologischen Auffälligkeiten. Die erste routinemäßige kraniale MRT erfolgte 3 Wochen nach Therapiebeginn, der Patient hatte also lediglich 2 Gaben intrathekalen Methotrexates erhalten, noch keine systemischen MTX-Gaben. Anamnestisch waren andere Ursachen einer zerebralen Schädigung nicht eruierbar. In den T2-gewichteten Aufnahmen zeigten sich bilateral Hyperintensitäten des occipitalen Marklagers, die bereits als wahrscheinlich therapiebedingt gewertet wurden. Keine Radiatio. 7 ½ Jahre später zeigt sich nahezu

ein Normbefund und eine unauffällige Spektroskopie.

Der Patient wies ebenfalls den MTHFR-Wildtyp auf und zeigte eine ausgeprägte Schleimhauttoxizität bei 3 von 4 HD-MTX-Blöcken, Hämatoxizität bei 2 von 4 HD-MTX-Blöcken.



***Patient 10, 3 Wochen nach Therapiebeginn und nur 2 Gaben MTX intrathekal (FLAIR)***



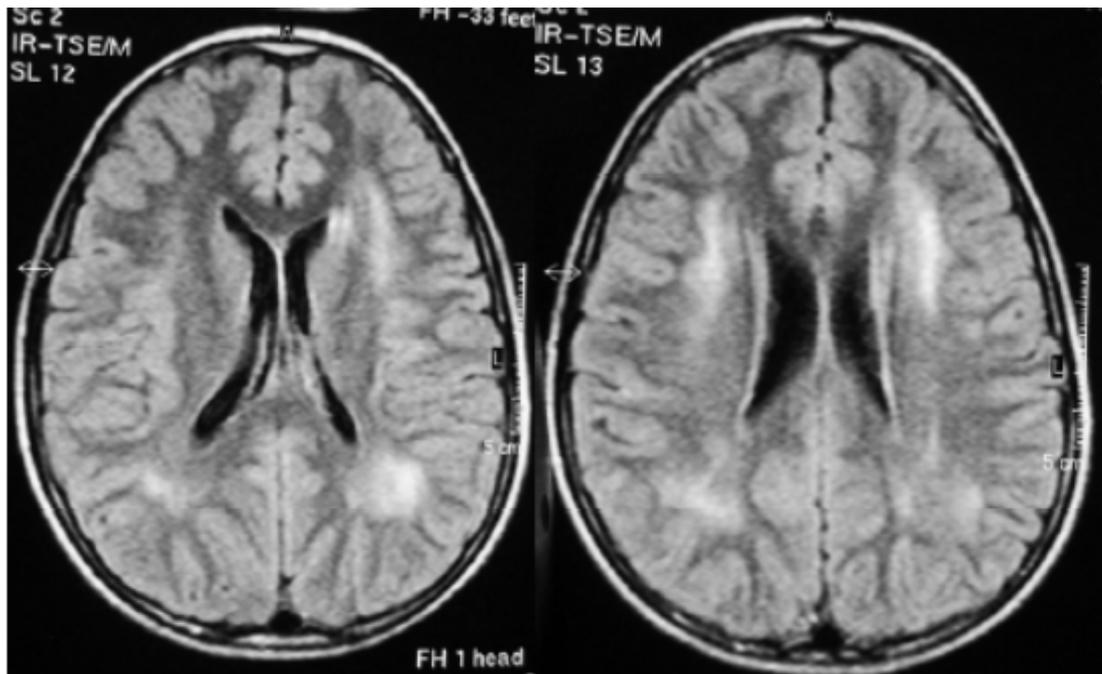
***Patient 10, Verlauf nach 7 Jahren (FLAIR)***

### ***Patient 11, G.M.***

Alter: 4 Jahre 10 Monate

Nach initial unauffälligem cranialem CT traten in Phase 2 von Protokoll II, also etwa 5 Wochen nach der letzten Hochdosis-MTX Therapie und einige Tage nach der letzten intrathekalen MTX-Gabe persistierende Kopfschmerzen auf. Ein erneutes CT zeigte diffuse Hypodensitäten des subkortikalen Marklagers in erster Linie einer medikamenteninduzierten LEP entsprechend. Keine Kontrastmittelaufnahme. Nach Ende der Chemotherapie erfolgte protokollgemäß die Bestrahlung des Schädels mit 12 Gy.

7 Jahre später zeigen sich beidseits im frontalen Marklager und im occipitalen Marklager links ausgeprägter als rechts T2-Hyperintensitäten. Keine Schrankenstörung.



### ***Patient 11, Verlauf nach 7 Jahren (FLAIR)***

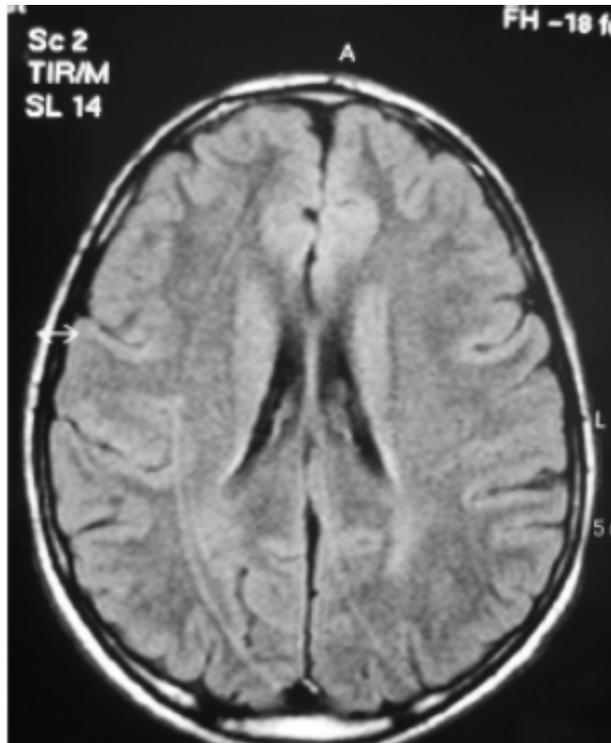
Der Patient zeigt Auffälligkeiten im Sinne eines Hyperaktivitäts-Aufmerksamkeits-Defizit-Syndroms (ADHS).

MTHFR-Wildtyp, ausgeprägte Schleimhauttoxizität bei 2 von 4 HD-MTX-Blöcken, Hämatoxizität bei 3 von 4 HD-MTX-Blöcken.

### ***Patient 5, D.A.***

Alter: 5 Jahre 1 Monat

Die Routine-MRT des Kopfes zeigte ca. 10 Jahre nach Therapiebeginn auf Höhe beider Hinterhörner eine leichte Hyperintensität in der T2- und FLAIR- Wichtung. Die Spektroskopie war unauffällig. Neurologische Symptomatik lag zu keinem Zeitpunkt vor.



### ***Patient 5, Verlauf nach 10 Jahren (FLAIR)***

MTHFR-Wildtyp, keine ausgeprägte Schleimhaut-, Hämato- oder Hepatotoxizität während der HD-MTX-Blöcke.

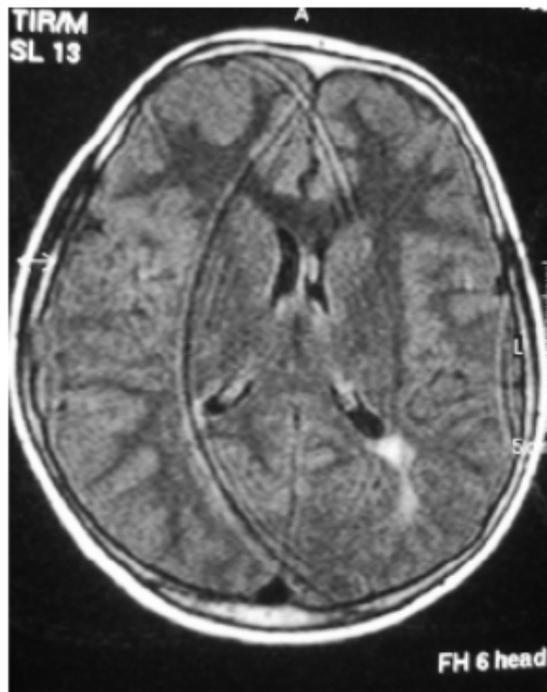
**Patient 8, F.H.**

Alter : 3 Jahre, 1 Monat

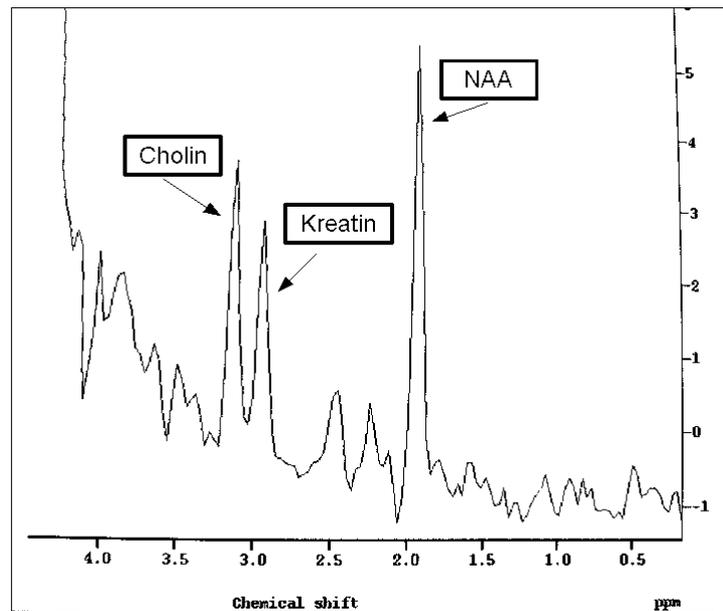
Ein Routine-MRT 9 Tage nach erstem HD-MTX zeigte in T2-FLAIR kortikal und subkortikal links occipital lokalisierte inhomogene Hyperintensitäten und fleckförmige Hyperintensitäten rechts occipital. Keine KM-Aufnahme. Weitere Hyperintensität im linken Marklager lateral angrenzend an den linken Thalamus. Keine neurologische Symptomatik.

**Patient 8, nach 1. HD-MTX (FLAIR)**

7 Jahre später zeigte sich noch die Hyperintensität im linken occipitalen Marklager, keine KM-Aufnahme. Spektroskopisch war der NAA / Kreatin-Quotient passend zu einer Leukenzephalopathie erniedrigt, der Cholin/Kreatin-Quotient erhöht. Weiterhin neurologisch unauffällig.



**Patient 8, Verlauf nach 7 Jahren (FLAIR)**



**Patient 8, Spektroskopie nach 7 Jahren**

MTHFR-heterozygot, ausgeprägte Schleimhauttoxizität bei 1 von 4 HD-MTX-Blöcken, Hämatotoxizität bei 3 von 4 HD-MTX-Blöcken, Bilirubinerhöhung bei 2 von 4 HD-MTX-Blöcken.

***Patient 26, Ü.T.***

Alter: 6 Jahre 9 Monate

Der einzige für die MTHFR-C677T-Mutation homozygote Patient zeigte bildmorphologisch keine Hinweise auf leukenzephalopathische Veränderungen, jedoch fand sich ca. 5 Wochen nach Therapiebeginn, also vor Beginn der Hochdosis-MTX-Therapie, aber nach 3 i.th. MTX- und v.a. 8 Asparaginase-Gaben im Routine-Verlaufs-MR eine asymptomatische Quersinusthrombose. Die kraniale MRT 8 Jahre später zeigte ein bildmorphologisch unauffälliges Hirnparenchym ohne Residuen der Sinusvenenthrombose, doch zeigte sich in der Spektroskopie eine erhöhte Cholin/Kreatin-Ratio bei normaler NAA/Kreatin-Ratio als Hinweis auf Leukenzephalopathie. Neurologische Auffälligkeiten bestanden nicht. Nach 1 von 4 HD-MTX-Blöcken hatte Hämatoxizität bestanden.

***MAGNETRESONANZTOMOGRAPHIE***

Bei allen Patienten mit zerebralen Auffälligkeiten lagen Veränderungen der weißen Substanz im Marklager und meist periventrikulär mit Hyperintensitäten in der FLAIR-Wichtung vor. Auch kortikale und subkortikale Veränderungen traten auf. Bei der am schwersten betroffenen Patientin waren auch die Basalganglien betroffen und die Läsionen zeigten initial eine Kontrastmittelaufnahme.

***SPEKTROSKOPIE***

Von 18 Patienten wurde eine Langechospektroskopie angefertigt. Bei 3 fand sich ein auffälliger Befund. Bei 2 Patienten ein erhöhter Cholin/Kreatin Quotient, bei einem außerdem ein erniedrigter NAA/Kreatin-Quotient.

Bei 2 dieser 3 Patienten lagen auch bildmorphologische Veränderungen mit hyperintensiven Marklagerläsionen vor, bei einer Patientin war der bildmorphologische Befund eine LEP betreffend immer unauffällig, allerdings hatte sie in Protokoll I eine asymptomatische Sinusvenenthrombose entwickelt.

## DISKUSSION

Seit den Arbeiten von Goyette et al. (Goyette *et al.* 1998; Goyette *et al.* 1994), die über Isolierung der cDNA und die Lokalisation des MTHFR-Gens auf Chromosom 1p36.3 schließlich zur Aufklärung der Genstruktur 1998 führten, war die Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) und ihr Gen Gegenstand intensiver Forschung. So fand allein Martin (Goyette *et al.* 1994; Martin *et al.* 2006) 65 Polymorphismen des Gens, wovon sich 11 als nicht synonyme SNP's (single nucleotide polymorphisms) herausstellten, also mit einer veränderten Aminosäurefolge im Protein einhergingen. 1995 beschrieben Frosst et al. (Frosst *et al.*) die C677T Mutation im MTHFR-Gen und bestimmten die Allelfrequenz in einer französisch-kanadischen Population auf 38%. Auch die infolge bestimmten Häufigkeiten entsprechen den bei uns bestimmten. Wilcken (Wilcken *et al.* 2003) fand bei Neugeborenen in den Niederlanden und Frankreich Heterozygotenfrequenzen von 42 bzw. 48 % und Homozygotie für MTHFR-C677T bei 6,4 bzw. 11,8 % bei einer Allelfrequenz von 27,4 bzw. 35,7. Auch die Frequenzen der weißen US-amerikanischen Bevölkerung (Atlanta) passen mit einer Heterozygotenfrequenz von 42% bei 11% Homozygoten für die MTHFR C677T-Mutation und einer T-Allelfrequenz von 31,7% zu unseren Daten (Wilcken *et al.* 2003). In einer britischen Population bestand eine T-Allelfrequenz von ca. 30% mit 7,4% Homozygotie und 44,7% Heterozygoten (Schneider JA 1998). Schnakenberg (Schnakenberg *et al.* 2005) fand in seiner Studie in der Kontrollgruppe in Deutschland ansässiger Personen kaukasischer Abstammung eine Häufigkeit der CT-Variante (Heterozygote) von 40% bei 11% TT-Homozygoten, Thirumaran (Thirumaran *et al.* 2005) 47 % bzw. 11,5 % bei 41,5 % Wildtyp-Homozygoten in einer Kontrollgruppe von 1472 Personen.

Die Anzahl der bei den oben genannten Studien untersuchten Personen lag mit 94 – 1472 deutlich über der des eigenen Patientengutes, so dass bei Übereinstimmung der Genotypfrequenzen mit unseren Daten eine in etwa der Normal-

bevölkerung entsprechende Verteilung bei den durch uns untersuchten Patienten angenommen werden darf.

Außerdem zeigte sich eine dem Hardy-Weinberg-Gesetz entsprechende Verteilung der Genotypen, so dass auch nach populationsgenetischen Gesichtspunkten kein Hinweis auf eine die MTHFR-Mutation betreffende Selektion vorliegt. Die in unserer Untersuchung gefundene Häufigkeit der MTHFR-C677T-Variante entsprach also den bei der Normalbevölkerung aus Mitteleuropa und Deutschland sowie bei weißen US-Amerikanern bekannten Verteilungen.

Weiterhin bestand zwischen einer 1472 Personen umfassenden deutschen Kontrollgruppe (Thirumaran *et al.* 2005) und unseren an ALL-Patienten bestimmten Häufigkeiten für die C677T-MTHFR-Genotypen kein statistisch signifikanter Unterschied, passend zu den Daten von Gast (Gast *et al.* 2007) und Thirumaran (Thirumaran *et al.* 2005) und der Metaanalyse von Pereira (Pereira *et al.* 2006), die ebenfalls gleiche Häufigkeiten bei pädiatrischen ALL-Patienten und einer Kontrollgruppe fanden. Die Mutation kam also bei unseren pädiatrischen ALL-Patienten nicht gehäuft vor, so dass die Daten von Seidemann (Seidemann *et al.* 2006), die bei pädiatrischen lymphoblastischen NHL -einer in klinischer, immunologischer und pathologischer Hinsicht der ALL sehr ähnlichen Erkrankung- eine erhöhte Frequenz gefunden hatte und hieraus eine mögliche Rolle in der Pathogenese der Erkrankung folgerte, nicht nachvollzogen werden können.

Andere Berichte, die aufgrund eines geringeren Vorkommens der C677T-MTHFR-Mutation bei pädiatrischen ALL-Patienten (Chatzidakis *et al.* 2006; Franco *et al.* 2001; Skibola *et al.* 1999; Wiemels *et al.* 2001) einen protektiven Effekt der C677T-MTHFR-Mutation vermuteten, konnten wir ebenso nicht bestätigen.

## **SCHLEIMHAUT-, LEBER- UND HÄMATOTOXIZITÄT**

Shimasaki berichtet in seiner Studie (Shimasaki *et al.* 2006) an pädiatrischen ALL-Patienten, die ähnlich wie unsere mit HD-MTX ( allerdings nur  $3\text{g}/\text{m}^2$ ) behandelt wurden, über Auftreten von Mukositis  $>2^\circ$  in 9% der MTX-Blöcke, über Erhöhung der Transaminasen mindestens auf das 2,6fache der Altersnorm in 33% und in 51 % über mindestens 3.-gradige Hämatotoxizität.

Auch bei unseren Patienten trat Hämatotoxizität mit 35% am häufigsten auf, jedoch kam es mit 12% deutlich seltener zu Transaminasenerhöhungen. Mukositis fand sich bei uns mit 16% wesentlich häufiger.

Imanishi (Imanishi *et al.* 2007) fand in seiner Untersuchung bei pädiatrischen ALL- und NHL-Patienten bei homozygoten Trägern der C677T-MTHFR-Mutation statistisch signifikant höhere MTX-Spiegel. In unserer Untersuchung traten MTX-Spiegel-Erhöhungen gleich häufig bei Wildtyp und C677T-MTHFR-Mutationsträgern auf, so dass wir seine Folgerung, der C677T-Polymorphismus sei für die MTX-Elimination relevant, nicht nachvollziehen können.

## **SCHLEIMHAUT-, LEBER-, HÄMATOTOXIZITÄT UND ASSOZIATION ZUR MTHFR-C677T-MUTATION**

Standen zunächst Verschlusskrankheiten kardialer, cerebraler und peripherer Arterien und Thromboseneigung (Frosst *et al.* 1995; Kang *et al.* 1993; Kelly *et al.* 2002; Kluijtmans *et al.* 1996; Morita *et al.* 1997) aufgrund der vor allem bei TT-Homozygoten auftretenden Hyperhomozysteinämie im Vordergrund der klinischen Forschung, so zeigte van der Put (van der Put *et al.* 2001) 1995 die Relevanz der C677T-Mutation für Neuralrohrdefekte, andere auch für weitere angeborene Fehlbildungen (Finnell *et al.* 1998) und Schwangerschaftskomplikationen (Ray & Laskin 1999).

In der Folge wurde bei einer Vielzahl von Erkrankungen nach Zusammenhängen mit MTHFR-Polymorphismen gesucht, unter anderem auch bei Krebserkrankungen und auch hierbei eine Vielzahl von Assoziationen beschrieben (Ueland *et al.* 2001).

Toffoli (Toffoli *et al.* 2000) berichtete 2000 erstmals über die erhöhte Toxizität eines Regimes aus Cyclophosphamid, 5-Fluouracil (5-FU) und MTX zur Therapie von Mamma-Karzinomen bei bestimmten Patientinnen.

Es war aufgefallen, dass bei manchen Patientinnen eine Grad-4-Toxizität bereits früh im Therapieverlauf auftrat und es bei der Mutter einer der Patientinnen zu ähnlichen Nebenwirkungen bereits im Rahmen einer Chemotherapie wegen eines Magenkarzinoms gekommen war. Auch die Mutter war unter anderem mit MTX und 5-FU behandelt worden. Bei der molekulargenetischen Untersuchung der Patientin und ihrer Mutter fand man die MTHFR-C677T Mutation und untersuchte infolge auch andere Patientinnen mit ausgeprägter Toxizität und fand bei 5 von 6 Patientinnen die gleiche Mutation. Bei den übrigen Patientinnen fand sich eine den lokalen Verhältnissen entsprechende Verteilung der Mutation. Ulrich (Ulrich *et al.* 2001) beschrieb 2001 ausgeprägtere MTX-induzierte Mukositis und länger anhaltende Thrombozytopenie bei niedrig dosierter MTX-Gabe nach allogener Knochenmarktransplantation bei CML-Patienten mit homozygoter MTHFR-C677T Mutation. Ähnliche Ergebnisse erhielt Kim (Kim *et al.* 2007).

2002 zeigte Taub *in vitro* an Lymphoblasten 6 pädiatrischer ALL-Patienten eine höhere MTX-Empfindlichkeit der Blasten mit TT-Genotyp (Taub *et al.* 2002). De Jonge konnte das 2005 an Lymphoblasten einer größeren Population pädiatrischer ALL-Patienten nicht statistisch signifikant nachvollziehen, verwies aber ebenfalls auf einen Trend zu mehr Toxizität bei homozygoter C677T MTHFR-Mutation (de Jonge *et al.* 2005). De Jonge verwendete Nährmedien mit hoher Folsäurekonzentration, was er als Begründung für einen möglicherweise abgeschwächten Effekt der Mutation anführte.

Ebenfalls 2002 berichtete Chiusolo (Chiusolo *et al.* 2002) erstmals über stärkere unerwünschte Wirkungen bei Kindern mit ALL, die sich in der Erhaltungstherapie befanden und MTX in einer niedrigen Dosierung von 15 –30 mg/m<sup>2</sup>/

Woche ohne Folinsäuresubstitution erhielten. 2007 bestätigte sie diese Ergebnisse bei Erwachsenen mit ALL (Chiusolo *et al.* 2007).

Untersuchungen von Aplenc (Aplenc *et al.* 2005) und Costea (Costea *et al.* 2006) wiesen in ähnlichen Patientengruppen mit ähnlicher Therapie keine Unterschiede zwischen den Toxizitäten bei Patienten mit MTHFR-Wildtyp und C677T-Mutation nach.

Die antirheumatische Therapie mit MTX in vergleichbar niedriger Dosierung zeigte bei verschiedenen Untersuchern mehr Nebenwirkungen beim Vorliegen der MTHFR C677T Mutation in hetero- oder homozygoter Ausprägung (Schmeling 2005; Urano *et al.* 2002) sofern keine Folinsäure gegeben wurde. Wurde Folinsäure verabreicht fand sich kein Unterschied (Aggarwal *et al.* 2006; Hughes *et al.* 2006).

Wurde mit Hochdosis-MTX-Protokollen und der notwendigen anschließenden Folinsäure-Rescue behandelt zeigte Gemmati (Gemmati *et al.* 2007) bei Erwachsenen mit hochmalignen Non-Hodgkin-Lymphomen vermehrte Toxizität bei Mutationsträgern, Chatzidakis (Chatzidakis *et al.* 2006) bei pädiatrischen ALL-Patienten lediglich eine verstärkte Hepatotoxizität beim TT-Genotyp, während die Hämatotoxizität beim CC-Genotyp ausgeprägter war.

Seidemann (Seidemann *et al.* 2006), Shimasaki (Shimasaki *et al.* 2006) und Imanishi (Imanishi *et al.* 2007) konnten bei **Hochdosis-MTX**-Protokollen mit Folinsäure-Rescue bei pädiatrischen ALL- und NHL-Patienten keine ausgeprägteren Nebenwirkungen bei Mutationsträgern (MTHFR-C677T) finden.

Die genannten Untersuchungen bewerteten zur Beurteilung der MTX-Toxizität lediglich hämatologische Parameter, Leberwerte, Infektion oder Mukositis.

Kishi (Kishi *et al.* 2003) erweiterte das Spektrum um neurotoxische Nebenwirkungen der Therapie mit MTX wie Krampfanfälle und fand keinen Zusammenhang mit erhöhten Homozysteinwerten oder der C677T-MTHFR-Mutation. 2005 untersuchte Linnebank (Linnebank *et al.* 2005) Erwachsene mit primären ZNS-Lymphomen und HD-MTX-Therapie bezüglich Risikofaktoren für das Auftreten einer Leukencephalopathie. Hierbei erhöhte neben dem Alter ein gestörter Methionin-Stoffwechsel, u.a. durch die Kombination aus MTHFR-C677T-Mutation mit anderen Faktoren das Risiko. Krajinovic (Krajinovic *et al.* 2005) unter-

suchte als Maß möglicher Langzeittoxizität den Intelligenzquotienten nach ALL-Therapie und fand keine Unterschiede im Zusammenhang mit der C677T-MTHFR-Mutation.

Somit lagen aus der Literatur zahlreiche Untersuchungen über MTX-Therapie bei MTHFR-C677T-Mutationsträgern und das Auftreten unterschiedlicher Zeichen von MTX-Toxizität vor.

Die Ergebnisse sind jedoch widersprüchlich und der Zusammenhang zwischen dem Auftreten von leukenzephalopathischen Veränderungen bei Hochdosis-MTX-Therapie und dann niedrig dosierte MTX-Dauertherapie mit dem Vorliegen einer C677T-Mutation im MTHFR-Gen wurde bei pädiatrischen ALL-Patienten bisher unseres Wissens bis auf Einzelfallbeschreibungen (Strunk *et al.* 2003) nicht untersucht.

Fand sich in der Literatur eine signifikant vermehrte Toxizität des MTX bei C677T mutierter MTHFR so waren meist Therapieregime betroffen, die MTX nur in niedriger Dosierung verabreichten und keine Folsäure verwendeten. Solche Regime führen zu einem mehrere Tage oder Wochen dauerndem Anstieg des Homozysteins (Broxson *et al.* 1989; Kishi *et al.* 2003; Refsum *et al.* 1986; Refsum *et al.* 1991).

Es ist jedoch bekannt, dass die verminderte MTHFR-Funktion aufgrund der C677T-Mutation nur bei relativem Folatmangel relevant wird bzw. durch ausreichende Folsäuresubstitution auszugleichen ist (Castro *et al.* 2004; Frosst *et al.* 1995; Guttormsen *et al.* 2001; Jacques *et al.* 1996; Malinow *et al.* 1997). Ein solcher Ausgleich findet, anhand der Homozysteinspiegel ablesbar, bei der HD-MTX-Therapie statt. Kishi (Kishi *et al.* 2003) und Sterba (Sterba *et al.* 2006) zeigten bei pädiatrischen ALL-Patienten und Refsum (Refsum *et al.* 1991) bereits 1991 bei Erwachsenen, dass die Homozysteinspiegel zwar unter der hochdosierten MTX-Gabe passager ansteigen, sich aber durch die Folsäuregabe rasch normalisieren. Effekte einer ausgeprägteren Hyperhomozysteinämie sollten erst nach Tagen oder Wochen ohne Folsäuresubstitution zu erwarten sein (Kishi *et al.* 2003), so dass der regelmäßige Folsäure-Rescue aus den unterschiedlichen MTHFR-Genotypen resultierende Unterschiede verwischen könnte.

Somit erscheinen die diskrepanten Befunde zumindest zum Teil durch einen unterschiedlichen Folsäurestatus, zum Beispiel aufgrund unterschiedlicher Substitutionsregime erklärbar. Bei Untersuchungen von Therapieformen, die keine Folate substituierten- wie in der ALL-Erhaltungstherapie, der Behandlung oder Prophylaxe einer GvHD oder z.T. in der Rheumatherapie, war ein Effekt der C677T-MTHFR-Mutation erkennbar, wurde die insuffiziente MTHFR- Aktivität aber durch vermehrte Zufuhr von Folinsäure -wie nach der Hochdosis-MTX-Therapie lebensnotwendig- ausgeglichen, waren mögliche Effekte, wie z.B. eine erhöhte Toxizität nicht mehr nachweisbar.

In unserer Untersuchung betrachteten wir die Akuttoxizität nach den Hochdosis-MTX-Blöcken in Form von Schleimhaut-, Hämato- und Hepatotoxizität in Bezug auf den C677T-MTHFR-Status der Patienten. Die Patienten erhielten sämtlich Folinsäure ab Stunde 42 nach MTX-Beginn, so dass jeweils nur kurze Phasen erhöhter Homozysteinspiegel aufgetreten sein sollten. Eine Bestimmung der Homozysteinspiegel erfolgte jedoch nicht.

Innerhalb dieses Therapieregimes fanden wir weder für die Schleimhaut- noch für die Hämato-oder Hepatotoxizität signifikante Unterschied zwischen C677T-MTHFR-Wildtyp und Mutation. Damit konnten wir die Ergebnisse der meisten Untersucher, die ähnliche Patientengruppen und Therapieregime (intrathekale und Hochdosis-MTX und Folinsäure-Rescue) untersucht haben, bestätigen.

Neben den verschiedenen MTX- und Folinsäureregimen bei z.T unterschiedlichen Erkrankungen kommen als Grund für die unter vielen Untersuchern diskrepanten Ergebnisse (Chiusolo *et al.* 2002; Gemmati *et al.* 2007; Lee *et al.* 2007; Schmelting 2005; Taub *et al.* 2002; Toffoli *et al.* 2000; Ulrich *et al.* 2001; Urano *et al.* 2002) insbesondere mögliche Unterschiede in vielen anderen die Folsäure-Homöostase beeinflussenden Faktoren in Frage. Neben Alkohol- und Nikotingenuss oder Komorbidität wie Niereninsuffizienz (Bostom & Culleton 1999) oder Hypothyreose (Nedrebo *et al.* 1998), die in der untersuchten Gruppe pädiatrischer ALL-Patienten eher eine untergeordnete Rolle spielen sollten, könnte eine Komedikation mit Antiepileptika oder Folsäureantagonisten wie Trimethoprim (Smulders *et al.* 1998; Ueland *et al.* 2001) für den Folsäurehaushalt und die Homozysteinspiegel relevant

sein. Trimethoprim wird bei Immunsuppression routinemäßig zur *Pneumocystis carinii*-Prophylaxe an 3 Tagen der Woche verabreicht und sollte, um eine zusätzliche Folsäuredepletion zu vermeiden, in möglichst großem zeitlichen Abstand zum MTX eingenommen werden. In unserer Studie wurde dieses Vorgehen bei allen Patienten in gleicher Art und Weise durchgeführt, inwieweit das Vorgehen anderer Untersucher hiervon abweicht, ist aus der Literatur nicht zu ersehen. Ebenso ist nicht erkennbar in welchem Maße mit dem Folsäurehaushalt interagierende Antikonvulsiva eingenommen wurden.

Die Verstoffwechslung von Medikamenten wird oft nicht monogenetisch sondern eher polygenetisch vererbt. Der Phänotyp einer Medikamentenwirkung resultiert dann aus einer Summe unterschiedlicher genetischer Anteile, die als Einzelne nur geringe Penetranz besitzen. Dieser polygenetische Ansatz passt gut auf die Gruppe der Antimetaboliten, da die regelrechte Funktion des Folsäure-Purin-Pyrimidin-Stoffwechsels vital für das Überleben der Zelle ist und somit insbesondere bei Schlüsselenzymen nur solche Mutationen eine Chance haben vererbt zu werden, die lediglich geringe Veränderungen bewirken. Phänotypisch wirksam werden könnten Mutationen dann, wenn sich Effekte gleichsinnig aufaddieren (Dervieux *et al.* 2005).

Somit stellen, neben den o.g. im weiteren Sinne Umwelteinflüssen, die bei den Untersuchten unbekanntes bzw. nicht untersuchten angeborenen Varianten anderer Enzyme oder deren Promotoren (Dulucq *et al.* 2008) mit Einfluss auf den Folsäurezyklus mögliche Modulatoren der Wirksamkeit und Toxizität von Folsäureantagonisten dar.

Einige der infrage kommenden Enzyme sind:

- MTR: 5-Methyltetrahydrofolat-Homozystein-Methyltransferase  
= Methionin -Synthetase
- TS: Thymidylat-Synthetase
- DHFR: Dihydrofolat-Reduktase
- DHFR-Promotor (Dulucq *et al.* 2008)

- MTHFD: 5,10-Methylen-Tetrahydrofolat-Dehydrogenase
- SHMT: Serin-Hydroxy-Methyltransferase
- TYMS: Thymidylat-Synthetase
- MTRR: 5-Methylentetrahydrofolat-Homozystein-Methyltransferase-Reductase = Methionin-Synthase-Reductase
- AICART: Aminoimidazol-Carboxamid-Ribonucleotid-Transformylase
- und der RFC: reduced folate carrier

(Dervieux *et al.* 2005; Dervieux *et al.* 2006; Dulucq *et al.* 2008; Gast *et al.* 2007; Gemmati *et al.* 2004; Kredich & Hershfield 1980; Kremer 2004; Matsuo *et al.* 2001; Pierik *et al.* 2006; Sharp & Little 2004; Skibola *et al.* 2004; Weisman *et al.* 2006)

Letztendlich bleibt auch die möglicherweise unterschiedliche Folataufnahme mit der normalen Nahrung oder speziell angereicherten Lebensmitteln oder Vitaminpräparaten als Ursache unterschiedlicher Ergebnisse möglich, da, wie auch bei uns, in den vorliegenden Studien keine Daten über Ernährung oder Folsäurestatus erhoben wurden.

## ***LEUKENZEPHALOPATHIE UND ASSOZIATION ZUR MTHFR-C677T-MUTATION***

Die Leukenzephalopathie als Spättoxizität wurde zwar i.d.R erst nach der anschließenden niedrig dosierten MTX-Dauertherapie beurteilt, doch muß sie wesentlich auf die Hochdosis- und intrathekale MTX-Therapie zurückgeführt werden (Haykin *et al.* 2006; Shuper *et al.* 2002). Leukenzephalopathische Veränderungen nach alleiniger niedrig dosierter, nicht-intrathekaler MTX-Therapie sind nicht beschrieben (Inaba *et al.* 2008). Dennoch ist nicht auszuschließen, dass sich die leukenzephalopathischen Veränderungen als Folge einer Kumulativtoxizität des intrathekalen und Hochdosis-MTX sowie der niedrigdosierten Erhaltungstherapie ohne Folsäuresubstitution und der übrigen protokollgemäßen Chemotherapeutika ergeben -ohne die anschließende Erhaltungstherapie die Veränderun-

gen also weniger ausgeprägt oder schneller wieder zurückgebildet sein könnten.

Geht man also davon aus, dass in Phasen mit regelmäßiger hochdosierter Folsäuregabe, wie der HD-MTX-Therapie, die verminderte Aktivität der C677T-MTHFR zumindest zum Teil ausgeglichen wird und deshalb keine statistisch signifikant vermehrte Toxizität der Chemotherapie auftritt, so könnte die Aktivitätsminderung in den folgenden Therapiephasen ohne Folsäuresubstitution wieder zum tragen kommen und als vermehrte Kumulativtoxizität in Form leukenzephalopathischer Veränderungen erkennbar werden.

Insofern hat unsere Untersuchung den Vorteil neben der akuten Toxizität nach den Hochdosis-MTX-Blöcken auch eine mögliche vermehrte Spättoxizität in Form der Leukenzephalopathie zu untersuchen.

In unserem Patientenkollektiv zeigte sich, wenn auch aufgrund der kleinen Fallzahl nicht repräsentativ, die weite Bandbreite der leukenzephalopathischen Symptomatik nach ALL-Therapie: passagere und persistierende Hemiparese, orofaciale Symptome, Aphasie, Athetose, chronisch kognitive Störung bei ADHS und asymptomatischer Verlauf.

Von den 23 mit MRT nachuntersuchten Patienten fanden sich bei 7 (30%) leukenzephalopathische Veränderungen in MRT oder Spektroskopie, 4 von diesen zeigten keine offensichtliche neurologische oder neuropsychiatrische Symptomatik. Die zerebralen Veränderungen verliefen also bei mehr als der Hälfte der Patienten subklinisch. Von den 16 nicht bestrahlten Patienten zeigten 5 Hinweise auf eine LEP. Von den 7 zusätzlich Bestrahlten zeigten 2 leukenzephalopathische Veränderungen.

Dies sind kleine Fallzahlen doch passen sie zu den literaturgängigen Angaben, wonach lt. einer Metaanalyse von Reddick (Reddick & al. 2005) nach Therapieende 5-53% aller nicht bestrahlten Patienten leukenzephalopathische Veränderungen aufweisen. Eine neuere an Kindern durchgeführte Studie von Ziareisen (Ziareisen *et al.* 2006) fand bei ca 17% der nicht bestrahlten Kinder MR-tomographisch eine LEP, 60% davon waren asymptomatisch. Langer konnte am Patientengut der ALL-BFM Studie nur bei 1 von 39 (2,5%) ohne Radiothe-

rapie behandelten Patienten nach im Mittel 7 Jahren noch Zeichen einer LEP finden, hingegen bei 25% falls zusätzlich zur HD-MTX-Therapie auch eine kraniale Bestrahlung erfolgt war (Langer *et al.* 1998). Da in unserem Kollektiv nicht von allen infrage kommenden Patienten MRT-Untersuchungen im Verlauf angefertigt wurden, aber alle symptomatischen Patienten in die Untersuchung ein gingen, ist bei uns tendenziell von einer zu hoch bestimmten Häufigkeit auszugehen.

**Die akute Form** der Neurotoxizität, mit Beginn der Symptomatik innerhalb weniger Stunden bis maximal 2 Tage nach MTX-Gabe, tritt in 5-40% aller Patienten auf, falls auch bestrahlt wurde, sonst wird die Häufigkeit akuter LEP mit klinischer Symptomatik mit 3-15% angegeben (Atra *et al.* 2004; Bleyer 1981; Mahoney *et al.* 1998; Rubnitz *et al.* 1998).

Typische akute Formen neurotoxischer Symptomatik sahen wir nicht.

Bei 2 Patienten traten **subakut** also wenige Tage bis Wochen nach hochdosierter und intrathekaler MTX-Gabe neurologische Veränderungen auf. Beide zeigten eine Hemiparese, die beim einen passager mit Aphasie verlief, bei der anderen Patientin persistierte. Solche „stroke-like syndromes“ sind typisch für die subakute Verlaufsform und in der Regel kommt es nach 48-72 Stunden zur kompletten Rückbildung der Symptomatik. Die Häufigkeit wird mit 4-15% der Patienten angegeben (Packer *et al.* 1983; Vezmar *et al.* 2003; Walker *et al.* 1986; Yim *et al.* 1991).

Auch die ausgeprägte Symptomatik unserer am schwersten und persistierend betroffenen Patientin, die neben der Hemiparese eine orofaciale Symptomatik und eine Choreoathetose bei Stammganglienbeteiligung zeigte, findet sich in der Literatur nahezu identisch wieder (Inaba *et al.* 2008).

Aufmerksamkeitsstörungen als **chronische Neurotoxizität** von MTX und Bestrahlung wie bei Patient G.M. sind ebenfalls typische Folgen der ALL-Therapie (Brouwers *et al.* 1985; Cousens *et al.* 1988; Langer *et al.* 1998) .

Auch der **subklinische Verlauf** wie bei 4 unserer Patienten findet sich regelmäßig bei Patienten mit HD-MTX-Therapie (Oka *et al.* 2003; Shuper *et al.* 2002).

Sofern eine MRT-Verlaufsbeurteilung erfolgte, waren die Veränderungen bei allen Patienten, wie von Reddick beschrieben, nach Jahren deutlich rückläufig

(Reddick & al. 2005).

Traten MR-tomographisch faßbare morphologische Veränderungen auf, so zeigten sich Hyperintensitäten an typischen Lokalisationen im periventrikulären Marklager aber auch im frontalen oder occipitalen Marklager. Bei zwei Patienten fanden sich auch kortikale und subkortikale Signalanhebungen. Bei einer Patientin mit bleibenden neurologischen Ausfällen waren auch die Stammganglien und die Capsula interna betroffen. Diese Lokalisationen stimmen mit Literaturbeschreibungen bei Shuper, Fisher, Inaba oder Oka überein (Fisher *et al.* 2005; Inaba *et al.* 2008; Oka *et al.* 2003; Shuper *et al.* 2002).

MR-Spektroskopisch auffällige Befunde wurden bei 3 von 18 mittels Langechospektroskopie Untersuchten erhoben. Wie Chu fanden wir erhöhte Cholin/Kreatin-Quotienten, einmalig auch einen erniedrigten NAA/Kreatin Quotienten. Bei einer Patientin fanden sich nur spektroskopische aber keine morphologische Veränderungen, auch das in der Literatur vorbeschrieben (Chu *et al.* 2003).

Sowohl die geringe Fallzahl als auch die geringe Zahl von homozygoten MTHFR C677T-Patienten und die zum Teil retrospektive Datenerhebung limitiert die Aussagekraft der vorliegenden Untersuchung, doch stimmen die Ergebnisse mit bereits veröffentlichten Daten, soweit vorhanden, überein. Der Zusammenhang zwischen Leukenzephalopathie nach MTX-Therapie und MTHFR C677T-Mutation wurde bisher nicht systematisch untersucht, der mangelnde Einfluss der Mutation passt jedoch gut in das Gesamtbild wonach Mutationsträger, die mit Hochdosis-MTX-Protokollen und anschließender Folinsäurerescue behandelt werden, keine vermehrten Toxizitätszeichen aufweisen.

Aufgrund des unklaren Zusammenhangs zwischen leukenzephalopathischen Veränderungen und klinischer Symptomatik erscheint eine anhaltende Nachsorge der Patienten und insbesondere eine testpsychologische Untersuchung auf subtile kognitive Defizite, wie sie in einer zweiten Untersuchung durchgeführt wird, notwendig.

## ZUSAMMENFASSUNG

Unsere Untersuchung zeigt, dass leukenzephalopathische Veränderungen nach Gabe von MTX zur Therapie einer ALL bei Vorliegen der MTHFR-C677T-Mutation nicht häufiger auftreten als beim MTHFR-Wildtyp.

Eine systematische Untersuchung dieses Zusammenhangs lag bisher nicht vor. Somit ist die Bestimmung des MTHFR-Status zur Aufdeckung eines erhöhten Leukenzephalopathierisikos oder eine Dosisreduktion zur Vermeidung zusätzlicher MTX-Toxizität nach heutigem Stand nicht sinnvoll.

Wir fanden, dass unter der hochdosierten und intrathekalen MTX-Therapie neben offensichtlichen neurologischen Ausfällen auch Marklagerveränderungen auftreten können, die nicht zu klinischen Symptomen führen. Inwieweit solche Veränderungen dennoch zu mit subtileren Testungen detektierbaren kognitiven Defiziten oder langfristigen Problemen führen ist bisher noch unklar, wird aber in einer parallel durchgeführten Arbeit untersucht.

Solange die fehlende Relevanz solcher Veränderungen nicht gezeigt werden konnte, sollten Nachuntersuchungen der Patienten erfolgen, um früh mögliche Defizite erkennen und die Patienten optimal zu fördern zu können.

Ein Zusammenhang zwischen vermehrter akuter MTX-Toxizität i.R. der intensiven ALL-Therapie und der MTHFR-C677T-Mutation konnte anhand von Mukositis, hämatologischen Parametern oder Leberwerten ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Ergebnisse anderer Untersucher mit ähnlichen Therapieregimen. Der Ausgleich der verminderten MTHFR-Funktion durch die im Therapieregime vorgegebene und notwendige regelmäßige Folatsubstitution ist hierfür ein plausibler Grund.

Andererseits ist bei der beschränkten Zahl der untersuchten Patienten und insbesondere durch das seltene Vorkommen der homozygoten MTHFR-C677T-Mutation in unserer Patientengruppe die statistische Aussagekraft beschränkt und ein möglicherweise nur leicht ausgeprägter Effekt nicht nachweisbar.

Auch wenn die MTHFR-C677T-Mutation nicht zur vermehrten MTX-Toxizität beizutragen scheint, so können doch vielfache Veränderungen im Folsäure-

haushalt des Patienten und bei den multiplen beteiligten Enzymen bestehen, die die unterschiedlich ausgeprägte Toxizität erklären könnten. Hier sollten weitere Untersuchungen erfolgen, um eine auf den individuellen Folsäurestoffwechsel abgestimmte, maßgeschneiderte Therapie zu erreichen.

# ANHANG

## Patientendaten

	PATIENT, SEX	ALTER	TYP	RAD	MTHFR	MTXSTART	ABST MR JAHR MON	MR1	MR 2 MR SPE	HEP	BIL	MTX	MUK	LEUK
1	A.C. w	7,42	Prä-B, MR	-	W	6/97	7 8	ob	ob,ob	2	0	1	1	3
2	A.A. m	5	CALL, MR	-	W	11/97	6 10	ob	ob,ob	O	O	0	O	0
3	B.C. w	5,42	CALL, MR	12gy	W	7/94	10 3		ob,ob	0	4	2	0	1
4	B.S. w	4,25	CALL,MR	12Gy	W	10/94				0	0	2	1	3
5	D.A. m	5,08	PräB, MR	12Gy	W	7/94	10 2		LEP,ob	0	0	0	0	0
6	D.V. w	3	CALL, MR	12Gy	H	4/91	14 4		ob,ob	0	0	1	2	4
7	F.J. w	1,92	CALL, SR	-	W	1/99				0	0	0	0	1
8	F.H. m	3,08	CALL, MR	-	H	9/97	7 0	LEP	LEP, +	0	2	0	1	3
9	F.J. m	9,42	TNHL, MR	-	H	8/97	7 0	ob	ob	0	2	1	0	1
10	G.P. m	3	CALL, SR	-	W	12/97	7 2	LEP	Besser,ob	O	O	0	3	2
11	G.M. m	4,83	CALL, MR	12,6Gy	W	6/95	7 3	CT LEP	LEP	O	O	O	2	3
12	K.M. m	6,92	CALL, MR	-	W	8/96	8 1	ob ,LEP	ob,+	0	0	1	0	0
13	K.A. m	2,33	CALL, SR	-	H	5/89	16 2	ob	ob,ob	0	0	0	0	1
14	K.C. m	12,92	PräB, MR	12Gy	W	4/92				4	0	1	2	4
15	K.A. m	8,42	Prä-B, MR	-	H	8/99	4 1		ob,ob	3	0	0	1	2
16	M.D. m	7,17	CALL, MR	12,6Gy	W	7/95	9 3		ob,ob	0	1	0	0	0
17	N.T. w	5,42	CALL, SR	-	H	8/96	9 0	ob	ob,ob	0	2	0	0	0
18	P.D. m	3,33	Prä-B, MR	-	H	5/99	6		ob,ob	0	0	1	0	3
19	R.M. m	6,42	CALL, SR	-	H	2/93	7 10		ob,ob	0	0	2	0	1

	PATIENT, Sex	Alter	TYP	RAD	MTHFR	MTX Start	Abst MR	MR1	MR 2 Mr spe	TA	BIL	MTX	MUK	Leuk <2
20	R.N. w	1,67	CALL MR	-	H	5/97	2 1	ob,+++	LEP	1	1	1	1	3
21	S.P. m	4,92	CALL MR	12Gy	H	10/94	8 11		ob,ob	0	0	0	0	0
22	S.V. w	2	CALL MR	18Gy	H	5/91	CT	ob		0	0	1	0	0
23	S.P. m	3,5	T-ALL MR	12Gy	H	4/92	12 6		ob	0	0	0	0	2
24	S.A. m	14,75	CALL MR	-	H	1/99		CT ob		0	1	2	3	0
25	T.G. w	9,08	T-NHL MR	-	H	11/96	6 6		ob,ob	3	3	1	1	0
26	Ü.T. w	6,75	CALL MR	-	HOMO	10/96	8 1	SVT	ob,LEP	0	0	0	0	1
27	W.A. m	5,33	TALL SR	-	H			CT ob		0	0	0	0	2
28	W.S. w	1,58	CALL MCA	-	W	4/97	8	ob	ob,ob	0	0	0	0	0
29	W.A. w	6,83	CALL SR	-	W	4/95				0	1	1	1	2
30	W.S. m	2,92	CALL MR	-	H	5/90				O	O	0	1	0
31	Z.K. w	5,17	CALL SR	-	W	7/90	14 4		ob	0	0	1	0	2

MTHFR: W= Wildtyp, H= Heterozygot, Homo= Homozygot

Rad= Radiatio, Abst.MR= Abstand zwischen MTX Beginn und letztem MRT, TA=Transaminasenerhöhung, Bili= Bilirubinerhöhung,

Muk= Mukositis, Leuk= Leukozytopenie

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Medikamente und zeitlicher Ablauf der ALL-BFM-Therapie</i> .....	6
<i>Folsäurezyklus und angrenzende Stoffwechselwege</i> .....	7
<i>Homozysteinabbau</i> .....	9
<i>Purinsynthese</i> .....	11
<i>Biopterin-Metabolismus und Biogene Amine</i> .....	12
<i>Folsäurezyklus- Überblick</i> .....	14
<i>Mögliche Mechanismen der Atherogenität von Homozystein</i> .....	17
<i>Chemische Struktur von Folsäure und Aminopterin</i> .....	24
<i>Chemische Struktur von Methotrexat</i> .....	24
<i>Metabolisierung von MTX</i> .....	28
<i>Intrazelluläre Wirkungsmechanismen von MTX und Rescue mit Leucovorin</i> ....	29
<i>MTX-Wirkung im Biopterinstoffwechsel</i> .....	31
<i>MTX-Wirkungen und mögliche neurotoxische Folgen</i> .....	36
<i>MTX-induzierte Stoffwechselstörungen, mögliche Pathomechanismen und Symptome</i> .....	37
<i>Normale Spektroskopie der weissen Substanz</i> .....	46
<i>Protokoll M, ALL-BFM 2000</i> .....	51
<i>Patient 20, MRT zu Beginn der neurologischen Symptomatik (FLAIR)</i> .....	62
<i>Patient 20, Verlauf nach 4 Wochen (FLAIR)</i> .....	62
<i>Patient 20, Verlauf nach 2 Jahren (FLAIR)</i> .....	63
<i>Patient 10, 3 Wochen nach Therapiebeginn und nur 2 Gaben MTX intrathekal (FLAIR)</i> .....	65
<i>Patient 10, Verlauf nach 7 Jahren (FLAIR)</i> .....	65
<i>Patient 11, Verlauf nach 7 Jahren (FLAIR)</i> .....	66
<i>Patient 8, nach 1. HD-MTX (FLAIR)</i> .....	68
<i>Patient 8, Verlauf nach 7 Jahren (FLAIR)</i> .....	69

## LITERATURVERZEICHNIS

- Abe, K., Fujimura, H., *et al.*: "The fluid-attenuated inversion-recovery pulse sequence in assessment of central nervous system involvement in myotonic dystrophy" *Neuroradiology* (1998) **40**(1): 32-5.
- Abelson, H. T.: "Methotrexate and central nervous system toxicity" *Cancer Treat Rep* (1978) **62**(12): 1999-2001.
- Adams, M., Smith, P. D., *et al.*: "Genetic analysis of thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for myocardial infarction" *Qjm* (1996) **89**(6): 437-44.
- Aggarwal, P., Naik, S., *et al.*: "Correlation between methotrexate efficacy & toxicity with C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate gene in rheumatoid arthritis patients on folate supplementation" *Indian J Med Res* (2006) **124**(5): 521-6.
- Allegra, C. J., Chabner, B. A., *et al.*: "Enhanced inhibition of thymidylate synthase by methotrexate polyglutamates" *J Biol Chem* (1985) **260**(17): 9720-6.
- Allegra, C. J., Fine, R. L., *et al.*: "The effect of methotrexate on intracellular folate pools in human MCF-7 breast cancer cells. Evidence for direct inhibition of purine synthesis" *J Biol Chem* (1986) **261**(14): 6478-85.
- Allegra, C. J., Hoang, K., *et al.*: "Evidence for direct inhibition of de novo purine synthesis in human MCF-7 breast cells as a principal mode of metabolic inhibition by methotrexate" *J Biol Chem* (1987) **262**(28): 13520-6.
- Andreassi, M. G. and Botto, N.: "DNA damage as a new emerging risk factor in atherosclerosis" *Trends Cardiovasc Med* (2003) **13**(7): 270-5.
- Andreassi, M. G., Botto, N., *et al.*: "Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism, homocysteine, vitamin B12, and DNA damage in coronary artery disease" *Hum Genet* (2003) **112**(2): 171-7.
- Antony, A. C.: "The biological chemistry of folate receptors" *Blood* (1992) **79**(11): 2807-20.
- Aplenc, R., Thompson, J., *et al.*: "Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and therapy response in pediatric acute lymphoblastic leukemia" *Cancer Res* (2005) **65**(6): 2482-7.
- Asato, R., Akiyama, Y., *et al.*: "Nuclear magnetic resonance abnormalities of the cerebral white matter in children with acute lymphoblastic leukemia and malignant lymphoma during and after central nervous system prophylactic treatment with intrathecal methotrexate" *Cancer* (1992) **70**(7): 1997-2004.
- Atra, A., Pinkerton, C. R., *et al.*: "Acute neurotoxicity in children with advanced stage B-non-Hodgkin's lymphoma and B-acute lymphoblastic leukaemia treated with the United Kingdom children cancer study group 9002/9003 protocols" *Eur J Cancer* (2004) **40**(9): 1346-50.

- Baggott, J. E., Johanning, G. L., *et al.*: "Cofactor role for 10-formyldihydrofolic acid" *Biochem J* (1995) **308** ( Pt 3): 1031-6.
- Baggott, J. E., Vaughn, W. H., *et al.*: "Inhibition of 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribotide transformylase, adenosine deaminase and 5'-adenylate deaminase by polyglutamates of methotrexate and oxidized folates and by 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside and ribotide" *Biochem J* (1986) **236**(1): 193-200.
- Bakshi, R., Ariyaratana, S., *et al.*: "Fluid-attenuated inversion recovery magnetic resonance imaging detects cortical and juxtacortical multiple sclerosis lesions" *Arch Neurol* (2001) **58**(5): 742-8.
- Baylin, S. B., Esteller, M., *et al.*: "Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer" *Hum Mol Genet* (2001) **10**(7): 687-92.
- Becker, A., Vezmar, S., *et al.*: "Marked elevation in homocysteine and homocysteine sulfinic acid in the cerebrospinal fluid of lymphoma patients receiving intensive treatment with methotrexate" *Int J Clin Pharmacol Ther* (2007) **45**(9): 504-15.
- Bender, R. and Lange, S.: "Was ist der p-Wert?" *Dtsch. Med. Wschr.* (2001) (Suppl. Statistik): T 39-T 40.
- Bender, R., Lange, S., *et al.*: "Wichtige Signifikanztests (Common significance tests)" *Dtsch Med Wochenschr* (2007): e24-e25.
- Bernini, J. C., Fort, D. W., *et al.*: "Aminophylline for methotrexate-induced neurotoxicity" *Lancet* (1995) **345**(8949): 544-7.
- Bethke, L., Webb, E., *et al.*: "Functional polymorphisms in folate metabolism genes influence the risk of meningioma and glioma" *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (2008) **17**(5): 1195-202.
- Bleyer, W. A.: "The clinical pharmacology of methotrexate: new applications of an old drug" *Cancer* (1978) **41**(1): 36-51.
- Bleyer, W. A.: "Neurologic sequelae of methotrexate and ionizing radiation: a new classification" *Cancer Treat Rep* (1981) **65** Suppl 1: 89-98.
- Bleyer, W. A.: "Central nervous system leukemia" *Pediatr Clin North Am* (1988) **35**(4): 789-814.
- Blount, B. C. and Ames, B. N.: "DNA damage in folate deficiency" *Baillieres Clin Haematol* (1995) **8**(3): 461-78.
- Blount, B. C., Mack, M. M., *et al.*: "Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage" *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997) **94**(7): 3290-5.
- Bode, U., Magrath, I. T., *et al.*: "Active transport of methotrexate from cerebrospinal fluid in humans" *Cancer Res* (1980) **40**(7): 2184-7.
- Bonaa, K. H., Njolstad, I., *et al.*: "Homocysteine Lowering and Cardiovascular Events after Acute Myocardial Infarction" *N Engl J Med* (2006) **354**(15): 1578-1588.
- Bostom, A. G. and Culleton, B. F.: "Hyperhomocysteinemia in chronic renal disease" *J Am Soc Nephrol* (1999) **10**(4): 891-900.
- Bottiglieri, T. and Hyland, K.: "S-adenosylmethionine levels in psychiatric and neurological disorders: a review" *Acta Neurol Scand Suppl* (1994) **154**: 19-26.

- Botto, L. D. and Yang, Q.: "5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review" *Am J Epidemiol* (2000) **151**(9): 862-77.
- Botto, N., Andreassi, M. G., *et al.*: "Genetic polymorphisms in folate and homocysteine metabolism as risk factors for DNA damage" *Eur J Hum Genet* (2003) **11**(9): 671-8.
- Brattstrom, L., Zhang, Y., *et al.*: "A common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation and longevity" *Atherosclerosis* (1998) **141**(2): 315-9.
- Bridges, R. J., Hatalski, C. G., *et al.*: "Gliotoxic actions of excitatory amino acids" *Neuropharmacology* (1992) **31**(9): 899-907.
- Brouwers, P., Riccardi, R., *et al.*: "Long-term neuropsychologic sequelae of childhood leukemia: correlation with CT brain scan abnormalities" *J Pediatr* (1985) **106**(5): 723-8.
- Broxson, E. H., Jr., Stork, L. C., *et al.*: "Changes in plasma methionine and total homocysteine levels in patients receiving methotrexate infusions" *Cancer Res* (1989) **49**(21): 5879-83.
- Budzik, G. P., Colletti, L. M., *et al.*: "Effects of methotrexate on nucleotide pools in normal human T cells and the CEM T cell line" *Life Sci* (2000) **66**(23): 2297-307.
- Buyschaert, M., Gala, J. L., *et al.*: "C677T methylene-tetrahydrofolate reductase mutation in type 2 diabetic patients with and without hyperhomocysteinemia" *Diabetes Metab* (2004) **30**(4): 349-54.
- Calvert, H.: "An overview of folate metabolism: features relevant to the action and toxicities of antifolate anticancer agents" *Semin Oncol* (1999) **26**(2 Suppl 6): 3-10.
- Castro, R., Rivera, I., *et al.*: "5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C-->T and 1298A-->C mutations are associated with DNA hypomethylation" *J Med Genet* (2004) **41**(6): 454-8.
- Castro, R., Rivera, I., *et al.*: "Increased homocysteine and S-adenosylhomocysteine concentrations and DNA hypomethylation in vascular disease" *Clin Chem* (2003) **49**(8): 1292-6.
- Chan, M. S., Roebuck, D. J., *et al.*: "MR imaging of the brain in patients cured of acute lymphoblastic leukemia--the value of gradient echo imaging" *AJNR Am J Neuroradiol* (2006) **27**(3): 548-52.
- Chan, Y. L., Roebuck, D. J., *et al.*: "Long-term cerebral metabolite changes on proton magnetic resonance spectroscopy in patients cured of acute lymphoblastic leukemia with previous intrathecal methotrexate and cranial irradiation prophylaxis" *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (2001) **50**(3): 759-63.
- Chatzidakis, K., Goulas, A., *et al.*: "Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism: association with risk for childhood acute lymphoblastic leukemia and response during the initial phase of chemotherapy in greek patients" *Pediatr Blood Cancer* (2006) **47**(2): 147-51.
- Chen, Z., Karaplis, A. C., *et al.*: "Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition" *Hum Mol Genet* (2001) **10**(5): 433-43.

- Chen, Z. S., Lee, K., *et al.*: "Analysis of methotrexate and folate transport by multidrug resistance protein 4 (ABCC4): MRP4 is a component of the methotrexate efflux system" *Cancer Res* (2002) **62**(11): 3144-50.
- Chiang, P. K., Gordon, R. K., *et al.*: "S-Adenosylmethionine and methylation" *Faseb J* (1996) **10**(4): 471-80.
- Chiusolo, P., Reddicono, G., *et al.*: "Preponderance of methylenetetrahydrofolate reductase C677T homozygosity among leukemia patients intolerant to methotrexate" *Ann Oncol* (2002) **13**(12): 1915-8.
- Chiusolo, P., Reddicono, G., *et al.*: "MTHFR polymorphisms' influence on outcome and toxicity in acute lymphoblastic leukemia patients" *Leuk Res* (2007) **31**(12): 1669-74.
- Choi, D. W.: "Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system" *Neuron* (1988) **1**(8): 623-34.
- Choi, S. W. and Mason, J. B.: "Folate and carcinogenesis: an integrated scheme" *J Nutr* (2000) **130**(2): 129-32.
- Chu E, A. C. (1996). Antifolates. Cancer chemotherapy and biotherapy. L. D. Chabner BA. Philadelphia, Lippincot-Raven: 109-47.
- Chu, W. C., Chik, K. W., *et al.*: "White matter and cerebral metabolite changes in children undergoing treatment for acute lymphoblastic leukemia: longitudinal study with MR imaging and 1H MR spectroscopy" *Radiology* (2003) **229**(3): 659-69.
- Costea, I., Moghrabi, A., *et al.*: "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* (2003) **13**(9): 577-80.
- Costea, I., Moghrabi, A., *et al.*: "Folate cycle gene variants and chemotherapy toxicity in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia" *Haematologica* (2006) **91**(8): 1113-6.
- Cousens, P., Waters, B., *et al.*: "Cognitive effects of cranial irradiation in leukaemia: a survey and meta-analysis" *J Child Psychol Psychiatry* (1988) **29**(6): 839-52.
- Craine, J. E., Hall, E. S., *et al.*: "The isolation and characterization of dihydropyridine reductase from sheep liver" *J Biol Chem* (1972) **247**(19): 6082-91.
- Cronstein, B. N.: "The mechanism of action of methotrexate" *Rheum Dis Clin North Am* (1997) **23**(4): 739-55.
- Cronstein, B. N., Naime, D., *et al.*: "The antiinflammatory mechanism of methotrexate. Increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an in vivo model of inflammation" *J Clin Invest* (1993) **92**(6): 2675-82.
- Csernansky, J. G.: "Structural MRI as a tool for the study of neurotoxicity and neurodegenerative disorders" *J Anal Toxicol* (2001) **25**(5): 414-8.
- Curras, M. C. and Dingledine, R.: "Selectivity of amino acid transmitters acting at N-methyl-D-aspartate and amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptors" *Mol Pharmacol* (1992) **41**(3): 520-6.
- Curtis, D. R. and Watkins, J. C.: "Acidic amino acids with strong excitatory actions on mammalian neurones" *J Physiol* (1963) **166**: 1-14.

- D'Angelo, A. and Selhub, J.: "Homocysteine and Thrombotic Disease" *Blood* (1997) **90**(1): 1-11.
- Davie, C. A., Hawkins, C. P., *et al.*: "Serial proton magnetic resonance spectroscopy in acute multiple sclerosis lesions" *Brain* (1994) **117**(1): 49-58.
- Davies, S. E., Newcombe, J., *et al.*: "High resolution proton NMR spectroscopy of multiple sclerosis lesions" *J Neurochem* (1995) **64**(2): 742-8.
- de Craen, A. J. M., Stott, D. J., *et al.*: "Homocysteine, B Vitamins, and Cardiovascular Disease" *N Engl J Med* (2006) **355**(2): 205-211.
- de Jonge, R., Hooijberg, J. H., *et al.*: "Effect of polymorphisms in folate-related genes on in vitro methotrexate sensitivity in pediatric acute lymphoblastic leukemia" *Blood* (2005) **106**(2): 717-20.
- Dempster, E. L., Kiss, E., *et al.*: "No evidence of association between a functional polymorphism in the MTHFR gene and childhood-onset mood disorders" *Mol Psychiatry* (2007) **12**(12): 1063-4.
- Dervieux, T., Furst, D., *et al.*: "Pharmacogenetic and metabolite measurements are associated with clinical status in patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate: results of a multicentred cross sectional observational study" *Ann Rheum Dis* (2005) **64**(8): 1180-5.
- Dervieux, T., Greenstein, N., *et al.*: "Pharmacogenomic and metabolic biomarkers in the folate pathway and their association with methotrexate effects during dosage escalation in rheumatoid arthritis" *Arthritis Rheum* (2006) **54**(10): 3095-103.
- Dianov, G. L., Timchenko, T. V., *et al.*: "Repair of uracil residues closely spaced on the opposite strands of plasmid DNA results in double-strand break and deletion formation" *Mol Gen Genet* (1991) **225**(3): 448-52.
- Diaz-Arrastia, R.: "Homocysteine and neurologic disease" *Arch Neurol* (2000) **57**(10): 1422-7.
- Djerassi, I., Farber, S., *et al.*: "Continuous infusion of methotrexate in children with acute leukemia" *Cancer* (1967) **20**(2): 233-42.
- Dufourg, M. N., Landman-Parker, J., *et al.*: "Age and high-dose methotrexate are associated to clinical acute encephalopathy in FRALLE 93 trial for acute lymphoblastic leukemia in children" *Leukemia* (2007) **21**(2): 238-47.
- Dulucq, S., St-Onge, G., *et al.*: "DNA variants in the dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood ALL" *Blood* (2008) **111**(7): 3692-700.
- Duthie, S. J.: "Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability" *Br Med Bull* (1999) **55**(3): 578-92.
- Duthie, S. J. and Hawdon, A.: "DNA instability (strand breakage, uracil misincorporation, and defective repair) is increased by folic acid depletion in human lymphocytes in vitro" *Faseb J* (1998) **12**(14): 1491-7.
- Duthie, S. J. and McMillan, P.: "Uracil misincorporation in human DNA detected using single cell gel electrophoresis" *Carcinogenesis* (1997) **18**(9): 1709-14.
- Engbersen, A. M., Franken, D. G., *et al.*: "Thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia" *Am J Hum Genet* (1995) **56**(1): 142-50.

- Errera, F. I., Silva, M. E., *et al.*: "Effect of polymorphisms of the MTHFR and APOE genes on susceptibility to diabetes and severity of diabetic retinopathy in Brazilian patients" *Braz J Med Biol Res* (2006) **39**(7): 883-8.
- Esteller, M. and Herman, J. G.: "Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours" *J Pathol* (2002) **196**(1): 1-7.
- Esteve, F., Rubin, C., *et al.*: "Transient metabolic changes observed with proton MR spectroscopy in normal human brain after radiation therapy" *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (1998) **40**(2): 279-86.
- Fabre, I., Fabre, G., *et al.*: "Polyglutamylation, an important element in methotrexate cytotoxicity and selectivity in tumor versus murine granulocytic progenitor cells in vitro" *Cancer Res* (1984) **44**(8): 3190-5.
- Farber, S., Diamond, L. K., *et al.*: "Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic antagonist 4-amethopteroylglutamic acid (aminopterin)" *NEJM* (1948).
- Finnell, R. H., Greer, K. A., *et al.*: "Neural tube and craniofacial defects with special emphasis on folate pathway genes" *Crit Rev Oral Biol Med* (1998) **9**(1): 38-53.
- Fisher, M. J., Khademan, Z. P., *et al.*: "Diffusion-weighted MR imaging of early methotrexate-related neurotoxicity in children" *AJNR Am J Neuroradiol* (2005) **26**(7): 1686-9.
- Fletcher, J. M. and Copeland, D. R.: "Neurobehavioral effects of central nervous system prophylactic treatment of cancer in children" *J Clin Exp Neuropsychol* (1988) **10**(4): 495-537.
- Fliessbach, K., Urbach, H., *et al.*: "Cognitive performance and magnetic resonance imaging findings after high-dose systemic and intraventricular chemotherapy for primary central nervous system lymphoma" *Arch Neurol* (2003) **60**(4): 563-8.
- Flohr, T., Schrauder, A., *et al.*: "Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia" *Leukemia* (2008) **22**(4): 771-82.
- Fodinger, M., Horl, W. H., *et al.*: "Molecular biology of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase" *J Nephrol* (2000) **13**(1): 20-33.
- Ford, A. M., Bennett, C. A., *et al.*: "Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia" *Proc Natl Acad Sci U S A* (1998) **95**(8): 4584-8.
- Franco, R. F., Simoes, B. P., *et al.*: "The methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism decreases the risk of childhood acute lymphocytic leukaemia" *Br J Haematol* (2001) **115**(3): 616-8.
- Freeman, A. I., Wang, J. J., *et al.*: "High-dose methotrexate in acute lymphocytic leukemia" *Cancer Treat Rep* (1977) **61**(4): 727-31.
- Friso, S. and Choi, S. W.: "Gene-nutrient interactions and DNA methylation" *J Nutr* (2002) **132**(8 Suppl): 2382S-2387S.
- Friso, S., Choi, S. W., *et al.*: "A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation"

- lation through an interaction with folate status" *Proc Natl Acad Sci U S A* (2002) **99**(8): 5606-11.
- Frosst, P., Blom, H. J., *et al.*: "A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase" *Nat Genet* (1995) **10**(1): 111-3.
- Fry, D. W., Yalowich, J. C., *et al.*: "Rapid formation of poly-gamma-glutamyl derivatives of methotrexate and their association with dihydrofolate reductase as assessed by high pressure liquid chromatography in the Ehrlich ascites tumor cell in vitro" *J Biol Chem* (1982) **257**(4): 1890-6.
- Gadener, G., Gaedicke, H., *et al.* (2006). Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Springer Verlag.
- Gale, K. B., Ford, A. M., *et al.*: "Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots" *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997) **94**(25): 13950-4.
- Gast, A., Bermejo, J. L., *et al.*: "Folate metabolic gene polymorphisms and childhood acute lymphoblastic leukemia: a case-control study" *Leukemia* (2007) **21**(2): 320-5.
- Gemmati, D., Ongaro, A., *et al.*: "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* (2004) **13**(5): 787-94.
- Gemmati, D., Ongaro, A., *et al.*: "Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C gene variants in adult non-Hodgkin's lymphoma patients: association with toxicity and survival" *Haematologica* (2007) **92**(4): 478-85.
- Gowan, G. M., Herrington, J. D., *et al.*: "Methotrexate-induced toxic leukoencephalopathy" *Pharmacotherapy* (2002) **22**(9): 1183-7.
- Goyette, P., Pai, A., *et al.*: "Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)" *Mamm Genome* (1995) **9**(8): 652-6.
- Goyette, P., Pai, A., *et al.*: "Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)" *Mamm Genome* (1998) **9**(8): 652-6.
- Goyette, P., Sumner, J. S., *et al.*: "Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification" *Nat Genet* (1994) **7**(2): 195-200.
- Greaves, M. F.: "Aetiology of acute leukaemia" *Lancet* (1997) **349**(9048): 344-9.
- Gressner, A. M.: "Molekulargenetische Analyse der Methylenetetrahydrofolat-Reduktase-C677T-Mutation (MTHFR-Genotypisierung)" *Mitteilung des Zentrallabors des UK Aachen* (1999).
- Grossman, R., Lenkinski, R., *et al.*: "MR proton spectroscopy in multiple sclerosis" *AJNR Am J Neuroradiol* (1992) **13**(6): 1535-1543.
- Guenther, B. D., Sheppard, C. A., *et al.*: "The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia" *Nat Struct Biol* (1999) **6**(4): 359-65.
- Guttormsen, A. B., Ueland, P. M., *et al.*: "Disposition of homocysteine in subjects heterozygous for homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency: relationship between genotype and phenotype" *Am J Med Genet* (2001) **100**(3): 204-13.

- Han, J., Colditz, G. A., *et al.*: "olymorphisms in the MTHFR and VDR genes and skin cancer risk" *Carcinogenesis* (2007) **28**(2): 390-7.
- Hardy, G. H.: ""Mendelian proportions in a mixed population"" *Science* (1908).
- Haykin, M. E., Gorman, M., *et al.*: "Diffusion-weighted MRI correlates of subacute methotrexate-related neurotoxicity" *J Neurooncol* (2006) **76**(2): 153-7.
- Hertfelder, H., Gnida, C., *et al.*: "MTHFR-Polymorphism C677T- Sinn und Unsinn der Diagnostik" *Deutsches Ärzteblatt* (2004) **101**(46): A3101-3105.
- Hill, B. T., Bailey, B. D., *et al.*: "Characteristics of transport of 4-amino anti-folates and folate compounds by two lines of L5178Y lymphoblasts, one with impaired transport of methotrexate" *Cancer Res* (1979) **39**(7 Pt 1): 2440-6.
- Hirano, K., Ogihara, T., *et al.*: "Homocysteine induces iron-catalyzed lipid peroxidation of low-density lipoprotein that is prevented by alpha-tocopherol" *Free Radic Res* (1994) **21**(5): 267-76.
- Hoffbrand, A. V. and Weir, D. G.: "The history of folic acid" *Br J Haematol* (2001) **113**(3): 579-89.
- Hoffman, D. L., Howard, J. R., Jr., *et al.*: "Encephalopathy, myelopathy, optic neuropathy, and anosmia associated with intravenous cytosine arabinoside" *Clin Neuropharmacol* (1993) **16**(3): 258-62.
- Huennekens, F. M., Vitols, K. S., *et al.*: "Membrane transport of folate compounds" *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* (1992) **Spec No**: 52-7.
- Huffman, D. H., Wan, S. H., *et al.*: "Pharmacokinetics of methotrexate" *Clin Pharmacol Ther* (1973) **14**(4): 572-9.
- Hughes, L. B., Beasley, T. M., *et al.*: "Racial or ethnic differences in allele frequencies of single-nucleotide polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and their influence on response to methotrexate in rheumatoid arthritis" *Ann Rheum Dis* (2006) **65**(9): 1213-8.
- Hwang, T. L., Yung, W. K., *et al.*: "Central nervous system toxicity with high-dose Ara-C" *Neurology* (1985) **35**(10): 1475-9.
- Hwang, T. L., Yung, W. K., *et al.*: "High dose Ara-C related leukoencephalopathy" *J Neurooncol* (1986) **3**(4): 335-9.
- Hyland, K., Smith, I., *et al.*: "Demyelination and decreased S-adenosylmethionine in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency" *Neurology* (1988) **38**(3): 459-62.
- Imanishi, H., Okamura, N., *et al.*: "Genetic polymorphisms associated with adverse events and elimination of methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia and malignant lymphoma" *J Hum Genet* (2007) **52**(2): 166-71.
- Inaba, H., Khan, R. B., *et al.*: "Clinical and radiological characteristics of methotrexate-induced acute encephalopathy in pediatric patients with cancer" *Ann Oncol* (2008) **19**(1): 178-84.
- Jacobs, S. A., Stoller, R. G., *et al.*: "7-Hydroxymethotrexate as a urinary metabolite in human subjects and rhesus monkeys receiving high dose methotrexate" *J Clin Invest* (1976) **57**(2): 534-8.

- Jacques, P. F., Bostom, A. G., *et al.*: "Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations" *Circulation* (1996) **93**(1): 7-9.
- Jansen, G., Mauritz, R., *et al.*: "A structurally altered human reduced folate carrier with increased folic acid transport mediates a novel mechanism of antifolate resistance" *J Biol Chem* (1998) **273**(46): 30189-98.
- Jolivet, J. and Chabner, B. A.: "Intracellular pharmacokinetics of methotrexate polyglutamates in human breast cancer cells. Selective retention and less dissociable binding of 4-NH<sub>2</sub>-10-CH<sub>3</sub>-pteroylglutamate<sub>4</sub> and 4-NH<sub>2</sub>-10-CH<sub>3</sub>-pteroylglutamate<sub>5</sub> to dihydrofolate reductase" *J Clin Invest* (1983) **72**(3): 773-8.
- Jolivet, J., Cole, D. E., *et al.*: "Prevention of methotrexate cytotoxicity by asparaginase inhibition of methotrexate polyglutamate formation" *Cancer Res* (1985) **45**(1): 217-20.
- Jones, B. G., Rose, F. A., *et al.*: "Lipid peroxidation and homocysteine induced toxicity" *Atherosclerosis* (1994) **105**(2): 165-70.
- Jones, P. A. and Laird, P. W.: "Cancer epigenetics comes of age" *Nat Genet* (1999) **21**(2): 163-7.
- Joober, R., Benkelfat, C., *et al.*: "Association between the methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T missense mutation and schizophrenia" *Mol Psychiatry* (2000) **5**(3): 323-6.
- Josting, A.: "Methotrexat" *Der Onkologe* (1998) **4**: 974-85.
- Justenhoven, C., Hamann, U., *et al.*: "One-carbon metabolism and breast cancer risk: no association of MTHFR, MTR, and TYMS polymorphisms in the GENICA study from Germany" *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (2005) **14**(12): 3015-8.
- Kaatsch, P., Haaf, G., *et al.*: "Childhood malignancies in Germany--methods and results of a nationwide registry" *Eur J Cancer* (1995) **31A**(6): 993-9.
- Kaatsch, P. and Spix, C.: "Jahresbericht deutsches Kinderkrebsregister" (2002).
- Kallianpur, A. R.: "Genomic screening and complications of hematopoietic stem cell transplantation: has the time come?" (2004) **35**(1): 1-16.
- Kanani, P. M., Sinkey, C. A., *et al.*: "Role of oxidant stress in endothelial dysfunction produced by experimental hyperhomocyst(e)inemia in humans" *Circulation* (1999) **100**(11): 1161-8.
- Kane, B. J., Kuhn, J. G., *et al.*: "Pentostatin: an adenosine deaminase inhibitor for the treatment of hairy cell leukemia" *Ann Pharmacother* (1992) **26**(7-8): 939-47.
- Kang, S. S., Passen, E. L., *et al.*: "Thermolabile defect of methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease" *Circulation* (1993) **88**(4 Pt 1): 1463-9.
- Kelly, P. J., Rosand, J., *et al.*: "Homocysteine, MTHFR 677C-->T polymorphism, and risk of ischemic stroke: results of a meta-analysis" *Neurology* (2002) **59**(4): 529-36.
- Kim, H. N., Lee, I. K., *et al.*: "Association between folate-metabolizing pathway polymorphism and non-Hodgkin lymphoma" *Br J Haematol* (2008) **140**(3): 287-94.

- Kim, I., Lee, K. H., *et al.*: "Polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene and clinical outcomes in HLA-matched sibling allogeneic hematopoietic stem cell transplantation" *Ann Hematol* (2007) **86**(1): 41-8.
- Kim, Y. I.: "Folate and carcinogenesis: evidence, mechanisms, and implications" *J Nutr Biochem* (1999) **10**(2): 66-88.
- Kishi, S., Griener, J., *et al.*: "Homocysteine, pharmacogenetics, and neurotoxicity in children with leukemia" *J Clin Oncol* (2003) **21**(16): 3084-91.
- Kluijtmans, L. A., van den Heuvel, L. P., *et al.*: "Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease" *Am J Hum Genet* (1996) **58**(1): 35-41.
- Koch, M. C., Stegmann, K., *et al.*: "Evaluation of the MTHFR C677T allele and the MTHFR gene locus in a German spina bifida population" *Eur J Pediatr* (1998) **157**(6): 487-92.
- Kotsopoulos, J., Zhang, W. W., *et al.*: "Polymorphisms in folate metabolizing enzymes and transport proteins and the risk of breast cancer" *Breast Cancer Res Treat* (2008).
- Krajinovic, M., *et al.*: "Role of polymorphisms in MTHFR and MTHFD1 genes in the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia" *Pharmacogenomics J* (2004) **4**(1): 66-72.
- Krajinovic, M., ; Lamothe, S., *et al.*: "Role of MTHFR genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia" *Blood* (2004) **103**(1): 252-7.
- Krajinovic, M., Lemieux-Blanchard, E., *et al.*: "Role of polymorphisms in MTHFR and MTHFD1 genes in the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia" *Pharmacogenomics J* (2004) **4**(1): 66-72.
- Krajinovic, M., Robaey, P., *et al.*: "Polymorphisms of genes controlling homocysteine levels and IQ score following the treatment for childhood ALL" *Pharmacogenomics* (2005) **6**(3): 293-302.
- Krause, A. S., Weihrauch, M. R., *et al.*: "Carboxypeptidase-G2 rescue in cancer patients with delayed methotrexate elimination after high-dose methotrexate therapy" *Leuk Lymphoma* (2002) **43**(11): 2139-43.
- Kredich, N. M. and Hershfield, M. S.: "Perturbations in S-adenosylhomocysteine and S-adenosylmethionine metabolism: effects on transmethylation" *Adv Enzyme Regul* (1980) **18**: 181-91.
- Kremer, J. M.: "Toward a better understanding of methotrexate" *Arthritis Rheum* (2004) **50**(5): 1370-82.
- Krull, K. R., Brouwers, P., *et al.*: "Folate pathway genetic polymorphisms are related to attention disorders in childhood leukemia survivors" *J Pediatr* (2008) **152**(1): 101-5.
- Kyoung-Jin Sohn, R. C., Zoe Yates, Mark Lucock, Young-In Kim: "Effect of the Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism on Chemosensitivity of Colon and Breast Cancer Cells to 5-Fluorouracil and Methotrexate" *Journal of the National Cancer Institute* (2004) **96**(2): 134-144.
- Lange, S. and Bender, R.: "Was ist ein Signifikanztest? Allgemeine Aspekte (What is a significance test? General issues)" *Dtsch Med Wochenschr* (2007): e19-e21.

- Langer, T., Huk, W., *et al.*: "Akute lymphoblastische Leukämie im Kindesalter: Morphe und Funktion des Gehirns nach Behandlungsende" Deutsches Ärzteblatt (1998) **95**(48): 3058-3068.
- Lee, K. M., Lan, Q., *et al.*: "One-carbon metabolism gene polymorphisms and risk of non-Hodgkin lymphoma in Australia" Hum Genet (2007) **122**(5): 525-33.
- Lewis, S., Lawlor, D., *et al.*: "The MTHFR C677T genotype and the risk of obesity in 3 large population based cohorts" Eur J Endocrinol (2008).
- Lewis, S. J., Ebrahim, S., *et al.*: "Meta-analysis of MTHFR 677C->T polymorphism and coronary heart disease: does totality of evidence support causal role for homocysteine and preventive potential of folate?" BMJ (2005) **331**(7524): 1053-.
- Linnebank, M., Pels, H., *et al.*: "MTX-induced white matter changes are associated with polymorphisms of methionine metabolism" Neurology (2005) **64**(5): 912-3.
- Linnebank, M., Semmler, A., *et al.*: "The methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) variant c.677C>T (A222V) influences overall survival of patients with glioblastoma multiforme" Neuro Oncol (2008).
- Linnebank, M. P., H.: " MTX-induced white matter changes are associated with polymorphisms of methionine metabolism" NEUROLOGY (2005) **64**: 912–913.
- Lippens, R. J. and Winograd, B.: "Methotrexate concentration levels in the cerebrospinal fluid during high-dose methotrexate infusions: an unreliable prediction" Pediatr Hematol Oncol (1988) **5**(2): 115-24.
- Liu, H. M., Maurer, H. S., *et al.*: "Methotrexate encephalopathy. A neuropathologic study" Hum Pathol (1978) **9**(6): 635-48.
- Löffler, G. (1999). Basiswissen Biochemie, Springer Verlag.
- Longo, G. S., Gorlick, R., *et al.*: "Disparate affinities of antifolates for folylpolyglutamate synthetase from human leukemia cells" Blood (1997) **90**(3): 1241-5.
- Loscalzo, J.: "The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia" J Clin Invest (1996) **98**(1): 5-7.
- Lühmann, D. S., S : Raspe, H; "Wie ist der derzeitige Stellenwert der Homozysteinbestimmung im Blut als Risikofaktor für die koronare Herzkrankheit (KHK)?" GMS Health Technol Assess. (2007).
- Ma, J., Stampfer, M. J., *et al.*: "Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer" Cancer Res (1997) **57**(6): 1098-102.
- Mahmud, N., Molloy, A., *et al.*: "Increased prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase C677T variant in patients with inflammatory bowel disease, and its clinical implications" Gut (1999) **45**(3): 389-94.
- Mahoney, D. H., Jr., Shuster, J. J., *et al.*: "Acute neurotoxicity in children with B-precursor acute lymphoid leukemia: an association with intermediate-dose intravenous methotrexate and intrathecal triple therapy--a Pediatric Oncology Group study" J Clin Oncol (1998) **16**(5): 1712-22.
- Malinow, M. R., Nieto, F. J., *et al.*: "The effects of folic acid supplementation on plasma total homocysteine are modulated by multivitamin use and me-

- thylenetetrahydrofolate reductase genotypes" *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (1997) **17**(6): 1157-62.
- Martin, Y. N., Salavaggione, O. E., *et al.*: "Human methylenetetrahydrofolate reductase pharmacogenomics: gene resequencing and functional genomics" *Pharmacogenet Genomics* (2006) **16**(4): 265-77.
- Martinez-Frias, M. L.: "The biochemical structure and function of methylenetetrahydrofolate reductase provide the rationale to interpret the epidemiological results on the risk for infants with Down syndrome" *Am J Med Genet A* (2008) **146A**(11): 1477-82.
- Marugame, T., Tsuji, E., *et al.*: "Relation of plasma folate and methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism to colorectal adenomas" *Int J Epidemiol* (2003) **32**(1): 64-6.
- Marz, W., Nauck, M., *et al.*: "The molecular mechanisms of inherited thrombophilia" *Z Kardiol* (2000) **89**(7): 575-86.
- Masson, E., Relling, M. V., *et al.*: "Accumulation of methotrexate polyglutamates in lymphoblasts is a determinant of antileukemic effects in vivo. A rationale for high-dose methotrexate" *J Clin Invest* (1996) **97**(1): 73-80.
- Matherly, L. H., Taub, J. W., *et al.*: "Elevated dihydrofolate reductase and impaired methotrexate transport as elements in methotrexate resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia" *Blood* (1995) **85**(2): 500-9.
- Matsumoto, K., Takahashi, S., *et al.*: "Leukoencephalopathy in childhood hematopoietic neoplasm caused by moderate-dose methotrexate and prophylactic cranial radiotherapy--an MR analysis" *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (1995) **32**(4): 913-8.
- Matsuo, K., Suzuki, R., *et al.*: "Association between polymorphisms of folate- and methionine-metabolizing enzymes and susceptibility to malignant lymphoma" *Blood* (2001) **97**(10): 3205-9.
- Matthews, R. G. and Haywood, B. J.: "Inhibition of pig liver methylenetetrahydrofolate reductase by dihydrofolate: some mechanistic and regulatory implications" *Biochemistry* (1979) **18**(22): 4845-51.
- Matthews, R. G. and Kaufman, S.: "Characterization of the dihydropterin reductase activity of pig liver methylenetetrahydrofolate reductase" *J Biol Chem* (1980) **255**(13): 6014-7.
- Maytal, J., Grossman, R., *et al.*: "Prognosis and treatment of seizures in children with acute lymphoblastic leukemia" *Epilepsia* (1995) **36**(8): 831-6.
- McGuire, J. J. and Bertino, J. R.: "Enzymatic synthesis and function of folylpolyglutamates" *Mol Cell Biochem* (1981) **38 Spec No**(Pt 1): 19-48.
- Meldrum, B. and Garthwaite, J.: "Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease" *Trends Pharmacol Sci* (1990) **11**(9): 379-87.
- Millot, F., Dhondt, J. L., *et al.*: "Impairment of cerebral biogenic amine synthesis in a patient receiving high-dose methotrexate" *Am J Pediatr Hematol Oncol* (1992) **14**(3): 276-8.
- Millot, F., Rubie, H., *et al.*: "Cerebrospinal fluid drug levels of leukemic children receiving intravenous 5 g/m<sup>2</sup> methotrexate" *Leuk Lymphoma* (1994) **14**(1-2): 141-4.
- Mooijaart, S. P., Gussekloo, J., *et al.*: "Homocysteine, vitamin B-12, and folic acid and the risk of cognitive decline in old age: the Leiden 85-Plus Study" *Am J Clin Nutr* (2005) **82**(4): 866-871.

- Morgan, S. L., Baggott, J. E., *et al.*: "Folic acid supplementation prevents deficient blood folate levels and hyperhomocysteinemia during longterm, low dose methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: implications for cardiovascular disease prevention" *J Rheumatol* (1998) **25**(3): 441-6.
- Mori, H., Colman, S. M., *et al.*: "Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development" *Proc Natl Acad Sci U S A* (2002) **99**(12): 8242-7.
- Morita, H., Taguchi, J., *et al.*: "Genetic polymorphism of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) as a risk factor for coronary artery disease" *Circulation* (1997) **95**(8): 2032-6.
- Nedrebo, B. G., Ericsson, U. B., *et al.*: "Plasma total homocysteine levels in hyperthyroid and hypothyroid patients" *Metabolism* (1998) **47**(1): 89-93.
- Ochs, J. J.: "Neurotoxicity due to central nervous system therapy for childhood leukemia" *Am J Pediatr Hematol Oncol* (1989) **11**(1): 93-105.
- Ogino, S. and Wilson, R. B.: "Genotype and haplotype distributions of MTHFR677C>T and 1298A>C single nucleotide polymorphisms: a meta-analysis" *J Hum Genet* (2003) **48**(1): 1-7.
- Ohmoto, Y., Kajiwara, K., *et al.*: "Atypical MRI findings in treatment-related leukoencephalopathy: case report" *Neuroradiology* (1996) **38**(2): 128-33.
- Oka, M., Terae, S., *et al.*: "MRI in methotrexate-related leukoencephalopathy: Disseminated necrotising leukoencephalopathy in comparison with mild leukoencephalopathy" *Neuroradiology* (2003) **45**(7): 493-7.
- Ou, C. Y., Stevenson, R. E., *et al.*: "5,10 Methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphism as a risk factor for neural tube defects" *Am J Med Genet* (1996) **63**(4): 610-4.
- Paakko, E., Harila-Saari, A., *et al.*: "White matter changes on MRI during treatment in children with acute lymphoblastic leukemia: correlation with neuropsychological findings" *Med Pediatr Oncol* (2000) **35**(5): 456-61.
- Packer, R. J., Grossman, R. I., *et al.*: "High dose systemic methotrexate-associated acute neurologic dysfunction" *Med Pediatr Oncol* (1983) **11**(3): 159-61.
- Papapetrou, C., Lynch, S. A., *et al.*: "Methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects" *Lancet* (1996) **348**(9019): 58.
- Paz, M. F., Avila, S., *et al.*: "Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors" *Cancer Res* (2002) **62**(15): 4519-24.
- Pejchal, R., Campbell, E., *et al.*: "Structural perturbations in the Ala --> Val polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase: how binding of folates may protect against inactivation" *Biochemistry* (2006) **45**(15): 4808-18.
- Pereira, T. V., Rudnicki, M., *et al.*: "5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and acute lymphoblastic leukemia risk: a meta-analysis" *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (2006) **15**(10): 1956-63.
- Peyriere, H., Poiree, M., *et al.*: "Reversal of neurologic disturbances related to high-dose methotrexate by aminophylline" *Med Pediatr Oncol* (2001) **36**(6): 662-4.
- Pierik, M., Rutgeerts, P., *et al.*: "Pharmacogenetics in inflammatory bowel disease" *World J Gastroenterol* (2006) **12**(23): 3657-67.

- Pinkel, D. and Woo, S.: "Prevention and treatment of meningeal leukemia in children" *Blood* (1994) **84**(2): 355-366.
- Piyathilake, C. J., Macaluso, M., *et al.*: "Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism increases the risk of cervical intraepithelial neoplasia" *Anticancer Res* (2000) **20**(3A): 1751-7.
- Poser, R. G., Sirotnak, F. M., *et al.*: "Differential synthesis of methotrexate polyglutamates in normal proliferative and neoplastic mouse tissues *in vivo*" *Cancer Res* (1981) **41**(11 Pt 1): 4441-6.
- Pratt, C. B., Roberts, D., *et al.*: "Clinical trials and pharmacokinetics of intermittent high-dose methotrexate-"leucovorin rescue" for children with malignant tumors" *Cancer Res* (1974) **34**(12): 3326-31.
- Pullan, L. M., Olney, J. W., *et al.*: "Excitatory amino acid receptor potency and subclass specificity of sulfur-containing amino acids" *J Neurochem* (1987) **49**(4): 1301-7.
- Quinn, C. T., Griener, J. C., *et al.*: "Elevation of homocysteine and excitatory amino acid neurotransmitters in the CSF of children who receive methotrexate for the treatment of cancer" *J Clin Oncol* (1997) **15**(8): 2800-6.
- Quinn, C. T., Griener, J. C., *et al.*: "Methotrexate, homocysteine, and seizures" *J Clin Oncol* (1998) **16**(1): 393-4.
- Ranganathan, P., Culverhouse, R., *et al.*: "Single nucleotide polymorphism profiling across the methotrexate pathway in normal subjects and patients with rheumatoid arthritis" *Pharmacogenomics* (2004) **5**(5): 559-69.
- Ranganathan, P., Culverhouse, R., *et al.*: "Methotrexate (MTX) Pathway Gene Polymorphisms and Their Effects on MTX Toxicity in Caucasian and African American Patients with Rheumatoid Arthritis" *J Rheumatol* (2008) **35**(4): 572-579.
- Ray, J. G. and Laskin, C. A.: "Folic acid and homocyst(e)ine metabolic defects and the risk of placental abruption, pre-eclampsia and spontaneous pregnancy loss: A systematic review" *Placenta* (1999) **20**(7): 519-29.
- Reddick, W. E. and al.: "A quantitative MR imaging assessment of leukoencephalopathy in children treated for acute lymphoblastic leukemia without irradiation" *AJNR Am J Neuroradiol* (2005) **26**(9): 2371-7.
- Reddick, W. E. and al., e.: "Prevalence of leukoencephalopathy in children treated for acute lymphoblastic leukemia with high-dose methotrexate" *AJNR Am J Neuroradiol* (2005) **26**(5): 1263-9.
- Refsum, H., Helland, S., *et al.*: "Fasting plasma homocysteine as a sensitive parameter of antifolate effect: a study of psoriasis patients receiving low-dose methotrexate treatment" *Clin Pharmacol Ther* (1989) **46**(5): 510-20.
- Refsum, H., Ueland, P. M., *et al.*: "Acute and long-term effects of high-dose methotrexate treatment on homocysteine in plasma and urine" *Cancer Res* (1986) **46**(10): 5385-91.
- Refsum, H., Ueland, P. M., *et al.*: "Homocysteine and cardiovascular disease" *Annu Rev Med* (1998) **49**: 31-62.
- Refsum, H., Wesenberg, F., *et al.*: "Plasma homocysteine in children with acute lymphoblastic leukemia: changes during a chemotherapeutic regimen including methotrexate" *Cancer Res* (1991) **51**(3): 828-35.

- Reinhardt, D., Sigusch, H. H., *et al.*: "Absence of association between a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and the risk of coronary artery disease" *Eur J Clin Invest* (1998) **28**(1): 20-3.
- Reiter, A., Schrappe, M., *et al.*: "Favorable outcome of B-cell acute lymphoblastic leukemia in childhood: a report of three consecutive studies of the BFM group" *Blood* (1992) **80**(10): 2471-8.
- Reiter, A., Schrappe, M., *et al.*: "Intensive ALL-type therapy without local radiotherapy provides a 90% event-free survival for children with T-cell lymphoblastic lymphoma: a BFM group report" *Blood* (2000) **95**(2): 416-21.
- Reiter, A., Schrappe, M., *et al.*: "Improved treatment results in childhood B-cell neoplasms with tailored intensification of therapy: A report of the Berlin-Frankfurt-Munster Group Trial NHL-BFM 90" *Blood* (1999) **94**(10): 3294-306.
- Relling, M. V. and Dervieux, T.: "Pharmacogenetics and cancer therapy" *Nat Rev Cancer* (2001) **1**(2): 99-108.
- Riehm, H., Schrappe, M., *et al.* (1995). *ALL-BFM 95- Studie*.
- Robien, K. and Ulrich, C. M.: "5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and leukemia risk: a HuGE minireview" *Am J Epidemiol* (2003) **157**(7): 571-82.
- Rocha, J. C., Cheng, C., *et al.*: "Pharmacogenetics of outcome in children with acute lymphoblastic leukemia" *Blood* (2005) **105**(12): 4752-8.
- Rollins, N., Winick, N., *et al.*: "Acute methotrexate neurotoxicity: findings on diffusion-weighted imaging and correlation with clinical outcome" *AJNR Am J Neuroradiol* (2004) **25**(10): 1688-95.
- Roser, W., Hagberg, G., *et al.*: "Proton MRS of gadolinium-enhancing MS plaques and metabolic changes in normal-appearing white matter" *Magn Reson Med* (1995) **33**(6): 811-7.
- Ross, J. S., Stagliano, N. E., *et al.*: "Atherosclerosis and cancer: common molecular pathways of disease development and progression" *Ann N Y Acad Sci* (2001) **947**: 271-92; discussion 292-3.
- Rubnitz, J. E., Relling, M. V., *et al.*: "Transient encephalopathy following high-dose methotrexate treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia" *Leukemia* (1998) **12**(8): 1176-81.
- Rüttger-Janssen, N.: "Möglichkeiten der computertomographischen und magnetresonanztomographischen Bildgebung des zentralen Nervensystems während der Behandlung von akut-lymphoblastischen Leukämien und lymphoblastischen Non-Hodgkin-Lymphomen" Dissertation an der RWTH Aachen (2001).
- Sandoval, C., Kutscher, M., *et al.*: "Neurotoxicity of intrathecal methotrexate: MR imaging findings" *AJNR Am J Neuroradiol* (2003) **24**(9): 1887-90.
- Schmeling: "Influence of MTHFR polymorphisms on efficacy and toxicity of methotrexate in patients with juvenile idiopathic arthritis" *J Rheumatol* (2005) **39**: 1832-6.
- Schnakenberg, E., Mehles, A., *et al.*: "Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and susceptibility to pediatric acute lymphoblastic leukemia in a German study population" *BMC Med Genet* (2005) **6**: 23.

- Schneider JA, R. D., Liu YT, Clegg JB: "Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation" *Am J Hum Genet* (1998) **62**: 1258 - 60.
- Schneider, J. A., Rees, D. C., *et al.*: "Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation" *Am J Hum Genet* (1998) **62**(5): 1258-60.
- Schrapppe, M.: "Prognostic factors in childhood acute lymphoblastic leukemia" *Indian J Pediatr* (2003) **70**(10): 817-24.
- Schrapppe, M., Harbott, J., *et al.* (2006). Akute lymphoblastische Leukämien. in: Pädiatrische Hämatologie und Onkologie. G. Gadener, Niemeyer, Ritter, Springer-Verlag.
- Seidemann, K., Book, M., *et al.*: "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* (2006) **85**(5): 291-300.
- Sharp, L. and Little, J.: "Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review" *Am J Epidemiol* (2004) **159**(5): 423-43.
- Shaw, G. M., Rozen, R., *et al.*: "Maternal vitamin use, genetic variation of infant methylenetetrahydrofolate reductase, and risk for spina bifida" *Am J Epidemiol* (1998) **148**(1): 30-7.
- Shimasaki, N., Mori, T., *et al.*: "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* (2006) **28**(2): 64-8.
- Shimasaki, N., Mori, T., *et al.*: "Influence of MTHFR and RFC1 Polymorphisms on Toxicities During Maintenance Chemotherapy for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia or Lymphoma" *J Pediatr Hematol Oncol* (2008) **30**(5): 347-352.
- Shuper, A., Stark, B., *et al.*: "Methotrexate treatment protocols and the central nervous system: significant cure with significant neurotoxicity" *J Child Neurol* (2000) **15**(9): 573-80.
- Shuper, A., Stark, B., *et al.*: "Methotrexate-related neurotoxicity in the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia" *Isr Med Assoc J* (2002) **4**(11): 1050-3.
- Skibola, C. F., Forrest, M. S., *et al.*: "Polymorphisms and haplotypes in folate-metabolizing genes and risk of non-Hodgkin lymphoma" *Blood* (2004) **104**(7): 2155-62.
- Skibola, C. F., Smith, M. T., *et al.*: "Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults" *Proc Natl Acad Sci U S A* (1999) **96**(22): 12810-5.
- Smith, M. T., McHale, C. M., *et al.*: "Molecular biomarkers for the study of childhood leukemia" *Toxicol Appl Pharmacol* (2005) **206**(2): 237-45.
- Smulders, Y. M., de Man, A. M., *et al.*: "Trimethoprim and fasting plasma homocysteine" *Lancet* (1998) **352**(9143): 1827-8.
- Spence, J. D., Bang, H., *et al.*: "Vitamin Intervention for Stroke Prevention Trial: An Efficacy Analysis" *Stroke* (2005) **36**(11): 2404-2409.

- Stanger, O., Dierkes, J., *et al.*: "Konsensuspapier der D.A.CH.-Liga Homocystein über den rationellen klinischen Umgang mit Homocystein, Folsäure und B-Vitaminen bei kardiovaskulären und thrombotischen Erkrankungen - Richtlinien und Empfehlungen" *Journal für Kardiologie* (2003) **10**(5): 190-199.
- Stankova, J., Lawrance, A. K., *et al.*: "Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): a novel target for cancer therapy" *Curr Pharm Des* (2008) **14**(11): 1143-50.
- Stanulla M, S. K., Schnakenberg E, Book M, Mehles A, Welte K, Schrappe M, Reiter A: "2005 Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C>T polymorphism and risk of pediatric non-Hodgkin lymphoma in a German study population" *BLOOD* (2005) **105**(2): 906-907.
- Starkebaum, G. and Harlan, J. M.: "Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine" *J Clin Invest* (1986) **77**(4): 1370-6.
- Sterba, J., Dusek, L., *et al.*: "Pretreatment plasma folate modulates the pharmacodynamic effect of high-dose methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphoma: "folate overrescue" concept revisited" *Clin Chem* (2006) **52**(4): 692-700.
- Stern, C.: "The Hardy–Weinberg law" *Science* (1943) **97**.
- Stern, L. L., Mason, J. B., *et al.*: "Genomic DNA hypomethylation, a characteristic of most cancers, is present in peripheral leukocytes of individuals who are homozygous for the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene" *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (2000) **9**(8): 849-53.
- Stott, D. J., MacIntosh, G., *et al.*: "Randomized controlled trial of homocysteine-lowering vitamin treatment in elderly patients with vascular disease" *Am J Clin Nutr* (2005) **82**(6): 1320-6.
- Stover, P. J.: "Physiology of folate and vitamin B12 in health and disease" *Nutr Rev* (2004) **62**(6 Pt 2): S3-12; discussion S13.
- Strunk, T., Gottschalk, S., *et al.*: "Subacute leukoencephalopathy after low-dose intrathecal methotrexate in an adolescent heterozygous for the MTHFR C677T polymorphism" *Med Pediatr Oncol* (2003) **40**(1): 48-50.
- Summers, C. M., Hammons, A. L., *et al.*: "Influence of the cystathionine beta-synthase 844ins68 and methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T polymorphisms on folate and homocysteine concentrations" *Eur J Hum Genet* (2008).
- Sun, D. F., Weng, Y. R., *et al.*: "Knock-down of methylenetetrahydrofolate reductase reduces gastric cancer cell survival: An in vitro study" *Cell Biol Int* (2008).
- Surtees, R., Clelland, J., *et al.*: "Demyelination and single-carbon transfer pathway metabolites during the treatment of acute lymphoblastic leukemia: CSF studies" *J Clin Oncol* (1998) **16**(4): 1505-11.
- Surtees, R., Leonard, J., *et al.*: "Association of demyelination with deficiency of cerebrospinal-fluid S-adenosylmethionine in inborn errors of methyl-transfer pathway" *Lancet* (1991) **338**(8782-8783): 1550-4.
- Suzuki, T., Matsuo, K., *et al.*: "One-carbon metabolism-related gene polymorphisms and risk of breast cancer" *Carcinogenesis* (2008) **29**(2): 356-62.

- Sydow, K. and Boger, R. H.: "[Homocysteine, endothelial dysfunction and cardiovascular risk: pathomechanisms and therapeutic options]" *Z Kardiol* (2001) **90**(1): 1-11.
- Taub, J. W., Matherly, L. H., *et al.*: "Polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methotrexate sensitivity in childhood acute lymphoblastic leukemia" *Leukemia* (2002) **16**(4): 764-5.
- The Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) 2 Investigators: "Homocysteine Lowering with Folic Acid and B Vitamins in Vascular Disease" *N Engl J Med* (2006) **354**(15): 1567-1577.
- Thirumaran, R. K., Gast, A., *et al.*: "MTHFR genetic polymorphisms and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia" *Blood* (2005) **106**(7): 2590-1; author reply 2591-2.
- Toffoli, G., Veronesi, A., *et al.*: "MTHFR gene polymorphism and severe toxicity during adjuvant treatment of early breast cancer with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil (CMF)" *Ann Oncol* (2000) **11**(3): 373-4.
- Treon, S. P. and Chabner, B. A.: "Concepts in use of high-dose methotrexate therapy" *Clin Chem* (1996) **42**(8 Pt 2): 1322-9.
- Trippett, T., Schlemmer, S., *et al.*: "Defective transport as a mechanism of acquired resistance to methotrexate in patients with acute lymphocytic leukemia" *Blood* (1992) **80**(5): 1158-62.
- Tutuncu, N. B., Erbas, T., *et al.*: "Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase enzyme genotype is frequent in type 2 diabetic patients with normal fasting homocysteine levels" *J Intern Med* (2005) **257**(5): 446-53.
- Ueland, P. M., Hustad, S., *et al.*: "Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism" *Trends Pharmacol Sci* (2001) **22**(4): 195-201.
- Ulrich, C. M., Curtin, K., *et al.*: "Polymorphisms in the reduced folate carrier, thymidylate synthase, or methionine synthase and risk of colon cancer" *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (2005) **14**(11 Pt 1): 2509-16.
- Ulrich, C. M., Yasui, Y., *et al.*: "Pharmacogenetics of methotrexate: toxicity among marrow transplantation patients varies with the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism" *Blood* (2001) **98**(1): 231-4.
- Upchurch, G. R., Jr., Welch, G. N., *et al.*: "Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase" *J Biol Chem* (1997) **272**(27): 17012-7.
- Urano, W., Taniguchi, A., *et al.*: "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* (2002) **12**(3): 183-90.
- Usenius, T., Usenius, J. P., *et al.*: "Radiation-induced changes in human brain metabolites as studied by <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy in vivo" *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (1995) **33**(3): 719-24.
- Valerino, D. M., Johns, D. G., *et al.*: "Studies of the metabolism of methotrexate by intestinal flora. I. Identification and study of biological properties of the metabolite 4-amino-4-deoxy-N<sup>10</sup>-methylptericoic acid" *Biochem Pharmacol* (1972) **21**(6): 821-31.

- van der Put, N. M., Steegers-Theunissen, R. P., *et al.*: "Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida" *Lancet* (1995) **346**(8982): 1070-1.
- van der Put, N. M., van Straaten, H. W., *et al.*: "Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview" *Exp Biol Med* (Maywood) (2001) **226**(4): 243-70.
- van Dongen, J. J., Seriu, T., *et al.*: "Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood" *Lancet* (1998) **352**(9142): 1731-8.
- Vecchi, M., Sacchi, E., *et al.*: "Inflammatory bowel diseases are not associated with major hereditary conditions predisposing to thrombosis" *Dig Dis Sci* (2000) **45**(7): 1465-9.
- Vežmar S, B. A., Bode U, Jaehde U: "Biochemical and Clinical Aspects of Methotrexate Neurotoxicity" *Chemotherapy* (2003) **49**: 92-104.
- Vežmar, S., Becker, A., *et al.*: "Biochemical and Clinical Aspects of Methotrexate Neurotoxicity" *Chemotherapy* (2003) **49**: 92-104.
- Wadia, R. S., Bandishti, S., *et al.*: "B12 and folate deficiency: incidence and clinical features" *Neurol India* (2000) **48**(4): 302-4.
- Wald, D. S., Law, M., *et al.*: "Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis" *BMJ* (2002) **325**(7374): 1202-1206.
- Waldrop, S. M., Davis, P. C., *et al.*: "Treatment of brain tumors in children is associated with abnormal MR spectroscopic ratios in brain tissue remote from the tumor site" *AJNR Am J Neuroradiol* (1998) **19**(5): 963-70.
- Walker, R. W., Allen, J. C., *et al.*: "Transient cerebral dysfunction secondary to high-dose methotrexate" *J Clin Oncol* (1986) **4**(12): 1845-50.
- Wei, J. and Hemmings, G. P.: "Allelic association of the MTHFR gene with schizophrenia" *Mol Psychiatry* (1999) **4**(2): 115-6.
- Weisman, M. H., Furst, D. E., *et al.*: "Risk genotypes in folate-dependent enzymes and their association with methotrexate-related side effects in rheumatoid arthritis" *Arthritis Rheum* (2006) **54**(2): 607-12.
- Welch, G. N. and Loscalzo, J.: "Homocysteine and atherothrombosis" *N Engl J Med* (1998) **338**(15): 1042-50.
- Westerhof, G. R., Schornagel, J. H., *et al.*: "Carrier- and receptor-mediated transport of folate antagonists targeting folate-dependent enzymes: correlates of molecular-structure and biological activity" *Mol Pharmacol* (1995) **48**(3): 459-71.
- Widemann, B. C. and Adamson, P. C.: "Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity" *Oncologist* (2006) **11**(6): 694-703.
- Wiemels, J. L., Cazzaniga, G., *et al.*: "Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children" *Lancet* (1999) **354**(9189): 1499-503.
- Wiemels, J. L., Smith, R. N., *et al.*: "Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia" *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001) **98**(7): 4004-9.
- Wilcken, B., Bamforth, F., *et al.*: "Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR):

- findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide" *J Med Genet* (2003) **40**(8): 619-25.
- Wilcken, D. E.: "MTHFR 677C-->T mutation, folate intake, neural-tube defect, and risk of cardiovascular disease" *Lancet* (1997) **350**(9078): 603-4.
- Yamada, K., Chen, Z., *et al.*: "Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase" *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001) **98**(26): 14853-8.
- Yim, Y. S., Mahoney, D. H., Jr., *et al.*: "Hemiparesis and ischemic changes of the white matter after intrathecal therapy for children with acute lymphocytic leukemia" *Cancer* (1991) **67**(8): 2058-61.
- Yoo, J. H., Choi, G. D., *et al.*: "Pathogenicity of thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase for vascular dementia" *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2000) **20**(8): 1921-5.
- Ziereisen, F., Dan, B., *et al.*: "Reversible acute methotrexate leukoencephalopathy: atypical brain MR imaging features" *Pediatr Radiol* (2006) **36**(3): 205-12.
- Zintzaras, E., Uhlig, K., *et al.*: "Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism as a risk factor for diabetic nephropathy: a meta-analysis" *J Hum Genet* (2007) **52**(11): 881-90.

## **DANKSAGUNG**

Herzlich danken möchte ich Herrn Professor Rolf Mertens für die Übernahme der Betreuung meiner Dissertation, ganz besonders Fr. Dr. Lisa Lassay für ihr stetes Ermutigen und Drängen und insbesondere meiner Familie und allen anderen Betroffenen für ihre Geduld.

Weiterhin zu Dank verpflichtet bin ich Frau Dr. Nicole Heussen für Ihre Hilfe bei statistischen Fragen und nicht zuletzt den Patienten und Ihren Eltern.

## **ERKLÄRUNG § 5 ABS.1 ZUR DATENAUFBEWAHRUNG**

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin und der Klinik für Neuroradiologie des Universitätsklinikums Aachen hinterlegt sind.

## LEBENS LAUF

Peter Deutz

geboren am 16.4.1968

in Aachen

ledig, 2 Kinder

1974- 78: Grundschule

1978-87: Einhard-Gymnasium, Aachen

06/87 : Abitur

12/87-07/89: Zivildienst

1990-96 Medizinstudium RWTH Aachen

03/94: 1.Staatsexamen

03/96: 2.Staatsexamen

04/96-04/97: Praktisches Jahr Uniklinik Aachen

5/97: 3. Staatsexamen und Approbation

ab 09/97: AiP bzw. Assistenzarzt Kinderklinik Aachen mit Schwerpunkt Kinder-  
onkologie

05/06: Facharzt für Kinder- und Jugendmedizin