

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für
Kinder- und Jugendmedizin
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



Direktor: Prof. Dr. med. Dieter Körholz

**Methylentetrahydrofolatreduktasegenpolymorphismen und Toxizität und Effektivität
von Methotrexat bei juveniler idiopathischer Arthritis**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Daniel Franz Biber
geboren am 07.07.1977 in Mussenhausen

Betreuer: Prof. Dr. med. Gerd Horneff

Gutachter:

Prof. Dr. med. Gerd Horneff (Bonn)
Prof. Dr. med. Gernot Keyßer
Prof. Dr. med. Günter Klaus (Marburg)

23.11.2006
04.06.2007

urn:nbn:de:gbv:3-000011946
[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000011946>]

Zielsetzung: Untersuchung des Einflusses des C677T- bzw. A1298C-Genpolymorphismus im Methylentetrahydrofolatreduktasegen (MTHFR-Gen) auf Toxizität und Effektivität von Methotrexat bei juveniler idiopathischer Arthritis

Methoden: Die Mutationsanalyse im MTHFR-Gen erfolgte mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion, Restriktionsenzymverdau und gelelektrophoretischer Auftrennung. Die erforderlichen klinischen Daten zur Erhebung von Toxizität und Effektivität wurden retrospektiv aus Krankenakten der Patienten erhoben.

Ergebnisse: Der C677T Polymorphismus war mit einer höheren Wahrscheinlichkeit von Nebenwirkungen assoziiert. 677T – Allelträger erlitten häufiger Nebenwirkungen als Patienten ohne Mutation. Wurden 677CT- mit 677CC-Patienten verglichen, ergaben sich signifikante Unterschiede hinsichtlich Nebenwirkungen im Allgemeinen, Transaminasenanstieg, Erbrechen sowie GI-Symptomen. Bei der Betrachtung des 1298A→C Polymorphismus ergab sich kein Zusammenhang bezüglich der Methotrexatverträglichkeit. Der A1298C Polymorphismus hingegen wies eine Korrelation zu besserem Therapieerfolg auf. Träger des Allels 1298C zeigten unter Therapie mit Methotrexat bessere Entzündungsparameter als Patienten ohne Mutation und erreichten häufiger Normwerte für BSG bzw. CRP. Klinisch boten 1298C–Allelträger unter Therapie weniger schmerzhafte Gelenke als 1298AA – Patienten. 1298AC-Patienten präsentierten unter Methotrexattherapie niedrigere Entzündungswerte, litten unter weniger schmerzhaften Gelenken und erreichten häufiger Normwerte für BSG bzw. CRP. Dagegen zeigten die 677C→T Genotypen keine Assoziation mit der Effektivität der Behandlung.

Zusammenfassung: Bei der Behandlung der juvenilen idiopathischen Arthritis mit Methotrexat scheint der C677T Polymorphismus mit einer höheren Wahrscheinlichkeit von Nebenwirkungen - der A1298C Polymorphismus hingegen mit besserem Therapieerfolg assoziiert zu sein.

Biber, Daniel Franz: Methylentetrahydrofolatreduktasegenpolymorphismen und Toxizität und Effektivität von Methotrexat bei juveniler idiopathischer Arthritis. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 63 Seiten, 2006

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 Juvenile idiopathische Arthritis	1
1.1.1 ILAR-Klassifikationskriterien für die juvenile idiopathische Arthritis	2
1.1.2 Therapie der JIA	6
1.1.3 Prognose der JIA	9
1.2 Methotrexat	9
1.2.1 Molekularer Wirkungsmechanismus von Methotrexat	10
1.2.2 Antientzündliche Wirkungen von Methotrexat	11
1.2.3 Pharmakologisches Profil von Methotrexat	12
1.2.4 Nebenwirkungen der Methotrexattherapie	12
1.3 Der Methylentetrahydrofolatreduktasegenpolymorphismus	14
1.3.1 Der C677T Polymorphismus	15
1.3.2 Der A1298C Polymorphismus	15
1.4 Ziel der Arbeit	16

2. Patienten, Materialen und Methoden

16

3. Ergebnisse

18

3.1 Der 677C→T Polymorphismus	18
3.2 Der 1298A→C Polymorphismus	19
3.3 Genotypenkombinationen 677C→T und 1298A→C	20
3.4 Korrelation der MTHFR-Polymorphismen mit der Toxizität von Methotrexat	21
3.4.1 Der 677C→T Polymorphismus und Nebenwirkungen	22
3.4.1.1 Vergleich Wildtyp Patienten mit Trägern des Allels 677T	23
3.4.1.2 Vergleich 677CC- mit 677CT-Patienten	26
3.4.2 Der 1298A→C Polymorphismus und Nebenwirkungen	28
3.4.2.1 Vergleich Wildtyp Patienten mit Trägern des Allels 1298C	28
3.4.2.2 Vergleich 1298AA- mit 1298AC-Patienten	31

3.5 Korrelation der MTHFR-Polymorphismen mit der Effektivität von Methotrexat	33
3.5.1 Der 677C→T Polymorphismus und Effektivität	33
3.5.1.1 Vergleich Wildtyp Patienten mit Trägern des Allels 677T	35
3.5.1.2 Vergleich 677CC- mit 677CT-Patienten	38
3.5.2 Der 1298A→C Polymorphismus und Effektivität	41
3.5.2.1 Vergleich Wildtyp Patienten mit Trägern des Allels 1298C	42
3.5.2.2 Vergleich 1298AA- mit 1298AC-Patienten	46
3.6 Genotypenkombinationen und Toxizität bzw. Effektivität	49
4. Diskussion	49
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	49
4.2 Zum 677C→T Polymorphismus und dessen Einfluss auf Toxizität	50
4.3 Zum 1298A→C Polymorphismus und dessen Einfluss auf Effektivität	52
4.4 Unterschiedliche Effekte der MTHFR Genpolymorphismen	53
5. Literaturverzeichnis	55
6. Thesen	61

1. Einleitung

1.1 Juvenile idiopathische Arthritis

Die juvenile idiopathische Arthritis (JIA) ist die häufigste chronisch entzündlich rheumatische Erkrankung im Kindesalter. Sie stellt eine fortschreitende Gelenkentzündung dar, die zu Schäden an Knorpel, Kapselbandapparat und gelenknahem Knochen führen kann. Auch eine Beteiligung innerer Organe ist möglich. Die Diagnose JIA steht für eine chronische, mindestens 6 Wochen persistierende Arthritis mit einem Erkrankungsbeginn im Alter von unter 16 Jahren, bei Ausschluss anderer Ursachen (Arthritis bei Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa, reaktive Arthritis, infektiöse Arthritis u.a. - Liste bei Brewer et al., 1977). Der Begriff der juvenilen idiopathischen Arthritis (JIA) soll nach den Empfehlungen der International League of Associations for Rheumatology (ILAR) und der WHO die zuvor gebräuchlichen Bezeichnungen juvenile Arthritis, juvenile rheumatische Arthritis (JRA) und juvenile chronische Arthritis (JCR) ersetzen. Nach den ILAR-Klassifikationskriterien existieren 7 Unterformen der JIA (siehe 1.1.1).

Zentrales Symptom aller JIA-Formen ist die Arthritis, die mit Schwellung, Schmerz und Bewegungseinschränkungen sowie mit Überwärmung und Ergussbildung einhergehen kann. Typischerweise klagen die Kinder über eine Morgensteifigkeit der Gelenke. Aus der chronischen Arthritis können schnell funktionelle Einschränkungen, Fehlhaltungen und Gelenkdeformierungen resultieren. Häufig ergeben sich nach langem Krankheitsverlauf Ulnardeviationen oder Bajonett-Deformitäten im Handgelenk sowie Radialdeviationen in Metacarpophalangealgelenken. Ebenso kommt es zu Wachstumsstörungen mit Minder-/Mehrwachstum der Gliedmaßen. Eine Beteiligung des Achsenskeletts, häufig der Halswirbelsäule, ist vor allem bei der systemischen Arthritis sowie bei der rheumafaktornegativen und rheumafaktorpositiven Polyarthritis zu beobachten. Das etwaige Auftreten von Tendopathien und Baker-Zysten ist allen JIA Formen gemeinsam. Vor allem bei frühem Auftreten der Erkrankung kann die motorische aber auch die psychosoziale Entwicklung im Kindesalter stark behindert werden.

Die Ätiologie der JIA ist bis heute weitgehend ungeklärt. Als mögliche auslösende Ursachen dürften Traumen und Stress, Infektionen, autoimmunologische Vorgänge und genetische Disposition eine Rolle spielen. Umfassende Untersuchungen ergaben für Deutschland eine Inzidenz von 5 - 6/100 000 und eine Prävalenz von 20 - 30/100 000 Kinder und Jugendliche

unter 16 Jahren (Truckenbrodt, 2002). Im Vergleich dazu, beträgt die Inzidenz der akuten lymphatischen Leukämie (ALL), der häufigsten malignen Erkrankung im Kindesalter 3,5/100 000 Kindern unter 15 Jahren (Graf, 2002).

1.1.1 ILAR-Klassifikationskriterien für die juvenile idiopathische Arthritis

Nach den ILAR-Klassifikationskriterien für die juvenile idiopathische Arthritis erfolgt nach Ablauf von 6 Erkrankungsmonaten und klinischer Beobachtung des Verlaufs eine Einteilung der Erkrankung in eine von 7 Subtypen. Im Folgenden sollen die einzelnen Subtypen der JIA und die aktuellen ILAR-Klassifikationskriterien (nach Hofer et Southwood, 2002) kurz aufgezeigt werden. Für jede ILAR-Kategorie müssen die jeweils angegebenen Ausschlusskriterien berücksichtigt werden:

Ausschlusskriterien:

- (a) Ärztlich gesicherte Psoriasis beim Patienten selbst oder bei einem Verwandten 1. Grades
- (b) Arthritis bei einem HLA-B27 positiven Jungen mit Krankheitsbeginn nach dem 6. Lebensjahr
- (c) Ankylosierende Spondylitis, Enthesitis-assoziierte Arthritis, Sakroiliitis bei entzündlicher Darmerkrankung, Reiter Syndrom, akute anteriore Uveitis bei einem Verwandten 1. Grades
- (d) Rheumafaktor-Nachweis bei zwei Untersuchungen im Abstand von mindestens 3 Monaten
- (e) Zeichen der systemischen Arthritis

1. Systemische Arthritis (Still-Syndrom)

Arthritis und Fieber (in Zusammenhang mit der Arthritis auftretend oder dieser vorausgehend für mindestens 2 Wochen Dauer und an mindestens 3 Tagen intermittierend bis 39°C und mehr) + eins der folgenden Kriterien:

- Exanthem
- Generalisierte Lymphknotenschwellungen
- Hepato- und/oder Splenomegalie
- Serositis

Ausschlusskriterien: a, b, c, d

Das Still-Syndrom tritt in jedem Alter auf, unter Umständen schon im 1. Lebensjahr, bei 2/3 der Patienten tritt die Erkrankung im 2. bis 4. Lebensjahr auf (Woo et Wedderburn, 1998). Eine geschlechterspezifische Häufung ist nicht vorhanden. Das Leitsymptom dieser Kategorie ist das intermittierende Fieber mit Spitzen über 39°C. Meist nur während des Fiebers zeigt sich vorzugsweise am Stamm und über den großen Gelenken ein lachsfarbenes polymorphes Exanthem. Die Arthritis manifestiert sich als Mon-, Oligo- oder Polyarthritis. Sie kann in Zusammenhang mit dem Fieber auftreten, kann aber auch initial nicht erkennbar sein und erst nach Wochen, Monaten, evtl. auch erst nach Jahren zum Vorschein kommen. Eine Achsenskelettbeteiligung mit Befall der Halswirbelsäule ist im Verlauf der Erkrankung häufig. Extraartikulär können sich Tenosynovitiden manifestieren. Die inneren Organe sind bei dieser Form der JIA in unterschiedlichem Ausmaß beteiligt. Häufig zeigt sich eine Lymphadenopathie, sowie eine Hepato- und Splenomegalie. Es können Myokarditiden, Perikarditiden, Pleuritiden und Peritonitiden auftreten. Auch eine zerebrale Beteiligung mit Müdigkeit und meningealer Reizung ist möglich. Selten tritt beim Still-Syndrom eine Uveitis auf. Labormedizinisch zeigt sich eine hohe Entzündungsaktivität mit stark beschleunigter BSG, erhöhtem CRP, Leukozytose mit Linksverschiebung, Thrombozytose und hypochromer Anämie. Antinukleäre Antikörper sind nicht nachzuweisen. Die Erkrankung verläuft typischerweise schubartig, wobei im Verlauf die Arthritis in den Vordergrund tritt und die systemischen Symptome nachlassen. Verschiedene Infektionen werden als auslösende Faktoren für ein Wiederauftreten systemischer Symptome nach beschwerdefreiem Intervall angesehen (De Vere-Tyndall et al., 1984). Aufgrund der systemischen Manifestationen, bietet sich ein breites differentialdiagnostisches Spektrum. So müssen z.B. schwere Verläufe bakterieller und viral er Infektionen, Leukämien, Lymphome, ein systemischer Lupus erythematodes, Vaskulitiden, genetische episodische Fiebersyndrome u.s.w. ausgeschlossen werden.

2. Rheumafaktor-negative Polyarthritis (mindestens 5 betroffene Gelenke in den ersten 6 Erkrankungsmonaten)

Ausschlusskriterien: a, b, c, d, e

An der Rheumafaktor-negativen Polyarthritis erkranken vor allem Mädchen in der ersten und zweiten Lebensdekade. Zu Beginn des Krankheitsverlaufes kann sich der Gelenkbefall symmetrisch oder asymmetrisch präsentieren, wobei die Polyarthritis große und kleine Gelenke befallen kann; häufig sind Handgelenke und Halswirbelsäule betroffen. Nicht selten

sind bei dieser Beginnform Tenosynovitiden Ausdruck der extraartikulären Manifestation, zudem besteht ein Uveitisrisiko. Eine radiologische Progression ist sehr variabel. BSG und CRP sind teilweise erhöht, die Erkrankung kann jedoch auch mit Normwerten einhergehen. Antinukleäre Antikörper sind in 25% der Fälle positiv, was oft mit einem aggressiveren Verlauf der Erkrankung verbunden ist (Davidson, 2000).

3. Rheumafaktor-positive Polyarthritis (mindestens 5 betroffene Gelenke in den ersten 6 Erkrankungsmonaten, mindestens 2maliger Nachweis von RF im Abstand von 3 Monaten)

Ausschlusskriterien: a, b, c, e

Auch an der Rheumafaktor-positiven Polyarthritis erkranken überwiegend Mädchen, mit einer Häufung nach dem 12. Lebensjahr. Bei symmetrischem Gelenkbefall, mit in der Regel mehr als zehn betroffenen Gelenken, treten häufig Tenosynovitiden der Hand auf. Auch Rheumaknötchen zeigen sich bei einem Teil der Patienten; andere extraartikuläre Manifestationen sind dagegen selten. Antinukleäre Antikörper sind bei 50-70% der betroffenen Kinder nachweisbar.

4. Oligoarthritis (1 – 4 betroffene Gelenke in den ersten 6 Erkrankungsmonaten)

(a) persistierende Oligoarthritis (nicht mehr als 4 betroffene Gelenke im Verlauf)

Ausschlusskriterien: a, b, c, d, e

Der Erkrankungsbeginn der Oligoarthritis liegt im Vorschulalter, Mädchen sind häufiger betroffen als Jungen. Meist sind die größeren Gelenke, darunter vor allem Knie-, Hand- und Sprunggelenke, bei dieser Form der JIA betroffen. In über 50% der Fälle äußert sich die Oligoarthritis im Befall des Kniegelenks. Nur selten ist das Achsenskelett beteiligt. Hinsichtlich des Gelenkbefalls werden vier Verteilungsmuster unterschieden:

- nur große Gelenke
- nur kleine Gelenke
- kleine und große Gelenke – obere Extremität bevorzugt
- kleine und große Gelenke – untere Extremität bevorzugt

Durch den oft schleichenden Verlauf der Erkrankung, bestehen zum Zeitpunkt der Diagnose häufig schon Fehlhaltungen oder Kontrakturen, auch Beinlängendifferenzen können als Folge der Entzündung beobachtet werden. Von großer Bedeutung ist die chronische Uveitis, die in bis zu 40% der Fälle auftritt, meist ohne äußere Symptome verläuft und nur durch Spaltlampenuntersuchung zu erkennen ist. Komplikationen der chronischen Uveitis sind

hintere Synechien mit drohendem Sekundärglaukom, sowie Keratopathie, Katarakt und Ophthalmophthisis. Die Entzündungsparameter sind häufig nur mäßig erhöht oder im Normbereich, Antinukleäre Antikörper sind in 50-75% der Fälle nachweisbar.

(b) extended Oligoarthritis (mehr als 4 betroffene Gelenke im Verlauf)

Ausschlusskriterien: a, b, c, d, e

Die extended Oligoarthritis stellt lediglich eine Sonderform der Oligoarthritis dar, bei der im Krankheitsverlauf mehr als 4 Gelenke betroffen sind.

5. Enthesitis-assoziierte Arthritis

Arthritis und Enthesitis oder

Arthritis oder Enthesitis + mindestens zwei der folgenden Kriterien:

- Druckschmerz über den Iliosakralgelenken und/oder entzündlicher Rückenschmerz im Lumbosakralbereich
- HLA-B27 – Nachweis
- Junge mit Erkrankungsalter > 6 Jahre
- HLA-B27 assoziierte Erkrankung bei einem Angehörigen 1. Grades (ankylosierende Spondylitis, Enthesitis-assoziierte Arthritis, Sakroiliitis bei entzündlicher Darmerkrankung, Reiter-Syndrom, akute anteriore Uveitis)

Ausschlusskriterien: a, d, e

Diese JIA-Kategorie beschreibt eine Oligoarthritis, die meist in der zweiten Lebensdekade bei männlichen Jugendlichen auftritt. Der asymmetrische Gelenkbefall betrifft typischerweise das Knie-, Sprung- oder Handgelenk. Die untere Extremität ist bevorzugt betroffen. Häufig ist diese Unterform mit Enthesiopathien, vorwiegend im Fußbereich, und Rückenschmerzen vergesellschaftet. Initial selten, jedoch im Verlauf häufig, tritt eine Sakroiliitis auf. Mögliche weitere extraartikuläre Manifestationen sind neben den Tendopathien auch ein Erythema nodosum und eine anteriore Uveitis, mit konjunktivaler Rötung, Schmerzen und Lichtscheu. IgM-Rheumafaktoren und antinukleäre Antikörper lassen sich nicht nachweisen, jedoch zeigt sich in über 80% der Fälle eine Assoziation mit HLA-B27.

6. Psoriasisarthritis

Arthritis und Psoriasis oder

Arthritis + mindestens zwei der folgenden Kriterien:

- Daktylitis

- Nagelauffälligkeiten (Tüpfel oder Onycholyse)
 - Ärztlicherseits bestätigte Psoriasis bei einem Angehörigen 1. Grades
- Ausschlusskriterien b, c, d, e

Typisch für die Psoriasisarthritis ist ein oligoartikulärer Gelenkbefall, gelegentlich kommen auch polyartikuläre Verlaufsformen vor. Die Arthritis zeigt sich meist in den Finger- bzw. Zehengelenken, ebenso charakteristisch ist der Befall der Finger- oder Zehengelenke im Strahl (Daktylitis). Wie bei der Oligoarthritis werden unterschiedliche Verteilungsmuster hinsichtlich des Gelenkbefalles unterschieden:

- nur große Gelenke
- nur kleine Gelenke
- kleine und große Gelenke – obere Extremität bevorzugt
- kleine und große Gelenke – untere Extremität bevorzugt
- kleine und große Gelenke – keine Bevorzugung
- Beteiligung des Achsenskeletts: Sakroiliitis (häufig erst im Verlauf)

Das typische Erkrankungsalter liegt in der zweiten Lebensdekade, Mädchen sind häufiger betroffen als Jungen. Die Psoriasis kann gleichzeitig mit der Arthritis auftreten, kann aber auch erst im Verlauf der Erkrankung hinzutreten (Southwood, 1998). Die Nagelauffälligkeiten finden sich bei 70-80% der Kinder. Zusätzlich können Enthesiopathien und eine akute Uveitis auftreten. Die Erkrankung verläuft häufig mit radiologischer Progression.

7. unklassifizierbare Arthritis

Sind keine der obigen Kategorien 1-6 erfüllt bzw. mehrere Kategorien zutreffend, erfolgt die Klassifikation in diese Untergruppe.

1.1.2 Therapie der JIA

Die Therapie der juvenilen idiopathischen Arthritis ist symptomatisch. Sie erfolgt in enger Kooperation von Ärzten unterschiedlicher Fachrichtung (Pädiater, pädiatrische Rheumatologen, Orthopäden und Ophthalmologen) sowie Physio- und Ergotherapeuten.

Die Physiotherapie hilft, frühzeitig begonnen, Gelenkkontrakturen und Fehlstellungen zu verhindern oder zu korrigieren, der ergotherapeutische Bereich umfasst die Verbesserung von Gelenkfunktionen. Zusätzlich ist die Anfertigung von Lagerungs- und Funktionsschienen

sowie die Hilfsmittelversorgung wichtig. Operative Eingriffe, meist als Ultima ratio, umfassen Synovektomien, Korrekturen von Kontrakturen und Fehlstellungen sowie den Gelenkersatz. Wichtigstes therapeutisches Standbein bei der Behandlung der chronischen Arthritis ist die medikamentöse Therapie. Die Behandlung folgt dabei keinesfalls einem strengen Stufenkonzept, vielmehr folgt sie individuell angepasst an JIA-Typ, Krankheitsaktivität, Verlauf und Prognose.

Folgende Medikamentengruppen stehen zur Verfügung:

1. Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR)

Der Wirkungsmechanismus der nichtsteroidalen Antirheumatika beruht im Wesentlichen auf einer Hemmung der Prostaglandin- und Thromboxansynthese, einer Gruppe von Mediatoren, welche u.a. eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen, sowie bei der Entstehung von Fieber und Schmerzen spielen. Pharmakologischer Angriffspunkt ist das im menschlichen Organismus ubiquitär vorhandene Enzym Cyclooxygenase (COX), welche von den einzelnen NSAR auf unterschiedliche Weise gehemmt wird. Von der COX existieren die zwei Isoformen COX-1 und COX-2, welche sich durch ihre Gewebeverteilung unterscheiden. So findet sich das Isoenzym COX-1 im Körpergewebe andauernd und ubiquitär, COX-2 hingegen präsentiert sich vor allem temporär, wie zum Beispiel bei Gewebeschädigungen bzw. entzündlichen Reizen in Makrophagen oder Synovialgewebe (Laufer et al., 2002). Mit ihrer analgetischen, antiphlogistischen und z.T. antipyretischen Wirkung stellen sie die erste Stufe der medikamentösen Therapie dar, und können für sich allein bei einem Teil der an JIA erkrankten Kindern schon eine adäquate medikamentöse Therapieform darstellen. Unerwünschte Arzneimittelwirkungen der NSAR betreffen den Gastrointestinaltrakt (Schmerzen, Übelkeit, Erbrechen, erhöhtes Ulzerarisiko), die Niere (Ödeme, Hypertonie, Nierenschäden bei Langzeitanwendung), die Leber (Enzymerhöhung, selten dauerhafte Schäden), das ZNS (Kopfschmerzen, psychische Alterationen), die Haut (allergische und toxische Reaktionen) und die Gerinnung. Häufig zum Einsatz kommende NSAR sind z.B. Ibuprofen, Naproxen, Diclofenac und Indometacin.

2. Steroide

Führt die Therapie mit nichtsteroidalen Antirheumatika nicht zum Erfolg, dann erfolgt üblicherweise der Einsatz von Steroiden. Neben der hocheffektiven entzündungshemmenden Potenz, wirken Steroide vor allem im Hinblick auf die JIA antiproliferativ und

immunsuppressiv. Die antiphlogistische Wirkung wird im Wesentlichen durch die Beeinflussung der Transkription, und damit durch die Beeinflussung der Synthese von an Entzündungsmechanismen beteiligten Proteinen (proinflammatorische Zytokine, COX-2) hervorgerufen. Das membranstabilisierende Potential der Steroide unterstützt den entzündungshemmenden Effekt. Vor allem bei länger durchgeföhrter und hochdosierter systemischer Applikation ist die Steroidtherapie mit einer Reihe erheblicher Nebenwirkungen behaftet: Cushing-Syndrom, Wachstumshemmung, Hypertonie, Ulcus ventriculi, prodiabetische Wirkung, Osteoporose, aseptische Knochennekrosen, erhöhtes Infektionsrisiko, Glaukom/Katarakt, Hautatrophie usw. Weitgehend ohne systemische Nebenwirkungen behaftet, ist die topische (intraartikuläre, konjunktivale) Anwendung.

3. Basistherapeutika und Immunsuppressiva

Basistherapeutika (Disease Modifying Antirheumatic Drugs – DMARDs) können die Progression der Erkrankung in unterschiedlichem Maße beeinflussen, verlangsamen und sogar Teil- oder Vollremissionen erreichen. Basistherapeutika werden heute nicht mehr nur zur Therapie schwerer Verläufe eingesetzt, vielmehr kommen sie oft schon sehr früh zum Einsatz, um irreparable Schäden durch den destruktiven Krankheitsverlauf der JIA zu vermeiden. Zu den Basistherapeutika gehören zahlreiche Substanzen über deren Wirkungsmechanismen oft nur geringe Kenntnisse vorhanden sind. Zum Teil verursachen diese Medikamente erhebliche Nebenwirkungen. Zur Behandlung der JIA kommen im wesentlichen Chloroquin und Hydroxychloroquin, Sulfasalazin sowie die Immunsuppressiva Cyclosporin A, Azathioprin und Methotrexat (MTX) in Frage. Auf die Wirkung von Langzeittherapeutika, im speziellen Methotrexat, wird in Kapitel 1.2 näher eingegangen.

4. Immunmodulatorische Therapieansätze

In den letzten Jahren ist der Zytokinhemmstoff des Tumornekrosefaktor α (TNF α), Etanercept, viel versprechend zur Anwendung gekommen, und der Nutzen in der Behandlung der JIA bereits durch kontrollierte Studien und positive Therapieerfahrungen belegt (Lovell et al., 2000).

1.1.3 Prognose der JIA

Die unterschiedlichen JIA-Formen, Geschlecht, Erkrankungsalter und individueller Krankheitsverlauf haben großen Einfluss auf die Prognose der juvenilen idiopathischen Arthritis, so dass Aussagen zu Prognose der JIA nur sehr schwer möglich sind. In aktuellen Studien zeigten Kinder mit oligoartikulärer Beginnform in 22-41% der Fälle eine persistierende aktive Arthritis über einen Zeitraum von über 10 Jahren, 27-48% der Kinder mit systemischen und ca. 50% der Kinder mit polyartikulärem Beginn wiesen eine über 10jährige aktive Arthritis auf (Petty, 1999). Mädchen scheinen ein fünfmal höheres Risiko für persistierende Krankheitsaktivität zu haben als Jungen (Ansell, 1999).

Bezüglich der Mortalitätsrate sind im Wesentlichen die Kinder mit systemischer Arthritis gefährdet (Mortalitätsrate < 1%). Neben kardiologischen Komplikationen im Rahmen der Grunderkrankung, kommen Amyloidose, Makrophagenaktivierungssyndrom sowie therapiebedingte Komplikationen als Todesursache in Frage (Wallace, 1991).

Obwohl eine kausale Behandlung der juvenilen idiopathischen Arthritis derzeit noch nicht zur Verfügung steht, kann der chronische Entzündungsprozess mit Hilfe des mehrdimensionalen Therapieansatzes langfristig durchaus eingeschränkt bzw. aufgehalten, und die Chance auf eine gute Prognose verbessert werden.

1.2 Methotrexat

Bereits 1948 wurde Methotrexat (MTX) als Nachfolger von Aminopterin zur Behandlung von Tumorleiden entwickelt. Zur Behandlung der rheumatoide Arthritis (RA) wurde das Medikament erst in den 80er Jahren breiter angewendet. Zuvor erschienen lediglich vereinzelte Berichte über den Einsatz von Methotrexat bei verschiedenen rheumatischen Erkrankungen. Bei der RA gehört Methotrexat bereits seit langem zu den am erfolgreichsten eingesetzten Basistherapeutika. In der Kinderheumatologie hat sich Methotrexat als sehr gut wirksames Medikament etabliert. Seit 2004 besteht für Methotrexat in Deutschland zur Therapie der JIA eine Zulassung. Die Wirksamkeit der Substanz ist in kontrollierten Doppelblindstudien bereits nachgewiesen (Giannini et al., 1992).

1.2.1 Molekularer Wirkungsmechanismus von Methotrexat

Durch die chemische Abwandlung der Folsäure wurde der Folsäureantagonist Methotrexat als ein hochselektives, falsches Substrat des Enzyms Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) entwickelt (Kremer JM, 1999). Im Stoffwechsel vermittelt die DHFR die Bildung von Tetrahydrofolat (FH_4), die biologisch aktive Form des Vitamins Folsäure. Als Coenzym für die Übertragung von 1-Kohlenstoffresten, spielt FH_4 für eine Reihe von Biosynthesen eine wichtige Rolle (Löffler, 2001), wobei im Hinblick auf den Wirkungsmechanismus von Methotrexat folgende biochemischen Reaktionen im Folsäurestoffwechsel von Bedeutung sind:

- FH_4 liefert zwei Kohlenstoffeinheiten für die Purinnucleotidsynthese
- FH_4 stellt die Methylgruppe für die Biosynthese des Thymins
- Durch Kohlenstoffübertragung von 5-Methyl-Tetrahydrofolat wird aus Homocystein Methionin synthetisiert. Aus Methionin entsteht wiederum S-Adenosyl-Methionin (SAM). SAM liefert die Methylgruppen bei über 100 Methylierungsreaktionen, so z.B. für die Methylierung von DNA, RNA und Proteinen, sowie für die Biosynthese von Lipiden und Neurotransmittern (Ueland, 1982).

Methotrexat, das intrazellulär als Polyglutamat gespeichert wird, besitzt eine wesentlich höhere Affinität zur DHFR als die Folsäure selbst (Mutschler, 1996). Allein schon aufgrund den beschriebenen zahlreichen Beziehung des Folsäuremetabolismus zu verschiedenen Biosynthesen, wird die inhibitorische Wirkung von MTX auf die Synthese von DNA, RNA, Aminosäuren, Proteinen und Phospholipiden, und damit auf den gesamten Zellstoffwechsel und die Zellproliferation deutlich.

Neben der Hemmung der Dihydrofolat-Reduktase fungiert Methotrexat auch als potenter Inhibitor der Methylentetrahydrofolatreduktase (Chabner et al., 1985). Außerdem sind mittlerweile weitere Wirkungsmechanismen von Methotrexat beschrieben. So Darunter die Hemmung der THYM – Synthetase (THYM = Thymidilat), ein Enzym der Pyrimidinsynthese, der GAR-Transformylase (GAR = Glycinamid-ribonucleotid), sowie der AICAR-Transformylase (AICAR = 5-Aminoimidazol-4-carboxamid-ribonucleotid), zwei Enzyme der Purinbiosynthese (Ranganathan P et al., 2003). Von größerer Bedeutung scheint dabei die Hemmung der AICAR-Transformylase zu sein, welche zudem auch indirekt über den DHFR-Mechanismus, durch MTX inhibiert wird. Es resultiert eine Akkumulation von AICAR, was über weitere Stoffwechselschritte letztlich zu einem Anstieg von extrazellulärem Adenosin führt (Cronstein BN et al., 1993). Viele der antientzündlichen Effekte von MTX

konnten in Zusammenhang mit erhöhten Adenosinkonzentrationen gebracht werden (Cutolo M et al., 2001). Ob dabei tatsächlich ein bestimmter Mechanismus die entscheidende Rolle in der antientzündlichen Wirkung von MTX bei rheumatischen Erkrankungen spielt, ist dabei immer noch Gegenstand der Forschung. Zudem ergeben sich Hinweise, dass einzelne Wirkmechanismen unterschiedlichen Einfluss auf Wirksamkeit bzw. Toxizität der MTX-Therapie haben.

1.2.2 Antientzündliche Wirkungen von Methotrexat

Die antientzündliche Potenz von Methotrexat ist zu einem gewissen Teil sicherlich durch dessen antiproliferative Wirkung zu erklären. So verursachte beispielsweise Methotrexat in Studien eine Herabsetzung der Proliferation von Lymphozyten (Olsen et al., 1989) und Fibroblasten (Rosenblatt DS et al., 1978). Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass Methotrexat eine Hemmung des klonalen Wachstums von T- und B-Zellen hervorruft (Nakajima et al., 1996). Von vielleicht sogar größerer Bedeutung scheint jedoch die äußerst vielfältige Wirkung auf Zytokinebene zu sein. So konnten unter Methotrexatherapie bei Patienten mit rheumatoider Arthritis geringere Serumspiegel an Interferon- γ (INF- γ) und Interleukin-6 (IL-6) gemessen werden (Kraan et al, 2004). Methotrexat hemmt die Zytokinproduktion aktiver T-Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass Methotrexat die T-Zell vermittelte Produktion der Zytokine Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-13 (IL-13), Tumornekrosefaktor α (TNF α), Interferon- γ (INF- γ) und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimuliernder-Faktor (GMCSF) hemmt, und diese Hemmung eine Folge der Interferenz mit der Purin- bzw. Pyrimidinsynthese darstellt, die Zytokinsynthese durch Monozyten wurde dagegen kaum beeinflusst (Gerards et al. 2003). Die Produktion von Leukotrien-B4 in Neutrophilen Zellen von RA Patienten wird durch Methotrexat gehemmt (Sperling et al., 1992). Aus den Einflüssen auf die Produktion der Zytokine, ergeben sich zahlreiche weitere immunmodulatorische Effekte. So ergeben sich Interaktionen mit der Synthese von Chemokine, matrixzerstörende Enzyme, Prostaglandine, C-reaktivem Protein und natürlich auf die Expression vieler weiterer Zytokine.

1.2.3 Pharmakologisches Profil von Methotrexat

Methotrexat steht in oraler, subkutaner, intramuskulärer und intravenöser Applikationform zur Verfügung. Die mittlere Bioverfügbarkeit nach oraler und parenteraler Gabe beträgt 70% (Laufer et al., 2002), es sind jedoch erhebliche Schwankungen (25-100%) möglich (Rau, 2000). Methotrexat weist eine Plasmaproteinbindung von weniger als 50% auf, und wird über ein aktives Transportsystem ins Zellinnere aufgenommen, und zu Polyglutamataten metabolisiert, wodurch es für einen langen Zeitraum im Zellinneren gehalten wird (Galivan J, 1980). Die Eliminationshalbwertszeit beträgt 6-8 Stunden (Laufer et al., 2002), jedoch ist auch hier eine erhebliche Schwankungsbreite bekannt. 50-80% werden unverändert durch glomeruläre Filtration und 9-26% mit der Galle ausgeschieden (Rau, 2000), wobei ein erheblicher enterohepatischer Kreislauf existiert.

Bei einer üblichen Dosierung von $10-15\text{mg}/\text{m}^2\text{Körperoberfläche/Woche}$ in der Therapie der JIA, ist nach einer Latenz von 4-8 Wochen mit einem Einsetzen der Wirkung zu rechnen. Klinische Parameter einer erfolgreichen Methotrexattherapie sind Verringerung der Anzahl an schmerzhaften, geschwollenen und bewegungseingeschränkten Gelenken, sowie eine Besserung der Morgensteifigkeit. Laborchemisch ist der Rückgang der Entzündungsparameter (CRP, BSG) für eine Einschätzung des Therapieerfolges von Bedeutung.

1.2.4 Nebenwirkungen der MTX-Therapie

Die Therapie von rheumatischen Erkrankungen mit Methotrexat ist mit einer Reihe von möglichen Nebenwirkungen behaftet. Im Wesentlichen scheinen die Nebenwirkungen mit dem Folsäure-Antagonismus zusammenhängen:

Gastrointestinaltrakt

Häufige Nebenwirkungen die den Gastrointestinaltrakt betreffen sind Ekel, Übelkeit, Erbrechen und Transaminasenanstieg. Ekel, Übelkeit und Erbrechen treten innerhalb kurzer Zeit nach Medikamentenapplikation auf und halten meist nur ein paar Stunden bis Tage an. Ein Anstieg der Transaminasen ist wohl eine der am häufigsten beobachteten Nebenwirkung während der Therapie mit Methotrexat. Die Transaminasenerhöhung tritt dabei häufig zu Beginn der Therapie auf. Bei Patienten mit RA oder Psoriasis existieren zahlreiche Studien,

die sich mit der Hepatotoxizität einer Methotrexattherapie in niedrigen Dosen beschäftigen. In Leberbiopsie-Studien an RA Patienten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen vor und während laufender Methotrexatbehandlung (Rau, 2000). Die Hepatotoxizität scheint bei Psoriatikern jedoch größer zu sein als bei Patienten mit RA (Schmidt, 2000).

Haut

Häufiger treten Stomatitis und Haarausfall auf. Seltener sind das Auftreten von Exanthenen, Vaskulitis sowie Rheumaknoten (Nodulosis).

Blut/Knochenmark

Nebenwirkungen, die das hämatopoetische System betreffen sind seltene Komplikationen der Methotrexatmedikation. Meist äußern sich diese Komplikationen in einer Leukopenie. Auch Thrombozytopenien, Granulozytopenien und (makrozytäre) Anämien sind mögliche Erscheinungsformen der Knochenmarksdepression.

Lunge

Seltene aber potentiell lebensbedrohliche Nebenwirkung stellt die interstitielle Pneumonitis dar. Bei RA Patienten wird die Häufigkeit der interstitiellen Pneumonitis zwischen 5 und 7% angegeben (Schmidt, 2000). Das Auftreten der Nebenwirkung scheint von Dosis und Therapiedauer unabhängig zu sein.

Infektionen

Begünstigt durch den immunsuppressiven Effekt von Methotrexat besteht ein erhöhtes Infektionsrisiko.

Sonstige Nebenwirkungen

Weitere seltene Nebenwirkungen betreffen die Nieren (eingeschränkte Nierenfunktion), das ZNS (Kopfschmerzen, Schwindel, Konzentrationsstörungen, Stimmungsveränderungen) und die Gonaden (Oligospermie, Impotenz und Gynäkomastie). Kontrovers diskutiert wird, ob die Behandlung mit Methotrexat durch die Osteoblastenhemmung eine Osteoporose verstärken kann. Obwohl Methotrexat kein karzinogenes Potential zugeschrieben wurde (Rustin et al., 1983), sind doch Fälle mit Tumoren beschrieben worden, darunter auch ein Hodgkin-

Lymphom bei JIA (Padeh et al., 1997). Es besteht eine hohe Teratogenität sowie Embryo- und Fetotoxizität.

1.3 Der Methylentetrahydrofolatreduktasegenpolymorphismus

Ein Schlüsselenzym des Folsäuremetabolismus ist die 5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR), welche die Reduktion von 5,10-Methylentetrahydrofolat zu 5-Methyltetrahydrofolat katalysiert (Abbildung 1). In einem Vitamin B₁₂ abhängigen Reaktionsschritt wird Homocystein mit 5-Methyltetrahydrofolat zu Methionin remethyliert. ATP-abhängig entsteht aus Methionin in einem weiteren Schritt S-Adenosyl-Methionin (SAM), das als Methylgruppenlieferant für eine Reihe wichtiger Synthesen dient (DNA- und RNA-Synthese, Proteinbiosynthese). Die 5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase wird von Methotrexat in seiner polyglutaminierten Form direkt gehemmt (Chabner et al., 1985).

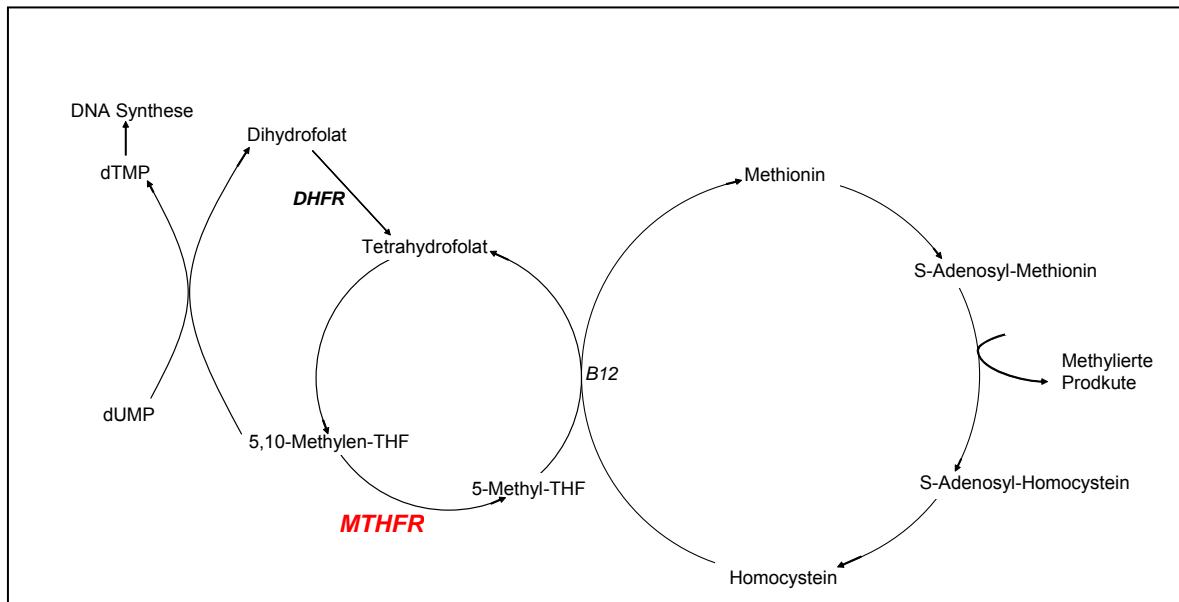


Abb. 1 Die 5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase als Schlüsselenzym im Folsäuremetabolismus

Das cytosolische Enzym MTHFR wird auf Chromosom 1p36.3 kodiert (Goyette et al., 1994). Zahlreiche Polymorphismen im MTHFR-Gen wurden bereits beschrieben. In der vorliegenden Arbeit sollen der C677T- sowie der A1298C-Polymorphismus betrachtet werden.

1.3.1 Der C677T Polymorphismus

1995 wurde erstmals der C677T-Polymorphismus beschrieben. Hierbei ergibt sich im MTHFR-Gen an Position 677 ein Basenaustausch von Cytosin zu Thymin (C677→T), was auf Proteinebene zur Substitution von Alanin durch Valin im katalytischen Zentrum der MTHFR führt (Frosst et al., 1995). Dieser Aminosäureaustausch führt zu einer thermolabileren Variante der MTHFR mit verminderter Enzymaktivität. Der heterozygote Genotyp 677CT zeigt eine Enzymaktivität von ca. 65% und der homozygote Genotyp 677TT von ca. 30%, verglichen mit der Aktivität des Wildtyps 677CC (Frosst et al., 1995). Durch die deutlich reduzierte Enzymaktivität lassen sich bei 677TT-Homozygoten außerdem erhöhte Homocysteinplasmaspiegel messen (Frosst et al., 1995). Der Genotyp 677TT ist zudem mit erniedrigten Folsäureplasmaspiegeln verbunden, verglichen mit den Genotypen 677CT und 677CC. (van der Put et al., 1998).

1.3.2 Der A1298C Polymorphismus

Ein weiterer Polymorphismus im MTHFR-Gen bewirkt einen Basenaustausch an Position 1298 von Adenin zu Cytosin (A1298→C), was auf Aminosäurenebene zu einer Substitution von Glutamat zu Alanin in der regulatorischen Domäne des Enzyms führt. Auch dieser Polymorphismus führt sowohl in der heterozygoten, als auch in der homozygoten Form zu einer im Vergleich zum Wildtyp reduzierten Enzymaktivität von ca. 80% beim Genotyp 1298AC bzw. ca. 60% beim Genotyp 1298CC (van der Put et al., 1998). Im Gegensatz zum C677T-Polymorphismus konnte beim A1298C-Polymorphismus, für sich allein betrachtet, weder ein Zusammenhang mit verstärkter Thermolabilität noch mit erhöhten Homocysteinplasmaspiegeln nachgewiesen werden (Weisberg et al., 2001). Ebenso bleibt der Folsäureplasmaspiegel unbeeinflusst vom A1298C-Polymorphismus, wenn der C677T-Polymorphismus nicht miteinbezogen wird (van der Put et al., 1998). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass kombiniert Heterozygote mit dem Genotyp 677CT/1298AC eine geringere Enzymaktivität aufweisen, als Individuen mit dem Typ 677CT/1298AA oder 677CC/1298AC. Verglichen mit dem 677CT/1298AA-Genotyp führt der kombiniert heterozygote Genotyp 677CT/1298AC zu erhöhten Homocysteinspiegeln und erniedrigten Folsäureplasmaspiegeln (van der Put et al., 1998).

1.4 Ziel der Arbeit

In zahlreichen Studien wurden bereits Assoziationen des Polymorphismus mit verschiedenen Erkrankungen untersucht. So konnten z.B. Zusammenhänge mit dem Risiko für akute lymphatische Leukämie (Skibola et al., 1999), für Kolorektale Karzinome (Chen et al., 1996), Neuralrohrdefekte (Ou et al., 1996), nicht syndromaler Lippen-Kiefer-Gaumenspalte (Prescott et al., 2002), oder koronarerterielle Erkrankungen (Kluijtmans et al., 1997) aufgezeigt werden. Auch bezüglich der Wirksamkeit und Toxizität von Methotrexat bei der Therapie verschiedener Erkrankungen, darunter auch rheumatoide Arthritis, konnten Zusammenhänge zum C677T- bzw. A1298C-Polymorphismus nachgewiesen werden. Einzelheiten dazu sollen in der Diskussion (Kapitel 4) abgehandelt werden. Ziel dieser Arbeit ist zu untersuchen, ob bei Kindern, die an juveniler idiopathischer Arthritis erkrankt sind, einen Zusammenhang zwischen C677T- bzw. A1298C-Polymorphismus und der Verträglichkeit bzw. Wirksamkeit von MTX besteht. Dazu wurden retrospektiv Effektivitätsmerkmale (Entzündungsparameter und Gelenkstatus) sowie Nebenwirkungen unter der Therapie mit MTX dokumentiert und anschließend die Patienten hinsichtlich der beiden Genpolymorphismen untersucht.

2. Patienten, Materialen und Methoden

Patienten:

58 Patienten (43 weibliche und 15 männliche) mit JIA, die regelmäßig an der Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in Behandlung waren, und die MTX per os für mindestens 3 Monate erhielten, wurden für diese Arbeit einbezogen. Eine gleichzeitige Behandlung mit TNF-Inhibitoren galt als Ausschlusskriterium. Alle Patienten wurden nach den ILAR Klassifikationskriterien eingeteilt: 21 Patienten litten unter Rheumafaktor-negativer, 8 unter Rheumafaktor-positiver Polyarthritis; 14 Patienten waren an Oligoarthritis erkrankt, 7 an Enthesitis-assoziierter Arthritis, 4 an Psoriasisarthritis, 2 an systemischer Arthritis und 2 Patienten waren nicht klassifizierbar. Das mittlere Erkrankungsalter lag bei $6,9 \pm 4,0$ Jahren (Min – Max: 1,1 – 14,5 Jahre), die MTX-Therapie wurde im Mittel mit $10,0 \pm 4,2$ Jahren (Min – Max: 2,3 – 19,3 Jahre) begonnen. Die mittlere Behandlungsdauer und damit die retrospektive Beobachtungszeit betrug $157,0 \pm 115,7$ Wochen (Min – Max: 12 – 459 Wochen)

mit einer Dosierung von im Mittel $12,8 \pm 2,6$ mg/m² Körperoberfläche (Min – Max: 8,4 – 20,5 mg/m²). Während der Behandlungszeit wurde bei keinem Patienten eine Folsäuresubstitution durchgeführt.

Erhebung von Nebenwirkungen und klinischer Effektivität:

Die erforderlichen Daten wurden retrospektiv aus den Krankenakten der Patienten erhoben. Dies erfolgte ohne Kenntnis des jeweiligen Genpolymorphismus. Nebenwirkungen wurden aufgezeichnet, wenn sie während der Methotrexattherapie auftraten und eindeutig auf diese zurückzuführen waren. Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST) wurden als erhöht bezeichnet, wenn sie mindestens auf das doppelte der Norm erhöht waren. Bei erhöhten Werten für ALT bzw. AST erfolgte eine Therapiepause bis sich die Lebertransaminasen normalisiert hatten. Zur Beurteilung der Effektivität der Behandlung wurden das C-reaktive Protein (CRP, Normwert: CRP \leq 6mg/l), die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG, Normwert: BSG \leq 15mm/h), sowie die Anzahl an geschwollenen und schmerzhaften Gelenken zum einen vor Therapiebeginn mit MTX erhoben, zum anderen wurde dann vergleichend dazu als zweiter Erhebungszeitpunkt der jeweils aktuellste, während laufender Methotrexattherapie, ambulante bzw. stationäre Vorstellungstermin gewählt. Wurde die Therapie mit Methotrexat abgebrochen, so konnte im Rahmen der retrospektiven Datenerhebung der Abbruchgrund häufig nicht eindeutig dem Versagen oder der Unverträglichkeit der Therapie zugeordnet werden. Die Abbruchrate als Kriterium für Effektivität bzw. Toxizität der Methotrexattherapie wurde deshalb nicht herangezogen.

Mutationsanalyse:

Alle Personen wurden über die Intention dieser Studie informiert und ausschließlich nach Einverständniserklärung in die Untersuchung aufgenommen. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg geprüft und befürwortet. Die Mutationsanalyse beruhte auf Standardmethoden in der Molekularbiologie. Sie wurde von Dr. Siegrid Heins im Forschungslabor der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität Halle-Wittenberg durchgeführt.

Die Isolation der DNA erfolgte aus EDTA Blut. Anschließend wurden mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion die Bereiche um den möglichen Nukleotidaustausch an den Positionen 677 bzw. 1298 des MTHFR-Gens amplifiziert. Der 677C→T Polymorphismus

führt zu einem Basenaustausch von Cytosin zu Thymin, was eine *HinfI*-Restriktionsschnittstelle einfügt. Das Vorhandensein der Schnittstelle wurde mittels des Restriktionsenzymes *HinfI* nach den Methoden von Frosst et al. (1995) untersucht. Der zweite Polymorphismus ergibt eine Basensubstitution von Adenin zu Cytosin. Dadurch wird eine vorhandene *MboII*-Schnittstelle zerstört, was mit Hilfe des Restriktionsenzymes *MboII* nach Hanson et al. (2001) nachgewiesen wurde. Nach dem Restriktionsverdau erfolgte die gelelektrophoretische Analyse der Fragmente.

Statistik:

Für die Erfassung der Daten wurde das Programm Excel für Windows® (Microsoft) verwendet, für die statistische Auswertung das Programmpaket SPSS® (SPSS Inc.). Um zu entscheiden, ob ein bestimmter Genotyp in Zusammenhang mit Toxizität bzw. Effektivität steht, wurden Gruppenvergleiche bezüglich kategorialer Daten (Nebenwirkungen ja/nein; normale Entzündungsparameter ja/nein) anhand des Chi² Test bzw. Fisher's exact Test ausgewertet. Fisher's exact Test wurde als Alternative zum Chi² Test gewählt, wenn dessen Anforderungen nicht erfüllt waren (Weiß, 2002). Gruppenvergleiche hinsichtlich der Merkmale BSG, CRP, Anzahl geschwollener Gelenke und Anzahl schmerzhafter Gelenke erfolgten anhand des Kruskall-Wallis- bzw. Mann-Whitney – Test. Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgesetzt. Als Maß für das Risiko wurden das Odds Ratio (OR) sowie das 95%ige Konfidenzintervall (CI) berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Der 677C→T Polymorphismus

Aus allen DNA-Proben der 58 JIA-Patienten konnte nach der PCR die Restriktionsspaltung des 198-bp MTHFR-Fragment mit *HinfI* erfolgreich durchgeführt werden. Durch einen etwaigen Basenaustausch wird das 198bp Genfragment in ein 175bp und ein 23bp Fragment gespalten. Damit zeigen bei der Agarosegelelektrophorese Wildtyp (CC) Individuen ein 198-bp Fragment, Homozygote (TT) ein 175-bp Fragment und Heterozygote (CT) beide, 175- und 198-bp Fragmente.

29 Patienten (50,0%) zeigten den MTHFR-Genotyp 677CC, 26 Patienten (44,8%) waren heterozygot mit dem Genotyp 677CT und 3 Patienten (5,2%) wiesen die homozygote Variante 677TT auf.

Tabelle 1 Verteilung des MTHFR 677C→T Genotyps und Allelfrequenzen

Anzahl	677C→T Polymorphismus			Allelfrequenz	
	CC	CT	TT	C	T
58	29 (50,0%)	26 (44,8%)	3 (5,2%)	0,72	0,28

58 Patienten wurden hinsichtlich des 677C→T Polymorphismus genotypisiert. Anschließend wurden die Allelfrequenzen berechnet.

3.2 Der 1298A→C Polymorphismus

Der 1298A→C Polymorphismus konnte bei 56 Patienten untersucht werden, bei zwei Patienten war der Restriktionsverdau erfolglos und ergab kein Ergebnis. Die DNA der Wildtyp-Variante (AA) erscheint bei gelelektrophoretischer Auf trennung als ein 176-bp Fragment (mit drei kleineren Fragmenten mit 22-, 28- und 30-bp), bei Homozygoten für das 1298C Allel zeigt sich ein 204-bp Fragment (mit zwei kleineren 22- und 30-bp Fragmenten), und 1298AC-Heterozygote präsentieren 176- und 204-bp Fragmenten (mit den beiden kleinen 28- und 30-bp Fragmenten).

Den MTHFR-Genotyp 1298AA wiesen 31 Patienten (55,4%) auf, 21 Patienten (37,5%) zeigten die heterozygote Variante 1298AC und 4 Patienten (7,1%) waren homozygot für das Allel 1298C.

Tabelle 2 Verteilung des MTHFR 1298A→C Genotyps und Allelfrequenzen

Anzahl	1298A→C Polymorphismus			Allelfrequenz	
	AA	AC	CC	A	C
56	31 (55,4%)	21 (37,5%)	4 (7,1%)	0,74	0,26

56 Patienten konnten hinsichtlich des 1298A→C Polymorphismus genotypisiert werden. Anschließend wurden die Allelfrequenzen berechnet.

3.3 Genotypenkominationen 677C→T und 1298A→C

Bei 56 Patienten wurden die Kombinationen der MTHFR-Genotypen untersucht. Aufgrund der fehlenden zwei Mutationsanalysen des 1298A→T Polymorphismus wurden zwei Individuen mit Genotyp 677CC bzw. 677CT nicht mit in Betracht gezogen. Die Verteilung der möglichen Kombinationen zeigt Tabelle 3. Die Genotypenvarianten 677TT/1298AC, 677CT/1298CC und 677TT/1298CC sind nicht aufgetreten. 8 Patienten (14,3%) erwiesen sich als kombiniert heterozygot.

Tabelle 3 Kombinationen der MTHFR-Genotypen
(677C→T und 1298A→C)

MTHFR	677CC	677CT	677TT
1298AA	11 (19,6%)	17 (30,4%)	3 (5,4%)
1298AC	13 (23,2%)	8 (14,3%)*	-
1298CC	4 (7,1%)	-	-

n=56; * definiert als kombiniert heterozygot

3.4 Korrelation der MTHFR-Polymorphismen mit der Toxizität von Methotrexat

Bei 26 Patienten (44,8%) traten unter der Behandlung mit Methotrexat Nebenwirkungen auf. Bei 19 Patienten (32,8%) zeigte sich ein Anstieg der Transaminasen (TA-Anstieg) auf mindestens das doppelte des Normalwertes, Übelkeit trat bei 12 (20,7%) und Erbrechen bei 5 Patienten (8,6%) auf. Jeweils 3 Patienten (5,2%) klagten über Bauchschmerzen bzw. Haarausfall nach Einnahme von Methotrexat. Symptome wie Bauchschmerzen, Übelkeit und Erbrechen wurden zudem zu gastrointestinalen Nebenwirkungen (GI-Symptome) zusammengefasst, sie traten bei insgesamt 14 Patienten (24,1%) auf.

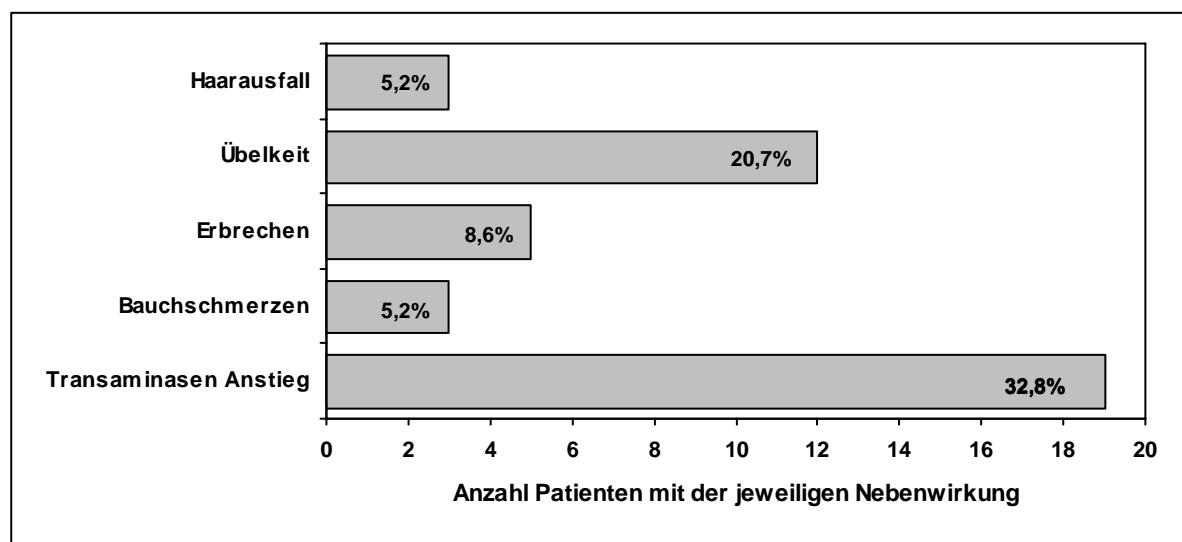


Abb. 2 Häufigkeitsverteilung der Nebenwirkungen unter n= 58 Patienten

Wie bereits erwähnt, wurden Nebenwirkungen nur aufgezeichnet, wenn sie während der Methotrexatherapie auftraten und eindeutig auf diese zurückzuführen waren. Dennoch sollte untersucht werden, ob Patienten, die außer Methotrexat weitere Medikamente einnahmen, häufiger unter dem Auftreten von Nebenwirkungen zu leiden hatten.

Bis auf 5 Patienten wurden alle anderen Patienten gleichzeitig mit nichtsteroidalen Antirheumatika behandelt. 3 (60,0%) von den 5 Patienten, die nicht gleichzeitig mit NSAR behandelt wurden, wiesen Nebenwirkungen auf, im Gegensatz zu 23 (43,4%) von 53 Patienten, die Methotrexat und NSAR gleichzeitig erhielten. Ebenso erhielten lediglich 10

Patienten zusätzlich keine Steroide, wohingegen 48 Patienten parallel mit Steroiden (oral, mit einer maximalen Dosierung von 10mg/Tag) therapiert wurden. Unter den 10 Patienten die keine Steroide zu sich nahmen klagten 4 Patienten (40,0%) über Nebenwirkungen. Unter den 48 Patienten, die zusätzlich Methotrexat erhielten, zeigten sich bei 22 Patienten (46,8%) Nebenwirkungen. 21 Patienten standen unter einer Kombinationstherapie mit Sulfasalazin (n=16), Chloroquin (n=5), Cyclosporin A (n=1) oder Goldsalz (n=1), 37 Patienten dagegen erhielten nur Methotrexat. Von den 21 Patienten die neben Methotrexat weitere sog. DMARDs erhielten, wiesen 11 Patienten (52,4%) Nebenwirkungen auf, im Gegensatz zu 16 (43,2%) von insgesamt 37 Patienten, die nicht unter einer Kombinationstherapie mit DMARDs standen. Es zeigte sich in keinem der betrachteten Fälle ein Zusammenhang zwischen der Kombination von Medikamenten und dem Auftreten von Nebenwirkungen ($p>0,05$; χ^2 -Test bzw. Fisher's Exact test).

3.4.1 Der 677C→T Polymorphismus und Nebenwirkungen

Der Zusammenhang zwischen dem 677C→T Polymorphismus und dem Auftreten von Nebenwirkungen (Transaminasenanstieg, Übelkeit, Erbrechen, Bauchschmerzen und Haarausfall) unter der Therapie mit Methotrexat wurde bei allen 58 Patienten untersucht. Unter den 29 Patienten mit dem Genotyp 677CC, traten bei 9 Patienten (31,0%) Nebenwirkungen auf, unter den 26 Patienten mit dem heterozygotem Genotyp 677CT bei 17 Patienten (65,4%). Bei den nur 3 Patienten mit der homozygoten Variante 677TT zeigten sich keine Nebenwirkungen. Damit ergibt sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem MTHFR 677C→T Polymorphismus und dem Auftreten von Nebenwirkungen ($p<0,05$; χ^2 -Test).

Tabelle 4 MTHFR 677C→T Polymorphismus und Nebenwirkungen

MTHFR Genotyp	Nebenwirkungen		Total
	nein	ja	
677CC	20	9	29
677CT	9	17	26
677TT	3	-	3
Total	32	26	58

Verteilung der Nebenwirkungen unter den einzelnen MTHFR 677C→T Genotypen

3.4.1.1 Vergleich Wildtyp Patienten mit Trägern des Allels 677T

Um die Auswirkungen des Polymorphismus auf das Auftreten von Nebenwirkungen zu untersuchen, wurden die drei Genotypen zunächst in zwei Gruppen eingeteilt:

- ohne T: Patienten ohne Mutation an Position 677, also mit Genotyp 677CC
- mit T: Patienten, welche Träger des Allels 677T sind, also Patienten mit Genotyp 677CT sowie Patienten mit Genotyp 677TT

29 Patienten haben keine Mutation an Position 677 (ohne T) und 29 Patienten sind Allelträger (mit T). Nebenwirkungen im Zusammenhang mit der Methotrexattherapie waren bei Trägern des Allels 677T signifikant häufiger (58,6%), als bei Patienten ohne Mutation (31,0%) ($p<0,05 \chi^2$ -Test). Das Odds Ratio von Trägern der Mutation zu Wildtyp Patienten mindestens eine Nebenwirkung zu erleiden, beträgt damit 3,15 : 1 (95% CI 1,07 – 9,26). Wurden die Nebenwirkungen einzeln untersucht, ergaben sich die in Tabelle 5 dargestellten Häufigkeitsverteilungen.

Tabelle 5 Einzelne Nebenwirkungen und MTHFR Genotyp

MTHFR	Nebenwirkungen					
	TA-Anstieg	Übelkeit	Erbrechen	Bauchschmerzen	GI-Symptome	Haarausfall
ohne T (n=29)	5 (17,2%)	4 (13,8%)	-	1 (3,4%)	4 (13,8%)	2 (6,9%)
mit T (n=29)	14 (48,3%)	8 (27,6%)	5 (17,2%)	2 (6,9%)	10 (34,5%)	1 (3,4%)
	p*<0,05	NS*	NS [#]	NS [#]	NS*	NS [#]

p*<0,05 (χ^2 -Test); NS* = nicht signifikant (χ^2 -Test); NS[#] = nicht signifikant (Fisher's Exact Test)

Ein signifikanter Zusammenhang ergibt sich hinsichtlich der Häufigkeit erhöhter Lebertransaminasen. Unter den Patienten, die das Allel 677T tragen, trat unter Methotrexattherapie bei 17 Patienten (48,3%) ein Transaminasenanstieg auf, im Vergleich zu 5 Patienten (17,2%), die 677CC homozygot sind. Das Odds Ratio eines Transaminasenanstiegs von Allelträgern beträgt das 4,48fache des Odds Ratio von Wildtyp Patienten (95% CI 1,34 – 14,99). Zwar traten bei 677CT/TT Patienten auch häufiger Übelkeit, Erbrechen und Bauchschmerzen auf, als bei 677CC Patienten – so litten 10 677CT/TT

Patienten (34,5%) und 4 677CC Patienten (13,8%) unter gastrointestinalen Nebenwirkungen – ein statistisch gesicherter Zusammenhang ist damit jedoch nicht nachzuweisen ($p>0,05$ χ^2 -Test bzw. Fisher's Exact test). Auch bezüglich der Häufigkeit von Haarausfall ergibt sich kein gesicherter Zusammenhang mit dem 677C→T Polymorphismus ($p>0,05$ Fisher's Exact test).

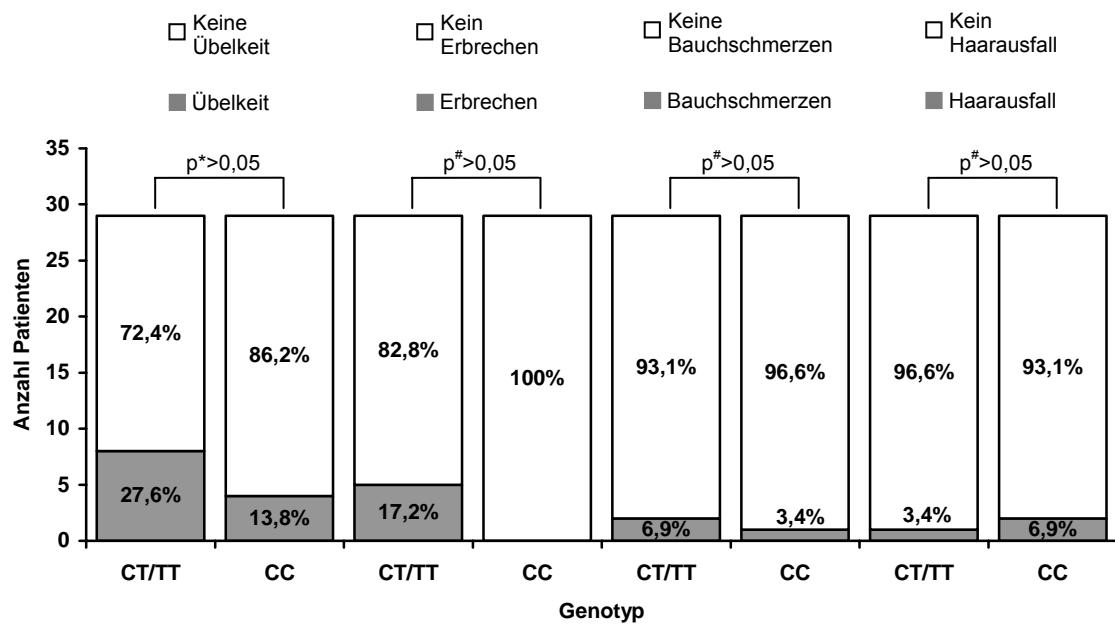
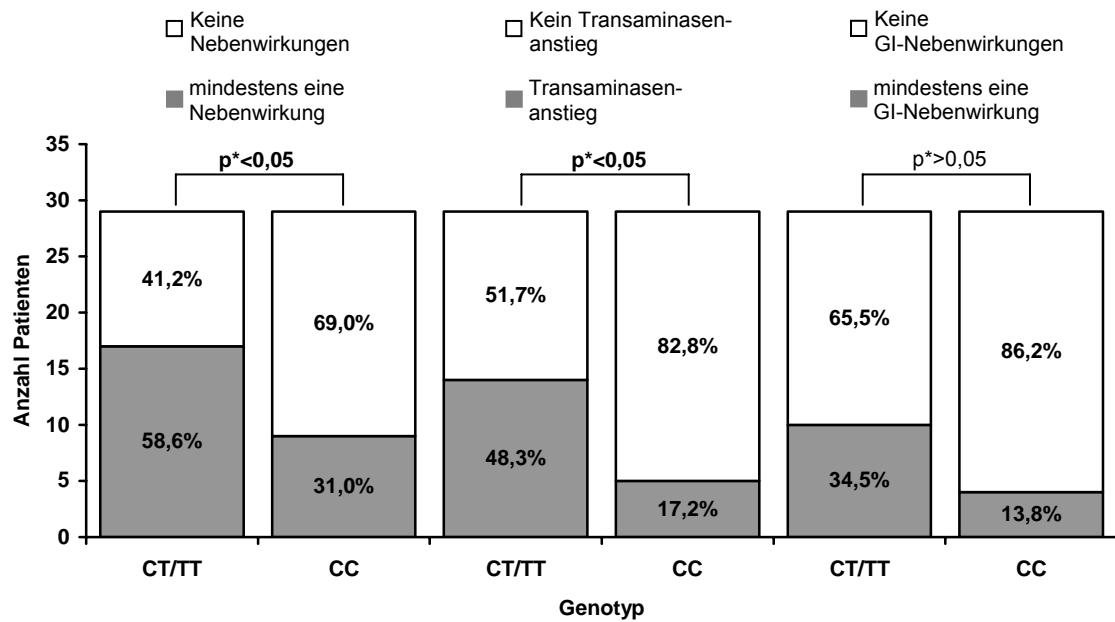


Abb. 2 Häufigkeitsverteilung der Nebenwirkungen bei Wildtyp Patienten und Trägern der Mutation; bei Allelträgern (CT/TT) treten signifikant häufiger Nebenwirkungen auf. $p^*<0,05$ (χ^2 -Test); OR = 3,15 95% CI 1,07 – 9,26; ebenso zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang hinsichtlich erhöhter Lebertransaminasen. $p^*<0,05$ (χ^2 -Test); OR = 4,48 95% CI 1,34 – 14,99; es kann kein Zusammenhang zwischen Polymorphismus und der Häufigkeit von GI-Symptomen, Übelkeit, Erbrechen, Bauchschmerzen und Haarausfall nachgewiesen werden. $p^*>0,05$ (χ^2 -Test) bzw. $p^#>0,05$ (Fisher's Exact Test)

3.4.1.2 Vergleich 677CC- mit 677CT-Patienten

Ein Vergleich der einzelnen Genotypen untereinander erfolgte aufgrund der nur geringen Zahl (n=3) an 677TT Patienten, lediglich zwischen 677CC und 677CT Patienten. Unter den 26 677CT-Heterozygoten zeigten sich bei 17 Patienten (65,4%) Nebenwirkungen, dies ist signifikant häufiger als bei den 29 677CC-Homozygoten, unter denen 9 Patienten (31,0%) Nebenwirkungen boten ($p<0,05 \chi^2$ -Test). Nebenwirkungen treten damit beim heterozygoten Genotyp 4,2mal häufiger auf, als bei Individuen ohne Mutation (95% CI 1,36 – 12,96). Wird auch hier das Auftreten der einzelnen Nebenwirkungen untersucht, ergeben sich die in Tabelle 6 gezeigten Verteilungen.

Tabelle 6 Vergleich 677CC mit 677CT

MTHFR	Nebenwirkungen					
	TA-Anstieg	Übelkeit	Erbrechen	Bauchschmerzen	GI-Symptome	Haarausfall
677CC (n=29)	5 (17,2%)	4 (13,8%)	-	1 (3,4%)	4 (13,8%)	2 (6,9%)
677CT (n=26)	14 (53,8%)	8 (30,8%)	5 (19,2%)	2 (7,7%)	10 (38,5%)	1 (3,8%)
	p*<0,05	NS*	p#<0,05	NS#	p*<0,05	NS#

p*<0,05 (χ^2 -Test); p#<0,05 (Fisher's Exact Test); NS* = nicht signifikant (χ^2 -Test);
NS# = nicht signifikant (Fisher's Exact Test)

Signifikante Zusammenhänge des Polymorphismus mit den einzelnen Nebenwirkungen, zeigen sich beim Transaminasenanstieg ($p<0,05 \chi^2$ - Test) beim Auftreten von Erbrechen ($p<0,05$ Fisher's Exact Test) sowie bei GI-Symptomen im Allgemeinen ($p<0,05 \chi^2$ - Test). Beim Genotyp 677CT kommt es 5,6mal häufiger zu einem Anstieg der Transaminasen (95% CI 1,63 – 19,24), GI-Symptome treten 3,91mal häufiger auf (95% CI 1,05 – 14,60).

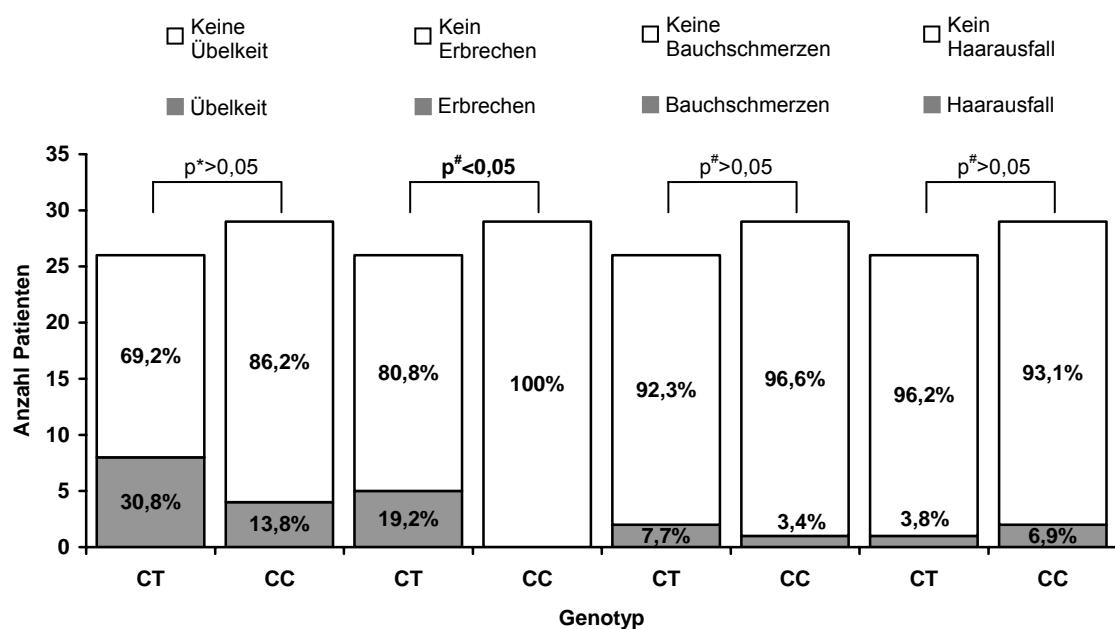
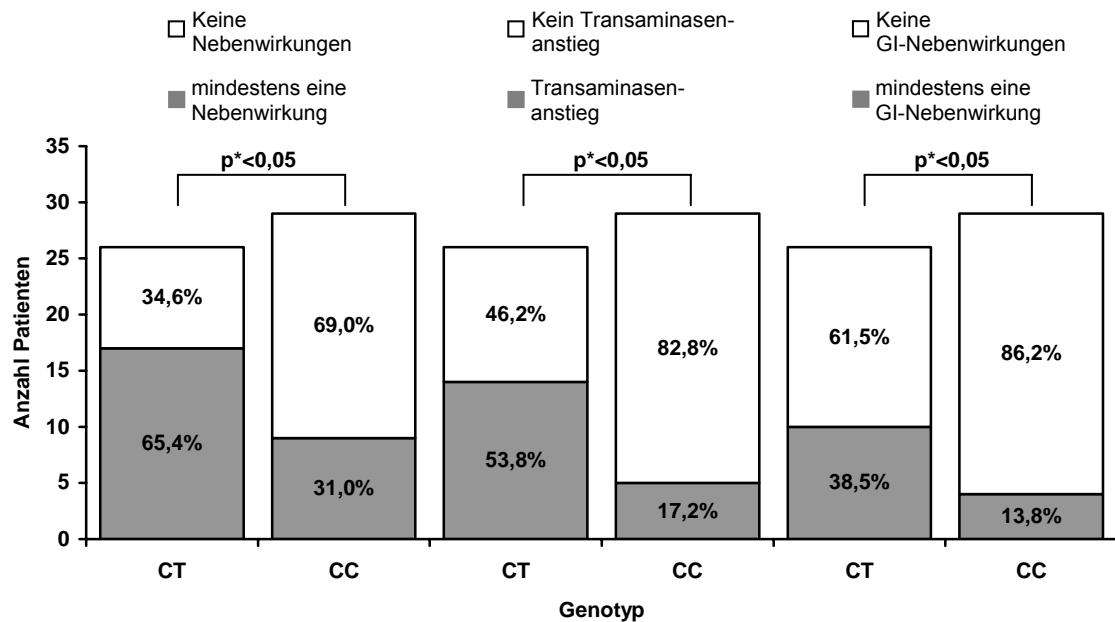


Abb. 3 Häufigkeitsverteilung der Nebenwirkungen bei 677CC – und 677CT – Patienten; bei 677CT Patienten treten signifikant häufiger Nebenwirkungen auf. Im einzelnen zeigen sich signifikant häufiger erhöhte Transaminasen, Erbrechen und allgemeine GI-Symptome. $p^*<0,05$ (χ^2 -Test) bzw. $p^#<0,05$ (Fisher's Exact Test); OR(Nebenwirkungen) 4,20 95% CI 1,36 – 12,96; OR(Transaminasenanstieg) 5,60 95% CI 1,63 – 19,24; OR(GI-Symptome) 3,91 95% CI 1,05 – 14,60; bezüglich Übelkeit, Bauchschmerzen und Haarausfall sind die Unterschiede nicht signifikant. $p^*>0,05$ (χ^2 -Test) bzw. $p^#>0,05$ (Fisher's Exact Test)

3.4.2 Der 1298A→C Polymorphismus und Nebenwirkungen

Ob auch zwischen dem 1298A→C Polymorphismus und dem Auftreten von Nebenwirkungen (Transaminasenanstieg, Übelkeit, Erbrechen, Bauchschmerzen und Haarausfall) unter der Therapie mit Methotrexat ein Zusammenhang besteht, wurde bei 56 Patienten analysiert. 15 Patienten (48,4%) zeigten unter den insgesamt 31 Patienten mit Genotyp 1298AA Nebenwirkungen, unter den 21 Patienten mit dem heterozygotem Genotyp 1298AC traten bei 9 Patienten (42,9%) Nebenwirkungen auf. Bei den 4 Patienten mit der homozygoten Variante 1298CC zeigte ein Patient (25,0%) Nebenwirkungen. Ein statistisch gesicherter Zusammenhang zwischen dem MTHFR 1298A→C Polymorphismus und dem Auftreten von Nebenwirkungen kann damit nicht festgestellt werden ($p>0,05$; χ^2 -Test).

Tabelle 7 MTHFR 1298A→C Polymorphismus und Nebenwirkungen

MTHFR Genotyp	Nebenwirkungen		
	Nein	ja	Total
1298AA	16	15	31
1298AC	12	9	21
1298CC	3	1	4
Total	32	26	58

Verteilung der Nebenwirkungen unter den einzelnen MTHFR 1298A→C Genotypen

3.4.2.1 Vergleich Wildtyp Patienten mit Trägern des Allels 1298C

Wieder wurden die drei Genotypen zunächst in zwei Gruppen eingeteilt, um die Auswirkungen der Mutation auf das Auftreten von Nebenwirkungen zu untersuchen:

- ohne C: Patienten ohne Mutation an Position 1298, also mit Genotyp 1298AA
- mit C: Patienten, welche Träger des Allels 1298C sind, also Patienten mit Genotyp 1298AC sowie Patienten mit Genotyp 1298CC

Unter den 25 Trägern des Allels 1298C (mit C) zeigten 10 Patienten (40,0%), und unter den 31 Individuen ohne Mutation (ohne C) zeigten 15 Patienten (48,4%) Nebenwirkungen. Beide Gruppen unterscheiden sich statistisch nicht hinsichtlich der Häufigkeit von Nebenwirkungen ($p>0,05$ χ^2 -Test). Bei der Untersuchung der einzelnen Nebenwirkungen ergeben sich die in

Tabelle 8 und Abbildung 4 dargestellten Häufigkeitsverteilungen. Auch hierbei ergibt sich kein Zusammenhang zwischen einzelnen Nebenwirkungen und dem Vorhandensein der Mutation an Position 1298.

Tabelle 8 Einzelne Nebenwirkungen und MTHFR Genotyp

MTHFR	Nebenwirkungen					
	TA-Anstieg	Übelkeit	Erbrechen	Bauchschmerzen	GI-Symptome	Haarausfall
ohne C (n=31)	12 (38,7%)	6 (19,4%)	4 (12,9%)	1 (3,2%)	7 (22,6%)	1 (3,2%)
mit C (n=25)	6 (24,0%)	6 (24,0%)	1 (4,0%)	1 (4,0%)	6 (24,0%)	2 (8,0%)
	NS*	NS*	NS [#]	NS [#]	NS*	NS [#]

NS* = nicht signifikant (χ^2 -Test); NS[#] = nicht signifikant (Fisher's Exact Test)

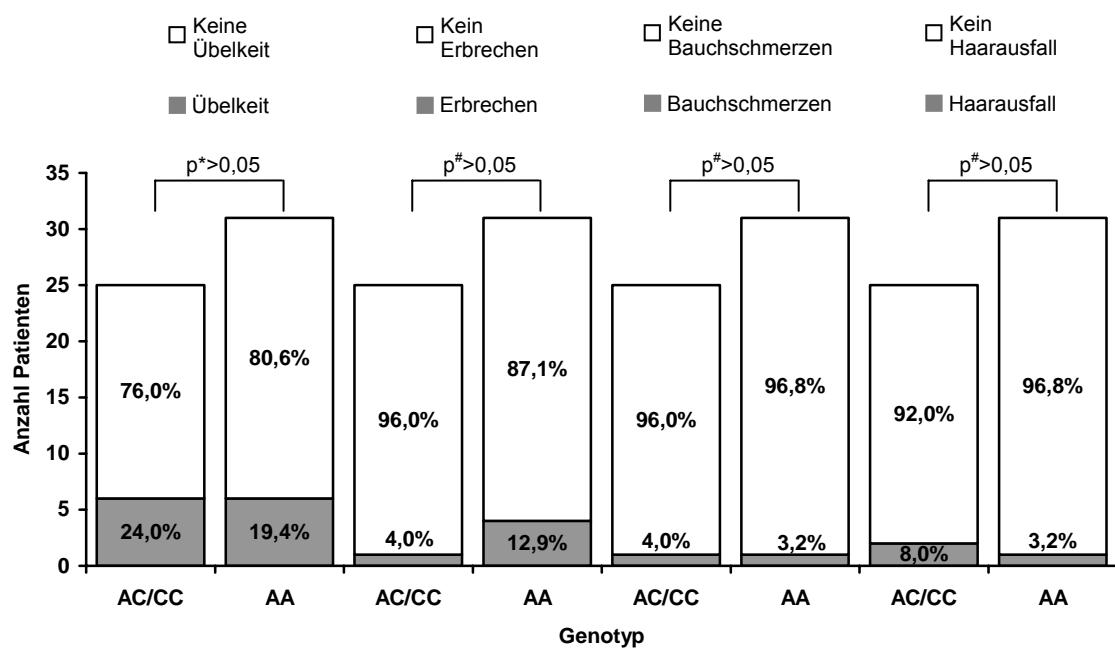
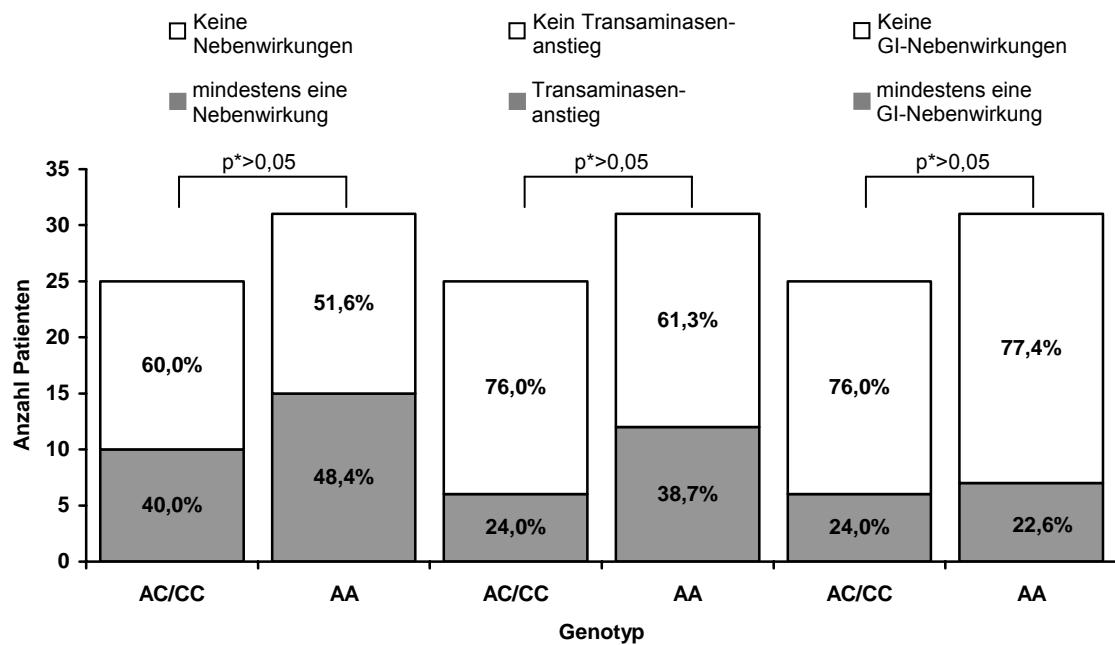


Abb. 4 Häufigkeitsverteilung der Nebenwirkungen bei Wildtyp Patienten und Trägern der Mutation; es kann kein Zusammenhang zwischen Polymorphismus und der Häufigkeit von Nebenwirkungen nachgewiesen werden. $p^*>0,05$ (χ^2 -Test) bzw. $p^{\#}>0,05$ (Fisher's Exact Test)

3.4.2.2 Vergleich 1298AA- mit 1298AC-Patienten

Auch hier waren in der für die Mutation homozygoten Gruppe (1298CC) nur 4 Patienten, weshalb wiederum lediglich der Vergleich von Patienten mit Genotyp 1298AA und Patienten mit Genotyp 1298AC durchgeführt wurde. Unter den 21 1298AC-Heterozygoten wiesen 9 Patienten (42,9%), und unter den 31 1298AA-Homozygoten 15 Patienten (48,4%) Nebenwirkungen auf. Der Unterschied ist statistisch nicht signifikant ($p>0,05 \chi^2$ -Test).

Tabelle 9 Vergleich 1298AA mit 1298AC

MTHFR	Nebenwirkungen					
	TA-Anstieg	Übelkeit	Erbrechen	Bauchschmerzen	GI-Symptome	Haarausfall
1298AA (n=31)	12 (38,7%)	6 (19,4%)	4 (12,9%)	1 (3,2%)	7 (22,6%)	1 (3,2%)
1298AC (n=21)	5 (23,8%)	6 (28,6%)	1 (4,8%)	1 (4,8%)	6 (28,6%)	2 (9,5%)
	NS*	NS [#]	NS [#]	NS [#]	NS*	NS [#]

NS* = nicht signifikant (χ^2 -Test); NS[#] = nicht signifikant (Fisher's Exact Test)

Tabelle 9 und Abbildung 5 zeigen die Häufigkeitsverteilungen der Nebenwirkungen, wenn diese einzeln betrachtet werden. Ein Zusammenhang zwischen den Genotypen 1298AA bzw. 1298AC und der Wahrscheinlichkeit des Auftretens einzelner Nebenwirkungen, ergibt sich beim 1298A→C Polymorphismus nicht.

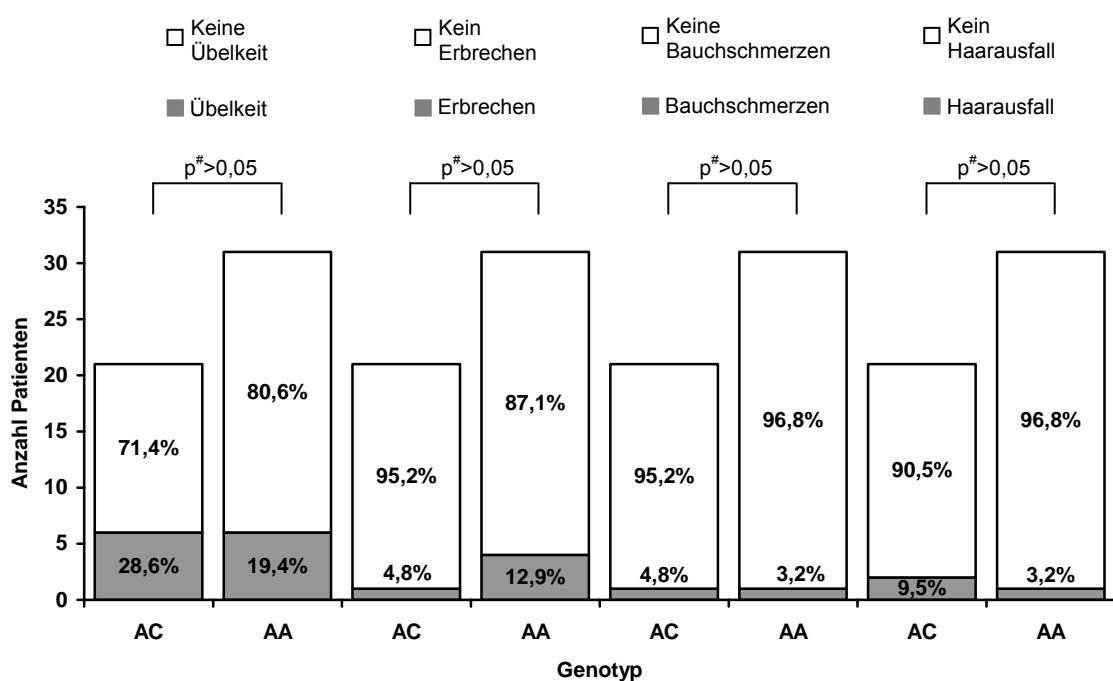
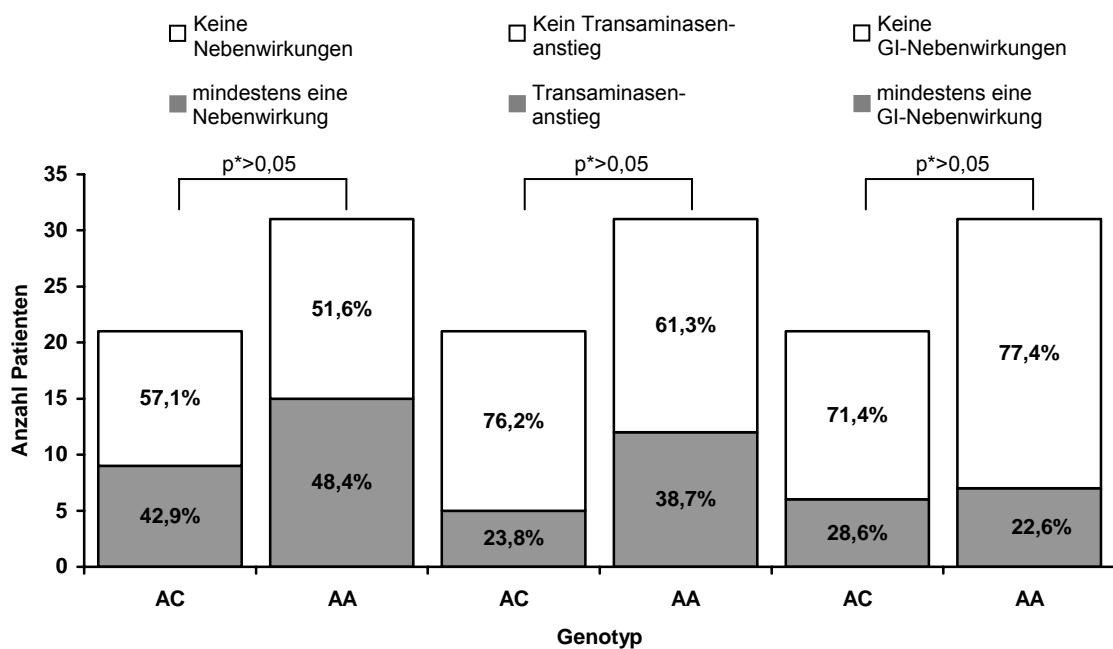


Abb. 5 Häufigkeitsverteilung der Nebenwirkungen bei 1298AA – und 1298AC – Patienten; es besteht kein Zusammenhang zwischen Polymorphismus und der Häufigkeit von Nebenwirkungen. $p^* > 0.05$ (χ^2 -Test) bzw. $p^{\#} > 0.05$ (Fisher's Exact Test)

3.5 Korrelation der MTHFR-Polymorphismen mit der Effektivität von Methotrexat

Um einen etwaigen Einfluss der beiden MTHFR-Polymorphismen auf die Effektivität der Methotrexattherapie zu untersuchen, wurden aus den Krankenakten der Patienten die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) und C-reaktives Protein (CRP) sowie die Anzahl geschwollener (Schwellung) und schmerzhafter (Schmerz) Gelenke betrachtet. Damit wurde jeweils der klinische bzw. laborparametrische Status vor Beginn der Methotrexattherapie erhoben, und zum Vergleich wurde dann als zweiter Erhebungszeitpunkt der jeweils aktuellste, während laufender Methotrexattherapie, ambulante bzw. stationäre Vorstellungstermin gewählt. Alle 58 Patienten wurden dabei mindestens 12 Wochen mit MTX therapiert; es ergibt sich ein Median von 130,0 Wochen Methotrexattherapie (Mittelwert \pm Standardabweichung $157,0 \pm 115,7$ Wochen);

Tabelle 10 zeigt die Mediane sowie die Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) der Labor- und Gelenkparameter aller Patienten vor Beginn der Methotrexattherapie sowie den aktuellen Status. Ebenso ist die mittlere Verbesserung der Labor- und Gelenkparameter unter der Methotrexattherapie angegeben.

Tabelle 10 Labor- und Gelenkparameter vor Therapie sowie unter laufender Methotrexattherapie

		Labor- und Gelenkparameter			
		BSG (mm/h)	CRP (mg/l)	Schwellung	Schmerz
Status vor Therapie	Median	38,0	32,70	5,5	4,0
	Mittelwert \pm SD	$42,2 \pm 27,5$	$45,98 \pm 41,92$	$8,9 \pm 8,0$	$6,7 \pm 6,4$
Aktueller Status	Median	11,5	7,90	2,0	1,5
	Mittelwert \pm SD	$21,2 \pm 20,8$	$21,93 \pm 34,23$	$6,7 \pm 8,5$	$3,4 \pm 5,0$
	Verbesserung	49,8%	52,3%	24,7%	49,3%

Mediane, Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) sowie mittlere Verbesserung (in % vom Ausgangswert); n=58

3.5.1 Der 677C→T Polymorphismus und Effektivität

Zunächst wurde geprüft, ob ein Unterschied hinsichtlich der Labor- und Gelenkparameter vor Beginn der Methotrexattherapie bestand. Tabelle 11 zeigt die jeweiligen Mediane und Mittelwerte \pm SD der einzelnen Genotypen. Verglichen wurden die drei einzelnen Genotypen

untereinander, 677CC mit 677CT/677TT sowie 677CC mit 677CT. Es ergibt sich kein statistisch gesicherter Unterschied unter den Genotypen hinsichtlich der einzelnen Parameter vor Beginn der Therapie mit Methotrexat ($p>0,05$ Kruskall-Wallis- bzw. Mann-Whitney – Test).

Tabelle 11 Labor- und Gelenkparameter vor Therapie

	BSG (mm/h)		CRP (mg/l)	
	Median	Mittelwert \pm SD	Median	Mittelwert \pm SD
677CC	35,0	39,4 \pm 25,1	28,00	39,98 \pm 33,76
677CT	40,0	44,9 \pm 30,6	41,60	52,27 \pm 51,39
677TT	41,0	45,7 \pm 27,3	46,00	49,53 \pm 8,21
677CT/TT	40,0	45,0 \pm 29,8	41,60	51,99 \pm 48,62

	Schwellung		Schmerz	
	Median	Mittelwert \pm SD	Median	Mittelwert \pm SD
677CC	5,0	7,8 \pm 7,1	4,0	6,6 \pm 7,3
677CT	7,0	10,5 \pm 9,1	5,0	7,2 \pm 5,8
677TT	11,0	5,3 \pm 4,2	5,0	4,0 \pm 1,0
677CT/TT	7,0	10,0 \pm 8,8	5,0	6,8 \pm 5,6

Mediane sowie Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD); es besteht kein Unterschied hinsichtlich den Parametern vor Beginn der Therapie mit Methotrexat. $p>0,05$ (Kruskall-Wallis- bzw. Mann-Whitney – Test)

Des weiteren wurde überprüft, ob ein Genotyp vor Beginn der Therapie mit MTX häufiger laborparametrisch im Normbereich lag (Tabelle 12). Eine BSG kleiner gleich 15mm/h und ein CRP kleiner gleich 6mg/l wurde als Normbereich angesehen. Es ergibt sich kein Zusammenhang zwischen den Entzündungswerten und dem 677C→T Polymorphismus vor Beginn der Methotrexattherapie ($p>0,05$ Fisher's Exact Test).

Tabelle 12 Normwerte BSG/CRP vor Therapiebeginn

MTHFR Genotyp	BSG		CRP	
	$\leq 15\text{mm/h}$	$> 15\text{mm/h}$	$\leq 6\text{mg/l}$	$> 6\text{mg/l}$
677CC	5 (17,2%)	24 (82,8%)	2 (6,9%)	27 (93,1%)
677CT	3 (11,5%)	18 (88,5%)	2 (7,7%)	24 (92,3%)
677CT/TT	3 (10,3%)	22 (89,7%)	2 (6,9%)	27 (93,1%)

Es besteht kein Zusammenhang zwischen normalen Entzündungswerten und den Genotypen vor Beginn der Therapie mit Methotrexat. $p>0,05$ (Fisher's Exact Test)

Um nun zu untersuchen, ob der Polymorphismus Einfluss auf die Effektivität der Methotrexattherapie hat, wurde darauf folgend der letzte dokumentierte Status unter laufender Methotrexattherapie in Zusammenhang mit den einzelnen Genotypen betrachtet.

3.5.1.1 Vergleich Wildtyp Patienten mit Trägern des Allels 677T

Die drei Genotypen wurden anschließend zunächst wieder in zwei Gruppen eingeteilt:

- ohne T: Patienten ohne Mutation an Position 677, also mit Genotyp 677CC
- mit T: Patienten, welche Träger des Allels 677T sind, also Patienten mit Genotyp 677CT sowie Patienten mit Genotyp 677TT

In Tabelle 13 sind Mediane und Mittelwerte \pm SD der aktuellen Labor- und Gelenkparameter, sowie die laborparametrische bzw. klinische Verbesserung in Prozent vom Ausgangswert angegeben. Es ergibt sich kein signifikanter Unterschied in der Effektivität der Behandlung zwischen Wildtyp Patienten und Trägern des Allels 677T ($p>0,05$ Mann - Whitney Test) (Abbildung 6).

Tabelle 13 Aktuelle Labor- und Gelenkparameter unter Methotrexattherapie

	BSG (mm/h)			CRP (mg/l)		
	Median	Mittelwert \pm SD	Verbesserung	Median	Mittelwert \pm SD	Verbesserung
ohne T (n=29)	11,0	19,6 \pm 18,4	50,3%	7,80	15,10 \pm 14,26	62,2%
mit T (n=29)	16,0	22,7 \pm 23,2	49,6%	8,00	28,75 \pm 45,66	44,7%
Schwellung			Schmerz			
Median	Mittelwert \pm SD	Verbesserung	Median	Mittelwert \pm SD	Verbesserung	
ohne T (n=29)	2,0	5,4 \pm 7,2	30,8%	1,0	2,8 \pm 4,3	57,6%
mit T (n=29)	3,0	7,9 \pm 9,6	21,0%	2,0	4,1 \pm 5,6	39,7%

Es besteht kein Unterschied zwischen 677CC Homozygoten bzw. Trägern des Allels T hinsichtlich der Effektivität der Methotrexattherapie. $p>0,05$ (Mann-Whitney Test)

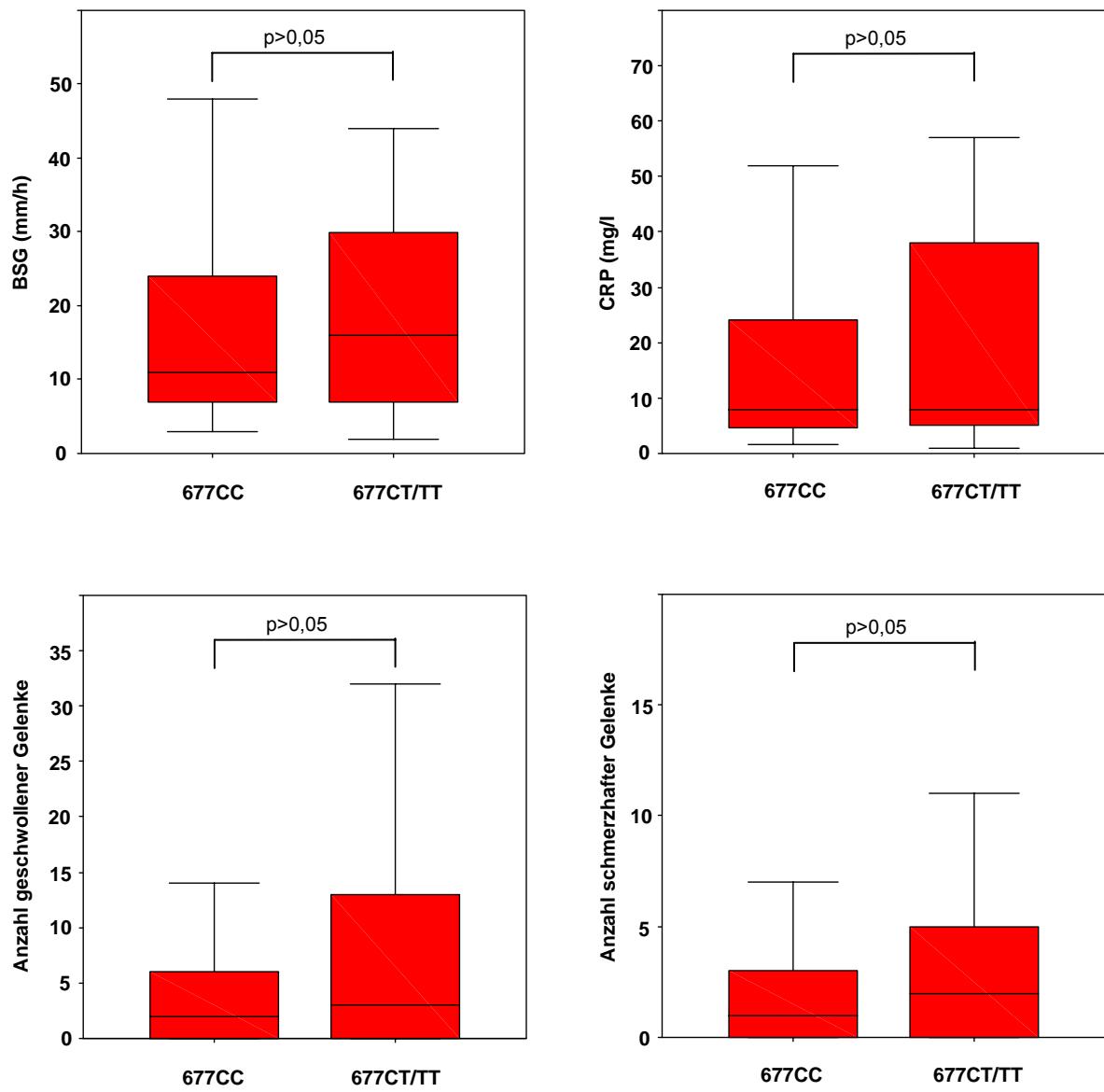


Abb. 6 Dargestellt sind Median, 1. und 3. Quartil sowie Lage des Minimums und Maximums der Stichprobe. Es ergibt sich kein Zusammenhang zwischen der Effektivität der Methotrexattherapie und 677CC Homozygoten bzw. Trägern des Allels T. $p > 0.05$ (Mann-Whitney Test)

Vergleichend zum Status vor Therapie wurde dann untersucht, ob ein Genotyp unter laufender Methotrexattherapie häufiger normale Entzündungswerte aufwies (Tabelle 14, Abbildung 7). Es ergeben sich jedoch keine statistisch gesicherten Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen ($p>0,05 \chi^2$ -Test).

Tabelle 14 Normwerte BSG/CRP unter Methotrexattherapie

MTHFR Genotyp	BSG		CRP	
	$\leq 15\text{mm/h}$	$> 15\text{mm/h}$	$\leq 6\text{mg/l}$	$> 6\text{mg/l}$
ohne T (n=29)	18 (62,1%)	11 (37,9%)	14 (48,3%)	15 (51,7%)
mit T (n=29)	14 (48,3%)	15 (51,7%)	11 (37,9%)	18 (62,1%)
NS*				NS*

NS* = nicht signifikant (χ^2 -Test);

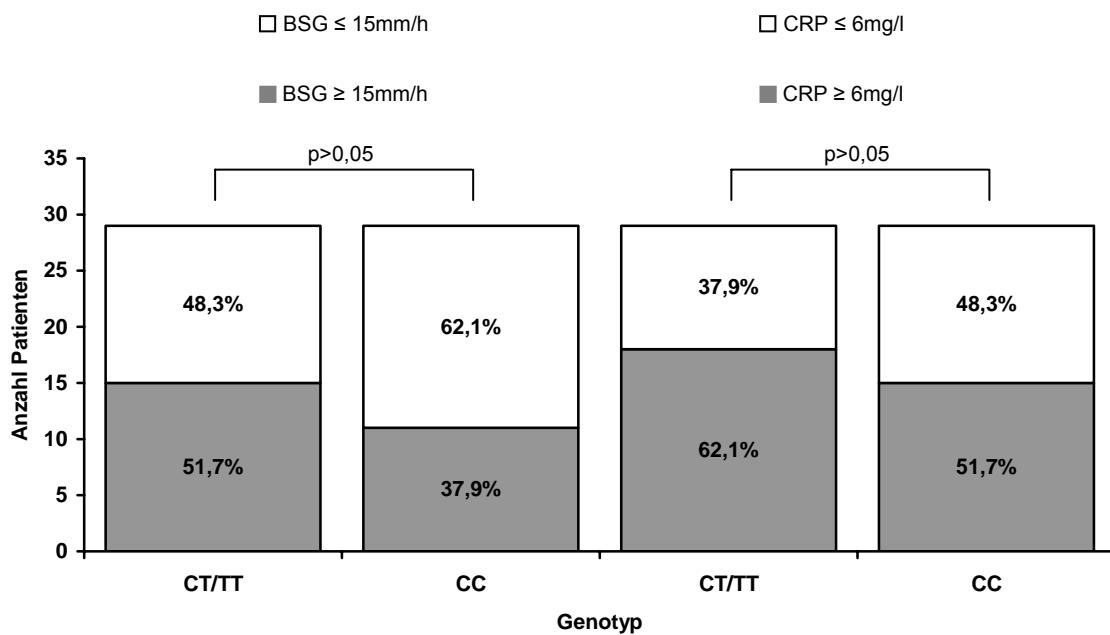


Abb. 7 Auch unter laufender Methotrexattherapie ergibt sich kein Zusammenhang zwischen der Anzahl an Patienten mit normalen Laborparametern und 677CC Homozygoten bzw. Allelträger (677CT/TT). $p>0,05$ (χ^2 -Test)

3.5.1.2 Vergleich 677CC- mit 677CT-Patienten

Ein Effektivitätsvergleich der einzelnen Genotypen untereinander erfolgte, wie bereits bei der Untersuchung der Nebenwirkungen erläutert, auch hier wieder lediglich zwischen 677CC und 677CT Patienten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 und Abbildung 8 angegeben, ein Zusammenhang zwischen klinischen Parametern und Genotyp ergibt sich nicht ($p>0,05$ Mann – Whitney Test).

Tabelle 15 Aktuelle Labor- und Gelenkparameter unter Methotrexattherapie

	BSG (mm/h)			CRP (mg/l)			
	Median	Mittelwert \pm SD	Verbesserung	Median	Mittelwert \pm SD	Verbesserung	
	677CC	11,0	19,6 \pm 18,4	50,3%	7,80	15,10 \pm 14,26	62,2%
	677CT	15,0	20,8 \pm 21,5	53,7%	7,55	28,70 \pm 47,96	45,1%
	Schwellung			Schmerz			
	Median	Mittelwert \pm SD	Verbesserung	Median	Mittelwert \pm SD	Verbesserung	
	677CC	2,0	5,4 \pm 7,2	30,8%	1,0	2,8 \pm 4,3	57,6%
	677CT	2,5	8,2 \pm 9,9	21,9%	2,0	4,3 \pm 5,8	40,3%

Es zeigt sich kein Zusammenhang zwischen klinischen Parametern und den einzelnen Genotypen. $p>0,05$ (Mann – Whitney Test)

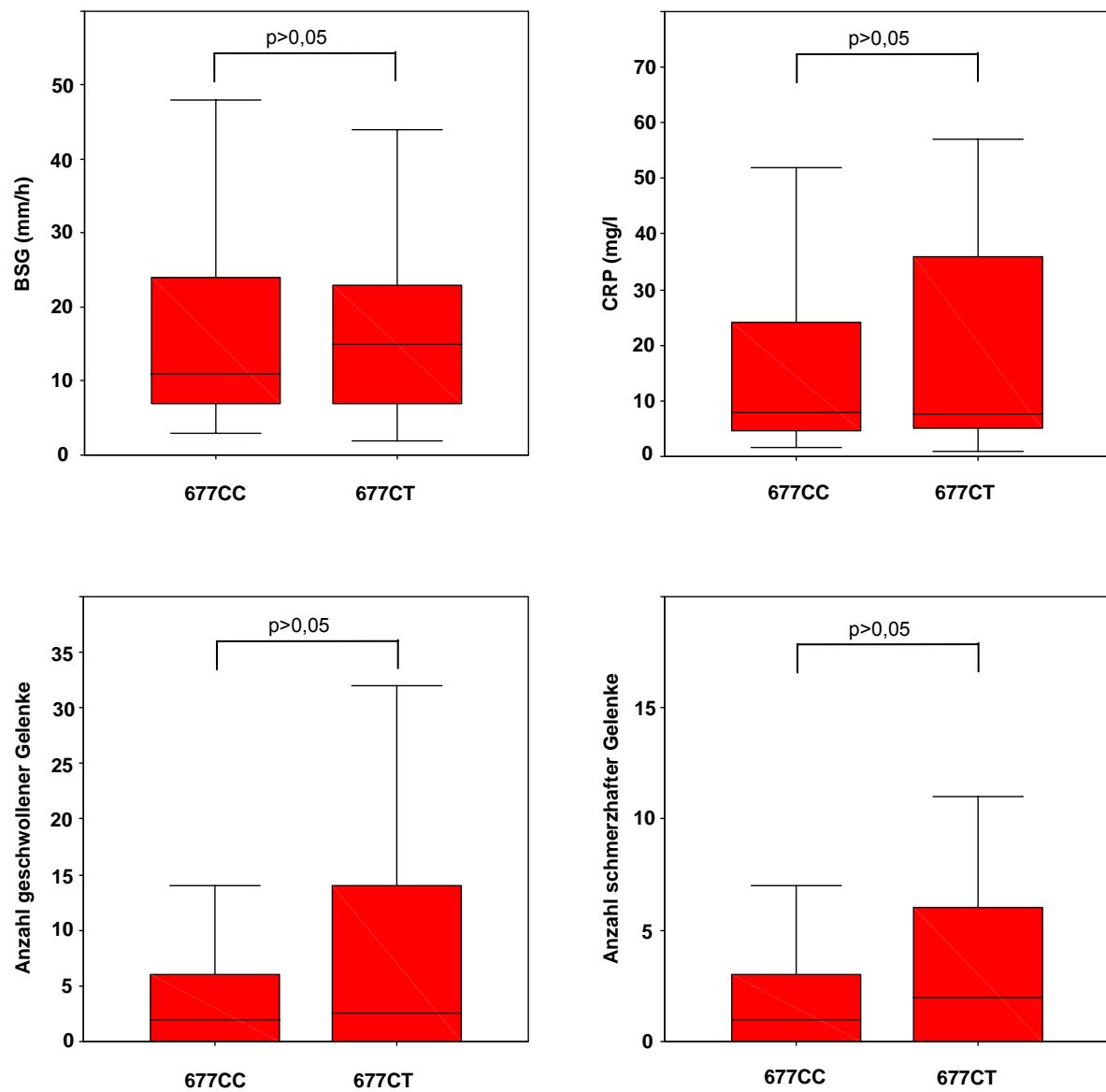


Abb. 8 Dargestellt sind Median, 1. und 3. Quartil sowie Lage des Minimums und Maximums der Stichprobe. Es ergibt sich kein Zusammenhang zwischen Labor- bzw. Gelenkparametern und den Genotypen 677CC bzw. 677CT während der Therapie mit Methotrexat. $p > 0,05$ (Mann-Whitney Test)

Wiederum wurde dann noch vergleichend zum Status vor Therapie analysiert, ob sich die Genotypen hinsichtlich der Anzahl an Patienten, die unter laufender Methotrexattherapie normale Entzündungswerte erreicht haben, unterscheiden. (Tabelle 16 und Abbildung 9). Auch hier sind die Unterschiede nicht signifikant ($p>0,05 \chi^2$ -Test).

Tabelle 16 Normwerte BSG/CRP unter Methotrexattherapie

MTHFR Genotyp	BSG		CRP	
	$\leq 15\text{mm/h}$	$> 15\text{mm/h}$	$\leq 6\text{mg/l}$	$> 6\text{mg/l}$
677CC	18 (62,1%)	11 (37,9%)	14 (48,3%)	15 (51,7%)
677CT	13 (50,0%)	13 (50,0%)	10 (38,5%)	16 (61,5%)
NS*				NS*

NS* = nicht signifikant (χ^2 -Test);

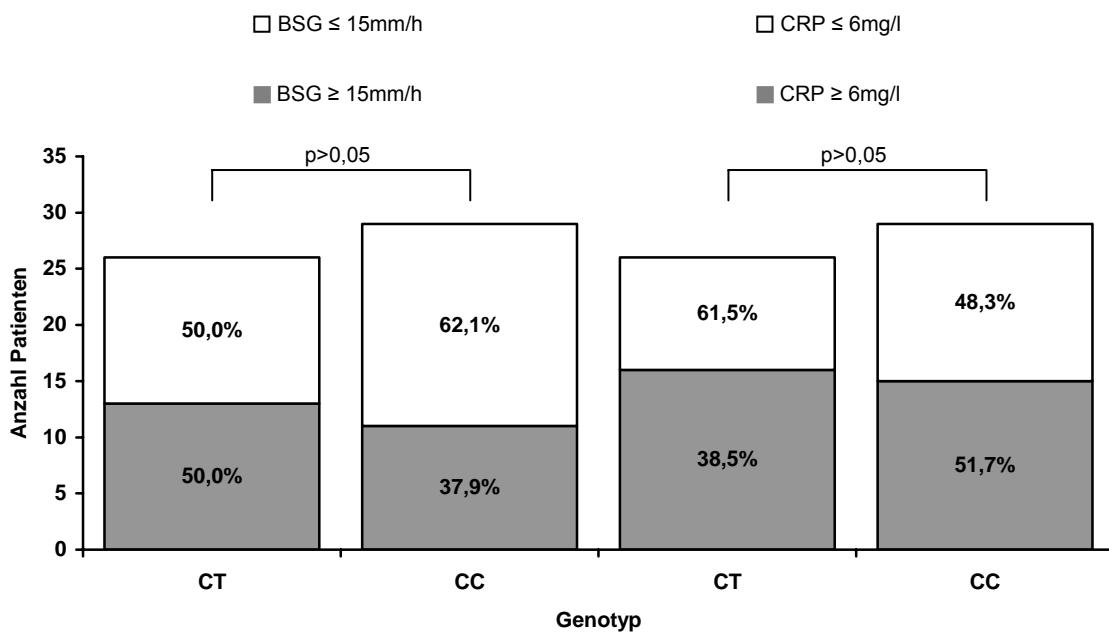


Abb. 9 Es besteht kein statistisch gesicherter Unterschied zwischen 677CC- und 677CT-Patienten bezüglich des Erreichens von normalen Laborparametern. $p>0,05$ (χ^2 -Test)

3.5.2 Der 1298A→C Polymorphismus und Effektivität

Auch der 1298A→C Polymorphismus wurde hinsichtlich der Behandlungseffektivität von Methotrexat untersucht. Die Analyse erfolgte anhand des gleichen Datensatzes (Labor- und Gelenkparameter), der bei der Betrachtung des 677C→T Polymorphismus herangezogen wurde. Aufgrund der fehlenden zwei Genotypenanalysen gingen 56 Patienten in die Betrachtung ein. Wiederum erfolgte zunächst die Betrachtung zum Zeitpunkt vor Beginn der Methotrexattherapie. Mediane und Mittelwerte \pm SD zeigt Tabelle 17. Auf statistische Signifikanz wurden getestet die drei Genotypen untereinander, 1298AA mit 1298AC/CC sowie 1298AA mit 1298AC. Ein statistisch gesicherter Zusammenhang zwischen Genotyp und Labor- bzw. Gelenkparameter vor Therapie ergibt sich nicht ($p>0,05$ Kruskall-Wallis- – bzw. Mann-Whitney – Test).

Tabelle 17 Labor- und Gelenkparameter vor Therapie

	BSG (mm/h)		CRP (mg/l)	
	Median	Mittelwert \pm SD	Median	Mittelwert \pm SD
1298AA	41,0	48,2 \pm 30,1	46,00	51,40 \pm 44,93
1298AC	31,0	36,9 \pm 24,1	25,00	43,60 \pm 41,43
1298CC	37,0	38,5 \pm 14,4	29,05	33,03 \pm 21,68
1298AC/CC	31,0	37,2 \pm 22,6	25,00	41,91 \pm 38,79

	Schwellung		Schmerz	
	Median	Mittelwert \pm SD	Median	Mittelwert \pm SD
1298AA	11,0	10,5 \pm 7,9	5,0	7,9 \pm 7,0
1298AC	4,0	7,0 \pm 8,1	3,0	5,4 \pm 6,3
1298CC	5,5	9,0 \pm 9,5	4,0	4,8 \pm 3,0
1298AC/CC	4,0	7,3 \pm 8,1	4,0	5,3 \pm 5,8

Mediane sowie Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD); es besteht kein Unterschied unter den Genotypen hinsichtlich den einzelnen Parametern vor Beginn der Therapie mit Methotrexat. $p>0,05$ (Kruskall-Wallis- – bzw. Mann-Whitney – Test)

Ebenso ergeben sich bei der Betrachtung der Normwerte von BSG bzw. CRP vor Therapiebeginn (Tabelle 18) keine signifikanten Unterschiede unter den einzelnen Genotypen ($p>0,05$ Fisher's Exact Test).

Tabelle 18 Normwerte BSG/CRP vor Therapiebeginn

MTHFR Genotyp	BSG		CRP	
	$\leq 15\text{mm/h}$	$> 15\text{mm/h}$	$\leq 6\text{mg/l}$	$> 6\text{mg/l}$
1298AA	4 (12,9%)	27 (87,1%)	3 (9,7%)	28 (90,3%)
1298AC	3 (14,3%)	18 (85,7%)	1 (4,8%)	20 (95,2%)
1298AC/CC	3 (12,0%)	22 (88,0%)	1 (4,0%)	24 (96,0%)

es besteht kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Entzündungsparameter unter den Genotypen vor Beginn der Therapie. $p>0,05$ (Fisher's Exact Test)

Um nun wieder den Einfluss des Polymorphismus auf die Effektivität der Methotrexattherapie zu analysieren, wird im Folgenden der Zusammenhang der einzelnen Genotypen mit dem Status unter laufender Methotrexattherapie betrachtet.

3.5.2.1 Vergleich Wildtyp Patienten mit Trägern des Allels 1298C

Anschließend erfolgte wieder die Zusammenfassung der drei Genotypen in zwei Gruppen:

- ohne C: Patienten ohne Mutation an Position 1298, also mit Genotyp 1298AA
- mit C: Patienten, welche Träger des Allels 1298C sind, also Patienten mit Genotyp 1298AC sowie Patienten mit Genotyp 1298CC

Tabelle 19 zeigt Mediane und Mittelwerte \pm SD der aktuellen Labor- und Gelenkparameter sowie die mittlere Verbesserung unter laufender Methotrexattherapie. Allelträger weisen unter der Therapie signifikant niedrigere Entzündungsparameter auf als 1298AA Homozygote. So betrug die BSG beim Genotyp 1298AA im Median 18,0mm/h und bei 1298AC/CC-Patienten 10,0mm/h. Das CRP lag bei Patienten ohne Mutation im Median bei 24,00mg/l im Vergleich zu 5,00mg/l bei Patienten mit Mutation. Klinisch zeigt sich ein statistisch gesicherter Zusammenhang zwischen Polymorphismus und Effektivität lediglich bezüglich der Anzahl der schmerhaften Gelenke. 1298AA-Patienten klagten unter Methotrexat im Median über 2,0

und 1298AC/CC-Patienten über 0 schmerzhafte Gelenke ($p<0,05$ Mann – Whitney Test). Hinsichtlich der Anzahl an geschwollenen Gelenken unter Methotrexattherapie ergibt sich mit $p>0,05$ kein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Gruppen (Abbildung 10).

Tabelle 19 Aktuelle Labor- und Gelenkparameter unter Methotrexattherapie

	BSG (mm/h)			CRP (mg/l)					
	Median	Mittelwert \pm SD	Verbesserung	Median	Mittelwert \pm SD	Verbesserung			
	ohne C (n=31)	18,0] $*$	28,0 \pm 24,4	41,9%	24,00] $*$	32,39 \pm 43,01	37,0%
	mit C (n=25)	10,0] $*$	14,0 \pm 12,3	62,4%	5,00] $*$	10,43 \pm 12,74	75,1%
	Schwellung						Schmerz		
	Median	Mittelwert \pm SD	Verbesserung	Median	Mittelwert \pm SD	Verbesserung			
	ohne C (n=31)	4,0	8,2 \pm 8,6	21,9%	2,0] $*$	4,6 \pm 5,5	41,8%	
	mit C (n=25)	2,0	5,1 \pm 8,4	30,1%	0] $*$	2,0 \pm 4,0	62,3%	

Allelträger zeigen unter Methotrexattherapie signifikant bessere Entzündungsparameter und leiden unter signifikant weniger schmerzhaften Gelenken als Patienten ohne Mutation. $*$ = $p<0,05$ (Mann-Whitney Test)

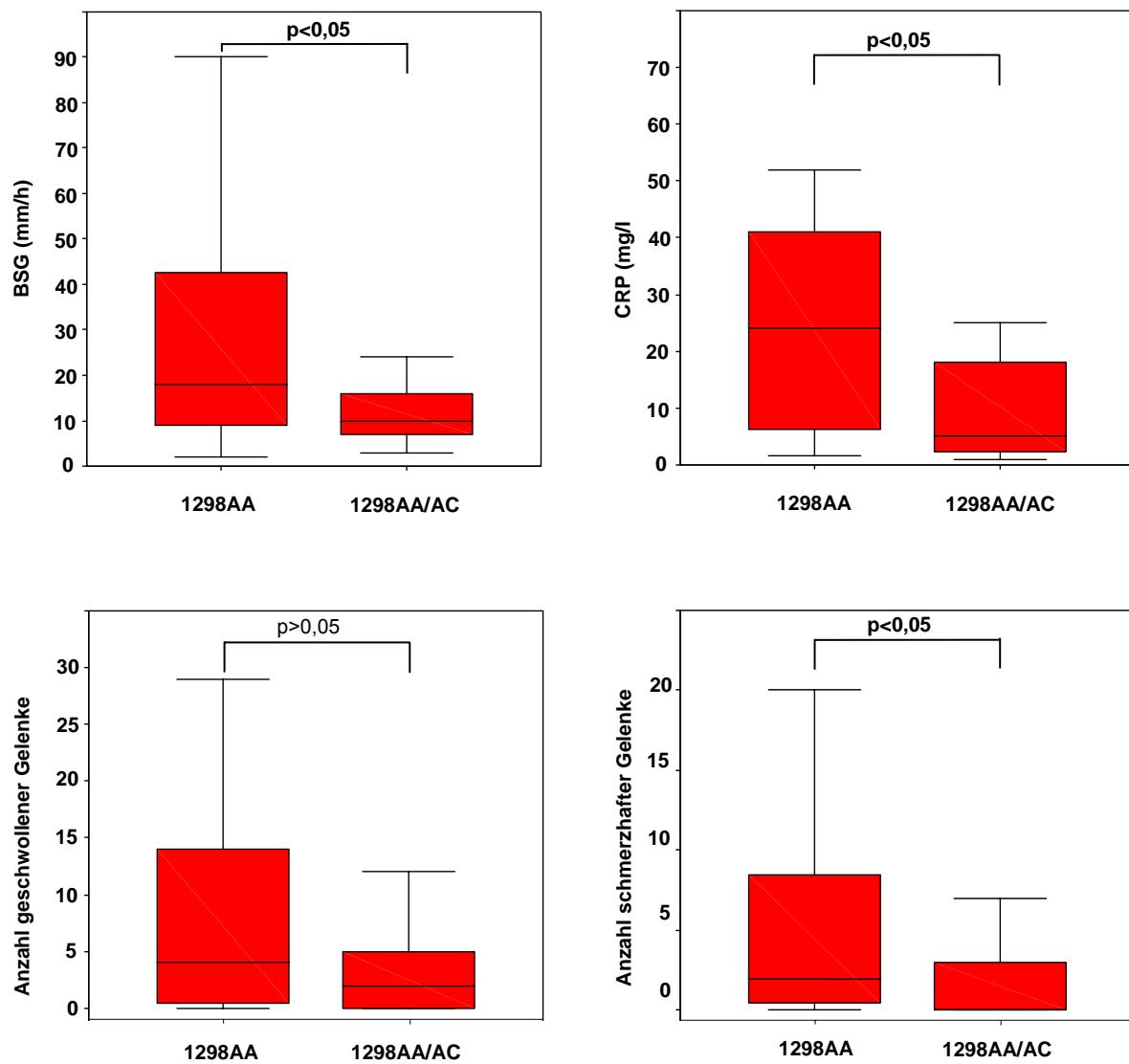


Abb. 10 Dargestellt sind Median, 1. und 3. Quartil sowie Lage des Minimums und Maximums der Stichprobe. Träger des Allels T weisen unter Methotrexattherapie signifikant bessere Entzündungsparameter auf, und leiden unter signifikant weniger schmerzhaften Gelenken $p < 0.05$ (Mann-Whitney Test). Hinsichtlich der Anzahl an geschwollenen Gelenken ergeben sich mit $p > 0.05$ keine statistisch gesicherten Unterschiede.

Von den 25 1298AC/CC-Patienten erreichten 18 (72,0%) eine BSG von kleiner gleich 15mm/h im Vergleich zu 12 (38,7%) von den 31 1298AA-Patienten. CRP-Werte kleiner gleich 6mg/l wurden von 16 Patienten (64,0%) aus der Gruppe der Allelträger (n=25) erreicht. Von den 1298AA-Homozygoten erreichten hingegen nur 7 von 31 Patienten (22,6%) normale CRP-Werte. Damit erreichen 1298AC/CC-Patienten unter Methotrexatbehandlung häufiger normale Entzündungswerte als Patienten mit Genotyp 1298AA ($p<0,05$ χ^2 -Test) - 4,1mal häufiger normale BSG-Werte (95% CI 1,31 – 12,65) und 6,1mal häufiger normale CRP-Werte (95% CI 1,89 – 19,70). (Tabelle 20 und Abbildung 11)

Tabelle 20 Normwerte BSG/CRP unter Methotrexattherapie

MTHFR Genotyp	BSG		CRP	
	$\leq 15\text{mm/h}$	$> 15\text{mm/h}$	$\leq 6\text{mg/l}$	$> 6\text{mg/l}$
ohne C (n=31)	12 (38,7%)	19 (61,3%)	7 (22,6%)	24 (77,4%)
mit C (n=25)	18 (72,0%)	7 (28,0%)	16 (64,0%)	9 (36,0%)
$p<0,05$				$p<0,05$

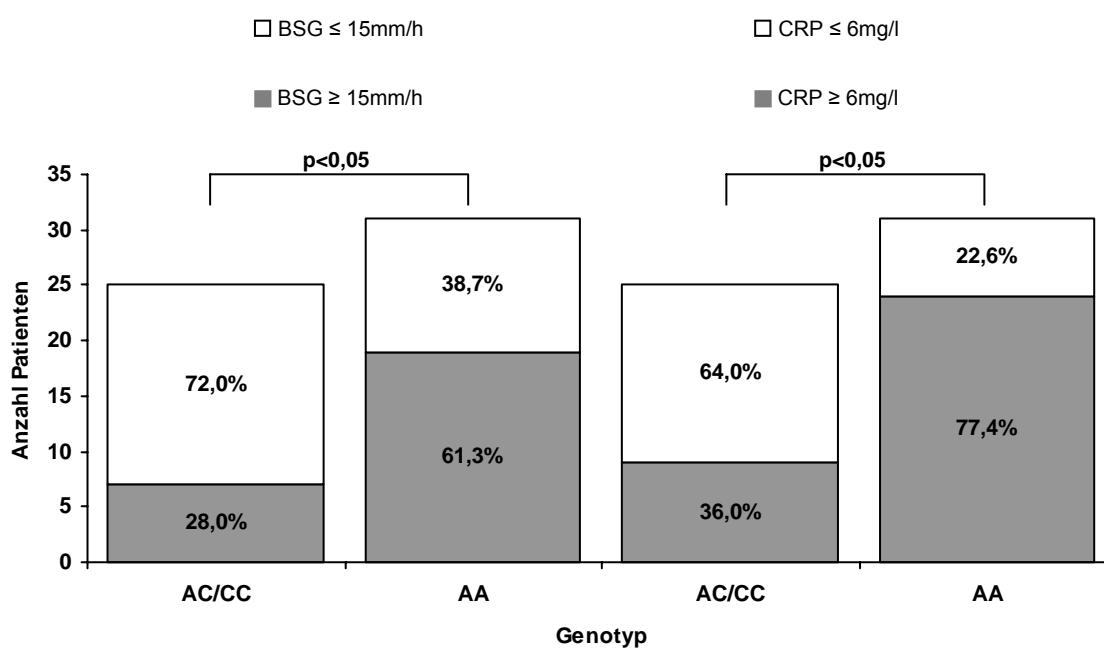


Abb. 10 Patienten mit Mutation an Stelle 1298 (1298AC/1298CC) weisen unter Methotrexatbehandlung signifikant häufiger normale Werte für BSG bzw. CRP auf, als Patienten mit Genotyp 1298AA. $p<0,05$ (χ^2 -Test); OR(BSG) 4,1 95% CI 1,31 – 12,65; OR(CRP) 6,1 95% CI 1,89 – 19,70;

3.5.2.2 Vergleich 1298AA- mit 1298AC-Patienten

Beim Effektivitätsvergleich zwischen den Genotypen 1298AA und 1298AC zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede bei den Parametern BSG, CRP und Anzahl an schmerzhaften Gelenken. Die BSG beim Genotyp 1298AA beträgt im Median 18,0mm/h und bei 1298AC-Patienten 10,0mm/h. Das CRP liegt bei Patienten ohne Mutation im Median bei 24,00mg/l verglichen mit 4,60mg/l bei 1298AC Heterozygoten. Klinisch ergibt sich ein gesicherter Zusammenhang zwischen Polymorphismus und Effektivität wiederum bezüglich der Anzahl der schmerzhaften Gelenke. 1298AA-Patienten klagen unter Methotrexat im Median über 2,0 und 1298AC-Patienten über 0 schmerzhafte Gelenke ($p<0,05$ Mann – Whitney Test). Der Unterschied in der Anzahl an geschwollenen Gelenken war dagegen nicht signifikant ($p>0,05$ Mann – Whitney Test). Die Ergebnisse zeigt Tabelle 21 und Abbildung 12.

Tabelle 21 Aktuelle Labor- und Gelenkparameter unter Methotrexattherapie

	BSG (mm/h)			CRP (mg/l)			
	Median	Mittelwert \pm SD	Verbesserung	Median	Mittelwert \pm SD	Verbesserung	
	1298AA	18,0	$28,0 \pm 24,4$	41,9%	24,00	$32,39 \pm 43,01$	37,0%
	1298AC	10,0	$11,4 \pm 7,0$	69,1%	4,60	$9,70 \pm 13,19$	77,8%
	Schwellung			Schmerz			
	Median	Mittelwert \pm SD	Verbesserung	Median	Mittelwert \pm SD	Verbesserung	
	1298AA	4,0	$8,2 \pm 8,6$	21,9%	2,0	$4,6 \pm 5,5$	41,8%
	1298AC	2,0	$4,7 \pm 8,2$	32,9%	0	$2,1 \pm 4,4$	61,1%

1298AC Patienten bieten unter Methotrexattherapie signifikant bessere Entzündungsparameter und leiden unter einer signifikant geringeren Anzahl an schmerzhaften Gelenken als 1298AA Patienten.

* = $p<0,05$ (Mann-Whitney Test)

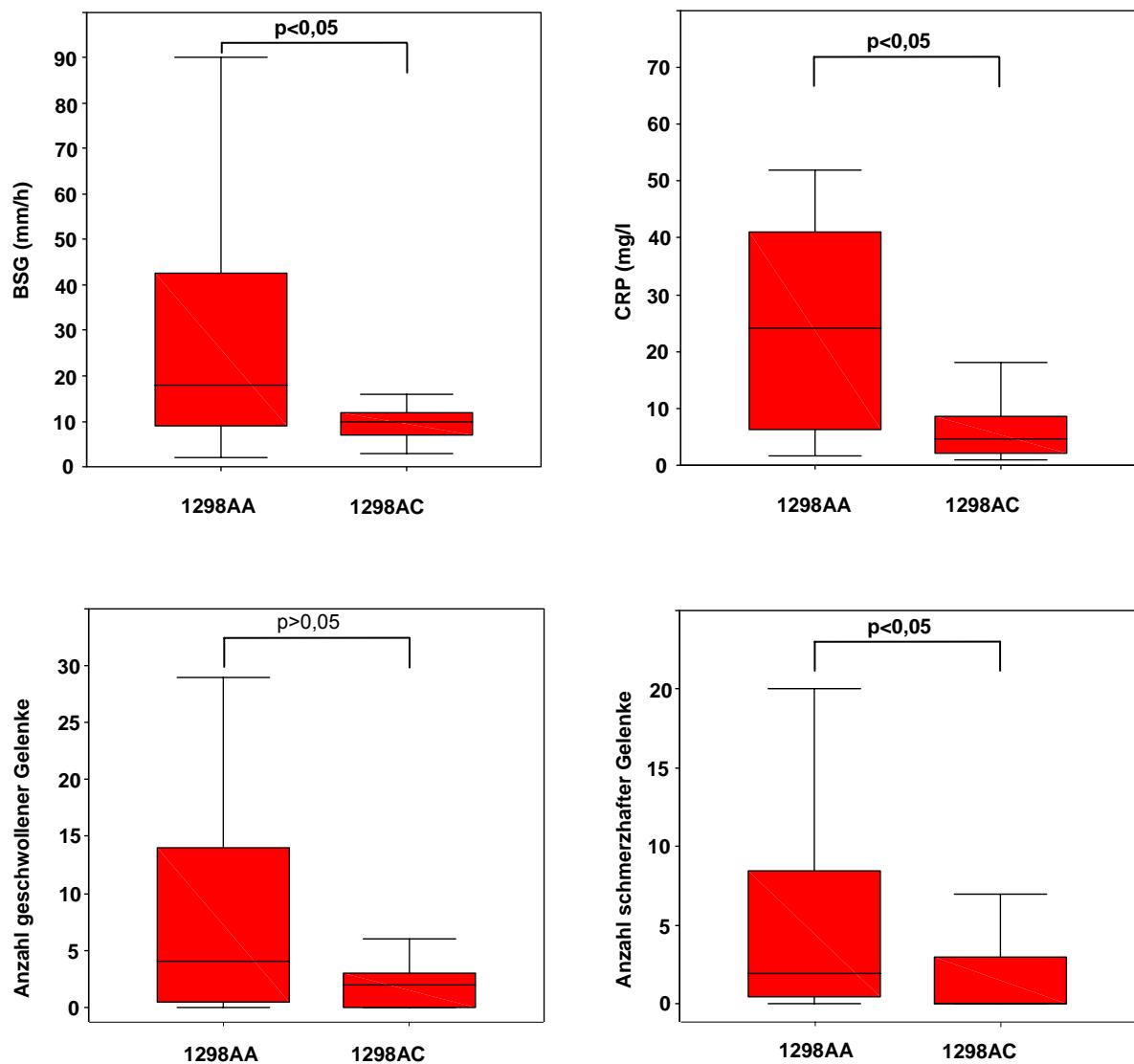


Abb. 12 Dargestellt sind Median, 1. und 3. Quartil sowie Lage des Minimums und Maximums der Stichprobe. Patienten mit Genotyp 1298AC zeigen unter Methotrexattherapie signifikant geringere BSG- und CRP-Werte. Ebenso leiden 1298AC-Heterozygote unter signifikant weniger schmerzhaften Gelenken. $p < 0,05$ (Mann-Whitney Test) Hinsichtlich der Anzahl an geschwollenen Gelenken ergibt sich mit $p > 0,05$ keine statistisch gesicherte Zusammenhang.

16 (76,2%) von 21 1298AC-Patienten erreichten eine BSG von kleiner gleich 15mm/h im Vergleich zu 12 (38,7%) von den 31 1298AA-Patienten. CRP-Werte kleiner gleich 6mg/l wurden von 14 Patienten (66,7%) aus der Gruppe der 1298AC-Homozygoten (n=21) erreicht. Von den 1298AA-Homozygoten erreichten hingegen nur 7 von 31 Patienten (22,6%) normale CRP-Werte. Es besteht damit ein statistisch gesicherter Zusammenhang zwischen Genotyp und dem Erreichen von normalen Entzündungswerten ($p<0,05 \chi^2$ -Test). Das Odds Ratio von 1298AC-Patienten zu 1298AA-Patienten, normale Entzündungsparameter zu erreichen, beträgt hinsichtlich der BSG 5,0 : 1 (95% CI 1,47 – 17,46) und hinsichtlich des CRP 6,9 : 1 (95% CI 1,99 – 23,64). (Tabelle 22 und Abbildung 13)

Tabelle 22 Normwerte BSG/CRP unter laufender Methotrexattherapie

MTHFR Genotyp	BSG		CRP	
	$\leq 15\text{mm/h}$	$> 15\text{mm/h}$	$\leq 6\text{mg/l}$	$> 6\text{mg/l}$
1298AA	12 (38,7%)	19 (61,3%)	7 (22,6%)	24 (77,4%)
1298AC	16 (76,2%)	5 (23,8%)	14 (66,6%)	7 (33,3%)

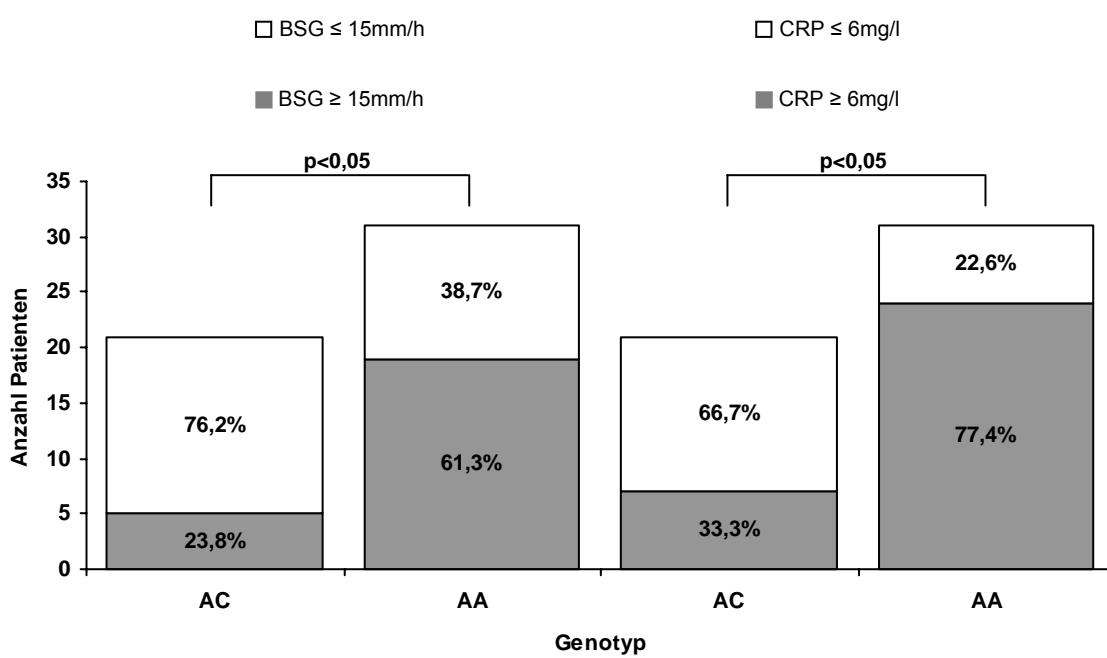


Abb. 13 1298AC Heterozygote Patienten weisen unter Methotrexatbehandlung signifikant häufiger normale Werte für BSG bzw. CRP auf, als Patienten mit Genotyp 1298AA. $p<0,05$ (χ^2 -Test); OR(BSG) 5,0 95% CI 1,47 – 17,46; OR(CRP) 6,9 95% CI 1,99 – 23,64;

3.6 Genotypenkombinationen und Toxizität bzw. Effektivität

Neben der Betrachtung der einzelnen Genpolymorphismen, erfolgte analog dazu auch die Untersuchung des Einflusses der verschiedenen Genotypenkombinationen auf Toxizität und Effektivität der Methotrexattherapie. Bei der Analyse der einzelnen Kombinationen untereinander ergaben sich jedoch keine Unterschiede hinsichtlich der Toxizität bzw. Effektivität bei der Behandlung mit Methotrexat. Wie bereits in Kapitel 3.3 dargestellt, erwiesen sich 8 Patienten (14,3%) als kombiniert heterozygot. Auch beim Vergleich von kombiniert homozygoten Patienten (677CC/1298AA) mit kombiniert heterozygoten Patienten (677CT/1298AC) ergaben sich keine Unterschiede bezüglich dem Auftreten von Nebenwirkungen bzw. dem Labor- und Gelenkstatus unter Methotrexattherapie (die Ergebnisse der statistischen Auswertung sollen hier nicht weiter aufgeführt werden).

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss zweier MTHFR - Polymorphismen auf Toxizität und Effektivität von Methotrexat bei der Behandlung von Patienten mit juveniler idiopathischer Arthritis untersucht. Bis jetzt existieren keine Studien mit JIA – Patienten bezüglich des MTHFR-Polymorphismus, es bietet sich jedoch der Vergleich der vorliegenden Daten mit Studien bei Patienten an, die an rheumatoider Arthritis erkrankt sind.

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Der MTHFR 677C→T Polymorphismus war mit einer höheren Wahrscheinlichkeit hinsichtlich des Auftretens von Nebenwirkungen assoziiert. 677T – Allelträger erleiden signifikant häufiger mindestens eine Nebenwirkung als Patienten ohne Mutation (58,6% vs. 31,0%) – das Odds Ratio beträgt 3,15 : 1. Bei 65,4% der 677CT Patienten traten mindestens eine Nebenwirkung auf vs. 31,0% der 677CC Patienten – 4,2mal häufiger. Bei einzelner Betrachtung der Nebenwirkungen ergibt sich lediglich hinsichtlich des TA-Anstiegs ein gesicherter Zusammenhang zwischen Allelträger und Enzymanstieg (48,3% bei Trägern des Allels 677T vs. 17,2% bei 677CC – Patienten – das Odds Ratio beträgt das 4,48fache).

Werden hingegen 677CT mit 677CC Patienten verglichen, ergeben sich signifikante Unterschiede hinsichtlich Transaminasenanstieg (53,8% vs. 17,2%; 5,6mal häufiger), Erbrechen (19,2% vs. 0%) sowie GI-Symptomen (38,5% vs. 13,8%; 3,91mal häufiger). Im Gegensatz zum 677C→T Polymorphismus ergab sich bei der Betrachtung des 1298A→C Polymorphismus kein Zusammenhang bezüglich der Verträglichkeit von Methotrexat.

Unter laufender Methotrexattherapie zeigten die unterschiedlichen 677C→T Genotypen keine Assoziation mit der Effektivität der Behandlung - die einzelnen Gruppen unterschieden sich nicht hinsichtlich der Labor- und Gelenkparameter. Der 1298A→C Polymorphismus hingegen wies eine Korrelation zu besserem Therapieerfolg auf. Träger des Allels 1298C bieten unter Therapie mit Methotrexat im Median signifikant bessere Entzündungsparameter auf als Patienten ohne Mutation (BSG: 10,0mm/h vs. 18,0mm/h; CRP: 5,0mg/l vs. 24,0mg/l) – ebenso erreichen 1298AC/CC-Patienten 4,1mal häufiger Normwerte für BSG bzw. 6,1mal häufiger Normwerte für CRP (Normwerte BSG: 72,0% vs. 38,7%; Normwerte CRP: 64,0% vs. 22,6%). Klinisch leiden 1298C-Allelträger unter Therapie im Median an signifikant weniger schmerzhaften Gelenken als 1298AA – Patienten (0 vs. 2). Ähnliche Ergebnisse lieferte der Vergleich von 1298AC- mit 1298AA-Patienten – heterozygote Patienten präsentieren im Median signifikant niedrigere Entzündungswerte, leiden unter Methotrexattherapie unter signifikant weniger schmerzhaften Gelenken (BSG: 10,0mm/h vs. 18,0mm/h; CRP: 4,6mg/l vs. 24,0mg/l; Anzahl schmerzhafter Gelenke 0 vs. 2) und erreichen 5,0mal häufiger Normwerte für BSG bzw. 6,9mal häufiger Normwerte für CRP (Normwerte BSG: 76,2% vs. 38,7%; Normwerte CRP: 66,6% vs. 22,6%).

4.2 Zum 677C→T Polymorphismus und dessen Einfluss auf Toxizität

Es existieren bereits einige Studien hinsichtlich des Einflusses des 677C→T Polymorphismus und der Verträglichkeit einer MTX-Behandlung. So berichtete Ulrich et al. über einen Zusammenhang der Mutation und der Nebenwirkungsrate bei Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie, die im Rahmen der Knochenmarktransplantation Methotrexat erhielten. Allelträger litten dabei häufiger unter oraler Mukositis als Wildtyppatienten. Ebenso stellte sich heraus, dass sich unter Mutationsträgern die Thrombozytenzahl langsamer erholte (Ulrich et al., 2001). In einer Studie über den Einfluss von Sulfasalazin und Methotrexat auf

die Homocysteinplasmakonzentration bei Patienten mit rheumatoider Arthritis wurden 105 Patienten auch auf eine Assoziation mit dem MTHFR-Genpolymorphismus untersucht (Haagsma et al., 1999). Es zeigte sich, dass der 677CT-Genotyp mit erhöhten Homocysteinplasmaspiegeln unter der Behandlung mit Methotrexat assoziiert war. 677CT-Patienten wiesen nach 52wöchiger Therapie signifikant höhere Homocysteinkonzentrationen auf, als 677CC-Patienten. 677TT-Patienten hatten schon vor Beginn der Therapie höhere Spiegel als 677CC- bzw. 677CT-Patienten, ohne dass sich die Konzentrationen unter Methotrexattherapie veränderten. Patienten, die über gastrointestinale Nebenwirkungen (Übelkeit, Bauchschmerzen und Sodbrennen) klagten, zeigten wiederum höhere Homocysteinspiegel als beschwerdefreie Patienten. Es ergab sich jedoch kein direkter Zusammenhang zwischen dem 677C→T Polymorphismus und dem Auftreten von Nebenwirkungen, obgleich ein erhöhter Homocysteinplasmaspiegel jedoch Vermittler der gastrointestinalen Nebenwirkungen darstellen könnte. Eine weitere Studie betrachtete den 677C→T Genpolymorphismus als etwaigen Risikofaktor für Nebenwirkungen der Methotrexattherapie bei RA-Patienten (van Ede et., 2001). 236 Patienten wurden in die Studie eingeschlossen und prospektiv untersucht. Im Vergleich zu Wildtyppatienten hatten 677T-Mutationsträger ein 2,01fach höheres Risiko (95% CI 1,09 – 3,70) die Methotrexattherapie aufgrund von Nebenwirkungen zu unterbrechen – das Risiko, die Therapie aufgrund von erhöhten ALAT-Werten zu unterbrechen, lag 2,38fach höher (95% CI 1,06 – 5,34). Eine Folsäuresubstitution während der Behandlung mit Methotrexat konnte die Häufigkeit erhöhter Lebertransaminasen, sowie die Therapieabbruchrate aufgrund von Nebenwirkungen im Allgemeinen und aufgrund erhöhter ALAT-Werten im Vergleich zur Placebogruppe signifikant verringern. Van Ede et al. betrachtete zudem den Einfluss des 677C→T Genotyps auf die Effektivität der Methotrexatbehandlung, konnte aber keinen Zusammenhang feststellen. 2001 veröffentlichte van Ede et al. eine Studie mit 434 RA-Patienten, bei der der Einfluss einer Folsäuresubstitution auf Effektivität und Toxizität der Methotrexattherapie betrachtet wurde. Hierbei zeigte sich, dass die Folsäuresubstitution die Häufigkeit des Auftretens erhöhter Leberenzyme (ALAT) und in einer Folge daraus die Häufigkeit eines Therapieabbruches reduzierte (van Ede et., 2001). In einer 2002 ebenfalls von van Ede et al. veröffentlichten Studie an 113 RA-Patienten, zeigte sich zwar, dass 677TT Patienten erhöhte Homocysteinkonzentrationen vor Beginn der Therapie aufwiesen, dass Methotrexat zu erhöhten Homocysteinspiegeln führte und eine Folsäuresubstitution die Homocysteinplasmaspiegel senken konnte, es ergab sich jedoch kein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß des Homocysteinanstiegs unter der Methotrexattherapie und dem

677C → T Genotyp. Auch konnte kein Zusammenhang zwischen dem Homocysteinstoffwechsel und der Wirksamkeit bzw. Verträglichkeit der Methotrexattherapie aufgezeigt werden (van Ede et al., 2002).

In einer retrospektiven Studie untersuchten Urano et al. den 677C→T- sowie den 1298A→C-Genpolymorphismus hinsichtlich Toxizität und Effektivität einer Methotrexattherapie bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (Urano et al., 2002). Nebenwirkungen waren bei den 677T-Allelträgern signifikant häufiger zu beobachten, als bei 677CC Patienten (26,9% vs. 8,6%) – ein Zusammenhang bezüglich der Wirksamkeit und 677C→T-Genotypen ergab sich jedoch nicht (zum 1298A→C Polymorphismus siehe Kapitel 4.3). Es sind bisher keine Studien zum MTHFR-Genpolymorphismus bei Patienten mit juveniler idiopathischer Arthritis veröffentlicht wurden - die Daten der Studien an Patienten mit rheumatoider Arthritis sind jedoch durchaus mit der vorliegenden Arbeit zu vergleichen. Die Ergebnisse der vorgestellten Studien stehen im Einklang mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit, in der sich der Basenaustausch C→T an Stelle 677 des MTHFR-Gens als ein Risikofaktor für das Auftreten von Nebenwirkung darstellt.

4.3 Zum 1298A→C Polymorphismus und dessen Einfluss auf Effektivität

In keiner der bereits genannten Studien konnte ein Einfluss des 677→T Genpolymorphismus auf die Effektivität einer Methotrexattherapie gezeigt werden. Die bereits zitierte retrospektive Untersuchung von Urano et al. betrachtete auch den 1298A→C Polymorphismus hinsichtlich Toxizität und Effektivität. Hatte der 1298A→C Genotyp keinen Einfluss auf die Verträglichkeit der Behandlung der RA – Patienten, konnte Urano et al. zeigen, dass Mutationsträger unter der Methotrexattherapie einen stärkeren Rückgang der Entzündungsparameter BSG bzw. CRP aufwiesen als 1298AA – Patienten. Eine Korrelation mit den klinischen Parametern – Anzahl schmerzhafter bzw. geschwollener Gelenke – konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Allerdings waren bei Patienten, die Träger des Allels C waren, signifikant geringere Methotrexatdosen notwendig, um deren Krankheitsaktivität zu kontrollieren. Diese Ergebnisse von Urano et al. sind konkordant mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit, bei der 1298-Mutationsträger unter der Behandlung mit Methotrexat

signifikant bessere Entzündungsparameter aufweisen und unter einer geringeren Anzahl schmerzhafter Gelenke leiden. Im Gegensatz zum 677C→T Polymorphismus scheint der 1298A→C Genotyp Einflussfaktor für ein besseres Ansprechen der Methotrexatbehandlung zu sein.

In einer Studie die an 167 rheumatoiden Arthritis Patienten durchgeführt wurde, zeigte sich weder hinsichtlich des 677C→T- noch des 1298A→C Genotyps eine Assoziation mit Effektivität bzw. Toxizität einer Methotrexatbehandlung (Kumagai et al., 2003).

4.4 Unterschiedliche Effekte der MTHFR Genpolymorphismen

Warum beide Mutationen unterschiedliche Effekte bei der Therapie mit Methotrexat aufweisen ist letztlich unklar. Beide Mutationen führen zu einer verminderten Enzymaktivität der 5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase. Allerdings liegt die 677C→T Mutation in der katalytischen und die 1298A→C Mutation in der regulatorischen Domäne des Enzyms. Ein weiter Unterschied besteht darin, dass die Aktivität in unterschiedlichem Ausmaß vermindert wird: kommt es bei 677CT-Patienten zu einer Reduktion der Aktivität auf ca. 65% bzw. bei 677TT-Patienten auf ca. 30%, reduziert sich die Aktivität des Enzyms bei 1298AC-Patienten nur auf ca. 80% und bei 1298CC-Patienten auf ca. 60%. Neben der geringer ausgeprägten Reduktion der Enzymaktivität durch die 1298A→C Mutation, konnte bei 1298C-Allelträgern im Vergleich zu 677T-Allelträgern auch keine Thermolabilität des Enzyms nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich lediglich beim 677C→T Polymorphismus ein Zusammenhang zwischen Mutation und erhöhten Homocystein- bzw. erniedrigten Folsäureplasmaspiegeln.

Sowohl die 677C→T Mutation im MTHFR-Gen als auch die Behandlung mit Methotrexat haben einen inhibitorischen Einfluss auf die Enzymaktivität der MTHFR sowie einen Einfluss auf erhöhte Homocystein- und erniedrigte Folsäureplasmaspiegel. Erhöhte Homocystein- und erniedrigte Folsäureplasmaspiegel wiederum scheinen Vermittler von Nebenwirkungen sowie damit auch Ursache für einen etwaigen Therapieabbruch unter der Behandlung mit Methotrexat zu sein. Folsäuresubstitution senkte bei RA-Patienten, die mit Methotrexat behandelt wurden die Häufigkeit erhöhter Transaminasen sowie die Häufigkeit eines

Therapieabbruches – die Effektivität hingegen blieb von der Folsäuresubstitution unbeeinflusst. Die Methylentetrahydrofolatreduktase nimmt eine Schlüsselrolle im Folsäurestoffwechsel ein, und es ist wohl sehr wahrscheinlich, dass die Interaktion von Methotrexat mit dem Folsäuremetabolismus die entscheidende Rolle hinsichtlich der Toxizität der Behandlung spielt – die Ergebnisse dieser Arbeit erscheinen damit plausibel: der 677C → T Genotyp stellt ein Faktor für Toxizität dar, wohingegen beim 1298A → C Polymorphismus kein Zusammenhang mit der Verträglichkeit einer Methotrexattherapie besteht, da im Gegensatz zur Mutation an Stelle 677 ein Basenaustausch an Stelle 1298 keinen Einfluss auf die Homocystein- bzw. Folsäureplasmakonzentration hat, und Homocystein bzw. Folsäure als Vermittler von Toxizität fungieren könnten.

Weshalb jedoch der 1298A → C Genpolymorphismus ein Faktor für die Effektivität der Methotrexatbehandlung darzustellen scheint, während sich dies beim 677→T Polymorphismus nicht aufzeigen lässt, ist durch die unterschiedlichen Auswirkungen auf den Homocystein- bzw. Folsäurespiegel nicht zu erklären. Es ist jedoch auch noch ungeklärt, welcher bzw. ob einer der bereits in Kapitel 1.2 dargestellten Mechanismen der Methotrexatwirkung die entscheidende Rolle in der Therapie rheumatologischer Erkrankungen und damit der Behandlung der JIA spielt. So könnte der inhibitorische Einfluss von Methotrexat auf die folsäureabhängige Methylentetrahydrofolatreduktase bezüglich der antirheumatischen Wirkung eine weniger dominante Rolle spielen, als bezüglich der toxischen Wirkung der Methotrexatbehandlung. Pharmakokinetische Untersuchungen könnten wertvolle Ergebnisse über die unterschiedlichen Effekte der beiden Polymorphismen und damit über die Verknüpfung von Genotyp und Phänotyp liefern.

Zahlreiche Studien unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit, wenngleich jedoch keine vergleichbaren Untersuchungen an Patienten, die an juveniler idiopathischer Arthritis erkrankt sind bisher veröffentlicht wurden. Es kann nur spekuliert werden, ob in Zukunft die Analyse des MTHFR – Genotyps von klinischer Bedeutung bei der Behandlung der JIA sein wird - in weiteren Untersuchungen könnten jedoch einige wichtige offene Aspekte geklärt werden.

5. Literaturverzeichnis

- ¹ Ansell BM: Prognosis in juvenile arthritis. *Adv Exp Med Biol* 455 (1999) 27-33
- ² Chabner BA, Allegra CJ, Curt GA, Clendeninn NJ, Baram J, Koizumi S et al.: Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug? *J Clin Invest* 76 (1985) 907-912
- ³ Chen J, Giovannucci E, Kelsey K, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Spiegelman D, Willett WC, Hunter DJ: Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 56 (1996) 4862-4864
- ⁴ Cronstein BN, Naime D, Ostad E: The anti-inflammatory mechanism of methotrexate: increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an in vivo model of inflammation. *J Clin Invest* 92 (1993) 2675-2682
- ⁵ Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C, Seriolo B, Straub RH: Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid Arthritis. *Ann Rheum Dis* 60 (2001) 729-735
- ⁶ Davidson J: Juvenile idiopathic arthritis: a clinical overview. *Eur J of Radiol* 33 (2000) 128-134
- ⁷ De Vere-Tyndall A, Bacon T, Parry R, Tyrrell DA, Denman AM, Ansell BM: Infection and interferon production in systemic juvenile chronic arthritis: a prospective study. *Ann Rheum Dis* 43 (1984) 1-7
- ⁸ van Ede AE, Laan RF, Rood MJ, Huizinga TW, van de Laar MA, van Denderen CJ, Westgeest TA, Romme TC, de Rooij DR, Jacobs MJ, de Boo TM, van der Wilt G, Severens JL, Hartman M, Krabbe PF, Dijkmans BA, Breedveld FC, van de Putte LB: Effect of Folic or Folinic Acid Supplementation on the Toxicity and Efficacy of Methotrexate in Rheumatoid Arthritis: A Forty-Eight-Week, Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Arthritis Rheum* 44 (2001) 1515-1524

- ⁹ van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, Huizinga TW, Haagsma CJ, Giesendorf BA, de Boo TM, van de Putte LB: The C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: a genetic risk factor for methotrexate-related elevation of liver enzymes in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 44 (2001) 2525-2530
- ¹⁰ van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, Boers GH, Haagsma CJ, Thomas CM, de Boo TM, van de Putte LB: Homocysteine and folate status in methotrexate-treated patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 41 (2002) 658-665
- ¹¹ Frosst P, Bloom H, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJH, den Heijer M, Kluijtmans LAJ, van den Heuvel LP, Rozen R: A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 10 (1995) 111-113
- ¹² Galivan J: Evidence for the cytotoxic activity of polyglutamate derivates of methotrexate. *Mol Pharmacol* 17 (1980) 105-110
- ¹³ Gerards AH, de Lathouder S, de Groot ER, Dijkmans BA, Aarden LA: Inhibition of cytokine production by methotrexate. Studies in healthy volunteers and patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 42 (2003) 1189-1196
- ¹⁴ Giannini EH, Brewer EJ, Kuzmina N, Shaikov A, Maximov A, Vorontsov I, Fink CW, Newman AJ, Cassidy JT, Zemel LS: Methotrexate in resistant juvenile rheumatoid arthritis. Results of the U.S.A.-U.S.S.R. double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med* 326 (1992) 1043-1049
- ¹⁵ Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AM, Rosenblatt DS, Matthews RG, Rozen R: Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet* 7 (1994) 551
- ¹⁶ Haagsma CJ, Blom HJ, van Riel PL, van't Hof MA, Giesendorf BA, van Oppenraaij-Emmerzaal D, van de Putte LB: Influence of sulphasalazine, methotrexate, and the combination of both on plasma homocysteine concentrations in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 58 (1999) 79-84

- ¹⁷ Hanson NQ, Aras Ö, Yang F, Tsai MY: C677T and A1298C Polymorphism of the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene: Incidence and Effect of Combined Genotypes on Plasma Fasting and Post-Methionine Load Homocysteine in Vascular Disease. *Clin Chem* 47 (2001) 661-666
- ¹⁸ Hofer M, Southwood TR: Classification of childhood arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 16 (2002) 379-396
- ¹⁹ Kluijtmans LA, Kastelein JJ, Lindemans J, Boers GH, Heils SG, Bruschke AV, Jukema JW, van den Heuvel LP, Trijbels FJ, Boerma GJ, Verheugt FW, Willems F, Blom HJ: Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. *Circulation* 96 (1997) 2573-2577
- ²⁰ Kraan MC, Smeets TJ, van Loon MJ, Breedveld FC, Dijkmans BA, Tak PP: Differential effects of leflunomide and methotrexate on cytokine production in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 63 (2004) 1056-1061
- ²¹ Kremer JM: Methotrexate and leflunamide: biochemical basis for combination therapy in the treatment of rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 29 (1999) 14-26
- ²² Kumagai K, Hiyama K, Oyama T, Maeda H; Kohno N: Polymorphisms in the thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase genes and sensitivity to the low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Mol Med* 11 (2003) 593-600
- ²³ Laufer S, Gay S, Brune K: *Rheumatische Erkrankungen und Entzündungen: von den molekularen Grundlagen zur medikamentösen Therapie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2002
- ²⁴ Löffler G: *Basiswissen Biochemie: mit Pathobiochemie*. 4.Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, (usw.), 2001

- ²⁵ Löffler P, Petrides PE: Biochemie und Pathobiochemie. 7.Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, (usw.), 2003
- ²⁶ Lovell DJ, Giannini EH, Reiff A, Cawkwell GD, Silverman ED, Nocton JJ, Stein LD, Gedalia A, Ilowite NT, Wallace CA, Whitmore J, Finck BK: Etanercept in children with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 342 (2000) 763-769
- ²⁷ Mutschler E: Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 7.Aufl. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1996
- ²⁸ Nakajima A, Hakoda M, Yamanaka H, Kamatani N, Kashiwazaki S: Divergent effects of methotrexate on the clonal growth of T and B lymphocytes and synovial adherent cells from patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 55 (1996) 237-242
- ²⁹ Olsen NJ, Murray LM: Antiproliferative effects of methotrexate on peripheral blood mononuclear cells. *Arthritis Rheum* 32 (1989) 378-385
- ³⁰ Ou CY, Stevenson RE, Brown VK, Schwartz CE, Allen WP, Khoury MJ, Rozen R, Oakley GP, Adams MJ: 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphism as a risk factor for neural tube defects. *Am J Med Genet* 63 (1996) 610-614
- ³¹ Prescott NJ, Winter RM, Malcolm S: Maternal MTHFR genotype contributes to the risk of non-syndromic cleft lip and palate. *J Med Genet* 39 (2002) 368-369
- ³² Ranganathan P, Eisen S, Yokoyama WM, McLeod HL: Will pharmacogenetics allow better prediction of methotrexate toxicity and efficacy in patients with rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis* 62 (2003) 4-9
- ³³ Rau R,: Basitherapie der rheumatoiden Arthritis. 1.Aufl. UNI-MED VerlagAG, Bremen, 2000
- ³⁴ Rosenblatt DS, Whitehead VM, Vera N, Pottier A, Dupont M, Vuchich MJ: Prolonged inhibition of DNA synthesis associated with the accumulation of methotrexate polyglutamates by cultured human cells. *Mol Pharmacol* 14 (1978) 1143-1147

- ³⁵ Schmidt Klaus L: Checkliste Rheumatologie. 2.Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2000
- ³⁶ Sitzmann FC: Pädiatrie. 2.Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2002
- ³⁷ Skibola CF, Smith MT, Kane E, Roman E, Rollinson S, Cartwright RA, Morgan G: Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. Proc Natl Acad Sci USA 96 (1999) 12810-12815
- ³⁸ Sperling RL, Benincaso AI, Anderson RJ, Coblyn JS, Austen KF, Weinblatt ME: Acute and chronic suppression of leukotriene B₄ synthesis ex vivo in neutrophils from patients with rheumatoid arthritis beginning treatment with methotrexate. Arthritis Rheum (35) 1992 376-384
- ³⁹ Truckenbrodt H: Rheumatische Erkrankungen beim Kind und Jugendlichen. In: Sitzmann FC (Hrsg):Pädiatrie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2002, S. 554-581
- ⁴⁰ Ueland PM: Pharmacological and biochemical aspects of S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteine hydrolase. Pharmacol Rev 34 (1982) 223-253
- ⁴¹ Ulrich CM, Yasui Y, Storb R, Schubert MM, Wagner JL, Bigler J, Ariail KS, Keener CL, Li S, Liu H, Farin FM, Potter JD: Pharmacogenetics of methotrexate: toxicity among marrow transplantation patients varies with the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. Blood 98 (2001) 231-234
- ⁴² Urano W, Taniguchi A, Yamanaka H, Tanaka E, Nakajima H, Matsuda Y, Akama H, Kitamura Y, Kamatani N: Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene were associated with both the efficacy and the toxicity of methotrexate used for the treatment of rheumatoid arthritis, as evidenced by single locus and haplotype analyses. Pharmacogenetics 12 (2002) 183-190

- ⁴³ van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Blom HJ: A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neuraltube defects? *Am J Hum Genet* 62 (1998) 1044–1051
- ⁴⁴ Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J, Boston AG, Chen Z, Curtis Ellison R, Eckfeldt JH, Rozen R: The 1298A→C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis* 156 (2001) 409-415
- ⁴⁵ Weisberg IS, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R: A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 64 (1998) 169–172
- ⁴⁶ Weiß Christel: Basiswissen medizinische Statistik. 2. Aufl. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, (usw.), 2002
- ⁴⁷ Woo P, Wedderburn LR: Juvenile chronic arthritis. *The Lancet* 351 (1998) 969-973

6. Thesen

1. Die juvenile idiopathische Arthritis (JIA) ist mit einer Prävalenz von 20 – 30/100 000 Kinder und Jugendlichen unter 16 Jahren die häufigste chronisch entzündliche rheumatische Erkrankung im Kindesalter. Nach den ILAR-Klassifikationskriterien existieren 7 Unterformen der JIA.
2. Die medikamentöse Therapie der JIA, als wichtigstes Standbein in der Behandlung, ist individuell angepasst an JIA-Unterform, Krankheitsaktivität und Prognose. Als Medikamentengruppen stehen dabei Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR), Steroide, Basistherapeutika, Immunsuppressiva sowie Immunmodulatorische Therapieansätze zur Verfügung.
3. Methotrexat fungiert neben Hemmung der Dihydrofolat-Reduktase auch als potenter Inhibitor der Methylentetrahydrofolatreduktase. Weitere Wirkmechanismen (Hemmung der THYM-Synthetase, sowie der GAR- und AICAR-Transformylase) sind beschrieben. Ob ein bestimmter Mechanismus die entscheidende Rolle bei der antirheumatischen Wirkung spielt, ist noch Gegenstand der Forschung – es ergeben sich jedoch Hinweise, dass einzelne Wirkmechanismen unterschiedlichen Einfluss auf Effektivität bzw. Toxizität der MTX-Therapie haben.
4. Klinische Parameter einer effektiven Methotrexattherapie sind Verringerung der Anzahl an schmerzhaften, geschwollenen und bewegungseingeschränkten Gelenken, sowie die Besserung der Morgensteifigkeit. Laborchemisch ist der Rückgang der Entzündungsparameter (CRP, BSG) Zeichen einer erfolgreichen Therapie.
5. Die Therapie mit Methotrexat kann mit einer Reihe von Nebenwirkungen vergesellschaftet sein. Sie betreffen im Wesentlichen den Gastrointestinaltrakt, Haut, Blut/Knochenmark, Lunge und das Immunsystem. Seltener Nebenwirkungen betreffen die Nieren, das ZNS und die Gonaden.
6. Die 5,10-Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR), ein Schlüsselenzym des Folsäuremetabolismus wird von Methotrexat in seiner polyglutamierten Form direkt gehemmt. Zahlreiche Genpolymorphismen im MTHFR-Gen wurden bereits beschrieben.

Ein Basenaustausch an Stelle 677 führt zu einer thermolabileren Variante der MTHFR mit einer verminderten Enzymaktivität von ca. 65% beim Genotyp 677CT und von ca. 30% bei 677TT Homozygoten. Auch der A1298C-Polymorphismus ist mit einer reduzierten Enzymaktivität verbunden. Der Genotyp 1298AC weist eine ca. 80%ige und der Genotyp 1298CC eine ca. 60%ige Enzymaktivität auf. Lediglich der C677T-Genpolymorphismus steht zudem in Zusammenhang mit erhöhten Homocystein- bzw. erniedrigten Folsäureplasmaspiegeln. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des C677T- sowie des A1298C-Poymorphismus auf Effektivität und Toxizität bei der Behandlung der JIA mit Methotrexat untersucht.

7. 50% der untersuchten Patienten zeigten den Genotyp 677CC, 44,8% den Genotyp 677CT und 5,2% waren 677TT homozygot. Den 1298AA Genotyp wiesen 55,4% auf, 37,5% waren 1298AC heterozygot und 7,1% zeigten den Genotyp 1298CC. 14,3% erwiesen sich als kombiniert heterozygot – 677CT/1298AC.
8. Der C677T-Polymorphismus war mit einer höheren Wahrscheinlichkeit bezüglich des Auftretens von Nebenwirkungen assoziiert. 677T-Allelträger (677CT- und 677TT-Patienten) klagten signifikant häufiger über Nebenwirkungen als Patienten ohne Mutation. Im Vergleich zu Wildtyp-Patienten traten bei 677CT-Patienten 4,2mal häufiger mindestens eine Nebenwirkung auf. 677CT heterozygote Patienten zeigten signifikant häufiger erhöhte Lebertransaminasen, Erbrechen und gastrointestinale Symptome im Allgemeinen (Übelkeit, Erbrechen und Bauchschmerzen). Der A1298C-Polymorphismus zeigte keine Assoziation hinsichtlich der Toxizität von Methotrexat.
9. Bei der Betrachtung der Effektivität der Methotrexattherapie zeigte sich ein Zusammenhang mit dem A1298C-Polymorphismus. Träger des Allels 1298C (1298AC- und 1298CC-Patienten) zeigten unter laufender Methotrexattherapie signifikant bessere Entzündungsparameter (BSG und CRP) und litten unter einer signifikant geringeren Anzahl an schmerzhaften Gelenken als Patienten ohne Mutation. Im Vergleich zu 1298AA-Patienten präsentierten 1298AC-Patienten ebenso signifikant geringere Entzündungsparameter, erreichten häufiger Normwerte für BSG bzw. CRP und klagten über weniger schmerzhafte Gelenke. Die unterschiedlichen C677T-Genotypen zeigten dagegen keine Assoziation mit der Effektivität der Behandlung.

10. Bis jetzt existieren keine Studien mit JIA-Patienten, die den Einfluss der MTHFR-Polymorphismen auf Effektivität bzw. Toxizität der Methotrexattherapie untersuchen. Zum Vergleich der vorliegenden Daten bieten sich jedoch vor allem Studien bei Patienten an, die an rheumatoider Arthritis (RA) erkrankt sind. Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen dabei im Wesentlichen in Konkordanz zu Studien an Patienten mit RA.
11. Sowohl die 677C → T Mutation als auch die Behandlung mit Methotrexat haben hemmenden Einfluss auf die Enzymaktivität der MTHFR sowie auf erhöhte Homocystein- und erniedrigte Folsäureplasmaspiegel. Erhöhte Homocystein- bzw. erniedrigte Folsäureplasmaspiegel wiederum scheinen die wesentlichen Vermittler der Toxizität bei der Methotrexattherapie zu sein. Es erscheint damit plausibel, dass lediglich der C677T-Polymorphismus ein Faktor für die Verträglichkeit der Therapie darstellt, wohingegen sich beim A1298C-Polymorphismus kein Zusammenhang feststellen lässt, da im Gegensatz zum C677T-Polymorphismus die Mutation an Stelle 1298 keinen Einfluss auf die Homocystein- bzw. Folsäureplasmakonzentration hat.
13. Weshalb nur die 1298A → C Mutation ein Faktor für die Effektivität der Methotrexatbehandlung ist, während der C677T-Polymorphismus keinen Einfluss darauf hat, ist durch die unterschiedlichen Auswirkungen auf die Homocystein- bzw. Folsäurespiegel nicht zu erklären und bleibt letztlich ungeklärt. Weitgehend unklar ist jedoch auch, welcher bzw. ob einer der bisher bekannten Wirkmechanismen von Methotrexat die entscheidende Rolle bezüglich der antirheumatischen Wirkung spielt.
14. Auch wenn die klinische Bedeutung der Analyse des MTHFR-Genotyps bei der Behandlung der JIA spekulativ sein mag - weitere Untersuchungen könnten wertvolle Erkenntnisse über die unterschiedlichen Effekte der beiden betrachteten Polymorphismen liefern und wichtige offene Aspekte über die Verknüpfung von Genotyp und Phänotyp klären.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Daniel Franz Biber
Anschrift Balthasarstr. 11
50670 Köln
Geburtsdatum/-ort 07.07.1977 in Mussenhausen, Bayern

Schullaufbahn

1984 – 1987 Grundschule Breitenbrunn/Loppenhausen
1987 – 1997 mathematisch-naturwissenschaftliches Gymnasium, Maristenkolleg Mindelheim, Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

1997 – 1998 Rettungsdiensthelfer an der Rettungswache Mindelheim, Bayerisches Rotes Kreuz, Kreisverband Unterallgäu
05/1998 Abschlusslehrgang zum Rettungssanitäter

Berufsausbildung

06/1998 – 12/1998 Besuch des Aufbaulehrganges „Rettungssanitäter zum Rettungsassistenten“ an der Paramed Rettungsdienstschule Dietmannsried; staatliche Prüfung für Rettungsassistenten
01/1999 – 10/1999 Beschäftigung im Rettungsdienst an der Rettungswache Mindelheim und verantwortlich für die Öffentlichkeitsarbeit des Bayerischen Roten Kreuzes im Kreisverband Unterallgäu

Studium

10/1999 – 03/2005 Medizinstudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
09/2001 Ärztliche Vorprüfung
08/2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2005 Wechsel an die Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg
05/2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

Chirurgie	Kreiskrankenhaus Rheinfelden (Universität Basel, Schweiz)
Innere Medizin	Hospital Lagomaggiore (Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentinien)
Anästhesie	Universitätsklinikum Erlangen

Ärztliche Tätigkeit

seit 07/2006	Assistenzarzt an der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
--------------	---

Köln, 01.11.2006

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die eingereichte Dissertationsschrift mit dem Titel „**Methylentetrahydrofolatreduktasegenpolymorphismen und Toxizität und Effektivität von Methotrexat bei juveniler idiopathischer Arthritis**“ unter Leitung von Prof. Dr. med. Gerd Horneff allein und selbstständig ohne die unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe, und alle hierbei benutzten wissenschaftlichen Arbeiten anderer Autoren und Hilfsmittel genau und vollständig angegeben habe. Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt. Ich versichere, dass diese Arbeit auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt.

Köln, den 01.11.2006

Daniel Biber

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Schmeling H, Biber D, Heins S, Horneff G: Influence of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms on efficacy and toxicity of methotrexate in patients with juvenile idiopathic arthritis. J Rheumatol 32 (2005) 1832-1836

Danksagung

Die vorliegende Dissertation habe ich an der Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg angefertigt. Mein Dank gilt Prof. Dr. Gerd Horneff für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die sehr gute Betreuung, die anregenden Diskussionen und die produktive Zusammenarbeit. Besonderer Dank gebührt Dr. Heinrike Schmeling für die Einarbeitung in die Thematik, ihre fachliche Kompetenz und die stetige freundschaftliche Hilfe und Unterstützung. Des weiteren möchte ich Dr. Sigrid Heins für die Mutationsanalyse im Forschungslabor der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität Halle-Wittenberg danken. Mein Dank gilt allen, die durch ihre freundliche Unterstützung zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben – nicht zuletzt den Patienten und ihren Familien für ihre Mitarbeit.

An dieser Stelle möchte ich meinen Eltern und Großeltern Danke sagen, die mir meine Ausbildung ermöglicht haben und mich von jeher in jeder Hinsicht unterstützt haben.