

Aus der Medizinischen Poliklinik, Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Komm. Direktor: Prof. Dr. M. Reincke

Einfluss von Polymorphismen der Methylentetrahydrofolat Reduktase sowie
des Multi-Drug-Resistance Proteins auf die Therapie der Rheumatoiden
Arthritis mit Methotrexat

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Julia Katharina Aust

aus

Bremen

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Rudolf Gruber
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Hendrik Schulze-Koops Priv. Doz. Dr. Katja Anslinger
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. H. Plischke
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	28.10.2010

I. Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	7
1.1 Allgemeines zu Rheumatologischen Erkrankungen	7
1.2 Epidemiologie	7
1.3 Äthiologie und Pathogenese der RA	8
1.3.1 Klinik der RA und Sonderformen	9
1.4 Diagnose	11
1.4.1 Spezielle Diagnostik	12
1.4.2 Aktivitätsparameter	13
1.4.3 Differentialdiagnostik	14
1.4.4 Therapie von chronisch entzündlichen Gelenkerkrankungen	15
1.4.4.1 Medikamentöse Therapie	15
1.4.4.2 Nichtmedikamentöse Therapieformen	18
1.4.5 Scores zur Erfassung der Krankheitsaktivität (DAS, SF-36)	19
1.4.5.1 HAQ	19
1.4.5.2 SF-36	19
1.4.5.3 Disease Activity Score (DAS 28)	20
1.5 Single Nukleotid Polymorphismus	22
1.6 Ziel der Arbeit	24
2 Patienten und Material	26
2.1 Patientenkollektiv und Kontrollgruppen	26
2.1.1 Durchführung	27
2.1.2 Datenschutz	28
2.1.3 Datenverarbeitung	28
2.1.4 Gestaltung der Fragebögen	28
2.1.4.1 Fragebögen HAQ / SF-36 / DAS 28	29
2.2 Laborgeräte	29
2.3 Chemikalien	30
2.4 Pufferlösungen	31
2.5 Enzyme	31
2.6 Oligonukleotide	31

2.6.1 Faustregel zur Bestimmung der Anlagerungstemperatur.....	32
3 Methoden.....	32
3.1 Molekulargenetische Methoden.....	32
3.1.1 Verarbeitung von EDTA-Blut zur Aufnahme in die DNA-Bank.....	32
3.1.2 Isolierung human genomischer DNA aus Vollblut.....	33
3.1.3 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	34
3.1.4 Die Polymerase-Kettenreaktion.....	34
3.1.5 Restriktionsverdau.....	35
3.1.6 Die Agarosegelelektrophorese.....	36
3.1.7 Auswertung des Gellaufes und Dokumentation, RFLP-Analyse.....	37
3.2 Blutkörperchengeswindigkeit (BSG/ BKS).....	37
3.3 C-reaktives Protein (CRP).....	37
3.4 Cyklisches Citrulliertes Peptid (CCP).....	38
3.5 Statistische Auswertung.....	38
4 Ergebnisse.....	39
4.1 Patienten und Kontrollen.....	39
4.1.1 Häufung weiterer Erkrankungen in der Patientengruppe.....	39
4.1.2 Häufung von Rheumatoider Arthritis in der Familie.....	39
4.1.2.1 Zusammenhang von Genotypen und der Häufung von familiärer RA.....	39
4.1.2.2 Häufung anderer Erkrankungen in der Familie.....	40
4.1.2.3 Zusammenhang von Genotyp und anderen Erkrankungen in der Familie.....	40
4.1.3 Häufigkeit der Genotypen bei Patienten und Kontrollen.....	40
4.1.4 Genotypen und Alter: Erstdiagnose.....	42
4.1.5 Genotypverteilung bei Männern und Frauen.....	44
4.1.6 Assoziation der Genotypen MTHFR und MDR-1 2.....	44
4.2 Korrelation mit Verlaufsparemtern.....	45
4.2.1 Korrelation der Polymorphismen mit den Variablen des DAS-28.....	45
4.2.1.1 Veränderungen des Tender Joint Count (28).....	45
4.2.1.2 Veränderung des Swollen Joint Count (28).....	46
4.2.1.3 Veränderung der BSG.....	47
4.2.2 Veränderung des Disease Activity Scores	48
4.2.3 HAQ und Polymorphismen.....	49
4.2.4 Auswertung des SF-36.....	50
4.2.5 Genotypverteilung und CCP.....	53

4.3 Patientenkollektiv bezüglich der Nebenwirkungen.....	54
4.3.1 Patientenkollektiv bezüglich der MTHFR C677T und A1298C Polymorphismen.....	55
4.3.1.1 Patienten bezüglich des MDR-1 C3435T Polymorphismus.....	57
4.3.2 Genotypverteilung und Therapiedauer.....	57
4.3.3 Korrelation der Polymorphismen und Kombinationstherapien.....	58
4.3.4 Genotypverteilung und Toxizität	58
4.3.4.1 Genotypverteilung und organspezifische Toxizität.....	59
4.3.4.1.1 Nebenwirkungen und Alkoholkonsum bei Patienten mit RA.....	61
4.3.4.1.2 Nebenwirkungen und Kaffee-/ Grünteeconsum bei Patienten mit RA.....	61
4.3.5 Genotypverteilung und Ansprechen auf die Therapie mit MTX.....	62
5 Diskussion	62
6 Zusammenfassung	67
II. Literaturverzeichnis	69

1 Einleitung

1.1 Allgemeines zu Rheumatologischen Erkrankungen

Der Stützapparat und unsere Bewegungsorgane bestimmen im Wesentlichen Haltung, Form und Fortbewegung des Menschen. Einen großen Anteil an unserer Lebensqualität, Leistungsfähigkeit und unserem Selbstverständnis haben ihre einwandfreie und vor allem schmerzfreie Funktionserfüllung. Eine Krankheit die diese Eigenschaften beträchtlich einzuschränken vermag, ist die Rheumatoide Arthritis (RA).

Rheuma, abgeleitet von dem griechischen Wort „rheo“ - ich fließe, bezeichnet im Volksmund allgemein Beschwerden des Bewegungsapparates mit meist lang anhaltenden oftmals ziehenden, reißenden und eben auch fließenden Schmerzen welche den Alltag funktionell stark beeinträchtigen können.

Die Begriffe Rheuma und Rheumatismus wurden erstmals 1642 von Guillaume de Baillou (französischer Arzt und Begründer der modernen Epidemiologie, *1538 in Paris; †1616) in seinem Werk *liber de rheumatismo et pleuritide dorsali* verwendet. Baillou war ein Verfechter der Humoralpathologie, der Lehre der Körpersäfte, und glaubte an das Herabfließen kalten Schleims vom Gehirn zu den Extremitäten wo dieser die Beschwerden auslösten sollte (Bloch H (1979)).

Die medizinisch korrekte Bezeichnung für Rheuma ist der Terminus „Krankheiten des rheumatischen Formenkreises“ da sich hinter dem Begriff eine Vielzahl von Erkrankungen verbergen, welche durch unterschiedlichste klinische und experimentelle Forschungsarbeiten und durch Jahrhunderte langes Sammeln von Erfahrungswerten und Beobachtungen definiert werden mussten.

1.2 Epidemiologie

Geographisch kennt sie keine Begrenzungen, auffällig ist jedoch die niedrige Prävalenz im ländlichen Afrika, China und Japan und eine sehr hohe Prävalenz bei den Pima-Indianern (5,3%) und den Chippewa-Indianern (6,8%) [Silman AJ et al. (2002)]. Sie kommt weltweit (Verhältnis: Frauen/ Männer etwa 2 – 5/ 1) mit einer Prävalenz von etwa 0,5 - 1,0% vor. Auch wenn die Erkrankung in jedem Alter auftreten kann, ist sie durch zwei Krankheitsgipfel gekennzeichnet. Der erste, geringer ausgeprägte, betrifft vorwiegend 20- bis 30-jährige Frauen, der zweite und zahlenmäßig bedeutendere beeinträchtigt Personen zwischen dem 50. und 65. Lebensjahr. Die von manchen Autoren als eigenständiges Krankheitsbild beschriebene Alters-RA ist durch eine relevante

Komorbidität des höheren Lebensalters gekennzeichnet [Healy LA (1986)][Keitel W(1993)].

Die Rheumatoide Arthritis ist nicht mit sozioökonomischem Status assoziiert. Der Effekt auf die Gesellschaft in Bezug auf Kosten, Behinderung und Funktionsverlust ist enorm. Obwohl der genaue Pathomechanismus noch immer unklar ist, gelang es im Laufe der letzten Jahrzehnte doch, viel über die zellulären und molekularen Mechanismen herauszufinden [Lee DM et al. (2001)].

Ihre familiäre Häufigkeit, eine 33-fach höhere Wahrscheinlichkeit unter eineiigen Zwillingen, dass auch der bislang gesunde Zwilling erkrankt, weist auf die Relevanz genetischer Merkmale hin, deren Bedeutung heute etwa auf 60% geschätzt wird [Mac Gregor AJ et al. (2000)].

1.3 Ätiologie und Pathogenese der RA

Es handelt sich um eine aggressiv- autoimmune Entzündungsreaktion des Körpers mit hauptsächlich Gelenkbeteiligung und hohem Destruktionspotential, die mit schnellem Funktionsverlust sowie reduzierter Lebenserwartung, Deformierung und Behinderung assoziiert ist [Antony AC (1992)][Drossaers-Bakker KW et al. (1999)][Pincus T et al. (2001)].

Über die Ätiologie ist bislang zahlreich spekuliert worden, doch liegt sie immer noch im Dunkeln. Es wird davon ausgegangen, dass sowohl Umwelt- als auch genetische Faktoren bei der Entstehung bzw. Prädisposition eine Rolle spielen. Da sich bislang bei den Entzündungen der RA keine direkten Erreger finden ließen, vermutet man eine fehlgeregelte, übersteigerte Aktivität des Immunsystems gegen körpereigene Gewebebestandteile, getriggert von exogenen, eventuell infektiösen Antigenen.

Zu den Merkmalen der chronischen Polyarthritis zählt die chronische Synovitis mit konsekutiver Hyperplasie der Gelenkschleimhaut, die zu Gelenkreizungen und schließlich zu Knorpel- und Knochendestruktion führt. Extraartikuläre Beteiligungen können, in Form chronischer Anämie, Rheumaknoten, Herz-, Lungen-, Augen- und Gefäßbeteiligungen etc., vorhanden sein. Der Befall innerer Organe und auch des Achsenskelettes (insbesondere der HWS) kann zu akut lebensbedrohlichen Komplikationen führen [Montemerani M et al. (1994)].

Des Weiteren existiert noch eine Vielzahl von Sonderformen. Beispielhaft seien das Felty- Syndrom und das Still- Syndrom, besonders schwere Verlaufsformen des Erwachsenen- beziehungsweise des Kindesalters erwähnt. Das Vorkommen autoreaktiver T- Lymphozyten, B- Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen etc., sowie von Rheumafaktoren (Autoantikörper gegen das F_c-Fragment des IgG-Antikörpers) charakterisieren sie als Autoimmunkrankheit.

Bislang dominierte allgemein ein Erklärungsansatz, der von einer molekularen Mimikry ausgeht, bei der ein Erreger ein ähnliches Oberflächenantigen wie auch das eigene Gewebe des Erkrankten

präsentiert. Die hierdurch aktivierte Immunabwehr richtet ihr zerstörerisches Potential nach Elimination des ursprünglichen Antigens gegen die eigenen, ähnlichen Zellen.

Eine genetische Prädisposition für eine RA wird heute allgemein auf ca. 60% geschätzt und die HLA-DRB1-Shared-Epitope (SE) Region konnte hierbei in mehreren ethnischen Gruppen als wichtigster genetischer Risikofaktor belegt werden [Del Rincon I et al. (2003)]. Insbesondere wird das Shared Epitope stark mit einer schwereren Verlaufsform der RA assoziiert [Gorman JD et al. (2004)].

Das Krankheitsgeschehen zeigt sich in seiner Entwicklung weitgehend stereotyp. Wird das „vermeintliche“ Antigen im Gelenk erkannt, erfolgt eine Einwanderung von Zellen der spezifischen und unspezifischen Immunabwehr. Nachdem diese sich an die „infizierten“ Zellen (z.B. Synovialis oder Knorpel) binden, kommt es zur Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen. Dadurch werden sowohl weitere immunkompetente Zellen in das Gelenk gelockt, als auch die bereits vorhandenen Zellen zur Proliferation angeregt.

Die massive Zerstörung von Knorpel- und auch Knochenstrukturen setzt ein. Die Immunreaktion wird durch freigesetzte Proteoglykane des Kollagens weiter verstärkt und die Synovialis wuchert zu einem Pannus aus Bindegewebe und Entzündungszellen. Endstadium sind zerstörte Knorpelflächen und Knochen, die die Funktion des Gelenkes nicht mehr gewährleisten. Infolge dessen kommt es zu biomechanischer Instabilität mit Mutationen und knöchernen Ankylosen.

1.3.1 Klinik der RA und Sonderformen

Ein an rheumatoider Arthritis erkrankter Patient, stellt sich regelhaft mit Gelenkschmerzen und/ oder –schwellungen, aber auch mit systemischen Beschwerden wie leichter Ermüdbarkeit, Übelkeit, Gewichtsverlust, Depression, allgemeiner Müdigkeit, Unwohlsein, nächtlichem Schwitzen oder Fieber vor.

Der Schmerz wird in Ruhe wie bei Bewegungen empfunden und hindert den Patienten oft am Durchschlafen. Patienten klagen über eine oft Stunden dauernde morgendliche Steifigkeit der Gelenke als ein wichtiges Kriterium der RA. Im akuten arthritischen Schub sind die entzündeten und/ oder (Druck-) schmerzhaften Gelenke überwärmt, geschwollen und manchmal erythematös verändert. Es können prinzipiell alle Gelenke betroffen werden, Ausnahmen bilden allerdings die Finger- und Zehenendgelenke, welche aus bisher unbekanntem Gründen für gewöhnlich verschont bleiben. Charakteristisch für die RA ist ein symmetrischer Befall, mit Bevorzugung von Fingermittelgelenken (proximale Interphalangealgelenke, sogenannte „PIP“) und/ oder

Fingergrundgelenke (Metacarpo-phalangealgelenke, auch „MCP“). Dies gilt ebenso für den Befall von Zehengelenken (Zehengrund- und Zehenmittelgelenk). Zusätzliche arthrotische Veränderungen der Endgelenke, beispielsweise die sogenannte Heberden-Arthrose, können sich bei älteren Patienten einstellen, sind jedoch nicht speziell mit der RA assoziiert. Diese Endgelenksveränderungen werden im aktivierten Zustand oft als Endgelenksbeteiligung im Rahmen der RA fehlgedeutet.

Besteht die Krankheit bereits über einen längeren Zeitraum hinweg, zeigen sich in den muskulären Anteilen der beteiligten Gelenke Atrophien (z.B. am Handrücken, M. interosseus dors. I), gleichermassen Subluxationen und Ulnardeviationen, Knopfloch- und Schwanenhalsdeformitäten, die sich aus Verkürzungen von Sehnen und Instabilität der Gelenkanteile ergeben [van de Putte LB et al. (1995)]. Das Knochengewebe wuchert reaktiv periartikulär und es entstehen schließlich Versteifungen, die somit zu knöchernen Ankylosen und dadurch schließlich zu Funktionsverlust der Gelenke führen können. Werden häufige Skelettbeteiligungen, wie beispielsweise eine Beteiligung der oberen Wirbelsäule (hier zum Beispiel die atlanto-axiale Instabilität bzw. Dislokation, in 30% der Fälle vorhanden) nicht rechtzeitig erkannt, kann dies lethale Auswirkungen haben. [Montemerani M et al. (1994)].

Rheumaknoten sind knotige, in der subcutis gelegene Zellaggregate mit einer zentralen fibrinoiden Nekrose und palisadenartiger Anordnung von Epitheloidzellen. Diese zeigen sich bei ca. 20% der Betroffenen. Die Rheumaknoten sind meist gut sichtbar an den Streckseiten der Ellenbogen lokalisiert, können jedoch ubiquitär, also auch in viszeralen Organen vorkommen. So ist auch ein Befall der Lunge beschrieben, differentialdiagnostisch dürfen hier eine Tuberkulose oder ein Bronchialkarzinom nicht übersehen werden. Begleitende Vaskulitiden können zu Infarzierungen, Ulzera und Gangrän im Bereich der Akren führen.

Viele weitere Organbeteiligungen sind in der Literatur beschrieben. Prädisponierend für diese sind ein langjähriger, mit hoher Krankheitsaktivität einhergehender Verlauf.

Auch Nervengewebe kann durch Entzündungs- oder Regenerationsgewebe betroffen werden. Dies äussert sich zumeist im Sinne einer Kompression und deren Auswirkungen, bekanntestes Beispiel hier der Nervus medianus, dessen Kompression im Bereich des Karpaltunnels zu Schmerzen oder Missempfindungen an den ersten drei Fingern der betroffenen Hand führt. Auch dies wiederum würde unbehandelt zu Muskelrückbildungen und Lähmungen führen.

1.4 Diagnose

Eine frühe Diagnosesicherung ermöglicht auch eine früh- und rechtzeitige Beurteilung von Aktivität und Destruktionspotential der Erkrankung. Es ist ganz entscheidend für den weiteren Verlauf der Krankheit, durch die möglichst frühe Diagnose rechtzeitig eine adäquate Therapie einzuleiten, um bleibende Gelenksdestruktionen zu verhindern.

International einheitliche Kriterien zur Diagnose der RA wurden von der American Rheumatism Association (ARA) erstmals 1956 mit dem Ziel der Vergleichbarkeit wissenschaftlicher Studien veröffentlicht. Die revidierte Form der Kriterien des American College of Rheumatology (ACR) von 1987 [Arnett FC et al. (1988)], beziehungsweise die Guidelines for the Management of Rheumatoid Arthritis von 1996 [ACR ad hoc committee (1996)], sind heute wichtiger Bestandteil der Diagnosesicherung auch außerhalb von Studien. Die Diagnose einer RA kann gestellt werden, wenn mindestens vier Kriterien erfüllt sind. Die Kriterien 1-4 (s. Tabelle 1.1) müssen mindestens 6 Wochen bestehen.

Kriterium	Definition
1. Morgensteifheit	Morgendliche Steifheit in und um die Gelenke, die mind. 1 Std. anhält bevor sie sich bessert.
2. Arthritis in 3 oder mehr Gelenken	Mind. 3 oder mehr Gelenke gleichzeitig von Weichteilschwellung betroffen (PIP, MCP, Handgelenk, Ellenbogen, Knie, Sprunggelenk und MTP)
3. Arthritis der Gelenke der Hand	Mind. 1 geschwollen: Handgelenk, MCP oder PIP
4. Symmetrische Arthritis	Gleichzeitige Schwellung der einander entsprechenden Gelenke beider Körperhälften (sind PIPs, MCPs oder MTP betroffen muss keine absolute Symmetrie gewährleistet sein.)
5. Rheumaknoten	Subkutane Knötchen, über prominenten knöchernen Strukturen, Streckseiten der Extremitäten oder juxtaartikulär
6. Rheumafaktor im Serum	Gemessen mit einer Methode mit ausreichender Sensitivität und Spezifität
7. Radiologische Veränderungen	Für die Rheumatoide Arthritis typische Veränderungen von posteroanterioren Hand und Handgelenksaufnahmen, Erosionen und knöcherne Dekalzifikation müssen nahe der betroffenen Gelenke darstellbar sein (osteoarthritische Läsionen allein sind nicht ausreichend)

Tabelle 1.1: 1987 ACR-Kriterien für die Klassifikation der Rheumatoiden Arthritis

Es wird entschieden radikaler therapiert und nicht mehr nur entsprechend der Auffassungen der 70er und 80er Jahre des 20. Jahrhunderts in der Mehrzahl der Fälle mit lange erprobten

konservativen Therapien scheinbar zufriedenstellend behandelt [Conaghan PG et al. (1997)].

Wird eine hohe klinische Aktivität der Erkrankung festgestellt, versucht man heute frühzeitig hochwirksame Medikamente einzusetzen. Die Indikatoren einer hohen klinischen Aktivität sind:

- a) Hoher Ritchie-Index
- b) Schlechte Funktionsindizes (z.B. im Health Assessment Questionnaire, SF-36)
- c) Systemische Manifestation (z.B. Rheumaknoten)
- d) Hohe serologische Entzündungszeichen (BSG, CRP)
- e) Positiver Rheumafaktor/ CCP-Antikörper
- f) Nachweis von HLA-DR4- Epitopen (nicht routinemäßig)
- g) Radiologischer Nachweis von Gelenksdestruktionen
- h) Junges Alter bei Krankheitsbeginn
- i) Weibliches Geschlecht

Allerdings sind diese klinischen Manifestationen nur im Ausnahmefall vereint am Patienten anzutreffen, besonders in der frühen Phase der Krankheitsmanifestation. Dies erschwert eine frühzeitige Diagnose was häufig dazu führt, dass die Diagnose der RA gegebenenfalls erst nach Ausschluss anderer rheumatischer Krankheiten gestellt werden kann.

1.4.1 Spezielle Diagnostik

Ein weiterer, für diese Arbeit nicht bestimmter, Parameter ist der Rheumafaktor. Es handelt sich hierbei um Autoantikörper verschiedener Immunglobulinklassen, die sich gegen das Fc-Fragment des IgG richten. Ohne klinische Kriterien ist der Rheumafaktor allein nicht aussagekräftig da er auch bei anderen rheumatischen Erkrankungen auftritt und ebenso bei einem bestimmten Prozentsatz der Normalbevölkerung ohne Krankheitswert positiv ausfällt. Seine Spezifität steigt mit zunehmender Titerhöhe, ebenso wie ein für alle drei Rheumafaktor Subklassen positives Ergebnis. Dann spricht man von einer „seropositiven“ Rheumatoiden Arthritis. Ein negativer Nachweis stellt kein Ausschlusskriterium für eine Rheumatische Erkrankung dar [Van Boekel MAM et al. (2002)].

Da der Rheumafaktor keine alleinige Gültigkeit für die Diagnosestellung besitzt, so brachte die Entdeckung der sogenannten Citrullin-Antigene und -Antikörper eine deutliche Verbesserung der Labordiagnostik einer Rheumatoiden Arthritis. Es handelt sich um natürlich vorkommende

Antigene, die im entzündeten Synnovialgewebe und als zirkulierende Antigene in der Synovia von Patienten mit konstaterter Rheumatoider Arthritis nachgewiesen werden können. Der Nachweis von Anti-Citrullin-Antikörpern hat auch die Diagnose der frühen Stadien der Erkrankung deutlich verbessern können, sie scheinen bereits Jahre vor dem Krankheitsausbruch nachweisbar zu werden. Dennoch ist die Kombination mehrerer Marker, wie z. B. zusätzlich des Rheumafaktors zu bevorzugen [Matsui T et al. (2006)].

Pathogenetisch spielen auch intrazelluläre Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle. Diese Proteine induzieren die Produktion inflammatorischer Zytokine wie den Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF- α) und Interleukin 1 (IL1), diese waren jedoch für die vorliegende Arbeit ohne Belang.

1.4.2 Aktivitätsparameter

Antikörper gegen das Cyklische Citrullinierte Peptid (Anti-CCP) können schon in der Frühphase der RA gefunden werden und sind ein guter prognostischer Marker bei der Unterscheidung zwischen erosiver und nicht erosiver RA. Anti – CCP ist, wie schon in vielen Studien gezeigt, ein sehr spezifischer und sensitiver Marker für die RA [Matsui T et al. (2006)]. Ähnlich dem Rheumafaktor besteht kein Zusammenhang von Antikörpertiterhöhe und Krankheitsaktivität der Rheumatoiden Arthritis. Auch ein pathogenetischer Zusammenhang zwischen Anti-CCP-Antikörper und Auftreten von Rheumatoider Arthritis, ließ sich nicht beweisen. Somit ist der gegen das citrullinierte Peptid gerichtete Antikörper bei der Diagnostik sehr früher Rheumatoider Arthritis ein sensitiver Marker, jedoch nicht als Verlaufspareter für die Krankheitsaktivität geeignet.

Nicht nur lokal an den Gelenken zeigt sich ein entzündliches Geschehen. Speziell in Schüben der Erkrankung kann die systemisch inflammatorische Aktivität stark zunehmen. Es werden Akute-Phase-Proteine (z.B. C-reaktives-Protein) und andere Proteine (z.B. Rheumafaktoren) gebildet. C-reaktives Protein (CRP) wird als zentrales Akute-Phase-Protein von der Leber produziert und ins Blut abgegeben. Bei einer beginnenden Entzündung steigt die CRP-Konzentration im Blut als unspezifische Antwort auf entzündliche Prozesse und Tumoren binnen weniger Stunden an. Der Anstieg geht oft den Symptomen wie Schmerzen, Fieber und anderen ungezielten Entzündungszeichen voraus. Der diagnostische Wert ist mit dem der Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) vergleichbar. Das CRP hat eine kurze Plasma-Halbwertszeit (etwa 24 h), reagiert zu Beginn einer Erkrankung also schneller als die BSG und normalisiert sich nach Beendigung der Erkrankung ebenfalls schneller (ca. zwei Wochen) im Vergleich zur BSG (ca. vier Wochen). Daher ist der CRP-Wert in der Diagnostik akuter Infektionen der BSG überlegen. Grundsätzlich jedoch hinkt die CRP-Konzentration der Krankheitsaktivität 12-24 Stunden hinterher. Akute unkomplizierte Virus-

Infektionen zeigen keinen CRP-Anstieg; bakterielle Infektionen erhöhen das CRP [Pepys MB et al. (2003)].

1.4.3 Differentialdiagnostik

Die Differentialdiagnosen der Rheumatoiden Arthritis sind vielfältiger Art. Wertvolle Informationen zur Abgrenzung von anderen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises bringen die bereits erwähnte Anamnese und die detaillierte Befunderhebung. Häufige Differentialdiagnosen sind beispielsweise: Arthrosen (Heberden-, Bouchard-, Rhizarthrose), andere Autoimmunerkrankungen (Vaskulitiden, Kollagenosen), Stoffwechselerkrankungen (Arthritis urica), etc. Besonders im Frühstadium sind andere Erkrankungen, vor allem des rheumatischen Formenkreises, schwer abzugrenzen (Tabelle 1.2).

ERKRANKUNG	BESONDERE MERKMALE
SLE	ANA↑↑
Sharp – Syndrom	anti - RNP
Panarteriitis nodosa	Biopsie
Psoriasisarthritis	typische Hauterscheinungen
Morbus Bechterew	HLA-B 27, Sakroiliitis, Wirbelsäulen – und Thoraxbeweglichkeit eingeschränkt
Reaktive Arthritis	nach urethritischen oder enteritischen Infekten mit Reiter- Syndrom: Arthritis, Konjunktivitis, Urethritis
Rheumatisches Fieber	ASL- Titer ↑
Lyme Arthritis	asymptomatisch, anamnestisch Zeckenbiß, Erythema migrans, Ak- Nachweis gegen Borrelia burgdorferi
Infektiöse Arthritis	Monarthritis mit Erregernachweis im Gelenkpunktat
Arthritis urica	Harnsäure ↑, vor allen Großzehengrundgelenk betroffen
Fibromyalgie	Tender points
Polyarthrose der Fingergelenke	Fingerend-, mittelgelenke betroffen, Daumensattelgelenk (Rhizarthrose)
Morbus Behcet	Iritis, orale und genitale Aphthen, Erythema nodosum, Arthralgien

Tabelle 1.2: Rheumatische Erkrankungen mit den wichtigsten Unterscheidungsmerkmalen

1.4.4 Therapie von chronisch entzündlichen Gelenkerkrankungen

Ziele der Therapie der Rheumatoiden Arthritis sind:

- a) Schmerzfreiheit des Patienten
- b) Verminderung der entzündlichen Aktivität
- c) Hemmung der Gelenkzerstörung
- d) Funktionserhalt
- e) Verhinderung weiterer Organkomplikationen

Neue Therapien wurden entwickelt, und in klinischen Studien die Wirksamkeit der aggressiven Frühtherapie belegt, sie entscheidet oft über den weiteren Krankheitsverlauf [van der Heide DMFM et al. (1996)]. Der rheumatische Entzündungsprozess muss in dieser Zeit wirkungsvoll unterdrückt werden, da sonst Gelenkdestruktionen drohen. Da Ätiologie und Pathogenese weitgehend unklar sind, ist die Therapie als palliativ, mit dem Ziel, Anzeichen und Symptome zu lindern, anzusehen.

Heute werden im Vergleich zu den 80er Jahren verbesserte Resultate in der Behandlung der Rheumatoiden Arthritis erzielt [Van der Heijde DMFM et al. (1992)].

1.4.4.1 Medikamentöse Therapie

Aufgrund der unterschiedlichen Genese rheumatischer Erkrankungen bedarf es unterschiedlicher Therapieansätze.

Chronisch-entzündliche Arthritiden werden in der Regel durch mehrere Medikamentengruppen behandelt. Aufgeteilt in die hauptsächlichen Therapeutika der Grunderkrankung, kommen verschiedene Medikamentengruppen zum Einsatz.

Entzündungshemmer haben insbesondere in der Frühphase und bei noch nicht gesicherter Diagnose einen hohen Stellenwert und werden auch zur Abmilderung eines entzündlichen Schubes verwendet. Die Wahl des NSAR richtet sich nach Kostenfaktor, Dauer der Anwendung und Präferenz des Patienten [Greene JM et al. (1992)]. Weder Krankheitsverlauf noch Gelenkdestruktion werden beeinflusst und es gibt keine signifikanten Unterschiede trotz unterschiedlicher Nebenwirkungsprofile [ACR ad hoc committee (1996)].

Auch Kortikosteroide stellen nach wie vor durch ihre ausgesprochen antiphlogistische Wirkung eine wichtige therapeutische Option bei der Behandlung chronischer Arthritiden dar. Insbesondere in hoch aktiven Krankheitsphasen kann der rechtzeitige systemische Einsatz von Kortikosteroiden akut lebensrettend sein.

Aufgrund der autoimmunen Genese wird zusätzlich im Sinne einer Immunsuppression therapiert,

um so die Aktivität der fehlgeleiteten Immunabwehr zu modulieren. Die Therapie mit langfristig wirksamen Medikamenten, die so genannte „Basistherapie“, soll die destruierende Potenz der Krankheit weitestgehend vermindern.

Diese Gruppe der sogenannten DMARDs sollte so frühzeitig wie möglich angewandt werden, um Gelenksbeeinträchtigungen zu vermindern bzw. zu verhindern, die Integrität und Funktion der Gelenke zu wahren und zu guter letzt auch um hierdurch entstehende Kosten im Gesundheitswesen zu senken.

Die Behandlung erfolgt idealerweise nicht mehr als drei Monate nach Krankheitsbeginn und über einen längeren Zeitraum. Bis zu einem klinisch feststellbaren Wirkeintritt können 1-6 Monate verstreichen.

In die Gruppe der DMARDs zählt man Hydroxychloroquin (HCQ), Sulfasalazin (SSZ), Goldsalze, D-Penicillamen (DP), Azathioprin (AZA) und Methotrexat (MTX).

Methotrexat ist ein Folsäureantagonist mit immunsuppressiver Wirkung, aber mit dem Risiko gastrointestinaler Nebenwirkungen und fetaler Missbildungen bei Schwangeren. Es ist das Mittel der Wahl bei mittelschwerer bis schwerer RA. Methotrexat wird vorwiegend unverändert renal eliminiert, weshalb es bei Kombination mit NSAR zu erhöhter Toxizität durch die verminderte renale Ausscheidung kommt. Methotrexat wirkt antiproliferativ mit Verlangsamung der Gelenksdestruktion.

Als Folateanalogon wurde es ursprünglich in den 1940er Jahren synthetisiert und hergestellt um die Dihydrofolat-Reduktase zu hemmen [Seeger DR et al (1949)]. Folate (5-Methyl-Tetrahydrofolat) spielen eine wichtige Rolle für verschiedene Reaktionen, welche für die de-novo-Synthetisierung von Purin- und Pyrimidinvorläufern von DNA und RNA für die Zellproliferation benötigt werden. Dennoch ist es Eukaryoten nicht möglich, sie zu synthetisieren und sie müssen extern aufgenommen werden.

MTX wurde weitläufig für die Behandlung neoplastischer Krankheiten eingesetzt. Die Begründung, es 1951 für die Behandlung von Rheumatoider Arthritis einzusetzen war der hemmende Effekt auf die Proliferation von Lymphozyten und anderen, für die Entzündungsreaktion in Zellen wichtigen Zellen [Gubner R et al. (1951)]. Aus den nun in den folgenden zwanzig Jahren gesammelten Erfahrungen geht hervor, dass MTX nicht nur als einfaches zytotoxisches (antiproliferatives) Agens für an der Gelenkszerstörung mitverantwortlichen Zellen fungiert [Cronstein BN et al. (1993)]. Es ist schwierig zu verstehen, wie ein Medikament Entzündungen durch Inhibition der Proliferation immunkompetenter Zellen bei kurzzeitig effektiven Konzentrationen einmal pro Woche, verhindern

kann. Schnelle klinische Remission und schnelle Auswirkungen auf akute Phase Proteine, wie man sie bei niedrig dosierter Einnahme beobachten kann, weisen auf mehr anti-inflammatorische als antiproliferative (immunsuppressive) Effekte hin [Kremer JM (2004)].

MTX wird über einen Reduced Folate Carrier (RFC1, auch SLC19A1) über die Plasmamembran in die Zelle (Abbildung 1.1) transportiert und hemmt dort direkt und indirekt die Enzyme des Folatmetabolismus [Brzezinska A et al. (2000)]. In der Zelle wird es, katalysiert durch die Polyglutamat Synthetase, polyglutamiert durch Addition von zwei bis sieben Glutamarsäure-Gruppen. Dieser Prozess ist wichtig für die Erstellung und Aufrechterhaltung eines Folatpools im Zellinneren. Die polyglutamierte Form hat innerhalb der Zelle eine längere Halbwertszeit sowie eine höhere Substrataffinität. Dies hat vermutlich grosse Auswirkungen auf die Zytotoxizität, da die polyglutamierten Derivate nicht nur die Dihydrofolat Reduktase, als das Hauptziel der MTX-vermittelten Wirkung, sondern auch weitere, Folat-abhängige Enzyme hemmen [Genestier L et al. (2000)].

Methotrexat beeinflusst unter anderem die Wirkung der Methylentetrahydrofolat Reduktase durch seine Effekte im Folsäuremetabolismus. Die MTHFR ist mitverantwortlich für die Aufrechterhaltung der Folat- und Homocystein-Homöostase, Enzymmangel führt unter anderem zu neurologischen und vaskulären Erkrankungen [Frosst P et al. (1995)].

Hauptsächliche Gründe für einen Therapieabbruch der niedrig dosierten MTX-Therapie bei RA sind Wirklosigkeit und/oder Toxizität. Patienten klagen unter der Therapie über Übelkeit, Bauchschmerzen, Diarrhöen, Ulzera im Mundraum, gestörte Leberfunktion, Rheumaknoten und hämatologische Auswirkungen [Berkun Y et al. (2004)]. Geschätzte 30% der Patienten sprechen nicht gut auf die Behandlung an und in einer Metaanalyse der Cochrane Collaboration konnte gezeigt werden, dass Patienten unter MTX mit 4fach erhöhter Wahrscheinlichkeit unerwünschte Nebenwirkungen entwickeln und schließlich das Medikament absetzen [Suarez-Almazor ME et al. (1998)].

Würden die grundlegenden Mechanismen der Wirkungsweise von MTX aufgeklärt, könnte auch das Problem derer Patienten mit RA gelöst sein, die bisher als non-responder oder therapieresistent eingestuft werden.

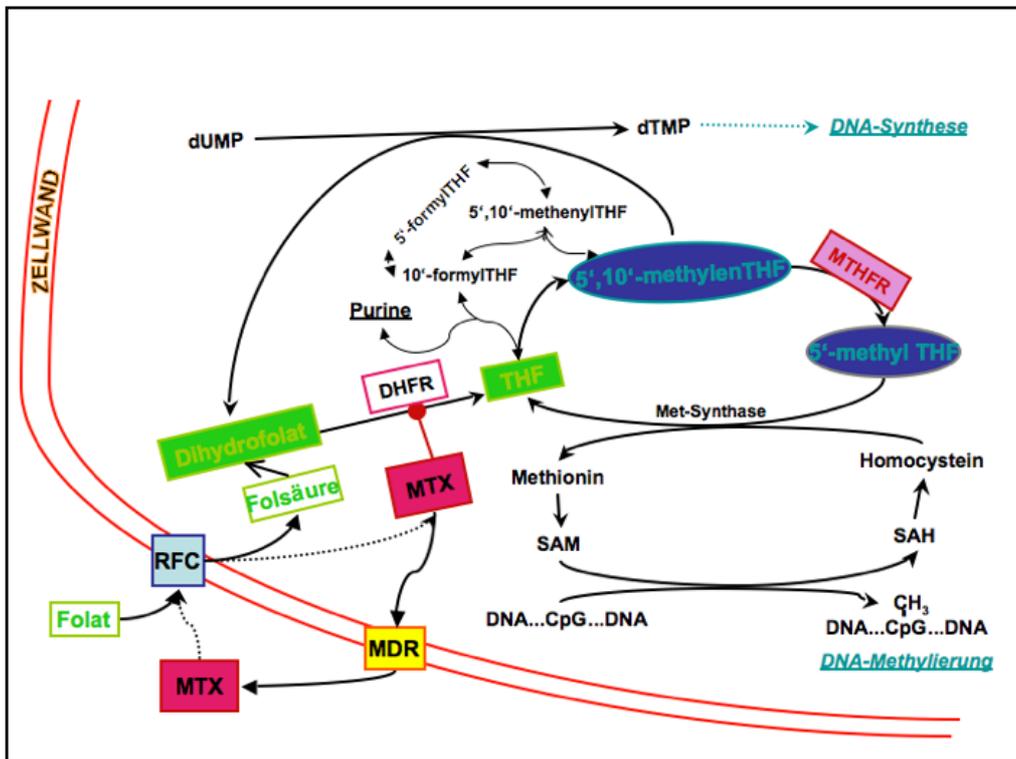


Abbildung 1.1: Schaubild der Wirk- und Transportmechanismen von MTX und MTHFR. RFC=Reduced Folate Carrier-1, MDR=Multi Drug Resistance Protein, DHFR=Dihydrofolat Reduktase, THF=Tetrahydrofolat.

Als schließlich vierte Gruppe werden TNF- α Blocker, eingesetzt. TNF- α wird hauptsächlich von Makrophagen produziert, doch auch Lymphozyten, Mastzellen, Endothelzellen und viele andere produzieren dieses Zytokin. Lokaler Anstieg von TNF- α führt zu einer Immunantwort mit Inflammation, Schmerz, Rötung und Schwellung in den betroffenen Gelenken. Diese Reaktion kann über einen monoklonalen Antikörper (Infliximab, Adalimumab) oder über ein zirkulierendes Fusionsprotein (Etanercept) gehemmt werden. Für das untersuchte Patientengut war jedoch eine Begleittherapie mit den sogenannten „Biologica“ ein Ausschlußkriterium.

1.4.4.2 Nichtmedikamentöse Therapieformen

Die bisher dargestellten Therapieformen stellen jedoch nur einen Teilaspekt der Therapieoptionen dar. Mindestens genau so wichtig für das Wohlergehen des Patienten und auch des Therapieerfolges ist ein adäquates supportives Angebot an nichtmedikamentösen Behandlungsformen wie z.B. begleitende psychologische Therapie, orthopädische Hilfsmittel, Physiotherapie, Ergotherapie bis hin zu - auch früher - rheumachirurgischer Intervention [Ranawat CS (1998)].

1.4.5 Scores zur Erfassung der Krankheitsaktivität (DAS, SF-36)

Bedenkt man den chronisch alternierenden Verlauf der Rheumatoiden Arthritis, muss ein langfristiger Behandlungsplan erstellt und der Patient in diesen Prozess mit einbezogen werden. Erwartungen an die Therapie und mögliche Hemmschwellen den Empfehlungen des Arztes zu folgen sollten diskutiert werden. Es wurde mehrfach nachgewiesen, dass psychologische Faktoren wie das eigene Selbstvertrauen, Krankheitsattributionen und Selbstwirksamkeitserwartungen Auswirkungen auf Therapieerfolg und Einhaltung der Therapie haben. Patienten sind oftmals in ihrer Lebensqualität schwerwiegend eingeschränkt [Newman S et al. (1996)]. Um diese Einschränkungen zu erfassen, wurden in der vorliegenden Arbeit im Folgenden beschriebene Methoden eingesetzt.

1.4.5.1 HAQ

Der Stanford Health Assessment Questionnaire (HAQ) ist ein in den 1970er Jahren von Jim Fries in Stanford entwickelter Fragebogen zur Erfassung des Ausmaßes der körperlichen Behinderung und der Einschränkung der Lebensqualität durch eine entzündlich-rheumatische Gelenkerkrankung. Er wurde erstmalig 1980 publiziert [Fries JF et al. (1980)]. Er ist das weltweit am meisten eingesetzte und am besten durch Forschung abgesicherte Instrument zur Messung der Funktionskapazität bei Rheumatoider Arthritis und wird international praktisch in allen relevanten klinischen Studien zur Rheumatoiden Arthritis verwendet [Bruce B et al. (2003)].

Mit Hilfe von 20 Fragen in acht Kategorien zu Aktivitäten des alltäglichen Lebens erfasst er die Beeinträchtigung der Patientinnen und Patienten in verschiedenen Bereichen (Anziehen, Aufstehen, Essen, Gehen, Körperpflege, Gegenstände reichen, Greifen, weitere Tätigkeiten) [Johnson SR et al. (2004)]. Für jede Frage wird der Schwierigkeitsgrad von 0-3 gemessen (0 = Patient ohne Schwierigkeit in der Lage, Aufgabe auszuführen, 1 = wenig Schwierigkeiten, 2 = Grosse Schwierigkeiten, 3 = unmöglich). Der HAQ-Behinderungsindex ergibt sich durch Mittelung der höchsten Werte jeder Kategorie, die so den Behinderungsgrad auf einer Skala von 0-3 ergeben. Je höher der Wert, umso höher wird der Funktionsverlust eingeschätzt. Eine klinisch signifikante Verbesserung wird ab einer Abnahme des HAQ um mindestens 0,5 Einheiten angenommen, die kleinste unterscheidbare Einheit (klinisch minimal differenzierbar) ist allgemein eine Veränderung um 0,22 Einheiten [Talamo J et al (1997)].

1.4.5.2 SF-36

Der SF-36 ist ein krankheitsübergreifendes Messinstrument mit 36 Fragen zur Erfassung des

allgemeinen Gesundheitszustandes der Patienten. Er umfasst 8 Skalen, die jeweils aus 2-10 Elementen bestehen. Diese acht Skalen formen zwei Cluster und ermöglichen somit Aussagen über körperliche (physical health) und geistige (mental health) Gesundheit. Er kann sowohl vom Patienten selbst, am Computer, von einem erfahrenen Interviewer und sogar am Telefon durchgeführt werden. Zur Erläuterung der einzelnen Komponenten siehe Abbildung 1.2 Werte werden für jede einzelne der acht Kategorien von 0-100 bestimmt wobei ein niedriger Punktwert einen schlechten Gesundheitszustand ausdrückt [Talamo J et al (1997)].

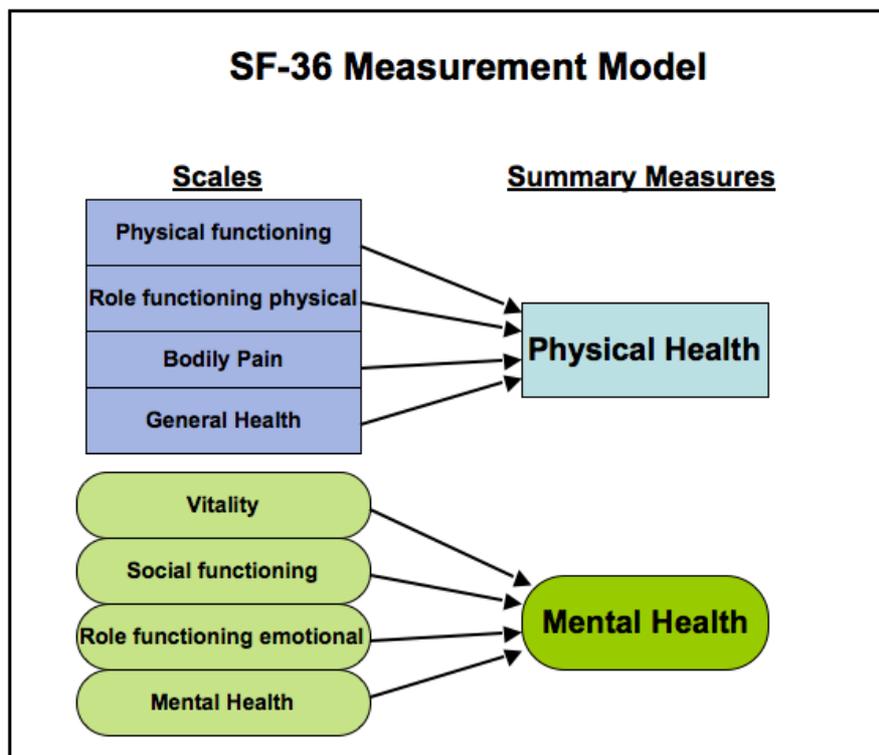


Abbildung 1.2: Sub- und Summenskalen des SF-36, adaptiert nach [Ware JE et al. (1994)]

1.4.5.3 Disease Activity Score (DAS 28)

Weiterhin wird der Disease Activity Score (DAS) berechnet, um die Wirkung von Basistherapien in kontrollierten Studien vergleichen zu können.

Der DAS ist die Summe aus, zu einem bestimmten Zeitpunkt am Patienten erhobenen krankheitsassoziierten Parametern, die je nach Wertigkeit mit einem Faktor gewichtet werden. Die wiederholte Erhebung nach einem definierten Zeitraum ermöglicht eine Abschätzung der Zu- bzw. Abnahme der Krankheitsaktivität.

In klinischen Studien wird der DAS 28 verwendet, um für einen bestimmten Patienten festzustellen, ob er, verglichen mit seinen Basisdaten, eine signifikante Verbesserung der Krankheitsaktivität erlangt hat. Für diesen Vergleich werden die EULAR response criteria herangezogen siehe Tabelle 1.3.

DAS 28 Verbesserung	>1,2	0,6 – 1,2'	< 0,6
Derzeitiger DAS-Wert			
< 3,2	Good Response	Moderate Response	No Response
3,2 – 5,1	Moderate Response	Moderate Response	No Response
> 5,1	Moderate Response	No Response	No Response

Tabelle 1.3: EULAR Response Criteria for DAS 28

Der DAS setzt sich aus einer bestimmten, vorgegebenen Anzahl (28) druckschmerzhafter Gelenke „tender joint count“ (TJ), einer gleichen Anzahl geschwollener Gelenke „swollen joint count“ (SJ), der Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) nach einer Stunde und aus einem Korrekturfaktor (ehemals die persönliche Einschätzung der Krankheitsaktivität des Patienten auf einer visuellen Analogskala (VAS 1-100)) zusammen. Die Eintragung erfolgt üblicherweise in ein Formblatt mit vordefinierten Gelenken.

Für klinische Studien gebräuchlich ist z.B. der DAS 28, mit 28 zu bewertenden Gelenken.

Die Berechnung des DAS 28 geschieht nach der Formel für 3 Variablen samt Korrekturfaktor:

$$DAS = (0,56*\sqrt{(28\ Tender\ Joints)})+0,28*\sqrt{(28\ Swollen\ Joints)}+0,7*LN(BSG))*1,08+0,16$$

Theoretisch erreicht dieser Werte von 0-10 und zeigt somit die derzeitige Aktivität der Erkrankung an, wobei ein DAS- Wert von 5,1 hohe Krankheitsaktivität, ein Wert unter 3,2 niedrige Krankheitsaktivität bedeutet. Remission gilt als erreicht bei DAS-Werten unter 2,6 (vergleichbar mit den ARA-Remissionskriterien).

Für die Durchführung von klinischen Studien hat sich der DAS als Standard etabliert. Allerdings konnten van der Heijde et al. unterschiede der Sensitivität des DAS im Vergleich mit den

Einzelparametern feststellen [van der Heijde DM et al. (1993)]. Im klinischen Alltag werden diese Parameter nicht streng nach diesem Schema berechnet, zumal nicht alle bei einer Untersuchung sichtbaren Aktivitätsparameter im DAS erfasst werden. Die Aktivitätseinschätzung ergibt sich in der Regel aus der Beurteilung des Untersuchers in Anlehnung an die Einzelparameter SJ, TJ, BSG (oder CRP).

1.5 Single Nukleotid Polymorphismus

Kommt es zu genetischen Veränderungen oder Variationen in der DNA-Sequenz eines Individuums, spricht man von Single Nucleotid Polymorphismen, SNPs. Diese Variationen treten beim Austausch einzelner Basenpaare, so genannter Single Nukleotide, auf. So wird zum Beispiel Adenin durch eine der anderen Basen, Thymin, Cytosin oder Guanin ersetzt.

Obwohl die meisten SNPs phänotypisch keine Veränderungen bei Ihren Trägern hervorrufen, wurde im Laufe der letzten Jahre immer öfter nachgewiesen, dass einige unter ihnen zu bestimmten Krankheitsbildern prädisponieren können.

Im Schnitt treten bei mehr als 1% der gesamten humanen Population solche SNPs auf. Auf Grund dessen, dass nur 3-5% der menschlichen DNA zur Proteinsynthese kodieren, finden sich die meisten jener Polymorphismen außerhalb dieser Bereiche. Für die Forschung sind gerade diese Punktmutationen in synthetisch aktiven Bereichen der DNA von großer Bedeutung, da diese leicht die Form und somit die biologische Funktion eines Proteins verändern können [Frosst P et al. (1995)].

Man verwendet den Term „genetischer Polymorphismus“, wenn ein monogen vererbtes Merkmal in der Bevölkerung in mindestens zwei Phänotypen und damit mindestens zwei Genotypen auftritt, jedoch keines der Allele eine geringere Häufigkeit als 1 bis 2% aufweist. Hingegen die seltene genetische Variante liegt bei einer Allelfrequenz <1% vor. Die Häufigkeit genetischer Polymorphismen unterliegt erheblichen ethnischen Unterschieden.

An der Aufnahme von Arzneistoffen aus dem Darm in den Organismus, dem Übertritt aus der Blutbahn an den Wirkort und der Ausscheidung über Leber und Nieren sind Transportproteine beteiligt. Jeder dieser Prozesse kann potentiell durch klinisch relevante genetische Variationen verändert sein. Mutationen, die die Expression und Funktion von Transportproteinen verändern, beeinflussen Umfang und Geschwindigkeit des Transports. In Abhängigkeit vom Genotyp kann somit der Transfer von Arzneistoffen aus der Blutbahn an den Wirkort erheblich variieren. Trotz vergleichbarer Plasmakonzentration des Arzneistoffs können somit Wirkung und Nebenwirkung

durch die unterschiedliche Bioverfügbarkeit von Patient zu Patient sehr unterschiedlich sein.



Abbildung 1.3: 3D-Modell des Enzyms Methylentetrahydrofolat Reduktase.

Mehrere dieser Einzel-Nukleotid Polymorphismen (SNPs) in Enzymen des Folatmetabolismus sowie in MTX-Transport-Proteinen sind beschrieben. Allein 15 davon im MTHFR-Gen (Darstellung des Enzyms s. Abbildung 1.3). Zwei dieser Polymorphismen (C677T und A1298C) wurden intensiv in diversen Zusammenhängen und verschiedenen ethnischen Gruppen untersucht [Friedman G et al. (1999)][Ghodke Y et al. (2008)]. Der Basenpaaraustausch C677T ist der häufigste und am intensivsten studierte. Er führt zu einem Aminosäurewechsel von Alanin zu Valin im Codon 222 des Nucleotids 677 mit funktionalen Auswirkungen, wie reduzierter Enzymaktivität und vermutlich vermehrter Toxizität unter der Therapie mit MTX [van der Put NM et al. (1998)]. Etwa 40% der asiatischen und kaukasischen Population sind heterozygot für diesen Polymorphismus während etwa 8-10% die Mutation heterozygot aufweisen [Ulrich CM et al. (2002)]. Der zweite SNP (A1298C) ist ein Glutamat-Alanin-Ersatz in Codon 429 und scheint schützende Effekte in Bezug auf die MTX-vermittelte Toxizität zu besitzen [Grabar PB et al. (2008)].

Ein weiteres Beispiel ist das für den Arzneimitteltransporter P-Glykoprotein (P-gP) verantwortliche Multidrug-Resistance Gen 1 (MDR1), ein Mitglied der ATP-binding cassette Familie. Es dient dem aktiven Transport überwiegend lipophiler Xenobiotika aus der Zelle und schleust somit auch MTX aus der Zelle hinaus. Genort ist die ATP-Binding Cassette B1 (ABCB1). Im MDR1 Gen sind mehr als 50 SNPs beschrieben worden [Schwab M et al (2003)]. Kürzlich wurden Mutationen beschrieben, die Einfluss auf die Effektivität von MTX in der Basistherapie der Rheumatoiden Arthritis nehmen. So setzt der Single Nucleotide Polymorphismus in Exon 26 an Stelle 3435 mit

Veränderung von Cytosin nach Thyrosin (MDR 1 C3435T, rs1045642) die P-gP Funktion in der Zelle herab, verlängert erneut die Halbwertszeit des Medikamentes in der Zelle und intensiviert dessen Wirkung. Patienten mit dieser Mutation zeigten mit einer 2,89-fachen Odds Ratio häufiger eine Remission als der CC-Typ und der CT-Typ [Pawlik A et al. (2004)].

Im Falle dieser Arbeit ist das wichtigste, die Pharmakokinetik beeinflussende, intrazellulär metabolisierende Enzym jedoch die polymorphe Methylentetrahydrofolat Reduktase (MTHFR). Zwei Varianten mit den SNPs C677T und A1298C konnten als Einflussfaktoren für Wirkung und Nebenwirkung identifiziert werden. So fanden sich beispielsweise erhöhte Leberwerte mit einem RR von 2,38 für das T-Allel von MTHFR 677 [van Ede AE et al. (2001)] Und in der asiatischen Population wurden für die Haplotypen C677C und A1298C niedrigere Methotrexat-Dosen zur Therapie der Rheumatoiden Arthritis benötigt [Urano W et al. (2002)].

1.6 Ziel der Arbeit

Trotz intensiver Forschung sind die Ursachen von chronisch entzündlichen Gelenkerkrankungen noch nicht geklärt. Präventiv kann daher nur wenig unternommen werden, um die Erkrankung zu verhindern. Hauptziel ärztlichen Handelns ist die bestmögliche Kontrolle dieser Krankheiten und die Vermeidung von Langzeitschäden. Dazu müssen die Patienten ohne längere Verzögerung die richtige Diagnosestellung erhalten und die adäquate medikamentöse Behandlung rasch etabliert werden.

Die für die Krankheitskontrolle verwendeten klassischen Medikamente, die so genannten Basistherapeutika, wirken verzögert und bei nicht wenigen Patienten zeigt sich erst nach einem viertel- bis halben Jahr der erste Erfolg. Bei entsprechend nicht effektiver Medikation kann die Krankheit im ungünstigsten Fall schon erhebliche Destruktionen an den betroffenen Gelenken hinterlassen haben, bevor eine wirksame Therapie begonnen werden konnte.

Methotrexat ist das am Häufigsten verschriebene DMARD und wird bei ungefähr einer halben Million Patienten mit Rheumatoider Arthritis weltweit eingesetzt. Auch in Deutschland ist Methotrexat aufgrund des günstigen Wirkungs- und Nebenwirkungsprofils nach wie vor das meistverwendete Basistherapeutikum mit Ansprechraten von 46-80% bei einer Dosierung von in der Regel 10-30 mg / Woche [Menninger H et al. (1998)]. Zudem kann durch verstärkten Einsatz von MTX die zunehmende Behinderung und die damit einhergehende Erwerbsunfähigkeit der RA Patienten deutlich reduziert werden [Puolakka K et al. (2005)].

Obwohl es so häufig in Gebrauch ist, sind viele der Aspekte seiner pharmakologischen Wirkweise

noch nicht klar. Die Wirksamkeit dieses Basismedikamentes ist zum einen in den letzten 20 Jahren durch vergleichende Studien gut belegt und für viele Patienten eine wirksame und gut verträgliche Therapieoption. Doch gibt es eine hohe Variation im klinischen Ansprechen auf die Medikation.

Zum anderen wird die Therapie häufig in den ersten Monaten aufgrund von Unverträglichkeit und/oder Insuffizienz abgebrochen und 10-30% der behandelten Patienten müssen die Behandlung aus diesen Gründen wieder abbrechen [Aletaha D et al. (2002)]. Es gibt gegenwärtig keine reliablen Tests welche die Wirkkraft oder die Schwere der Nebenwirkungen verlässlich vorhersagen können. Pharmakologische Analysen genetischer Polymorphismen der in den Metabolismus involvierten Enzyme können hier hilfreiche Ansätze liefern.

Die Methylentetrahydrofolat Reduktase ist ein zentrale regulierendes Enzym des Folsäuremetabolismus welches die Konversion von 5-Tetrahydrofolat zu 5,10-Methylentetrahydrofolat katalysiert, welches wiederum die Konversion von Homocystein zu Methionin katalysiert [Ranganathan P et al. (2003)]. Methotrexat verursacht auf zellulärer Ebene den Abbau von Folaten und beeinflusst die Aktivität dieses Enzyms.

Viele Studien haben eine Assoziation von Allelen immunregulatorischer Gene mit der Rheumatoiden Arthritis (RA) nachgewiesen [Berkun Y et al. (2004)][van Ede AE et al. (2001)] [Urano W et al. (2002)]. Es wurden jedoch auch gegenteilige Ergebnisse publiziert [Haagsma CJ et al. (1999)]. Etwa zwölf verschiedene Polymorphismen wurden bislang im MTHFR Gen beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Genorte eingeschlossen, für die von Kumagai *et al.* Assoziationen publiziert worden waren.

Ziel der Arbeit war es, die Bedeutung von C677T und A1298T Einzelbasenaustauschen im Methylentetrahydrofolat Reduktase Gen bezüglich der Toxizität und Effektivität von Methotrexat bei Patienten mit rheumatoider Arthritis zu untersuchen. Also wurden Wirkung und Nebenwirkung sowie das Auftreten unerwünschter Arzneimittelwirkungen unter Behandlung mit Methotrexat retrospektiv erfasst und anschließend beide SNP bei den Patienten mit RA analysiert.

Unter Umständen können die Ergebnisse japanischer Untersuchungen auch für die kaukasische Rasse bestätigt werden und ein erweitertes individuelles Therapiekonzept abgeleitet werden [Kumagai K et al. (2003)], welches durch die Untersuchung des Genotyps auf das Nebenwirkungsprofil Rückschlüsse zulässt.

Sollten sich die Ergebnisse bestätigen, wäre ein großer Schritt auf dem Weg zu einer individuellen Vorhersage von Wirkung und Nebenwirkung und somit einer effektiveren und effizienteren medikamentösen Therapie getan. Dabei scheint es insbesondere bei Langzeittherapien chronischer

Erkrankungen ein hohes Optimierungspotential zu geben, gerade im Hinblick auf Folgekosten durch inadäquate Behandlung (Arbeitsunfähigkeit, Frühberentung, Operationen, RehaMaßnahmen, etc.).

Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung von Prädiktoren der Verträglichkeit während der Therapie mit Methotrexat bei rheumatoider Arthritis des Erwachsenen.

2 Patienten und Material

2.1 Patientenkollektiv und Kontrollgruppen

Die 78 untersuchten Patienten stammten aus der Rheumatologischen Ambulanz des Asklepios Klinikum für Rheumatologie / Klinische Immunologie Bad Abbach (damaliger Leiter Prof. Dr. H. Menninger), Kooperationsklinik der Universität Regensburg. Insgesamt 82 Patienten (60 Frauen, 22 Männer) im Alter von 22 bis 83 Jahren wurden in die Studie aufgenommen. Zur Diagnosefindung dienten die Kriterien des American College of Rheumatology (ACR) für das Vorliegen von Rheumatoider Arthritis von 1987. Diese wurden bei Erstdiagnose von allen Patienten ausnahmslos erfüllt.

Für die Arbeit liegt uns ein Ethikvotum der Ethikkommission der LMU München vor. Die Patienten waren über Sinn und Absicht der Studie sowie die Untersuchungen ausführlich informiert und gaben ihr Einverständnis zu den molekularbiologischen Untersuchungen sowie der Einsichtnahme und Auswertung der Krankenakten.

Einschlusskriterien für die Aufnahme in die Studie waren Mono- und Kombinationstherapien mit Methotrexat (MTX) oder Patienten, die zur Nachuntersuchung kamen und welche zwar über einen längeren Zeitraum Methotrexat erhalten, dies jedoch aufgrund von unerwünschten Arzneimittelwirkungen wieder abgesetzt hatten.

Von der Studie ausgeschlossen wurden Patienten mit akuten schweren Begleiterkrankungen, die ein mögliches Confounding mit unerwünschten Wirkungen von MTX hervorrufen könnten. Die zusätzliche Einnahme von Steroiden und NSAR war - wie bei RA-Studien üblich – auch für diese Untersuchungen möglich, und wurde dokumentiert. Die Datenerhebung erfolgte mittels standardisierter Fragebögen.

Die meisten Patienten erhielten zum Zeitpunkt der Blutentnahme Methotrexat. Allerdings waren auch einige Patienten in der Kohorte, die aufgrund von unerwünschten Arzneimittelnebenwirkungen die Behandlung unterbrechen mussten. Dies bedeutete nicht

automatisch den Ausschluss von der Studie, da genau hieran der vermutete Zusammenhang von Polymorphismus und unerwünschten Arzneimittelwirkungen untersucht werden sollte.

Es gab für die Studie keine vorgeschriebene Altersbegrenzung, doch da das typische Manifestationsalter der chronischen Polyarthritits um die 4. bis 7. Lebensdekade liegt, verwundert es nicht, dass das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Untersuchungen bei etwa 59,3 Jahren lag (22-83 Jahre). Die Abstammung, also das Geburtsland, wurde zwar bis zu den Großeltern väterlicher- wie mütterlicherseits erfragt, stellte jedoch zunächst kein Kriterium für Aufnahme oder Ausschluss dar, sondern diente lediglich der Bestätigung der Zugehörigkeit zur kaukasischen Rasse.

Um zusätzlich den Vergleich mit einer gesunden Population zu ermöglichen, wurden 77 weitere, nicht verwandte Probanden durch das Zufallsprinzip aus einer Datenbank ausgewählte, gesunde Kontrollprobanden in die Studie aufgenommen. Bedingung für die Aufnahme in die Studie war der Ausschluss anamnestischer oder körperlicher Hinweise auf das Vorliegen einer systemischen Erkrankung aus dem rheumatoiden Formenkreis im Sinne einer Vaskulitis oder Kollagenose sowie Zugehörigkeit zur Kaukasischen Rasse. Alter, Geschlecht und BMI waren nicht von Bedeutung. Die Kontrollgruppen für die einzelnen Polymorphismen waren teilweise bereits für Genloci typisiert und in der DNA-Bank der Rheuma-Einheit der Poliklinik Innenstadt der Ludwig-Maximilian Universität erfasst worden.

Eine dritte Gruppe schließlich, mit insgesamt 77 nicht verwandten Patienten (sog. „Positiv-Kontrolle“), litt an Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, *ausgenommen* Rheumatoide Arthritis. Somit sollte es möglich sein, eine gewisse Häufung eines oder mehrerer SNPs wenn schon nicht ausschließlich bei MTX- Unverträglichkeit, so doch vielleicht bei RA oder zumindest anderen rheumatischen Erkrankungen nachzuweisen.

Bis auf die erste Gruppe wurden aufgrund der Anonymität der Daten bzw. deren Verschlüsselung keine weiteren Fragebögen ausgefüllt bzw. Untersuchungen der Patienten vorgenommen. Bei beiden Kontrollgruppen wurden ausschließlich die Polymorphismen bestimmt und miteinander ins Verhältnis gesetzt, um eine Korrelation zu ermöglichen.

2.1.1 Durchführung

Die Patientenauswahl wurde nach Mittelung durch das ärztliche Personal vorgenommen. In einem Patienten-Erfassungsbogen wurden Adresse, Diagnose, Geburtsdatum, behandelnder Arzt sowie Behandlungsbeginn festgehalten. Anschließend erfolgte die persönliche Einbestellung oder die Zusendung des Patientenbogens mit telefonischer Befragung. Auch wenn die Therapie früher

abgebrochen wurde, konnte die Befragung nicht immer zeitnah erfolgen und stützte sich in diesen Fällen auf Auskünfte sowohl von Seiten der Patienten als auch der Patientenakte. Die Befragung per Fragebogen diente der Feststellung von Therapiedauer, Compliance sowie der subjektiv (durch den Patienten) und objektiv (durch den Arzt) feststellbaren Wirkung und/ oder Nebenwirkung des Medikamentes.

2.1.2 Datenschutz

Um ausreichenden Datenschutz zu gewährleisten, wurden getrennte Personendaten- und Parameterdateien eingerichtet. Adresse, Geburtsdatum und Telefonnummern wurden in einer getrennten Datei im MS-Excel-Format angelegt und nur für den Fall einer notwendigen Kommunikation mit den Patienten verwendet. Die Fragebögen enthalten außer einer Seriennummer, Geschlecht und Geburtsjahr keinerlei Hinweise auf die Identität des Patienten. Geschlecht und Geburtsjahr sind als einzige ubiquitäre Daten auf Fragebogen/ Parameter- und Adressdatei vorhanden. Dies ist bei der Auswertung zur Detektion von Erfassungsfehlern nötig, ermöglicht jedoch nicht den Rückbezug von Daten auf einen speziellen Patienten.

2.1.3 Datenverarbeitung

Die Patientendaten sowie die Informationen der Auswertungsbögen wurden zunächst in eine computerlesbare Form gebracht (Excel- Tabelle), um sie im weiteren Verlauf computergeschützt auswerten zu können. Nachdem die Daten somit roh erfasst waren, fand eine zweite, stichprobenartig überprüfende Erfassung durch eine weitere, unabhängige Person statt. Diese, sozusagen doppelte Datenerhebung, lässt auf eine relativ fehlerfreie Übertragung der gewonnenen Daten schließen.

2.1.4 Gestaltung der Fragebögen

Um die Verträglichkeit von Basismedikamenten zu erfassen, sind vielfältige Themenbereiche inklusive Compliance, und sowohl Art als auch Dauer der Therapie zu erfragen. Somit wurde ausgehend von den publizierten Methoden der Literatur ein Fragebogen entwickelt, mit welchem die verschiedenen Einflussfaktoren auf die Verträglichkeit von Basismedikamenten weitestgehend erfasst werden konnten.

Es wurden 27 Fragen mit insgesamt 133 Ausprägungen zu folgenden Themen gestellt:

- a) Basismedikament
- b) Geburtsjahr, Geschlecht, Erstauftreten / Erstdiagnose der RA, Abstammungsland einschließlich der Großeltern
- c) Die effektive Therapiedauer mit Methotrexat
- d) Die Häufigkeit und Ursachen von Therapieabbrüchen
- e) Ärztliches oder eigenes Absetzen der Methotrexat-Therapie
- f) Auftreten und Dauer unerwünschter Begleiterscheinungen während der Therapie
- g) Zusatzinformationen über weitere Erkrankungen bzw. zusätzlich zur Basistherapie eingenommene Medikamente (durch ärztliche sowie persönliche Empfehlung), Risikofaktoren (z. B. Raucher, Alkohol-, Kaffee-, Grünteeconsum,..)
- h) Leidensdruck der Patienten und die subjektive Wirksamkeit von Methotrexat sowie weiteren eingenommenen Medikamenten.

Zusätzlich wurden der DAS 28 errechnet und die ACR- Response erhoben, sowie die in mehreren Studien validierten und standardisierten Patientenfragebogen HAQ und SF-36 zur Beurteilung des Outcomes erfasst.

2.1.4.1 Fragebögen HAQ / SF-36 / DAS 28

Jeder Patient wurde einzeln nach einem kurzen einleitenden Gespräch, ausführlicher Aufklärung über Studiendesign und –inhalt sowie Einwilligung und schriftlicher Einverständniserklärung unter Zuhilfenahme dieser Fragebögen befragt. Ziel war es, mehr über das subjektive Krankheitsempfinden und die Nebenwirkungen unter MTX-Therapie herauszufinden.

Der HAQ wurde wie in 1.4.5.1 besprochen erhoben. Für den SF-36 werden 36 Fragen mit 150 Ausprägungen zur Erfassung der globalen Lebensqualität gestellt und anhand 1.4.5.2 ausgewertet.

Der DAS 28 wurde wie unter 1.4.5.3 besprochen, bestimmt und berechnet. Es wurden 28 Gelenke untersucht, die BSG wurde zeitnah bestimmt und der 1-Stunden Wert floss in die Berechnung mit ein.

2.2 Laborgeräte

Brutschrank	Thermolyne, Type 142300 Incubator, Dubuque Iowa, USA
Elektrophoresekammer	BioRad, Sub-Cell GT Agarose Gel Electrophoresis Systems, Hercules

	CA, USA
Präzisionswaage	OHAUS, LS200, Folham Park NJ, USA
Spannungsgerät	Biotech Fischer, Pherostab 0352, Reiskirchen, Deutschland
Thermocycler	Biometra, T-Gradient Thermoblock, Göttingen, Deutschland
Vortex-Geräte	Scientific Industries, Vortex-Genie 2, Bohemia NY, USA
Zentrifugen	Hettich, Rotina 46R, Tuttlingen, Deutschland
	Heraeus Sepatech, Biofuge Primo, Osterode, Deutschland
	Heraeus Sepatech, Biofuge 13, Osterode, Deutschland
Kameratisch	Polaroid, MP4+ 44-16, Cambridge MA, USA
Kamera	EHD imaging GmbH, kamPro 02, Damme, Deutschland
Bildverarbeitungsprogramm	Paintshop Pro 7
UV-Transluminator	Konrad Benda, Faust N90 KW 254nm, Wiesloch, Deutschland
Thermomixer 5436	Comfort, Eppendorf, Deutschland
SpektrPhotometer Bio	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Eppendorf, Deutschland
Multimanpipette	Eppendorf, Deutschland
Pipettenspitzen	Filter DNA-frei, Sarstedt, Deutschland
Thermomixer	Comfort, Eppendorf, Deutschland
Reaktionsgefäße	DNA-frei, Biosphere Micro Tube 1,5ml, Sarstedt, Deutschland

2.3 Chemikalien

Agarose	PeqLab, peqGOLD MoSieve Agarose, Erlangen, Deutschland
	Merck, 1.01236.0500 Agarose, Darmstadt, Deutschland
Aqua ad injectabilia	Braun Melsungen AG, Deutschland
Ethanol 96-100%	Apotheke Innenstadt Universität München, Deutschland
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
HCL	Merck, Darmstadt, Deutschland
GelStar	Nucleic Acid, Cambrex Bio Science, Rockland, USA
Einfrriermedium 100ml 60ml HBSS (Hanks), GIBCO-BRL, Eggenstein, Deutschland	
	20 ml FCS, Kalbserum- Hitze inaktiviert, GIBCO-BRL, Eggenstein, Deutschland
	20 ml DMSO, SIGMA-Aldrich, USA
PCR-Master Kit	PCR-Master Mix S, peQlab, Erlangen, Deutschland (Mg ²⁺ , dNTP, Taq-Polymerase, A.bidest. enthalten)
Aqua bidest.	peQlab, Erlangen, Deutschland
Molekulargrößenstandard	Alpha Quant 5 25-500 bp, Alpha Innotech, San Leandro CA,

	USA
Natrium-EDTA	Titriplex, Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris	ICN Biochemicals Inc., Aurora, USA
Essigsäure	Apotheke Innenstadt Universität München, Deutschland

2.4 Pufferlösungen

TAE-Puffer (2/1/0,1M) pH 8,5	Apotheke Innenstadt Universität München, Deutschland
Laufpuffer der Agarosegele	TAE-Puffer 1:50 Aqua dest.
Applikationspuffer	AppliChem, DNA IV, Darmstadt, Deutschland
dNTP-Lösung (10x)	2 mM dATP 2 mM dCTP 2 mM dTTP 2 mM dGTP in PCR-Master Mix S, peQlab, Erlangen, Deutschland, enthalten
Restriktionspuffer:	
NEBuffer1 (1x)	10 mM Bis Tris Propane-HCL 10 mM MgCl ₂ 1 mM Dithiothreitol pH 7.0 @ 25 °C, New England Biolabs, Frankfurt
NEBuffer4 (1x)	50 mM K-Acetat 20 mM Tris-Acetat 10 mM Mg-Acetat 1 mM dithiothreitol pH 7.9 @ 25 °C, New England Biolabs, Frankfurt

2.5 Enzyme

Hinfl-Restriktionsenzym	New England Biolabs, Frankfurt
MB0II-Restriktionsenzym	New England Biolabs, Frankfurt

2.6 Oligonukleotide

Alle Primer wurden von der Firma New England Biolabs (Frankfurt) synthetisiert, gereinigt, lyophilisiert und gebrauchsfertig geliefert (Tabelle 2.1).

A1298C	<i>Forward primer sequence</i>	5'-CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTAC-3'
A1298C	<i>Reverse primer sequence</i>	5'-CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTAC-3'
C677T	<i>Forward primer sequence</i>	5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3'
C677T	<i>Reverse primer sequence</i>	5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'

Tabelle 2.1: Primer Sequenzen für die PCR Amplifikation der MTHFR SNPs.

2.6.1 Faustregel zur Bestimmung der Anlagerungstemperatur

$$T^{\circ} = (m \cdot 2^{\circ}\text{C} + n \cdot 4^{\circ}\text{C}) - 5^{\circ}\text{C}$$

m: Anzahl dATP und dTTP / Senseprimer

n: Anzahl dCTP und dGTP / Senseprimer

Die Anlagerungstemperatur entspricht der niedrigeren der beiden, für ein Senseprimerpaar berechneten, Temperaturen und gilt als Näherungswert, der je nach Primer oder verwendeten Apparaturen, um mehrere °C variieren kann.

3 Methoden

3.1 Molekulargenetische Methoden

3.1.1 Verarbeitung von EDTA-Blut zur Aufnahme in die DNA-Bank

Es wurden zur Verarbeitung der Proben 200 µl EDTA-Blut verwendet, welches maximal zwei Tage bei 4°C aufbewahrt wurde. Das Material wurde in eine DNA-freie Eppendorf-Küvette pipettiert und anschließend durch Zentrifugation (Hettich, Rotina 46R) bei 4000 UPM über zehn Minuten vom Plasma getrennt. Das Plasma wurde vorsichtig abpipettiert und bei -20 ° C eingefroren. Im folgenden Arbeitsschritt wurde der Buffy Coat erstellt, indem mittels schräg abgeschnittener Pipettenspitzen (Eppendorf-Standard) die Leukozyten vorsichtig von den Erythrozyten abgehoben wurden, wobei möglichst wenige Erythrozyten mitgeführt wurden. Etwa 700 µl des Buffy Coats konnten so entnommen werden und in eine frische, DNA-freie Küvette pipettiert wurden. Der so gewonnene Buffy Coat wurde mit 1,5 ml HANKS versehen und sanft per Hand durchmischt (kein Vortex!). Das Ergebnis wurde bei 8000 UPM für zwei Minuten (Biofuge) zentrifugiert, der

Überstand abpipettiert und verworfen. Die erhaltenen Pellets am Grund der Küvetten wurden mittels Vortex gelöst, mit 1000 µl des Einfriermediums aufgefüllt und wieder überkopf gemischt. Die so gewonnen DNA-Proben konnten anschließend markiert und in die DNA-Bank aufgenommen werden, wo sie bei -80 °C gelagert werden.

3.1.2 Isolierung human genomischer DNA aus Vollblut

Die DNA wurde mit Hilfe des Kits der Firma Qiagen isoliert.

Die DNA wurde an einer Silica-Gel-Membran gebunden, anschließend gewaschen und eluiert. Mittels hoher Konzentrationen an chaotropen Salzen wurden die Moleküle dehydriert und die Nukleinsäuren gebunden. Daraufhin wurden die nicht absorbierbaren Polysaccharide und Proteine entfernt und die Nukleinsäuren nach einem erneuten Waschschrift unter Niedrigsalzbedingungen (beschrieben nach [Miller SA et al. (1988)]) eluiert.

Die Proben und Reagenzien wurden auf Raumtemperatur erwärmt, die Reagenzien entsprechend der Anleitung (Qiagen) vorbereitet und der Thermomixer vortemperiert.

In ein 1,5 ml Eppendorf Reagenzgefäß wurden 20 µl Qiagen Protease pipettiert, 200 µl EDTA-Blut zugegeben und im Anschluss mit 200 µl Lysepuffer versetzt.

Der Probenansatz wurde mittels Vortex für ca. 15 sek. gut durchmischt und daraufhin, um die maximale Ausbeute zu erlangen, bei 56 °C über 10 min inkubiert. Zur Inaktivierung infektiösen Materials erfolgte eine weitere Inkubation bei 70 °C über 15 min.

Im Weiteren wurden die Ansätze für zwei Min. bei 8000 UPM zentrifugiert, dann mit 200 µl Ethanol versetzt erneut gut durchmischt (Vortex) und wiederum bei 8000 UPM über zwei Min. zentrifugiert. Das Lysat wurde auf die QiAmp-Säule zugegeben und nochmals weitere zwei min bei 8000 UPM zentrifugiert.

Das so entstandene Pellet wurde mitsamt dem Eppendorf Gefäß verworfen und die Säule auf ein Collection-Tube gestellt, mit 500 µl Waschpuffer AW1 gewaschen und anschließend bei 8000 UPM zwei min. zentrifugiert. Ein weiterer Waschschrift über einem neuen Collection-Tube erfolgte mittels 500 µl AW2 Waschpuffer und einer weiteren Zentrifugation bei 11990 UPM für drei min.

Dann wurde die Säule in das 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und das Collection-Tube verworfen. Um die DNA auszulösen wurde 200 µl AE-Puffer (= Aqua dest) zugegeben, bei Raumtemperatur über fünf min inkubiert und im Anschluss zwei min bei 8000 UPM zentrifugiert.

Die DNA befindet sich nun in 200 µl AE-Puffer und kann bei -20°C über einen längeren Zeitraum gelagert werden.

3.1.3 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Licht wird von Nukleinsäuren in Abhängigkeit von ihrer Konzentration (in einer Lösung) bei 260 nm Wellenlänge absorbiert. Proteine absorbieren ein Maximum an Licht bei 280 nm. Je grösser nun das Verhältnis der Absorbtionswerte bei 260 und 280 nm, also A_{260}/A_{280} wird, um so geringer ist der Anteil an Proteinen in der Lösung (die Verunreinigung). Das Verhältnis für reine DNS beträgt 2,0, angestrebt wird ein Verhältnis um 1,8. Da eine optische Dichte von 1 bei 260 nm 50 ng/ µl dsDNS entspricht, lässt sich hieraus die Konzentration der gemessenen Lösungen berechnen.

Zur Konzentrationsermittlung wurden DNA-freie Quartz-Küvetten mit einem im Verhältnis 1:21 (DNA:Ultraschall) gereinigten Wasser angesetzt, bei 260 nm Wellenlänge die Leerwerte bestimmt, Nulleichung durchgeführt und kontrolliert. Nach Zugabe von 10 µl DNS und Mischen der Lösung erfolgte die Bestimmung des Absorbtionswertes A_{260} . Nach erneuter Nulleichung erfolgte die gleiche Messreihe bei Licht der Wellenlänge 280 nm.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$c = OD * \text{Verdünnungsfaktor} * \odot$$

c: *Konzentration der DNA*

\odot : *Extinktionskoeffizient dsDNS (50ng/µl)*

OD₂₆₀: *Extinktion bei 260nm Wellenlänge*

3.1.4 Die Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR ist eine einfache und schnelle Methode für das Kopieren und Amplifizieren spezifischer DNA-Sequenzen bis zu einer Länge von 1 kb. Entsprechende Sequenzen des zum Kopieren vorgesehenen DNA-Stückes bestimmen die Oligonukleotid-Primer, welche verwendet werden (s. Tabelle 2.1 gemäß Peng *et al* [Peng F et al (2001)].)

Die Bestimmung des C677T Genotyps wird nach Frosst *et al.* [Frosst P et al. (1995)] durchgeführt. Hierfür wurde der Ansatz nach Peng *et al.* [Peng F et al (2001)] wie folgt modifiziert:

Die Isolierte DNA (5 µl) wird mit 12,5 µl Master-Mix, jeweils 0,05 µl Forward und Reverse Primer für die C677T und A1298C SNPs und 7,4 µl Aqua dest. angesetzt und inkubiert. Initial wird dieser

Ansatz bei 94 °C 12 Min. im Perkin Elmer 9700 Thermocycler denaturiert, um Basenpaare zu lösen und Einzelstränge (Matrizen) herzustellen. Anschließend erfolgen 35 Zyklen der PCR Amplifikation wie folgt: Zunächst 30 sek. Denaturierung (Fragmentierung) der DNA bei 94 °C, gefolgt von 30 sek. *annealing* bei 60 °C (Anlagerung der primer an sense- und antisense-Strang) und 30 sek. *extension* bei 72 °C (Taq-Polymerase bewirkt Nukleotid-an-lagerung) und wieder 30 sek. *annealing* bei 60 °C. So wird in einer Kettenreaktion die Zahl der verfügbaren Matrixstränge in jedem Zyklus verdoppelt. Am Schluss erfolgt eine 3-minütige Extensionsphase bei 72 °C mit anschließender Pause und Abkühlung auf 4 °C. Das nun fertige PCR-Produkt kann jetzt weiterverwendet werden oder auch bei dieser Temperatur eine Nacht bis maximal eine Woche überdauern.

Es folgt der Verdau über Nacht (bzw. mind. 3 Stunden) wie im Folgenden beschrieben.

3.1.5 Restriktionsverdau

Die menschliche doppelsträngige DNA lässt sich mittels bakterieller Restriktionsenzyme in gezielte Bruchstücke zerteilen. Diese Endonukleasen spalten die Phosphodiesterketten der DNA immer an denselben Loci. Diese Loci enthalten für das jeweilige Enzym typische Erkennungssequenzen aus, in der Regel 4-8 Basenpaaren:



Bsp.: MboII

Je abgelegener von der Symmetrieachse die Schnittstelle liegt, desto eher kommt es zu so genannten klebrigen Enden.

Eine Unit eines Enzyms (U) ist Definiert als die Menge eines Enzyms, die 1 µg innerhalb von 30 Minuten spaltet. Reaktionsbedingungen und die zu verwendenden Pufferlösungen ergeben sich aus den Lebensbedingungen der Bakterien von welchen die Endonukleasen gewonnen wurden und werden vom Hersteller (hier New England Biolabs) angegeben.

Der MTHFR A1298C Polymorphismus besitzt eine Erkennungssequenz für das *Mbo II* Restriktionsenzym. So werden 8 µl MTHFR-1298 PCR- Produkt mit 1 µl dieses Enzyms und 1 µl 10xPuffer bei 37 °C über Nacht (bzw. mindestens 3 Std) inkubiert. Gleichermäßen wird mit dem MTHFR C677T Polymorphismus (Restriktionsenzym: *HinfI*) verfahren.

3.1.6 Die Agarosegelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wird 3,5%iges Agarosegel mit Ethidiumbromid verwendet. Hierfür werden 3,5 g Agarosepulver abgewogen und mit 100ml TAE-Puffer in der Mikrowelle zum Kochen gebracht, bis sich alle festen Teile gelöst haben. Anschließend werden 10 µl Ethidiumbromid hinzupipettiert und die Masse zum Aushärten in die vorbereitete Gelelektrophorese-Kammer gegossen (ca. 20 Min). Zum verdauten PCR-Ansatz (10 µl) werden 2 µl Ladepuffer DNA IV zur Lauf-Kontrolle in das Gel pipettiert. Das Gel läuft etwa 50 Minuten bei 120Volt, 500 mA und 150 Watt.

Beispiele von Ergebnissen unter der UV-Lampe sehen wie folgt aus:

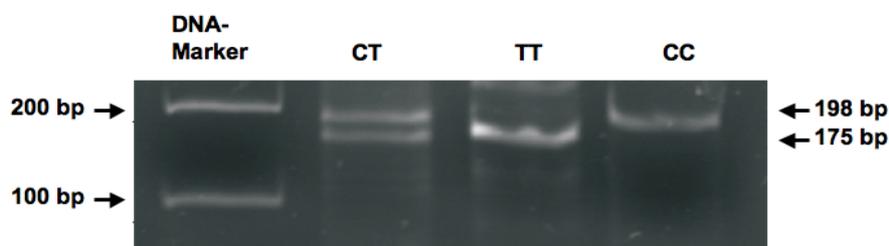


Abbildung 3.1: Darstellung der Agarosegelelektrophorese des MTHFR C677T Polymorphismus, CC = Wildtyp, CT = Heterozygote, TT = Homozygote Mutation, bp=Basenpaare.

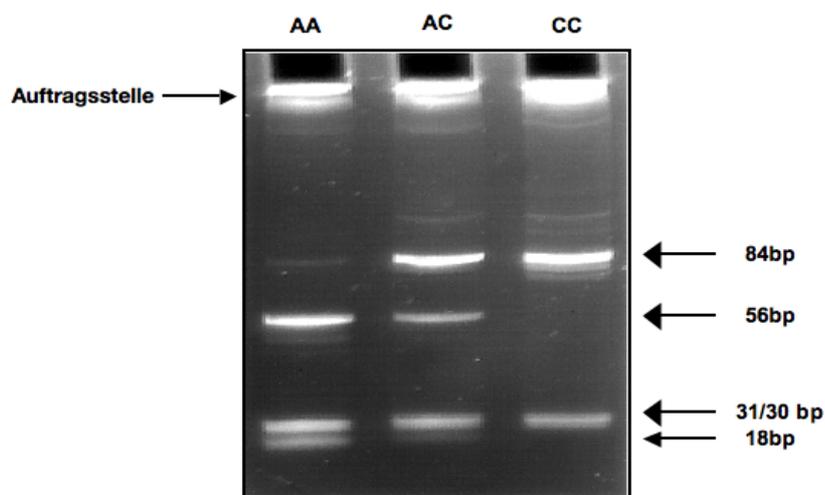


Abbildung 3.2: Darstellung der Agarosegelelektrophorese des MTHFR A1298C Polymorphismus, AA = Wildtyp, AC = Heterozygote, CC = Homozygote Mutation, bp=Basenpaare.

3.1.7 Auswertung des Gellaufes und Dokumentation, RFLP-Analyse

Die fertigen Gele wurden unter Durchleuchtung mit UV-Licht ausgelesen, das Ergebnis hierbei von zwei unabhängigen Personen gleichzeitig dokumentiert, da das Ergebnis des Gellaufes zwar eindeutig sichtbar und auswertbar, jedoch aufgrund der Flüchtigkeit und mangels entsprechender Kameraausrüstung nur bedingt dokumentierbar war. Anschließend wurden die Ergebnisse in eine Sammeldatei eingetragen und diese der Rheumaeinheit der LMU nach Abschluss der Arbeit überlassen.

3.2 Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG/ BKS)

Die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit ist ein unspezifischer Suchtest bei Verdacht auf entzündliche Erkrankungen und zu deren Verlaufsbeurteilung.

Die Bestimmung der BSG (BKS) wurde direkt im Anschluss an Untersuchung und Blutentnahme vollzogen. Den Patienten wurde venöses Blut entnommen und dieses im Verhältnis 1:5 mit 3,8%iger Natrium-Citrat-Lösung im Senkungsröhrchen gemischt. Sodann wurde eine senkrecht stehende Pipette von 200mm aufgesetzt und zur Sedation der festen Bestandteile aufgestellt. Die Geschwindigkeit in mm/h wurde nach der ersten und zweiten Stunde abgelesen, wobei im Allgemeinen der 1-Stunden-Wert genügte (der 2-Stunden-Wert bringt keine zusätzliche Information). Danach konnte das Röhrchen samt Inhalt verworfen und entsorgt werden. Der 1 h-Wert ging in die Berechnung des Disease-Activity-Scores (DAS 28) mit ein.

3.3 C-reaktives Protein (CRP)

Das CRP gilt als klassisches „Akut-Phase-Protein“, welches als unspezifische Antwort auf entzündliche Prozesse und Tumoren gebildet wird.

Allerdings konnte der CRP-Wert nicht wie geplant in dieser Studie verwendet werden, da für die Berechnung des HAQ zu Behandlungsbeginn stattdessen die BSG eingesetzt wurde. Ein weiteres Problem ergab sich bei der Bestimmung, da 13 Patienten durch den Hausarzt untersucht wurden. Da in diesen Fällen auch die Blutentnahmen durch den Arzt durchgeführt wurden, war eine Bestimmung des CRP nicht in allen Fällen lückenlos dokumentierbar.

3.4 Cyklisches Citrulliertes Peptid (CCP)

Die Analyse des CCP wurde mit einer ELISA nach Herstellerangaben (EUROIMMUN) vorgenommen.

3.5 Statistische Auswertung

Für die statistischen Berechnungen wurde Microsoft® Excel® 2004 for Mac (Version 11.5.3), sowie SPSS 15.0 for Windows Evaluation Version verwendet. Neben der rein deskriptiven Statistik wurden die einzelnen (nicht-metrischen = nominal oder ordinal skalierte Variablen) Merkmale mittels des χ^2 -Tests auf statistisch signifikante Assoziationen untersucht. Bei absoluten Häufigkeiten <5 wurde Fishers exakter Test angewandt. Dabei wurde die jeweilige Nullhypothese auf dem 5%-Niveau (bei verwerfen der Nullhypothese anschließend auf dem 1%- und weiter dem 0,5%-Niveau) geprüft. Ein Ergebnis mit $p \leq 0,10$ wurde als Trend gewertet. Die Odds-Ratio als Chancenverhältnis wurde dabei wie folgt berechnet:

	Mit Risikofaktor	Ohne Risikofaktor
Merkmal a	a	b
Merkmal b	c	d

Tabelle 3.1: Berechnung der Odds Ratio (OR)

$$\text{OddsRatio} = c*b : a*d$$

Zur Überprüfung der Stichproben auf Normalverteilung wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test eingesetzt. Aussagekräftig war hier die Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$, die bedeutet, dass die Stichprobe signifikant von der Normalverteilung abweicht. In diesem Fall konnten keine Tests angewandt werden, die eine Normalverteilung voraus setzen (t-Test nach Student bei zwei unabhängigen Stichproben bzw. einfaktorielle ANOVA bei mehreren unabhängigen Stichproben). Signifikante Ergebnisse beim multiplen Testen wurden mittels der Bonferroni-Korrektur überprüft.

Für nicht normalverteilte Stichproben wurde für zwei unabhängige Stichproben der U-Test nach Mann&Whitney, bei n-unabhängigen Stichproben der H-Test nach Kruskal&Wallis berechnet.

4 Ergebnisse

Der Ergebnisteil gliedert sich in beschreibende Statistik zum Patientenkollektiv, zur Medikamenteneinnahme, BSG, CCP, DAS und HAQ sowie zu zusätzlicher Medikation und zu festgestellten unerwünschten Arzneimittelwirkungen. Die Gruppen mit respektive ohne MTX-bezogene Nebenwirkungen wurden verglichen sowie der Zusammenhang von Genotypen und klinischen Befunden evaluiert. BSG- und DAS 28 (Tender Joint, Swollen Joint Count) Werte vor und nach Beginn der Behandlung mit MTX wurden verglichen, der Vergleich mit Genotypen wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse ermittelt. Ein $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen, $p < 0,1$ als Trend.

4.1 Patienten und Kontrollen

4.1.1 Häufung weiterer Erkrankungen in der Patientengruppe

Hinsichtlich der Häufung weiterer Erkrankungen in der Patientengruppe und MTHFR C677T Polymorphismus ergab sich kein signifikanter Zusammenhang ($\chi^2(n=78)=0,6$; $p \leq 0,7$). Dies gilt ebenso für den MTHFR A1298C-Polymorphismus ($\chi^2(n=78)=4,3$; $p \geq 0,1$) und auch den MDR-1 C3435T-Polymorphismus ($\chi^2(n=78)=0,4$; $p \leq 0,9$). Träger der Mutation hatten nicht signifikant gehäuft unter weiteren Erkrankungen zu leiden.

4.1.2 Häufung von Rheumatoider Arthritis in der Familie

Eine familiäre Häufung der Rheumatoiden Arthritis wurde in der Literatur gehäuft beobachtet (siehe Kapitel 1.2, Seite 7). 23 Patienten (29,5%) berichteten über das Auftreten von Rheumatoider Arthritis in ihrer Familie.

4.1.2.1 Zusammenhang von Genotypen und der Häufung von familiärer RA

Hinsichtlich der Häufung familiärer RA und MTHFR C677T Polymorphismus ergab sich bei den untersuchten Patienten kein signifikanter Zusammenhang ($\chi^2(n=78)=1,0$; $p \leq 0,6$). Dies gilt ebenso für den MTHFR A1298C-Polymorphismus ($\chi^2(n=78)=1,5$; $p \leq 0,5$) und auch den MDR-1 C3435T-Polymorphismus ($\chi^2(n=78)=1,9$; $p \leq 0,4$). Bei Trägern der Mutation trat die Rheumatoide Arthritis nicht gehäuft in der Familie auf.

4.1.2.2 Häufung anderer Erkrankungen in der Familie

Durch die Fragebögen wurde weiterhin das Auftreten anderer Erkrankungen in der Familie wie Diabetes mellitus, Asthma bronchiale, Neurodermitis, Depressionen, Schizophrenie und Sonstigen erfragt. Unter sonstigen wurden maligne Erkrankungen (Colon-Karzinom), weitere Rheumatische Erkrankungen (Psoriasis) und Erkrankungen des atopischen Formenkreises angegeben. Von den Befragten gaben 25 (32,1%) das Vorliegen dieser in ihrer Familie an. Bei 20 Patienten (25,6%) lag in der Familie eine der erfragten Krankheiten vor, drei Patienten (3,8%) klagten über bei zwei Familienmitgliedern vorliegende Erkrankungen und zwei Patienten (2,5%) über drei Krankheitsfälle in der Familie (s. Abbildung 4.1).

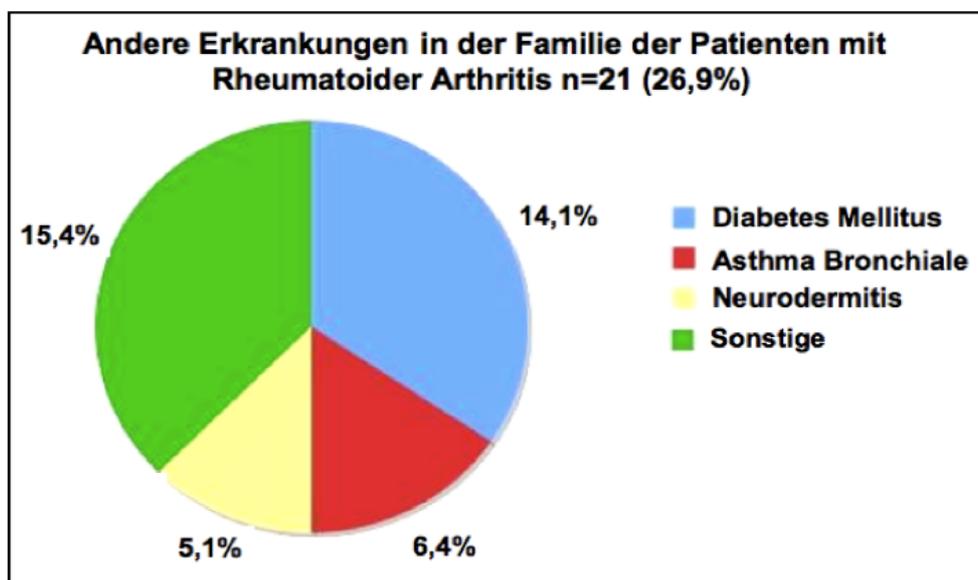


Abbildung 4.1: Zusätzlich in der Familie auftretende Erkrankungen der Patientengruppe mit RA.

4.1.2.3 Zusammenhang von Genotyp und anderen Erkrankungen in der Familie

Hinsichtlich der Häufung der weiterhin untersuchten familiären Erkrankungen und MTHFR C677T Polymorphismus ergab sich bei den untersuchten Patienten kein signifikanter Zusammenhang ($\chi^2(n=78)=0,5$; $p \leq 0,8$). Dies gilt ebenso für den MTHFR A1298C-Polymorphismus ($\chi^2(n=78)=3,0$; $p \leq 0,2$) und auch den MDR-1 C3435T-Polymorphismus ($\chi^2(n=78)=0,07$; $p \geq 0,9$). Bei Trägern der Mutation traten die untersuchten Erkrankungen nicht gehäuft in der Familie auf.

4.1.3 Häufigkeit der Genotypen bei Patienten und Kontrollen

Anzahl und Häufigkeiten von Genotypen und Allelen der SNP-Polymorphismen C677T und

A1298C sowie MDR-1 C3435T bei 78 Rheumapatienten sind in Tabelle 4.1 und Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Das Hardy-Weinberg Gesetz definiert einen einfachen Zusammenhang zwischen der Häufigkeit von Genen in der Bevölkerung und der Häufung von Genotypen (z.B. Individuen). Unter bestimmten Bedingungen (zufällige Partnerwahl, keine Migration, keine Verwandtenehen, keine Selektion, grosse Bevölkerungsgröße) werden die erwarteten Häufigkeiten in allen Generationen die gleichen sein [Friedman G et al. (1999)]. Die Verteilung von Genotypen auf jeder Seite war vereinbar mit dem errechneten Hardy-Weinberg-Gesetz, was eine niedrige Homozygotierate für das T-Allel in der Bevölkerung nahe legt.

Die Allelhäufigkeiten des C677T und A1298C sowie des C3435T Polymorphismus bei 78 Patienten mit rheumatoider Arthritis waren ähnlich derer von 86 Patienten ohne rheumatische Erkrankung. Somit trat in der ersten Gruppe vermutlich kein systematischer Fehler durch die Allelhäufigkeit auf.

		C677T Polymorphismus			p-Wert	X²-Wert
	n	C/C	C/T	T/T		
RA-Patienten	78	30 (38,5%)	38 (48,7%)	10 (12,8%)	0,9	0,22
Kontrollgruppe	93	39 (41,9%)	43 (46,2%)	11 (11,8%)		
Erwartete Häufigkeit (RA)		32	37	10		
		A1298C Polymorphismus			p-Wert	X²-Wert
	n	A/A	A/C	C/C		
RA-Patienten	78	28 (35,9%)	32 (41,0%)	18 (23,1%)	0,5	1,2
Kontrollgruppe	93	41 (44,1%)	34 (36,6%)	18 (19,4%)		
Erwartete Häufigkeit (RA)		32	30	16		
		MDR-1 C3435T Polymorphismus			p-Wert	X²-Wert
	n	T/T	T/C	C/C		
RA-Patienten	78	22 (28,2%)	38 (48,7%)	18 (23,1%)	0,6	0,96
Kontrollgruppe	93	24 (25,8%)	52 (55,9%)	17 (18,3%)		
Erwartete Häufigkeit (RA)		20	39	15		
RA-Patienten		Mit A1298C Polymorphismus			p-Wert	X²-Wert
		A/A	A/C	C/C		
Mit C677-Polymorphismus	C/C	8 (10,3%)	13 (16,7%)	9 (11,5%)		
	C/T	11 (14,1%)	19 (24,4%)	8 (10,3%)		
	T/T	9 (11,5%)	0 (0,0%)	1 (1,3%)		

Tabelle 4.1: Verteilung der MTHFR-Genotypen bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA) und Kontrollgruppe.

Heterozygotie war bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis am Häufigsten anzutreffen (48,7% versus 46,8% bei 677CT respektive 41,0% versus 36,6% bei 1298AC und 48,7% bei MDR-1) wohingegen in der Kontrollgruppe bis auf den MDR-1 SNP vermehrt Wildtypkonfiguration vorlag (s.Tabelle 4.1). Genotyp- und Allelverteilung unterscheiden sich bei Patienten und Kontrollen jedoch nicht wesentlich voneinander, weder Allel 677T (37,2%) noch 1298C (43,6%) kamen im Patientengut signifikant häufiger vor als im Kontrollkollektiv (p -Wert $> 0,1$), siehe Tabelle 4.2.

Ein signifikanter Zusammenhang ($p \leq 0,05$, $\chi^2=14,6$ bei 4 Freiheitsgraden) besteht jedoch zwischen 1298AC und 677CT, die in der Patientengruppe häufig mit je einem mutierten Allel vorliegen (24,4%).

Allel	Patienten n=78	Kontrollpersonen n=93
677C	98 (62,8%)	121 (65,1%)
677T	58 (37,2%)	65 (34,9%)
1298A	88 (56,4%)	116 (62,4%)
1298C	68 (43,6%)	70 (37,6%)
3435C	82 (52,6%)	100 (53,8%)
3435T	74 (47,4%)	86 (49,7%)

Tabelle 4.2: Allelverteilung bei Patienten und Kontrollpersonen (%). $p_{(C677T)}=0,7$, Odds Ratio 0,7; $p_{(A1298C)}=0,3$, OR=0,7; $p_{(C3435T)}=0,8$, OR=0,7.

4.1.4 Genotypen und Alter: Erstdiagnose

Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Datenerhebung im Durchschnitt $59,3 \pm 13,1$ Jahre alt (22-83), sie wurden im Alter von $48,3 \pm 17,5$ Jahren diagnostiziert (17,5-79), vgl. Tabelle 4.3.

Aufgeteilt nach Genotypen ergab sich, dass Patienten mit Genotyp 3435CC das jüngste Durchschnittsalter bei Diagnosestellung hatten ($41,3 \pm 10,4$), während Patienten mit Genotyp 1298AC die späteste Diagnosestellung erfuhren ($50,8 \pm 14,6$).

	Alter (Jahre)	Alter bei Diagnosestellung	$p_{(Alter)}$	$p_{(Erstdiagnose)}$
MTHFR 677CC	58,7 ± 11,8	49,9 ± 12,9	0,8	0,3
MTHFR 677CT	60,1 ± 14,9	48,8 ± 15,4		
MTHFR 677TT	58,3 ± 18,7	432,1 ± 11,1		
MTHFR 1298AA	57,1 ± 14,3	44,5 ± 14,1	0,3	0,2
MTHFR 1298AC	62,2 ± 12,0	51,3 ± 14,6		
MTHFR 1298CC	57,7 ± 12,8	48,9 ± 12,2		
MDR 3435TT	59,9 ± 12,9	49,5 ± 13,9	0,07	0,07
MDR 3435TC	61,9 ± 13,4	50,8 ± 14,9		
MDR 3435CC	53,3 ± 11,5	41,8 ± 10,4		

Tabelle 4.3: Alter und Erstdiagnose bei MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MDR-1 T3435C, $p_{(Alter)}$; $p_{(Erstdiagnose)}$.

Ein Trend war bei dem Mittelwert des Alters bei Diagnosestellung für MDR 1-Polymorphismen zu erkennen ($p_{(MDR-1)}=0,07$), Patientenalter und MDR-1 2 SNP korrelierten signifikant miteinander (Spearman Korrelation $p \leq 0,049$), Patienten mit MDR 3435CC waren somit bei Diagnosestellung deutlich jünger als Patienten mit Wildtyp Allel bzw. heterozygoter Mutation, s. Abbildung 4.2.

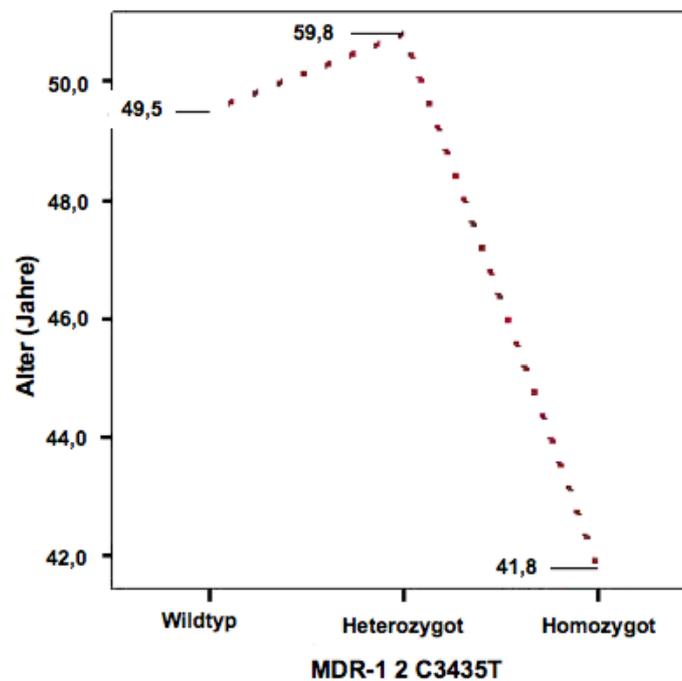


Abbildung 4.2: Altersdurchschnitt in Abhängigkeit vom MDR-1 Genotyp, Spearman's Rangkorrelation $p \leq 0,04$.

4.1.5 Genotypverteilung bei Männern und Frauen

Bei den untersuchten Patienten fanden sich deutlich mehr Frauen (74,4%) als Männer (25,6%). Auch wenn bei Männern (5%) der 677T-Genotyp weniger häufig nachweisbar war, als bei Frauen (15,5%), ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in Genotyp- und Allelverteilung zwischen den Geschlechtern ($\chi^2(n=78)=1,3$; $p \leq 0,6$, s. Tabelle 4.4).

	Männer (n=20)	Frauen (n=58)	χ^2 (n=78)	p
MTHFR 677C	8 (40,0%)	22 (37,9%)	1,3	$\leq 0,6$
MTHFR 677CT	11 (55,0%)	27 (46,6%)		
MTHFR 677T	1 (5,0%)	9 (15,5%)		
MTHFR 1298A	5 (25,0%)	23 (39,7%)	1,5	$\leq 0,5$
MTHFR 1298AC	10 (50,0%)	22 (37,9%)		
MTHFR 1298C	5 (25,0%)	13 (22,4%)		
MDR-1 3435C	5 (27,8%)	16 (28,6%)	1,6	$\leq 0,5$
MDR-1 3435CT	7 (38,9%)	29 (51,8%)		
MDR-1 3435T	6 (33,3%)	11 (19,6%)		

Tabelle 4.4: Genotypverteilung MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MDR-1 C3435T bei Männern und Frauen.

Ebenso verhält es sich für den A1298C-SNP ($\chi^2(n=78)=1,5$; $p \leq 0,5$, s. Tabelle 4.4).

Und auch für den C3435T-SNP konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern nachgewiesen werden ($\chi^2(n=78)=1,6$; $p \leq 0,5$ s. Tabelle 4.4).

Diese Zusammenhänge ließen sich auch in der Kontrollgruppe für die Polymorphismen C677T (Fisher's exact Test: $\chi^2(n=78)=3,4$; $p \leq 0,2$), A1298C ($\chi^2(n=78)=0,5$; $p \leq 0,8$) und C3435T ($\chi^2(n=78)=0,5$; $p \leq 0,8$) bestätigen. Es besteht kein signifikanter Zusammenhang von Mutation und Geschlecht.

4.1.6 Assoziation der Genotypen MTHFR und MDR-1 2

Auch die Kombination von MTHFR-C677T, MTHFR A1298C und MDR-1 2 C3435T Polymorphismen wurde in dieser Arbeit untersucht. Hierbei lag bei einer Gesamtzahl von 78 Patienten, 4 Freiheitsgraden, $\chi^2=2,4$, $p=0,7$, keine Assoziation von MDR-1 2 und MTHFR C677T vor. Es wurde ebenfalls bei der gleichen Gruppe das gemeinsame Vorliegen von MDR-1 2 und MTHFR A1298C überprüft. Bei einem $\chi^2=2,7$ und 4 Freiheitsgraden ergab sich $p < 0,6$. Es besteht keine Abhängigkeit zwischen den untersuchten Polymorphismen in der Patientengruppe.

Dieser Zusammenhang wurde auch in der Kontrollgruppe überprüft. Es ergab sich keine nachweisbare Assoziation von MDR-1 2 und MTHFR C677T ($\chi^2(n=78)=5,3$; $p \leq 0,3$) noch von MDR-1 2 und MTHFR A1298C ($\chi^2(n=78)=5,4$; $p \leq 0,3$). Die Polymorphismen liegen nicht gekoppelt vor.

4.2 Korrelation mit Verlaufsparemtern

4.2.1 Korrelation der Polymorphismen mit den Variablen des DAS-28

Der DAS-28 wurde bei 78, mit MTX behandelten Patienten bestimmt. Deren Zusammenhang mit klinischen Parametern sollen im Folgenden dargestellt werden. Mittelwertunterschiede wurden mittels einfaktorieller ANOVA durchgeführt, der α -Fehler durch den Bonferroni-Test korrigiert, bei signifikanter Abweichung von der Normalverteilung nach Kruskal-Wallis wurden die Mediane mittels Mann-Whitney Test verglichen. Rangkorrelationen wurden bei Normalverteilung nach Pearson durchgeführt, bei Abweichungen von der Normalverteilung nach Spearman.

4.2.1.1 Veränderungen des Tender Joint Count (28)

Der Tender Joint Count von 28 Gelenken wurde vor und unter der Therapie mit MTX erhoben. Es ergab sich bei N=78 kein signifikanter Zusammenhang von TJC und den untersuchten Polymorphismen, weder im Medianvergleich für den MTHFR C677T-SNP [(TJ zu Beginn: ($\chi^2(2, n=78)=2,9$; $p \leq 0,2$); TJ unter Therapie: ($\chi^2(2, n=78)=0,1$; $p \leq 0,9$); Differenz: ($\chi^2(2, n=78)=1,6$; $p \leq 0,4$)], noch den MTHFR A1298C-SNP [(TJ zu Therapiebeginn: ($\chi^2(2, n=78)=2,9$; $p \leq 0,2$); TJ unter Therapie: ($\chi^2(2, n=78)=0,1$; $p \leq 0,9$); Differenz: ($\chi^2(2, n=78)=1,6$; $p \leq 0,4$)], noch in der Rangkorrelation nach Spearman (s. Tabelle 4.5).

	C677T Polymorphismus				A1298C Polymorphismus			
	C/C	C/T	T/T	Sig.	A/A	A/C	C/C	Sig.
TJ (n)	30	38	10		28	32	18	
Az Beg.	7,0 ± 6,7	6,0 ± 5,8	7,0 ± 6,4	0,2	5,5 ± 5,1	7,0 ± 6,7	7,0 ± 7,2	0,2
Az Ther.	1,0 ± 3,5	1,0 ± 1,8	1,0 ± 1,5	0,8	0,0 ± 2,0	1,0 ± 3,4	1,0 ± 1,4	0,9
Diff.	4,5 ± 6,5	5,0 ± 5,9	4,0 ± 7,3	0,3	3,5 ± 5,5	5,0 ± 6,3	7,0 ± 7,5	0,2

Tabelle 4.5: Mediane der Veränderungen des 28-Tender Joint Count bei 78 Patienten unter Behandlung mit MTX. TJ (n)=Anzahl Tender Joint, Az Beg.=Anzahl TJ vor Therapiebeginn, Az Ther.=Anzahl TJ unter Therapie mit MTX, Diff.=Veränderung der Anzahl TJ unter der Therapie mit MTX, Sig.=Rangkorrelation nach Spearman.

Auch für den MDR-1-SNP konnte kein signifikanter Zusammenhang von SNP und Tender Joint Count hergestellt werden, weder im Medianvergleich [(TJ zu Therapiebeginn: ($\chi^2(2, n=78)=1,8$; $p \leq 0,4$); TJ unter Therapie: ($\chi^2(2, n=78)=2,2$; $p \leq 0,3$); Differenz: ($\chi^2(2, n=78)=2,6$; $p \leq 0,9$)] noch in der Rangkorrelation nach Spearman (s. Tabelle 4.6).

	MDR-1 2 C3435T			
	T/T	T/C	C/C	Sig.
TJ (n)	22	38	18	
Az Beg.	5,5 ± 7,1	6,0 ± 6,0	8,5 ± 5,8	0,6
Az Ther.	0,5 ± 2,0	0,5 ± 1,7	1,0 ± 4,2	0,5
Diff.	5,5 ± 5,7	4,5 ± 6,0	5,5 ± 5,6	0,8

Tabelle 4.6: Mediane der Veränderungen des 28-Tender Joint Count bei 78 Patienten, behandelt mit MTX.

4.2.1.2 Veränderung des Swollen Joint Count (28)

Der Swollen Joint Count von 28 Gelenken wurde vor und unter der Therapie mit MTX erhoben. Es ergab sich bei N=78 kein signifikanter Zusammenhang von SJC und den untersuchten Polymorphismen, weder im Medianvergleich für den MTHFR C677T-SNP [(SJ zu Beginn: ($\chi^2(2, n=78)=2,9$; $p \leq 0,2$); SJ unter Therapie: ($\chi^2(2, n=78)=0,3$; $p \leq 0,9$); Differenz: ($\chi^2(2, n=78)=2,5$; $p \leq 0,3$)], noch den MTHFR A1298C-SNP [(SJ zu Therapiebeginn: ($\chi^2(2, n=78)=0,3$; $p \leq 0,9$); SJ unter Therapie: ($\chi^2(2, n=78)=0,4$; $p \leq 0,8$); Differenz: ($\chi^2(2, n=78)=0,2$; $p \leq 0,9$)], noch in der Rangkorrelation nach Spearman (s. Tabelle 4.7).

	C677T Polymorphismus				A1298C Polymorphismus			
	C/C	C/T	T/T	Sig.	A/A	A/C	C/C	Sig.
SJ (n)	30	38	10		28	32	18	
Az Beg.	7,0 ± 5,4	5,3 ± 5,3	5,2 ± 5,2	0,2	5,3 ± 4,4	6,0 ± 5,4	6,7 ± 6,6	0,6
Az Ther.	1,8 ± 2,3	1,7 ± 1,9	2,3 ± 2,7	0,8	1,6 ± 1,9	1,9 ± 2,9	2,1 ± 2,7	0,6
Diff.	5,2 ± 5,7	3,6 ± 5,6	2,9 ± 6,4	0,2	3,8 ± 4,9	4,1 ± 5,4	4,7 ± 7,5	0,7

Tabelle 4.7: Veränderungen des 28-Swollen Joint Count bei 78 Patienten unter Behandlung mit MTX. TJ (n)=Anzahl Tender Joint, Az Beg.=Anzahl TJ vor Therapiebeginn, Az Ther.=Anzahl TJ unter Therapie mit MTX, Diff.=Veränderung der Anzahl TJ unter der Therapie mit MTX, Sig.=Signifikanz (Korrelation nach Spearman).

Auch mit zu dem MDR-1-SNP konnte kein signifikanter Zusammenhang von SNP und Swollen Joint Count hergestellt werden, weder im Medianvergleich [(SJ zu Therapiebeginn: ($\chi^2(2, n=78)=0,8$; $p \leq 0,7$); TJ unter Therapie: ($\chi^2(2, n=78)=0,5$; $p \leq 0,8$); Differenz: ($\chi^2(2, n=78)=0,1$; $p \leq$

0,9)] noch in der Rangkorrelation nach Spearman (s. Tabelle 4.8).

	MDR-1 2 C3435T			
	T/T	T/C	C/C	Sig.
SJ (n)	22	38	18	
Az Beg.	6,7 ± 6,7	5,5 ± 5,2	6,0 ± 5,3	0,8
Az Ther.	2,1 ± 2,6	1,6 ± 1,8	2,1 ± 2,3	0,9
Diff.	4,6 ± 7,8	4,0 ± 5,2	3,9 ± 3,7	0,8

Tabelle 4.8: Veränderungen des 28-Swollen Joint Count bei 78 Patienten, behandelt mit MTX.

Es besteht kein Zusammenhang zwischen den Veränderungen der Gelenksuntersuchungen und der Zahl mutierter Allele.

4.2.1.3 Veränderung der BSG

Die BSG wurde vor und unter der Therapie mit MTX bestimmt. Es ergaben sich bei N=78 keine signifikanten Zusammenhänge von BSG und SNP C677T mit $\chi^2(2, N=78)=0,1$; $p \leq 0,9$ (Kontrollgruppe $\chi^2(2, N=78)=1,7$; $p \leq 0,4$) noch A1298C mit $\chi^2(2, N=78)=0,5$; $p \leq 0,8$ (Kontrollgruppe $\chi^2(2, N=78)=1,9$; $p \leq 0,4$) (s. Tabelle 4.9).

	C677T Polymorphismus				A1298C Polymorphismus			
	C/C	C/T	T/T	Sig.	A/A	A/C	C/C	Sig.
Az (n)	30	38	10		28	32	18	
Beg.	19,3±16,1	15,5±13,2	20,4±17,4	0,2	14,5±13,0	18,4±16,6	20,8±14,3	0,6
Ther.	31,5±24,6	28,1±22,0	24,7±30,3	0,8	29,0±23,1	30,7±26,1	31,4±22,3	0,6
Diff.	12,3±22,1	12,7±21,2	14,3±26,5	0,8	3,8 ± 4,9	4,1 ± 5,4	4,7 ± 7,5	0,5

Tabelle 4.9: Veränderungen der Blutsenkung bei 78 Patienten unter Behandlung mit MTX. Az (n)=Anzahl der Patienten, Beg.= Blutsenkung (mm/Std.) vor Therapiebeginn, Ther.=Blutsenkung (mm/Std.) unter Therapie mit MTX, Diff.= Veränderung der Blutsenkung unter der Therapie mit MTX, Sig.= Signifikanz (Korrelation nach Pearson).

Bei der Untersuchung von BSG-Mittelwert-Unterschieden von BSG vor der Therapie und MDR-1 C3435T mit Bonferroni-Korrektur ergab sich $\chi^2(2, N=78)$; $p \leq 0,05$ und in der Rang-Korrelation nach Pearson für normalverteilte Werte ein Koeffizient von $p \leq 0,02$. Somit besteht in dieser Gruppe ein signifikanter Zusammenhang der Höhe der BSG vor Therapiebeginn mit dem mutierten MDR-1 Allel (s. Tabelle 4.10), Mutationsträger des MDR-1 C3435T SNPs haben signifikant niedrigere BSG-Werte als Träger der Wildtypkonfiguration.

	MDR-1 2 C3435T			
	T/T	T/C	C/C	Sig.
Az (n)	22	38	18	
Beg.	39,0±29,2	29,7±22,5	20,8±15,8	0,02
Ther.	17,2±15,0	19,3±15,7	14,4±12,9	0,6
Diff.	21,7±23,5	10,5±21,3	6,4±19,0	0,02

Tabelle 4.10: Veränderungen der BSG bei 78 Patienten, behandelt mit MTX. Az (n)=Anzahl der Patienten, Beg.=Blutsenkung (mm/Std.) vor Therapiebeginn, Ther.=Blutsenkung (mm/Std.) unter Therapie mit MTX, Diff.= Veränderung der Blutsenkung unter der Therapie mit MTX, Sig.= Signifikanz (Korrelation nach Pearson).

In der Kontrollgruppe ergab sich erwartungsgemäss kein signifikanter Zusammenhang zwischen MDR-1 C3435T und BSG-Werten ($\chi^2(2, N=78)=1,1; p \leq 0,6$). Graphisch dargestellt ergibt sich in Abbildung 4.3 gezeigter Zusammenhang von MDR-1 und BSG.

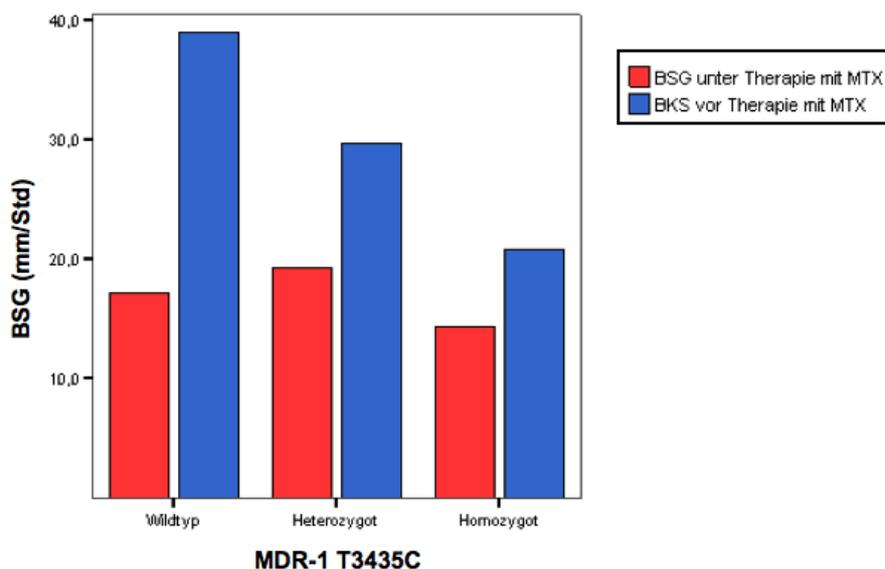


Abbildung 4.3: Blutsenkungsgeschwindigkeit (mm/Std) vor Therapiebeginn mit MTX in Abhängigkeit von MDR-1 T3435C, Pearson $p \leq 0,02$, Varianzanalyse (nach Bonferroni) $p \leq 0,05$.

4.2.2 Veränderung des Disease Activity Scores

Der Disease Activity Score für 28 Gelenken wurde vor und unter der Therapie mit MTX erhoben. Es ergab sich bei N=78 kein signifikanter Zusammenhang von DAS-28 und den untersuchten Polymorphismen, weder im Mittelwertvergleich noch in der Rangkorrelation nach Pearson für Normalverteilte Werte (s. Tabelle 4.11, Tabelle 4.12).

	C677T Polymorphismus				A1298C Polymorphismus			
	C/C	C/T	T/T	Sig.	A/A	A/C	C/C	Sig.
Az (n)	30	38	10		28	32	18	
Beg.	4,9 ± 1,5	4,4 ± 1,4	4,5 ± 2,0	0,2	4,4 ± 1,6	4,6 ± 1,5	4,8 ± 1,4	0,3
Ther.	3,0 ± 1,3	2,8 ± 1,0	3,1 ± 0,7	0,9	2,7 ± 1,0	3,0 ± 1,2	3,0 ± 1,1	0,3
Diff.	-2,0 ± 1,4	-1,6 ± 1,6	-1,4 ± 2,3	0,3	-1,7 ± 1,7	-1,7 ± 1,4	-1,8 ± 1,9	0,9

Tabelle 4.11: Veränderungen des Disease Activity Scores für 28 Gelenke bei 78 Patienten unter Behandlung mit MTX. Az (n)=Anzahl der Patienten, Beg.= DAS 28 Wert vor Therapiebeginn, Ther.=DAS 28 Wert unter Therapie mit MTX, Diff.= Veränderung der DAS 28 Werte unter Therapie mit MTX, Sig.= Signifikanz (Korrelation nach Pearson).

	MDR-1 2 C3435T			
	T/T	T/C	C/C	Sig.
Az (n)	22	38	18	
Beg.	5,0 ± 1,5	4,5 ± 1,5	4,5 ± 1,5	0,3
Ther.	2,9 ± 1,1	2,9 ± 1,0	2,9 ± 1,3	0,9
Diff.	-2,1 ± 1,8	-1,6 ± 1,5	-1,6 ± 1,8	0,3

Tabelle 4.12: Veränderungen des Disease Activity Scores für 28 Gelenke bei 78 Patienten, behandelt mit MTX. Az (n)=Anzahl der Patienten, Beg.= DAS 28 Wert vor Therapiebeginn, Ther.=DAS 28 Wert unter Therapie mit MTX, Diff.= Veränderung der DAS 28 Werte unter Therapie mit MTX, Sig.= Signifikanz (Korrelation nach Pearson).

Es besteht kein Zusammenhang zwischen den Veränderungen des DAS-28 und der Zahl mutierter Allele.

4.2.3 HAQ und Polymorphismen

Der Stanford Health Questionnaire wurde unter der Therapie mit MTX erhoben. Es ergab sich bei N=78 kein signifikanter Zusammenhang von HAQ-Ergebnis und dem A1298C SNP bei der Rangkorrelation nach Spearman für nicht-normalverteilte Werte ($p \leq 0,7$), im H-Test nach Kruskal Wallis ($p \leq 0,2$) kein Zusammenhang von Polymorphismus und Median-Werten(s. Tabelle 4.13). Der H-Test in Abhängigkeit vom C677T SNP ergab ein $p \leq 0,04$, aufgeschlüsselt nach Mann&Whitney einen signifikanten Unterschied bei Trägern des C677T-Allel (HAQ-Medianvergleich von C677CT und 677CC: $p \leq 0,7$, Vergleich von 677CT und 677TT: $p \leq 0,02$), die einen signifikant höheren Behinderungsindex angaben. Der Korrelationstest nach Spearman ergab einen Trend ($p \leq 0,059$) für die Korrelation.

	C677T Polymorphismus				A1298C Polymorphismus			
	C/C	C/T	T/T	Sig.	A/A	A/C	C/C	Sig.
Az (n)	30	38	10		28	32	18	
Ther.	0,13 (1,0)	0,13 (0,75)	0,82 (1,65)	0,04	0,13 (0,35)	0,25 (1,29)	0,13 (0,38)	0,7

Tabelle 4.13: Median und Quartilenabstand (in Klammern) des Stanford Health Activity Questionnaires bei 78 Patienten unter Behandlung mit MTX. Az (n)=Anzahl der Patienten, Ther.=HAQ- Wert unter Therapie mit MTX, Sig.= Signifikanz (Korrelation nach Spearman).

Für den HAQ-Median ergab sich kein signifikanter Zusammenhang ($p \leq 0,4$), noch eine Korrelation mit dem MDR-1 T3435C Polymorphismus ($p \leq 0,4$) (s. Tabelle 4.14 und Abbildung 4.4).

	MDR-1 2 C3435T			
	T/T	T/C	C/C	Sig.
Az (n)	22	38	18	
Ther.	0,07 (0,97)	0,25 (1,00)	0,13 (1,10)	0,4

Tabelle 4.14: Median und Quartilenabstand (in Klammern) des Stanford Health Questionnaires bei 78 Patienten, behandelt mit MTX.

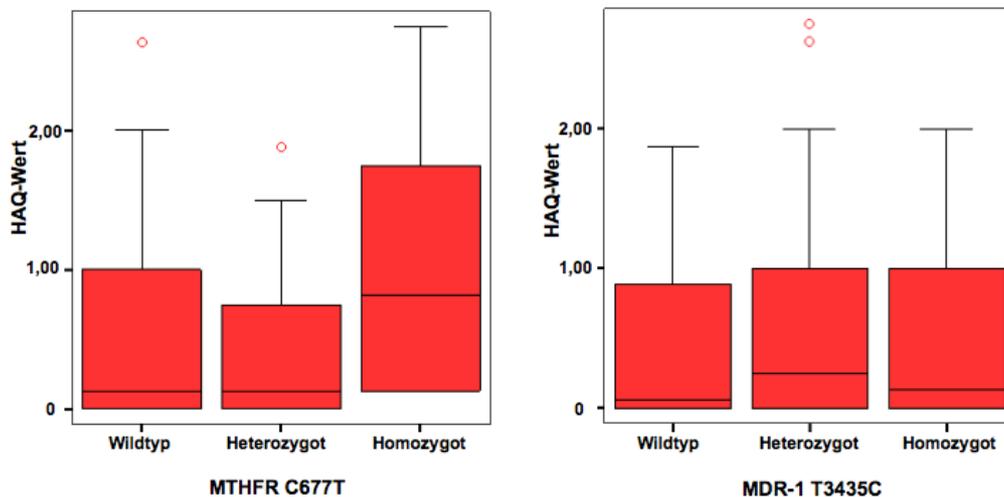


Abbildung 4.4: HAQ-Werte und MTHFR C677T- sowie MDR-1 T3435C Polymorphismen. Darstellung von Median, Quartilenabstand und Spannweite der HAQ-Werte bei Patienten mit RA, Ausreisser und Extremwerte sind als roter Kreis markiert.

4.2.4 Auswertung des SF-36

Entgegen der ursprünglichen Annahme lag bei einer ersten Auswertung des Fragebogens SF-36 keine Normalverteilung (nach Kolmogorov-Smirnov) in den acht untersuchten Kategorien vor, so

dass Mittelwerte und Standardabweichungen zwar berechnet werden können- jedoch über wenig Aussagekraft verfügen (s. Abbildung 4.5).

Somit wurden Median und Interquartilen für die Rheuma-Patienten berechnet. Wenn möglich wurden Spearman's Rangkorrelation und der H-Test nach Kruskal-Wallis bzw. weiterhin wo möglich der U-Test nach Mann-Whitney durchgeführt.

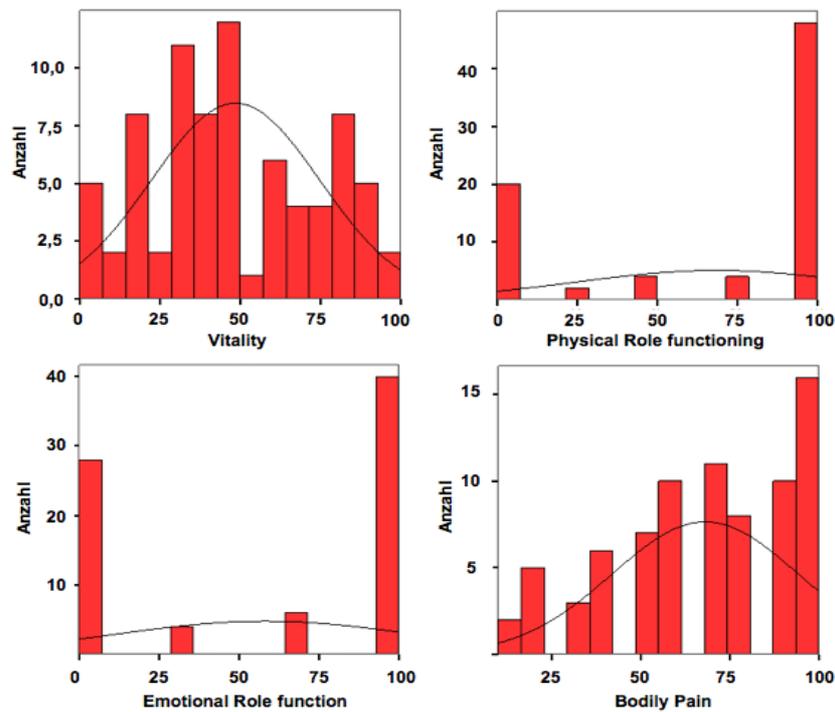


Abbildung 4.5: Verteilung einiger beispielhafter Elemente des SF-36: links körperliche, rechts mentale Gesundheitsaspekte. Auf der horizontalen Achse ist der Score (von 0-100) aufgetragen, niedrige Werte bedeuten schlechten Gesundheitszustand, Normverteilungskurve in schwarz überlegt.

In Tabelle 4.15 werden Median und Quartilenabstände für jeden Teilbereich des Gesundheitszustandes, wie durch SF-36 erhoben, nach Geschlecht, Alter sowie insgesamt angegeben.

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der Mediane zwischen Geschlechtern sowie den Einzelparametern des SF-36, abgesehen von den Werten für „General Health perception“ ($p \leq 0,06$) und „Mental Health“ ($p \leq 0,006$). Beim Vergleich der Altersgruppen (Alter ≤ 55 und Alter > 55) zeigten sich signifikant unterschiedliche Empfindungen in den Bereichen „Physical Role function“ ($p \leq 0,005$), „Bodily Pain“ ($p \leq 0,04$), „General Health perception“ („Vitalität“) ($p \leq 0,002$) und ein erkennbarer Trend bei „Emotional Role function“ ($p \leq 0,1$).

Betrachtet man hingegen die aufsummierten Komponenten, so ergibt sich ein Trend im U-Test nach Mann&Whitney von $p \leq 0,07$ zwischen den Geschlechtern und Physical Health; Frauen scheinen körperlich stärker eingeschränkt zu sein als Männer. Für die Komponente des Mental Health lässt sich hingegen kein Unterschied zwischen den Geschlechtern feststellen ($p \geq 0,1$).

Ebenso ergibt sich ein signifikanter Zusammenhang in der Auffassung körperlicher Gesundheit und Alter; Patienten jünger als 55 Jahre fühlen sich körperlich fitter (*Physical Health*) als ältere ($p \leq 0,003$ nach Mann&Whitney). Auch ist ein Trend erkennbar, dass jüngere Patienten sich eher geistig fit fühlen (*Mental Health*) als Patienten > 55 Jahre ($p \leq 0,1$).

Wie zu erwarten konnte die bestehende Korrelation von HAQ und dem SF-36 Aspekt „Role Function Physical“ in der untersuchten Population bestätigt werden ($p \leq 0,01$), siehe Abbildung 4.6. Allerdings gibt es eine grosse Variabilität zwischen den Patienten.

	Frauen (n=58)	Männer (n=20)	Alter ≤ 55 (n= 28)	Alter > 55 (n= 50)	Gesamtzahl (n=78)
Physical role functioning	58 (40,0)	95 (28,8)	95 (15,0)	82,5 (46,3)	90 (36,3)
Social role functioning	100 (30,0)	100 (10,0)	100 (10,0)	100 (32,5)	100 (20,0)
Role function (physical)	100 (100,0)	100 (37,5)	100 (25,0)	100 (100,0)	100 (100,0)
Role function (emotional)	67 (100,0)	100 (100,0)	100 (91,5)	67 (100,0)	100 (100,0)
Mental health	62 (36,0)	80 (19,0)	76 (34,0)	68 (33,0)	68 (32,0)
Pain	70 (50,0)	75 (30,0)	90 (40,0)	65 (30,0)	70 (40,0)
General Health perception	67 (34,0)	75,5 (31,8)	81 (21,3)	62,5 (28,0)	69 (34,5)
Vitalität	42,5 (47,5)	50,0 (32,5)	52,5 (58,7)	42,5 (31,3)	47,5 (41,3)
Physical Health	294,5 (152)	322 (129)	355 (97)	287 (142)	300 (143)
Mental Health	243,5 (161)	324 (138)	294,5 (147)	250,5 (165)	274 (166)

Tabelle 4.15: Median-Werte und Quartilenabstände (in Klammern) für die unterschiedlichen Elemente des SF-36 Fragebogens bei 78 Patienten mit Rheumatoider Arthritis.

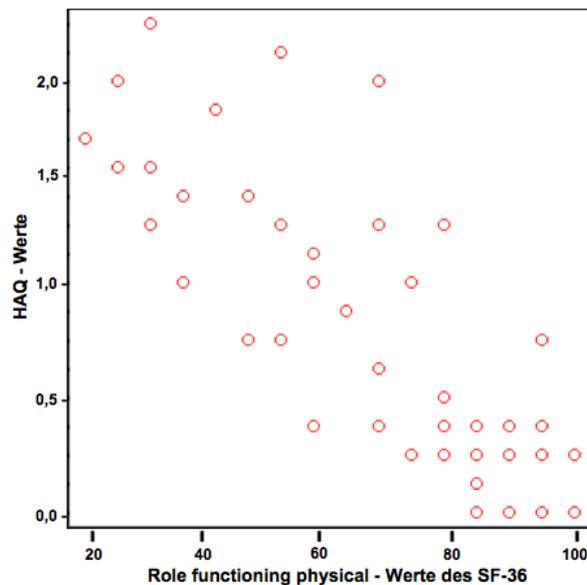


Abbildung 4.6: Scatter plot von HAQ-Werten (0-3) aufgetragen gegen Role Function Physical – Werte des SF-36 (0-100). Ein hoher Behinderungsgrad wird durch hohe HAQ-Werte und niedrige SF-36-Werte ausgedrückt.

Es ließ sich kein signifikanter Zusammenhang von den Aspekten des SF-36 und der MDR-1 Mutation herstellen ($p \geq 0,1$). Patienten mit MTHFR A1298C lassen einen Trend beim „Role Function Physical“ mit im Trend besseren Werten für den heterozygoten Genotyp verglichen mit Wildtyp und homozygoter Mutation erkennen (33,3 versus 42,8 (Wildtyp), bzw. 45,5 (homozygot), $p \leq 0,09$). Signifikant bessere Medianwerte ergeben sich im Bereich „Vitality“ für Träger des C-Allels (1298AC: 36,1, 1298CC: 32,4 versus 1298AA: 48,0, $p \leq 0,05$). In anderen Bereichen ist kein signifikanter Zusammenhang zwischen Ergebnis des SF-36 und MTHFR A1298C-Mutation herstellbar. Für SF-36 Werte und MTHFR C677T ließen sich keine Signifikanzen aufzeigen.

4.2.5 Genotypverteilung und CCP

Es ergibt sich in der vorliegenden Population kein signifikanter Unterschied der Mediane nach Kruskal&Wallis ($p \leq 0,2$) und kein signifikanter Zusammenhang von CCP und Genotyp C677T; $\chi^2(2, n=78)=3,4$; $p \leq 0,2$. Gleiches gilt für den Genotyp A1298C mit $\chi^2(2, n=78)=4,5$; $p \geq 0,1$ und auch MDR-1 mit $\chi^2(2, n=78)=0,1$; $p \leq 0,9$.

In der Kontrollgruppe errechnete sich ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang von CCP-Positivität und C677T ($\chi^2(2, N=78)=2,0$; $p \leq 0,4$), A1298C ($\chi^2(2, N=78)=1,6$; $p \leq 0,4$) und C3435T ($\chi^2(2, N=78)=0,4$; $p=1,0$).

4.3 Patientenkollektiv bezüglich der Nebenwirkungen

Ursprünglich umfasste das Patientenkollektiv 104 Patienten, in die Auswertung konnten 78 Patienten einbezogen werden. Gründe für das Ausscheiden von 25% waren:

- Patienten haben oft einen weiten Anreiseweg und sind für die Erhebung der Nebenwirkungen sowie die nötigen Untersuchungen durch den Anfahrtsweg aus teils weit entfernt liegenden Orten in Deutschland schwer zu mobilisieren.
- Desinteresse (16) und
- Tod (8).

Die Patientengruppe bestand somit aus 78 untersuchten Patienten, die an RA erkrankt waren und mit MTX behandelt wurden. Die demographischen und klinischen Befunde zum Zeitpunkt der Untersuchungen sind Tabelle 4.16 zu entnehmen. Insgesamt 35 der 78 Patienten litten unter unerwünschten Arzneimittelwirkungen (44,9%). Patienten in beiden Gruppen hatten variable Dosen von Methotrexat verschrieben (7,5-25,0 mg/Woche). Konnte kein befriedigendes Ansprechen auf die Therapie durch den behandelnden Rheumatologen festgestellt werden, wurde die Medikamentendosis erhöht. In der Gruppe ohne Nebenwirkungen erhielten 12 (15,4%) Patienten Folsäure, um der Entwicklung unerwünschter Arzneimittelwirkungen vorzubeugen, in der Gruppe mit Nebenwirkungen erhielten es zum Zeitpunkt der Untersuchung 10 (12,8%) Patienten, um diese unerwünschten Effekte zu minimieren.

Die mittlere Therapiedauer mit Methotrexat lag zum Zeitpunkt der Datenerhebung bei $5,4 \pm 3,80$ Jahren, die mittlere MTX Dosis ist $14,3 \pm 3,34$ mg/Woche. Die Basisdaten unterschieden sich nicht signifikant in den beiden Gruppen und waren vergleichbar.

	Unerwünschte Arzneimittelwirkungen vorhanden (n=47)	Keine unerwünschten Arzneimittelwirkungen (n=31)
Alter Mittelwert ± SD (Jahre) Range (Jahre)	58,2 ± 13,6 22 - 82	61,0 ± 12,3 37 - 83
Geschlecht Anzahl Frauen	26 (34%)	32 (41%)
Krankheitsdauer Mittelwert ± SD (Jahre) Range (Jahre)	9,0 ± 7,6 2,6 - 31,7	9,1 ± 9,8 2,0 - 47,2
Therapiedauer MTX Mittelwert ± SD (Jahre)	4,0 ± 2,2	6,5 ± 4,4
BSG Mittelwert ± SD (mm/Std)	19,3 ± 15,1	14,9 ± 14,4
CCP positive Patienten	18 (23,1%)	24 (30,8%)
Disease Activity Score	3,0 ± 1,0	2,7 ± 1,2
Tender Joint Count (28)	1,3 ± 1,7	1,9 ± 3,5
Swollen Joint Count (28)	1,9 ± 1,9	1,8 ± 2,5
HAQ	0,5 ± 0,7	0,5 ± 0,7
SF-36	521,2 ± 168,4	572,3 ± 161,9
MTX-Dosis Mittelwert ± SD (mg/ Wo) Range (mg/Woche)	14,0 ± 3,1 7,5 - 20,0	14,8 ± 3,7 7,5 - 25,0
Folatsupplementation (Anzahl)	15 (31,9%)	7 (22,6%)
Zusätzliche Medikamente (Az. der Patienten)		
Steroide	31 (66,0%)	16 (51,6%)
DMARDs	21 (44,7%)	5 (16,1%)
NSAID	19 (40,4%)	10 (32,3%)

Tabelle 4.16: Demographische und klinische Befunde von 78 Patienten mit rheumatoider Arthritis unter Behandlung mit MTX (RA-Gruppe). SD=Standard derivation, BSG=Blutsenkungsgeschwindigkeit, CCP= cyklisches citrulliertes Peptid, HAQ= Health Questionnaire, SF-36= Short Form 36.

4.3.1 Patientenkollektiv bezüglich der MTHFR C677T und A1298C Polymorphismen

In einem zweiten Schritt wurde das Patientenkollektiv wieder in Gruppen aufgeteilt, diesmal jedoch bezüglich des Vorhandenseins der MTHFR-C677T bzw. MTHFR A1298C Polymorphismen. Zählungen und Häufigkeiten von Genotypen, demographischen und klinischen Befunden zum Zeitpunkt der Untersuchungen sind Tabelle 4.17 zu entnehmen. Es tragen 48 Patienten den C677T Polymorphismus, 10 von ihnen homozygot und 50 Patienten sind Träger des A1298C

Polymorphismus, von ihnen sind 18 homozygot. Die Basisdaten unterschieden sich nicht wesentlich in beiden Gruppen und sind auch in dieser Form mit und ohne die jeweilige Mutation vergleichbar.

	Genotyp MTHFR C677T			Genotyp MTHFR A1298C		
	CC (n=30)	CT (n=38)	TT (n=10)	AA (n=28)	AC (n=32)	CC (n=18)
Alter MW ± SD Range (Jahre)	58,7 ± 11,8 28-81	59,4 ± 15,0 22-83	48,0 ± 18,7 44-73	57,1 ± 14,3 22-82	62,2 ± 12,0 37-83	57,7 ± 12,8 28-75
Geschlecht Az. Frauen	22 (28,2%)	27 (34,6%)	9 (11,5%)	23 (29,5%)	22 (28,2%)	13 (16,7%)
Krankheitsdauer MW ± SD (Jahre) Range (Jahre)	8,5 ± 7,8 2,4-31,2	9,4 ± 9,1 2,0-47,2	9,5 ± 8,8 3,0-31,7	9,6 ± 10,2 2,0 – 47,2	9,8 ± 8,5 2,6-31,2	6,8 ± 4,5 2,6-22,6
Therapiedauer MTX MW ± SD (Jahre)	5,0 ± 2,8	5,9 ± 4,7	4,7 ± 2,2	5,5 ± 3,9	5,5 ± 4,4	5,1 ± 2,4
BSG MW±SD(mm/Std)	19,3 ± 16,1	15,5 ± 13,2	20,4 ± 17,4	14,5 ± 12,9	18,4 ± 16,6	20,8 ± 14,3
CCP pos. Patienten	16 (20,5%)	18 (23,1%)	8 (10,2%)	19 (24,4%)	13 (16,7%)	10 (12,8%)
DAS 28	3,0 ± 1,3	2,8 ± 1,0	3,1 ± 0,8	2,7 ± 1,0	3,0 ± 1,2	3,0 ± 1,1
TJ Count (28)	1,8 ± 3,5	1,4 ± 1,8	1,4 ± 1,8	1,4 ± 2,0	2,0 ± 3,4	1,1 ± 1,4
SJ Count (28)	1,8 ± 2,3	1,7 ± 2,0	2,3 ± 2,7	1,6 ± 1,9	1,9 ± 2,1	2,1 ± 2,7
HAQ	0,5 ± 0,8	0,4 ± 0,5	1,0 ± 1,0	0,4 ± 0,7	0,7 ± 0,7	0,4 ± 0,7
SF-36	544,4 ± 180,7	553,9 ± 154,9	486,0 ± 172,5	571,1 ± 176,2	515,3 ± 169,2	542,2 ± 147,0
MTX-Dosis MW±SD (mg/Wo) Range (mg/Wo)	14,3 ± 3,8 7,5-20,0	14,2 ± 3,2 7,5-25,0	15,0 ± 2,4 10,0-20,0	14,3 ± 3,8 7,5-20,0	14,2 ± 3,2 7,5-25,0	15,0 ± 2,4 10,0-20,0
Folatsuppl. (Az)	12 (15,4%)	9 (11,5%)	1 (1,3%)	7 (9%)	7 (9%)	8 (10,3%)
Zusätzl. Med. (Anzahl Patient.)						
Steroide	16 (20,5%)	25 (32,5%)	6 (7,7%)	18 (23,1%)	20 (2,6%)	9 (11,5%)
DMARDs	13 (16,7%)	10 (12,8%)	3 (3,8%)	10 (12,8%)	9 (11,5%)	7 (9%)
NSAID	10 (12,8%)	15 (19,2%)	4 (5,1%)	10 (12,8%)	10 (12,8%)	9 (11,5%)

Tabelle 4.17: Demographische und klinische Befunde von 78 Patienten mit rheumatoider Arthritis mit oder ohne Mutation (RA-Gruppe). *SD*=Standard derivation, *BSG*=Blutsenkungs-geschwindigkeit, *CCP*= cyklisches citrulliertes Peptid, *HAQ*= Health Questionnaire, *SF-36*= Short Form 36.

4.3.1.1 Patienten bezüglich des MDR-1 C3435T Polymorphismus

Auch demographische und klinische Befunde hinsichtlich der Zählungen und Häufigkeiten des MDR-1 C3435T Polymorphismus wurden untersucht und sind Tabelle 4.18 zu entnehmen.

	Genotyp MDR-1 C3435T		
	CC (n=22)	CT (n=38)	TT (n=18)
Alter MW ± SD Range (Jahre)	59,8 ± 12,7 28-83	61,9 ± 13,3 22-82	53,1 ± 11,8 36-68
Geschlecht Az. Frauen	18 (23,1%)	29 (37,2%)	11 (14,1%)
Krankheitsdauer MW ± SD (Jahre) Range (Jahre)	10,1 ± 10,5 3,0-47,2	7,4 ± 6,5 2,0-30,7	11,2 ± 9,2 2,6-31,2
Therapiedauer MTX MW ± SD (Jahre)	5,7 ± 3,4	5,1 ± 4,0	5,6 ± 4,0
BSG MW±SD(mm/Std)	39,0 ± 29,2	29,7 ± 22,4	20,8 ± 15,8
CCP pos. Patienten	12 (15,4%)	21 (26,9%)	9 (11,5%)
DAS 28	2,9 ± 1,1	2,9 ± 1,0	2,9 ± 1,3
TJ Count (28)	1,6 ± 2,0	1,6 ± 1,8	2,5 ± 4,2
SJ Count (28)	2,1 ± 2,6	1,6 ± 1,8	2,1 ± 2,3
HAQ	0,4 ± 0,7	0,6 ± 0,8	0,5 ± 0,7
SF-36	550,0 ± 155,7	535,9 ± 177,8	543,0 ± 164,3
MTX-Dosis MW±SD (mg/Wo) Range (mg/Wo)	13,8 ± 3,5 8,0-20,0	14,5 ± 3,1 8,0-25,0	14,7 ± 3,6 10,0-25,0
Folatsuppl. (Az)	6 (7,7%)	12 (15,4%)	4 (5,1%)
Zusätzl. Med. (Anzahl Patient.)			
Steroide	12 (15,4%)	22 (28,2%)	13 (16,7%)
DMARDs	6 (7,7%)	10 (12,8%)	10 (12,8%)
NSAID	12 (15,4%)	11 (14,1%)	6 (7,7%)

Tabelle 4.18: Demographische und klinische Befunde von 78 Patienten mit rheumatoider Arthritis mit oder ohne Mutation (RA-Gruppe). *SD*=Standard derivation, *BSG*=Blutsenkungs-geschwindigkeit, *CCP*= cyclisches citrulliertes Peptid, *HAQ*= Health Questionnaire, *SF-36*= Short Form 36.

4.3.2 Genotypverteilung und Therapiedauer

Da eine längere Therapiedauer unter MTX Rückschlüsse auf die (Un-) Verträglichkeit des Medikamentes zuliebe, wurde auch sie statistisch analysiert.

Dabei ergab sich für den C677T Genotyp ein $\chi^2(n=78)=0,1$; $p \geq 0,9$, für den A1298C Genotyp $\chi^2(n=78)=0,6$; $p \leq 0,7$ und für MDR-1 $\chi^2(n=78)=1,7$; $p \leq 0,4$. Es ließ sich kein signifikanter Zusammenhang hinsichtlich längerer (oder kürzerer) Therapiedauer und Polymorphismen herstellen.

4.3.3 Korrelation der Polymorphismen und Kombinationstherapien

Weiterhin wurde untersucht, ob sich bei Mutationsträgern gehäuft die Notwendigkeit von Kombinationstherapien ergab. Der Fisher's exact Test ergab für C677T ein $\chi^2(n=78)=1,9$; $p \leq 0,4$, somit werden Mutationsträger nicht gehäuft mit Kombinationstherapien behandelt. Dies gilt ebenso für den A1298C SNP ($\chi^2(n=78)=2,8$; $p \leq 0,2$) und den C3435T SNP ($\chi^2(n=78)=4,1$; $p \geq 0,1$).

Bei Mutationsträgern liegt keine signifikant erhöhte Notwendigkeit zum Einsatz von Kombinationstherapien vor.

4.3.4 Genotypverteilung und Toxizität

Wie schon in Tabelle 4.16 gezeigt, wurden die Patienten zunächst nach Vorhandensein von MTX-assoziierten Nebenwirkungen in zwei Gruppen geteilt. Diese wurden dann hinsichtlich ihrer Genotypverteilung auf weitere Assoziationen mittels χ^2 - bzw. Fisher's exact Test untersucht.

Insgesamt 47 der 78 Patienten (60,3%) gaben unerwünschte Arzneimittelnebenwirkungen unter der Therapie mit MTX an. Von diesen wurden 15 (31,9%) zusätzlich mit Folsäure therapiert. Aus der Nebenwirkungsfreien Gruppe erhielten 7 Patienten präventiv Folsäure (22,6%). Mit χ^2 (1, $n=78$)=0,8; $p \leq 0,4$ ergibt sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Folatverteilung zwischen den beiden Gruppen.

Von den 47 Patienten, die Nebenwirkungen angaben, gaben 33 mehr als einen unerwünschten Effekt der unter der Therapie an (70,2%).

	N (%)
Unerwünschte Nebeneffekte	47 (60,3)
Mundentzündung	10 (21,3)
Haarausfall	13 (27,7)
Schwächegefühl	4 (8,5)
Müdigkeit	17 (36,2)
Schwindel	6 (12,8)
Fieber	1 (2,1)
Rheumaknoten	2 (4,3)
Hautausschlag	12 (25,5)
Übelkeit/Erbrechen	18 (38,3)
Magen-/ Bauchschmerzen	11 (23,4)
Durchfall	4 (8,5)
Appetitlosigkeit	2 (4,3)
Kopfschmerzen	5 (10,6)
Depressionen	5 (10,6)
Hoher Blutdruck	10 (21,3)

Tabelle 4.19: Überblick unerwünschter Arzneimittelleffekte bei 78 Patienten mit Rheumatoider Arthritis unter Behandlung mit MTX. Einige Patienten gaben mehr als einen Nebeneffekt der Behandlung an, siehe Text für Erläuterungen.

4.3.4.1 Genotypverteilung und organspezifische Toxizität

Im weiteren wurden die Nebenwirkungen zu organspezifischen Gruppen zusammengefasst; Allgemeinsymptome, Hämatologie, Gastro-/Intestinal, Transaminasen-Anstieg. Pulmonale und renale Nebenwirkungen traten im untersuchten Patientenkollektiv nicht auf. Es lag kein signifikanter Unterschied im Auftreten von Nebenwirkungen und MTHFR C677T-Polymorphismus ($\chi^2(2, n=78)=0,08; p=1,0$). Es ergab sich ein Trend hinsichtlich des Auftretens organspezifischer Toxizität (s. Tabelle 4.20) für Patienten mit 677TT-Allel hinsichtlich des Auftretens von Allgemeinsymptomen ($\chi^2(2, n=78)=4,3; p \leq 0,1$) und Transaminasenanstieg ($\chi^2(2, n=78)=5,0; p \leq 0,06$).

	Genotyp MTHFR C677T			Gesamtzahl 1 (n=78)	p-Wert
	C/C (n=30)	C/T (n=38)	T/T (n=10)		
UAW	18 (60,0)	23 (60,5)	6 (60,0)	47 (60,3)	1
Allgemeinsymptome	1 (3,3)	7 (18,4)	2 (20,0)	10 (12,8)	0,1
GI	11 (36,7)	13 (34,2)	6 (60,0)	30 (38,5)	0,3
Hämatologisch	1 (3,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,3)	0,5
Transaminasen	0 (0,0)	2 (5,3)	2 (20,0)	4 (5,1)	0,06

Tabelle 4.20: Organspezifische MTX-Toxizität in Relation zu MTHFR C677T Polymorphismus. UAW=unerwünschte Arzneimittelwirkung, GI=Gastro-intestinal. Allelfrequenz 677T-Allel=0,14 (ohne UAW=0,14).

Gleichermassen wurde für den MTHFR A1298C Polymorphismus vorgegangen. Es lag kein signifikanter Unterschied im Auftreten von Nebenwirkungen und MTHFR A1298C-Polymorphismus ($\chi^2(2, n=78)=0,07$; $p=1,0$) (s. Tabelle 4.21). Es ergab sich kein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen protektivem oder schädigendem Einfluss des 1298C-Allels.

	Genotyp MTHFR A1298C			Gesamtzahl (n=78)	p-Wert
	A/A (n=28)	A/C (n=32)	C/C (n=18)		
UAW	17 (60,7)	19 (59,4)	11 (61,1)	47 (60,3)	1
Allgemeinsymptome	4 (14,3)	5 (15,6)	1 (5,6)	10 (12,8)	0,6
GI	11 (39,3)	14 (43,8)	5 (27,8)	30 (38,5)	0,6
Hämatologisch	0 (0,0)	1 (3,1)	0 (0,0)	1 (1,3)	1
Transaminasen	3 (10,7)	1 (3,1)	0 (0,0)	4 (5,1)	0,3

Tabelle 4.21: Organspezifische MTX-Toxizität in Relation zu MTHFR A1298C Polymorphismus. UAW=unerwünschte Arzneimittelwirkung, GI=Gastro-intestinal. Allelfrequenz 1298C-Allel=0,19 (ohne UAW=0,19).

Ebenso wurde für den MDR-1 T3435C Polymorphismus vorgegangen. Es lag kein signifikanter Unterschied im Auftreten von Nebenwirkungen und MDR-1 C3435T-Polymorphismus ($\chi^2(2, n=78)=2,0$; $p=0,4$) vor (s. Tabelle 4.22). Es ergab sich kein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen protektivem oder schädigendem Einfluss des 3435C-Allels.

	Genotyp MDR-1 C3435T			Gesamtzahl (n=78)	p-Wert
	T/T (n=22)	T/C (n=38)	C/C (n=18)		
UAW	16 (72,7)	21 (55,3)	10 (55,6)	47 (60,3)	0,4
Allgemein- symptome	4 (18,1)	5 (13,2)	1 (5,6)	10 (12,8)	0,6
GI	12 (54,4)	12 (31,6)	6 (33,3)	30 (38,5)	0,2
Hämatologisch	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (5,6)	1 (1,3)	0,2
Transaminasen	2 (9,1)	1 (2,6)	1 (5,6)	4 (5,1)	0,6

Tabelle 4.22: Organspezifische MTX-Toxizität in Relation zu MDR-1 C3435T Polymorphismus. UAW=unerwünschte Arzneimittelwirkung, GI=Gastro-intestinal. Allelfrequenz des 3435C-Allels bei UAW=0,19 (ohne UAW=0,28).

4.3.4.1.1 Nebenwirkungen und Alkoholkonsum bei Patienten mit RA

Insgesamt gaben 5 Patienten den regelmässigen Konsum alkoholhaltiger Getränke an (6,4%). Zwei von ihnen klagten über das Auftreten unerwünschter Arzneimittelwirkungen. Bei derart kleinen Fallzahlen lohnt eine Berechnung von Zusammenhängen mangels Aussagekraft nicht.

4.3.4.1.2 Nebenwirkungen und Kaffee-/ Grünteeconsum bei Patienten mit RA

Auch die Konsumgewohnheiten in Bezug auf Kaffee- und Grünteeconsum wurden in Zusammenhang mit ihrem Hemmpotential des MDR-1 erfragt. Obwohl es deutlich mehr Konsumenten (60 vs. 18) gab, lässt sich in der untersuchten Gruppe kein signifikanter Zusammenhang eines erhöhten Auftretens von Nebenwirkungen nachweisen ($\chi^2(2, N=78)=0,007$; $p \leq 0,9$, s. Tabelle 4.23).

	Unerwünschte Arzneimittelwirkungen (n=47)	Keine Nebenwirkungen (n=31)
Kaffee-/ Grünteeconsum	36 (46,2)	24 (30,8)
Verzicht	11 (14,1)	7 (9,0)

Tabelle 4.23: Auftreten von Nebenwirkungen und Kaffee-/ Grünteeconsum bei Patienten mit RA unter Behandlung mit MTX. Prozentzahlen in Klammern.

4.3.5 Genotypverteilung und Ansprechen auf die Therapie mit MTX

Es gab keine signifikanten Unterschiede im Ansprechen auf die Therapie mit MTX bei Betrachtung des MTHFR C677T-Polymorphismus ($\chi^2(4, n=78)=7,4; p \leq 0,2$). Ebenso verhielt es sich bei MTHFR A1298C ($\chi^2(4, n=78)=2,2; p \leq 0,7$). Auch für MDR-1 C3435T ($\chi^2(4, n=78)=0,05; p=1$) konnte kein signifikant erhöht oder erniedrigtes Ansprechen auf die Therapie mit MTX festgestellt werden (s. Abbildung 4.7).

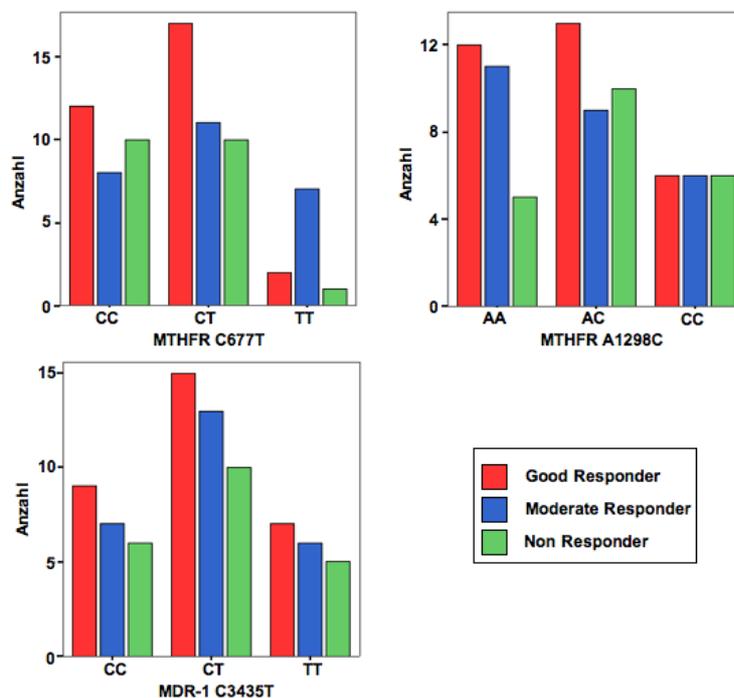


Abbildung 4.7: Graphische Darstellung der Responder in Abhängigkeit der jeweiligen SNP.

Mutationsträger sprechen in dieser Studie nicht signifikant besser oder schlechter auf die Therapie an, als Träger der Wildtypallele.

5 Diskussion

Es konnte durch die bisherige Studienlage belegt werden, dass etwa 30% der Patienten mit Rheumatoider Arthritis die Therapie mit Methotrexat aufgrund von unerwünschten Nebenwirkungen abbrechen [Mielants H et al. (1991)][Buchbinder R et al. (1993)]. Die Abbruchraten variieren von 2,83% - 24,15% in Studien, welche den Zusammenhang von MTHFR-Genotypen und MTX-assoziierten Nebenwirkungsprofilen untersuchten, obwohl keine dieser Studien die Abbruchraten mit dem Genotyp explizit korrelierte [van Ede AE et al. (2001)][Urano W

et al. (2002)][Kumagai K et al. (2003)].

In der vorliegenden Studie wurde der Zusammenhang von Polymorphismen an Stelle des 677. sowie des 1298. Nukleotid des MTHFR-Gens sowie des MDR-1 C3435T Polymorphismus und der MTX-vermittelten Wirkungen und Nebenwirkungen in einer longitudinalen Studie untersucht. Es konnte in der vorliegenden Studie kein Zusammenhang von Auswirkungen der Polymorphismen auf die Nebenwirkungen noch die Wirkkraft von Methotrexat bestätigt werden.

Die Prävalenz des homozygoten C677T Polymorphismus war in der vorliegenden Studie höher als in vorhergehenden Studien, was durch ethnische Differenzen begründet sein könnte [Haagsma CJ et al. (1999)][Ulrich CM et al. (2001)][Aggarwal P et al. (2006)][van Ede AE et al. (2001)][Urano W et al. (2002)]. Diese ethnischen Variationen in der Verteilung der Genotypen könnte möglicherweise auf die Bedeutung der Genotypisierung zur Vorhersage geeigneter Dosierungen der low-dose MTX-Therapie hinweisen.

Patienten mit MDR 3435CC-Allelen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung signifikant jünger als Patienten mit T/T- bzw. heterozygoter Mutation und wiesen eine signifikante Verringerung der Blutsenkungsgeschwindigkeit unter Therapie mit MTX auf. Der DAS 28 zeigte jedoch keine weiteren ausschlaggebenden Argumente für einen signifikanten Einfluss der Zahl mutierter Allele.

Es konnte ein signifikanter Unterschied in der Auswertung des HAQ-Behinderungsindex für Träger des 677T-Allels (0,82 versus 0,13 für den Wildtyp), jedoch lediglich ein Trend für die Stärke des Zusammenhangs nach Spearman gezeigt werden. Dies kann auf die zu kleine Studienkohorte zurückzuführen sein. Zumal sich bei der Untersuchung des Auftretens organspezifischer Toxizität für Patienten mit 677TT-Allel ein Trend hinsichtlich des Auftretens von Allgemeinsymptomen und Transaminasenanstieg ergab. Diese insgesamt geringen Werte könnten auf eine Bias im Studienaufbau durch die Vorauswahl der Patienten zurückzuführen sein und auch durch eine engmaschigere Überwachung von Allgemeinsymptomen, speziell jedoch der Leberwerte unter der Therapie mit Methotrexat erklärbar sein. Allerdings durchaus auch ein Hinweis auf den Einfluß der Mutation auf den Krankheitsverlauf unter der Therapie mit MTX sein. Die zusätzlich untersuchten Datensätze belegen dies jedoch nicht weiter.

In der Auswertung des SF-36 fand sich ein Trend für das Role Functioning Physical für heterozygote Merkmalsträger und signifikant bessere Werte im Bereich der Vitalität für homozygote Träger des 1298CC-Allels. Sämtliche weiteren Bereiche des SF-36 ergaben keine signifikanten Zusammenhänge mit den untersuchten Polymorphismen und auch die Zusammenfassung der Subgruppen, um Aussagen zu körperlicher und geistiger Gesundheit und

deren Zusammenhang mit den Polymorphismen zu ermöglichen blieb ohne nennenswerte Ergebnisse.

Da MTX seine Wirkung und wenigstens einen Teil seiner Nebenwirkungen durch Inhibition des Folsäuremetabolismus entfaltet [Tishler M et al. (1988)][Joyce DA et al. (1991)], erklärt sich die berechnete Annahme, dass die Verminderung der Enzymaktivität eines der Schlüsselenzyme des Folsäuremetabolismus die Wirkung von MTX steigern, was sich wiederum positiv oder negativ auf den Patienten auswirken kann. Dies wurde bei in-vitro Untersuchungen hinsichtlich der Enzymaktivität bestätigt; sowohl das T-Allel an Stelle C677T als auch das C an A1298C führen zu verminderter Enzymaktivität [Frosst P et al. (1995)][van der Put NM et al. (1998)][Weisberg I et al. (1998)]. So haben zum Beispiel Haagsma *et al.* über erhöhte Homocysteinspiegel bei Patienten mit RA unter Behandlung mit MTX berichtet, die höher seien als bei gesunden Probanden [Haagsma CJ et al. (1999)], was wiederum eine Verbindung zu gastrointestinalen Nebenwirkungen nahelegen könnte. Ulrich *et al.* zeigten bei Knochenmarkstransplantierten Patienten mit 677T Genotyp eine stärkere Häufung von Mucosa-assoziierten Nebenwirkungen unter MTX als bei Probanden mit anderen Allelen. Auch [van Ede AE et al. (2001)] und [Urano W et al. (2002)] publizierten eine signifikante Assoziation des C677T Polymorphismus und MTX-vermittelter Toxizität oder dessen effektiver Wirkung bei Patienten mit RA; das T-Allel ließ Patienten sensitiver auf Nebenwirkungen reagieren, während das 1298C-Allel Patienten besser auf die Behandlung ansprechen ließ. Zusätzlich wird in der Literatur von weiteren Auswirkungen des MTHFR Polymorphismus berichtet: der C677T Polymorphismus wurde als Risikofaktor für arteriosklerotische Gefässerkrankung [Kluijtmans LA et al. (1996)], Neuralrohrdefekte [van der Put NM et al. (1995)] und Schizophrenie/ Depression [Arinami T et al. (1997)] entdeckt. Skibola *et al.* beschrieben für doppel-Heterozygotie des MTHFR-Gens (also 677C/T und 1298A/C) ein fünffach niedriger geschätztes Risiko als bei doppelter Homozygotie (entsprechend 677TT und 1298CC), eine akute lymphozytäre Leukämie zu entwickeln [Skibola CF et al. (1999)].

In zwei kürzlich veröffentlichten Studien zu diesem Thema konnte kein Zusammenhang zwischen medikamenteninduzierter Toxizität und Polymorphismen aufgezeigt werden [Kumagai K et al. (2003)][Berkun Y et al. (2004)]. In dieser Studie war die verschriebene MTX-Dosis niedriger als in anderen Studien, was die Ergebnisse beeinflusst haben könnte. In früheren Studien zur Korrelation von MTX induzierter Wirkung und Nebenwirkung bei Patienten mit RA erhielt die Mehrheit der Patienten keine präventive Folsäure [Haagsma CJ et al. (1999)][van Ede AE et al. (2001)][Urano W et al. (2002)][Kumagai K et al. (2003)]. In der Studie der Gruppe um van Ede *et al.* mussten viele Patienten die Behandlung mit MTX aufgrund der Nebenwirkungen abbrechen (24%), im Gegensatz

zu der vorliegenden Arbeit, da es keine medikamenteninduzierten Abbrüche gab. Dies kann durch eine Auswahlbias erklärt werden, wurden doch bevorzugt Patienten mit Rheumatoider Arthritis unter MTX-Therapie angeschrieben, da nach diesen Kriterien in der Datenbank bevorzugt gesucht wurde. Bei einem Großteil der bisher untersuchten Studienpopulationen scheint die hohe Rate an unerwünschten Arzneimittelnebenwirkungen auf einen Mangel an zusätzlich verschriebener protektiv wirkender Folsäure [Morgan SL et al. (1998)] zurückführbar zu sein. Allgemein war die Toxizität jedoch ähnlich in den Gruppen mit und ohne Polymorphismus, unabhängig von der Folsäuresupplementation. In einer neueren Studie an Patienten mit Autoimmunerkrankungen die MTX erhielten, stellte sich eine entgegengesetzte Relation von C677T Polymorphismus und Toxizität dar [Speletas M et al. (2005)].

All diese Daten lassen vermuten, dass eine durch MTX verursachte niedrigere Folatkonzentration die Verfügbarkeit an Folaten bei Patienten mit dem 677T-Allel erniedrigt. Somit scheint zusätzliches Verschreiben von Folsäure der schädlichen Wirkung des C677T Polymorphismus bei Patienten mit RA entgegen zu wirken. Auf molekularer Basis könnte dieser Effekt durch Schutz des MTHFR Enzyms vor thermaler Inaktivierung durch Therapie mit Folsäure bedingt sein [Guenther BD et al. (1999)].

In Studien an Patienten mit Knochenmarkstransplantationen und malignen Erkrankungen konnte eine Assoziation des C677T Polymorphismus im MTHFR-Gen und MTX-vermittelter Toxizität gezeigt werden [Ulrich CM et al. (2001)][Toffoli G et al. (2000)][Toffoli G et al. (2003)]. Die hier beobachteten Assoziationen von C677T Polymorphismen und Nebenwirkungen von MTX bei Transplantations- und Krebspatienten könnte in Zusammenhang mit den verwendeten höher liegenden Dosen von MTX stehen. Die Dosis von MTX bei RA Patienten liegt deutlich niedriger so dass die vermittelten Auswirkungen vermutlich nicht in ihrer Gänze zum Tragen kommen und sich keine Verbindung von Polymorphismus und Nebenwirkungsprofil aufzeigen lässt.

Ähnlich der hier vorgelegten Studie gab es weitere Studien, die keine Assoziation zwischen dem C677T Polymorphismus und der Wirkung der Behandlung von RA-Patienten mit MTX belegen. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür könnte sein, dass der Aktionsmechanismus von niedrig-dosiertem MTX in der Therapie von RA Patienten stärker anti-inflammatorisch ist, als anti-proliferativ [Cutolo M et al. (2001)]. Es ist daher durchaus vorstellbar, dass andere Polymorphismen als der C677T eine Korrelation mit der klinischen Effektivität von MTX bei RA Patienten aufweisen.

Eine anderer Erklärungsansatz, der berücksichtigt werden muss liegt im Studiendesign: 22,6% der mit MTX behandelten Patienten ohne jegliche UAWs wurden mit Folsäure behandelt um MTX-

assoziierter Toxizität von Vorneherein vorzubeugen. Es wurde mehrfach gezeigt, dass der Effekt von Folsäure hilfreich sei, Nebenwirkungen unter niedrig-dosierter MTX Therapie abzuschwächen [Morgan SL et al. (1998)]. Weiterhin waren in der Patientengruppe ohne unerwünschte Arzneimittelwirkungen 51,6% Steroide, 16,1% DMARDs und 32,3% NSAIDs verordnet. Diese zusätzlichen Therapien könnten durchaus die Entwicklung MTX-assoziierter Toxizität beeinflusst haben.

Zusätzlich wurde in diesem Zusammenhang die Prävalenz der weiterhin beschriebenen Mutation A1298C im MTHFR-Gen untersucht und sowohl mit der C677T-Mutation als auch dem von Patientenseite beschriebenen Nebenwirkungsprofil in Verbindung korreliert. Für die Mutation A1298C unterschied sich die Häufigkeit des Auftretens von Nebenwirkungen für Patienten in den verschiedenen Gruppen nicht, noch zeigte sich ein Zusammenhang mit der Mutation 677TT. Berkun *et al.* konnten eine schützende Wirkung des 1298CC Genotypes für das Auftreten von Nebenwirkungen unter der Methotrexattherapie nachweisen [Berkun Y et al. (2004)], der sich ähnlich auch bei Typ-II Diabetikern anhand des verminderten Auftretens diabetischer Nephropathie zeigen ließ [Shpichinetsky V et al. (2000)]. Dies lies sich in der vorliegenden Studie jedoch nicht bestätigen. Auch die von Drozdik *et al.* publizierten Zusammenhänge des MDR1 C3435T Polymorphismus hinsichtlich der gesteigerten Wahrscheinlichkeit einer Remission für Träger des T-Allels oder die höheren Ansprechraten auf die Therapie mit MTX konnten nicht erneut belegt werden [Pawlik A et al. (2004)][Drozdik M et al. (2006)]. Und weiterhin gab es keine signifikanten Unterschiede der Genotypenverteilung in Bezug auf Ansprechen der Therapie mit Methotrexat. Die bisherige Datenlage scheint nahezu legen, dass MDR1 Polymorphismen vielen weiteren Einflüssen unterliegen, so zum Beispiel auch der Aktivität von P-gP, welche die Wirkung der Therapie Rheumatoider Arthritis weiter beeinflusst. P-gP könnte an der Zelle wie eine Effluxpumpe wirken und so die intrazelluläre Medikamentenkonzentration herabsetzen. Weiter könnte dieses Protein auch in den transmembranen Transport von Zytokinen involviert sein und so die Aktivität der RA beeinflussen. Die anti-inflammatorische Wirkung von DMARDs ist auch abhängig von deren Auswirkungen auf die Freisetzung verschiedener Zytokine. Somit könnte P-gP durch seine Effekte auf den transmembranen Transport von Zytokinen die Aktivität antirheumatischer Medikamente beeinflussen.

Da der Entwicklungsprozess medikamentenassoziierter Nebenwirkungen heterogen ist, werden weiterführende Studien mit grösseren Patientengruppen notwendig sein, um einen endgültigen Schluss zwischen Genotypen und Nebenwirkungen in einer (deutsch-) kaukasischen Studienpopulation ziehen zu können.

Zusammenfassend ist der C677T Polymorphismus des MTHFR-Gens kein Vorhersagemarker für Wirkung oder Toxizität der Behandlung an Rheumatoider Arthritis erkrankten Patienten mit Methotrexat und Folatsupplementation. Weitere Studien sind nötig um Polymorphismen in anderen Kandidatengen zu identifizieren, die für die beobachtete Streuung von klinischer Antwort auf die Behandlung und das Auftreten von Nebenwirkungen verantwortlich sind.

Es konnte kein Zusammenhang zwischen den C677T und A1298C Polymorphismen im MTHFR-Gen sowie dem C3435T Polymorphismus im MDR-1 Gen und Toxizität oder Wirkung von MTX aufgezeigt werden.

6 Zusammenfassung

Die RA ist durch eine Entzündung der Synovia gekennzeichnet und kann weiterhin zu Bursitis, Tendovaginitis und Arthritis führen. Die genaue Ätiologie dieser aggressiv- autoimmunen Entzündungsreaktion des Körpers bleibt insgesamt ungeklärt. Es wird spekuliert, dass ein Zusammenspiel von Umwelt- als auch genetischen Faktoren (Shared Epitope) die Entstehung begünstigen.

Es gibt entsprechende Screening- Tests, die eine frühe, aggressive und somit erhofft rechtzeitige Therapieeinleitung ermöglichen, doch bleibt der erwünschte Erfolg trotz der Kombination verschiedener Medikamentengruppen, wie allgemeiner Therapeutika, NSAR, DMARDs, Immunsuppressiva und TNF- α -Blockern häufig aus. Zum Einen kommt es zu Verzögerung durch Therapieabbrüche aber auch Arzneimittelunverträglichkeiten der verschiedenen Medikamentengruppen. Daher ist es wichtig, weiterhin nach pharmakogenetischen Prädiktoren zu suchen.

In dieser Studie untersuchten wir die Einflüsse der C677T-, A1298C-Polymorphismen im MTHFR-Gen und C3435T-Polymorphismen im MDR-A-Gen bei 78 Patienten mit Rheumatoider Arthritis auf die Behandlung mit Methotrexat. Es konnten im Patientengut keine signifikanten Zusammenhänge von Polymorphismen und assoziierten Erkrankungen (familiärer RA, weitere Erkrankungen) oder Unterschiede im Auftreten bei den Geschlechtern festgestellt werden. Allerdings liegen MTHFR 1298AC und 677CT in der Patientengruppe signifikant häufig mutiert vor und Patienten mit MRD-1 3435CC Genotyp waren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung signifikant jünger.

Die Korrelation mit Verlaufparametern wie dem DAS-28 ergab keine signifikanten Ergebnisse, bis

auf signifikant niedrigere BSG-Mittelwert-Unterschiede nach Therapiebeginn bei Patienten mit MRD-1 3435CT SNP, welche auf ein besseres Ansprechen auf die Therapie hinweisen könnten. Für den HAQ konnte kein Zusammenhang für MTHFR 1298 bzw. MDR-1 3435 gezeigt werden. Patienten mit MTHFR C677T-Allel allerdings gaben einen signifikant höheren Behinderungsindex an. Der SF-36 ergab eine stärkere körperliche Einschränkung von Frauen gegenüber Männern und eine deutlich erhöhte physische und mentale Fitness jüngerer gegenüber älteren Patienten. Gesundheitsempfinden und physische Körperwahrnehmung waren signifikant besser bei Trägern des MTHFR 1298C-Allels, konnten für MTHFR 677 bzw MDR-1 3435 SNP jedoch keine Ergebnisse belegen.

Obwohl sich in anderen Studienpopulationen Hinweise auf einen Einfluss der untersuchten Kandidatengene in Bezug auf ihren Beitrag zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen von Methotrexat in der Behandlung von Patienten mit Rheumatoider Arthritis ergaben, zeigten sich insgesamt in der vorliegenden Studie keine erhöhten Risiken oder protektive Wirkungen für bestimmte Allelträger. Es gab keinerlei signifikante Zusammenhänge zwischen den Polymorphismen bezüglich der Therapiedauer, Notwendigkeit von Korrelationstherapien, MTX-assoziiertes Toxizität oder Ansprechen auf die Therapie mit MTX. Lediglich ein Trend für das vermehrte Auftreten von Allgemeinsymptomen bzw. Transaminasenanstieg bei 677TT-Mutation ließ sich nachweisen.

Möglicherweise tritt ein erhöhtes Risiko nur in Zusammenhang mit bestimmten Umweltfaktoren auf und es bedarf der Untersuchung einer grösseren Patientengruppe, um dies deutlich machen zu können.

Ein Ausblick in die Zukunft der Pharmakogenetik lässt erahnen, dass die Untersuchung genetischer Polymorphismen für mehrere zusammenspielende Gene eventuell nicht nur über die Wahrscheinlichkeit des Erlangens einer Krankheit sondern durchaus auch über Ansprechen auf bestimmte Medikamente und potentielle Nebenwirkungen geben könnten. Allerdings ist der Nutzen einer Genotypisierung von Patienten mit Rheumatoider Arthritis vor Therapiebeginn für Polymorphismen der MTHFR bislang nicht zu rechtfertigen und keine Alternative um die MTX-assoziierten Nebenwirkungen zu reduzieren.

II. Literaturverzeichnis

- Aggarwal P, Naik S, Mishra KP, Aggarwal A, Misra R. Correlation between methotrexate efficacy & toxicity with C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate gene in rheumatoid arthritis patients on folate supplementation Indian J Med Res 2006;124:521-526.
- Aletaha D, Smolen JS. The rheumatoid arthritis patient in the clinic: comparing more than 1,300 consecutive DMARD courses. Rheumatology (Oxford) 2002;41:1367–1374.
- American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Clinical Guidelines. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1996;39:713-722.
- Antony AC. The biological chemistry of folate receptors. Blood 1992;79:2807–2820.
- Arinami T, Yamada N, Yamakawa-Kobayashi K, Hamaguchi H, Toru M. Methylenetetrahydrofolate reductase variant and schizophrenia/depression. Am J Med Genet 1997;74:526-28.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane IN, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SK, Liang MH, Luthra HS, Medsger TA Jr, Mitchell DM, Neustadt DH, Pinals KS, Schaller JG, Sharp JT, Wilder RL, Hunder GG. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1987;31:315-324.
- Berkun Y, Levartovsky D, Rubinow A, Orbach H, Aamar S, Grenader T, et al.. Methotrexate related adverse effects in patients with rheumatoid arthritis are associated with the A1298C polymorphism of the MTHFR gene. Ann Rheum Dis 2004;63:1227-31.
- Bruce B, Fries JF. The Stanford Health Assessment Questionnaire: a review of its history, issues, progress, and documentation. J Rheumatol 2003;30:167-78.
- Brzezinska A, Winska P, Balinska M. Cellular aspects of folate and antifolate membrane transport. Acta Biochim Pol 2000;47:735-49.
- Buchbinder R, Hall S, Sambrook PN et al. Methotrexate therapy in rheumatoid arthritis: a life table review of 587 patients treated in community practice. J Rheumatol 1993;20:639-44.
- Conaghan PG, Lehmann T, Brooks P. Disease-modifying antirheumatic drugs. Curr Opin Rheumatol 1997;9:183-90.
- Cronstein BN, Naime D, Ostad E.. The antiinflammatory mechanism of methotrexate: increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an in vivo model of inflammation. J Clin Invest 1993;92:2675-82.
- Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C, Straub RH. Antiinflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 2001;60:729-35.
- Del Rincon I, Battafarano DF, Arroyo RA, Murphy FT, Fischbach M, Escalante A. 2003;.

- Drossaers-Bakker KW, de Buck M, van Zeben D, Zwinderman AH, Breedveld FC, Hazes JM. Long-term course and outcome of functional capacity in rheumatoid arthritis: the effect of disease activity and radiologic damage over time. *Arthritis Rheum* 1999;42:1854-60.
- Drozdziak M, Rudas T, Pawlik A, Kurzawski M, Czerny B, Gornik W et al. The effect of 3435C>T MDR1 gene polymorphism on rheumatoid arthritis treatment with disease-modifying antirheumatic drugs. *Eur J Clin Pharmacol* 2006;62:933–937.
- Friedman G, Goldschmidt N, Friedlander Y, Ben-Yehuda A, Selhub J, Babaey S, et al.. A common mutation A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene: association with plasma total homocysteine and folate concentrations. *J Nutr* 1999;129:1656-61.
- Fries JF, Spitz P, Kraines RG, Holman HR. Measurement of patient outcome in arthritis *Arthritis Rheum* 1980;23:137-45.
- Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews R et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111–113.
- Genestier L, Paillot R, Quemeneur L, Izeradjene K, Revillard JP. Mechanisms of action of methotrexate *Immunopharmacol* ;47:247-57.
- Ghodke Y, Chopra A, Joshi K, Patwardhan B. Are Thymidylate synthase and Methylene tetrahydrofolate reductase genes linked with methotrexate response (efficacy, toxicity) in Indian (Asian) rheumatoid arthritis patients? *Clin Rheumatol* 2008;27:787-89.
- Gorman JD, Lum RF, Chen JJ, Suarez-Almazor ME, Thomson G, Criswell LA. Impact of shared epitope genotype and ethnicity on erosive disease: a meta-analysis of 3,240 rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 2004;50:400-412.
- Grabar PB, Logar D, Lestan B, Dolzan V. Genetic determinants of methotrexate toxicity in rheumatoid arthritis patients: a study of polymorphisms affecting methotrexate transport and folate metabolism. *Eur J Clin Pharmacol* 2008;64:1057-1068.
- Greene JM, Winickoff RN. Cost conscious prescribing of non-steroidal antiinflammatory drugs for adults with arthritis: a review and suggestions. *Arch Intern Med* 1992;152:1995-2002.
- Gubner R, August S, Ginsberg V. Therapeutic suppression of tissue reactivity. II. Effect of aminopterin in rheumatoid arthritis and psoriasis. *Am J Med Sci* 1951;221:176-82.
- Guenther BD, Sheppard CA, Tran P, Rozen R, Mathews RG, Ludwig ML. The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. *Nat Struct Biol* 1999;6:359-65.
- Haagsma CJ, Blom HJ, van Riel PL, van't Hof MA, Giesendorf BA, van Oppenraaij-Emmerzaal D, et al.. Influence of sulphasalazine, methotrexate, and the combination of both on plasma

- homocysteine concentrations in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1999;58:79-84.
- Healy LA.. Rheumatoid arthritis in the elderly. *Clin Rheum Dis* 1986;1:173-9.
 - Johnson SR, Lee P. The HAQ disability index in scleroderma trials. *Rheumatology (Oxford)* 2004;43:472-8.
 - Joyce DA, Will RK, Hoffman DM, Laing B, Blackburn SJ. Exacerbation of rheumatoid arthritis in patients treated with methotrexate after administration of folic acids. *Ann Rheum Dis* 1991;50:913-914.
 - Keitel W. {Follow-up of rheumatoid arthritis beginning in advanced age} *Z Rheumatol* 1993;52(3):138-41.
 - Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, Boers GH, Frosst P, Stevens EM, van Oost BA, et al.. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet* 1996;58:35-41.
 - Kremer JM. Towards a better understanding of methotrexate. *Arthritis Rheum* 2004;50:1370-82.
 - 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* 2003;11:593-600.
 - Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2001;358:903-11.
 - MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, et al.. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. 2000;.
 - Matsui T, Shimada K, Ozawa N, Hayakawa H, Hagiwara F, Nakayama H, Sugii S, Ozawa Y, Tohma S. Diagnostic utility of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies for very early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2006;33:2390-97.
 - Menninger H, Herborn G, Sander O, Blechschmidt J, Rau R. A 36 month comparative trial of methotrexate and gold sodium thiomalate in the treatment of early active and erosive rheumatoid arthritis. *BR J Rheumatol* 1998;37:1060-8.
 - Mielants H, Veys EM, Van der Straeten C, Ackerman C, Goemaere S. The efficacy and toxicity of a constant low dose of methotrexate as a treatment for intractable rheumatoid arthritis: an open prospective study. *J Rheumatol* 1991;18:978-83.
 - Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215-8.
 - Montemerani M, Venturi C, Bracco S, Coviello G, Minari C, Fioravanti A, Marcolongo R. Involvement of atlanto-axial joint in rheumatoid arthritis: rare or frequent? *Clin Rheumatol* 1994;13:459-64.

- Morgan SL, Baggott JE, Lee JY, Alarcon GS. Folic acid supplementation prevents deficient blood folate levels and hyperhomocysteinemia during longterm, low dose methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: implications for cardiovascular disease prevention. *J Rheumatol* 1998;25:441-6.
- Newman S, Fitzpatrick R, Revenson TA, Skevington S, Williams G, editors. *Understanding rheumatoid arthritis*. London: Routledge 1996;.
- Pawlik A, Wrzesniewska J, Fiedorowicz-Fabrycy I, Gawronska-Szklarz B. The MDR1 3435 polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Pharmacol Ther* 2004;42:496-503.
- Peng F, Labelle LA, Rainey BJ, Tsongalis GJ.. Single nucleotide polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are common in US Caucasian and Hispanic American populations. *Int J Mol Med* 2001;8:509-11.
- Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update *J Clin Invest*. 2003;111:1805-12.
- Pincus T, Sokka T, Wolfe F. Premature mortality in patients with rheumatoid arthritis: evolving concepts. *Arthritis Rheum* 2001;44:1234-6.
- Puolakka K, Kautiainen H, Möttönen T, Hannonen P, Korpela M, Hakala M, Järvinen P, Ahonen J, Forsberg S, Leirisalo-Repo M; FIN-RACo Trial Group.. Early suppression of disease activity is essential for maintenance of work capacity in patients with recent-onset rheumatoid arthritis: five-year experience from the FIN-RACo trial. *Arthritis Rheum* 2005;52:36-41.
- Ranawat CS. Surgical management of the rheumatoid hip. *Rheum Dis Clin North Am* 1998;24:129-41.
- 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* 2003;62:4-9.
- Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF. Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2003;43:285-307.
- Seeger DR, Cosulich DDB, Smith JM, Hultquist ME. Analogs of pteroylglutamic acid. II. 4-aminoderivatives. *J Am Chem Soc* 1949;71:1297-301.
- Silman AJ, Pearson JE. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2002;4 Suppl 3:265-72.
- Skibola CF, Smith MT, Kane E, Roman E, Rollinson S, Cartwright RA, et al.. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leucemia in adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:12810-15.
- Speletas M, Papadopoulos N, Daiou C, Katodritou E, Pavlitou-Tsiontsi A, Galanopoulou V. Relationship between 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism and

- methotrexate related toxicity in patients with autoimmune diseases receiving folic acid supplementation. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1791-2.
- Spichinetsky V, Raz I, Friedlander Y, Goldschmidt N, Wexler I, Ben-Yehuda A, et al.. The association between two common mutations C677T and A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene the risk for diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients. *J Nutr* 2000;130:2493-7.
 - Suarez-Almazor ME, Belseck E, Shea B, Tugwell P, Wells GA. Methotrexate for treating rheumatoid arthritis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 1998;Issue 2. Art. No.: CD000957.DOI:10.1002/14651858.CD000957.
 - Talamo J, Frater A, Gallivan S, Young A. Use of the short form 36 (SF36) for health status measurement in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1997;36:463-69.
 - Tishler M, Caspi D, Fishel B, Yaron M. The effects of leucovorin (folinic acid) on methotrexate therapy in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 1988;31:906-908.
 - Toffoli G, Russo A, Innocenti F, Corona G, Tumolo S, Mini E, et al.. Effect of methylenetetrahydrofolate reductase 677CT polymorphism on toxicity and homocysteine plasma level after chronic methotrexate treatment of ovarian cancer patients. *Int J Cancer* 2003;103:294-9.
 - Toffoli G, Veronesi A, Boiocchi M, Crivellari D. MTHFR gene polymorphism and severe toxicity during adjuvant treatment of early breast cancer with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil (CMF). *Ann Oncol* 2000;11:373-4.
 - Ulrich CM, Robien K, Sparks R. Pharmacogenetics and folate metabolism: a promising direction. *Pharmacogenomics* 2002;3:299-313.
 - Ulrich CM, Yasui Y, Storb R, Schubert MM, Wagner JL, Bigler J, et al.. Pharmacogenetics of methotrexate: toxicity among marrow transplantation patients varies with the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Blood* 2001;98:231-234.
 - Urano W, Taniguchi A, Yamanaka H, Tanaka E, Nakajima H, Matsuda Y et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene were associated with both the efficacy and the toxicity of methotrexate used for the treatment of rheumatoid arthritis, as evidenced by single locus and haplotype analyses. *Pharmacogenetics* 2002;12:183-190.
 - Van Boekel MAM, Vossenaar ER, van den Hoogen F, van Venrooij WJ. Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Res* 2002;4:87-93.
 - van de Putte LB, van Riel PL. Rheumatoid arthritis -- changing theories and treatment modalities. *Acta Orthop Scand Suppl.* 1995;266:10-3.
 - van der Heide A, Jacobs JWJ, Bijlsma JWJ, Heurkens AHM, van Booma-Frankfort C, van der Veen MJ, Haanen HCM, Hofman DM. The effectiveness of early treatment with "second-line"

- antirheumatic drugs: a randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 1996;124:699-707.
- van der Heijde DM, van 'tHof M, van Riel PL, van de Putte LB. Validity of single variables and indices to measure disease activity in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1993;20:538-41.
 - Van der Heijde DMFM, van Leeuwen MA, van Riel PLCM, Koster AM, van't Hof MA, Rijswijk MH, van de Putte LBA. Biannual radiographic assessments of hands and feet in a three-year prospective followup of patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1992;35:26-34.
 - van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 1998;62:1044–1051.
 - van der Put NM, Steegers-Theunissen RP, Frosst P, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, et al.. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 1995;346:1070-71.
 - van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, Huizinga TW, Haagsma CJ, Giesendorf BA et al. 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* 2001;44:2525–2530.
 - Ware JE, Kosinski M, Keller SD. SF-36 Physical and Mental Summary Scales: A User's Manual. Boston, MA: New England Medical Center, The Health Institute, 1994;.
 - Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen Rl. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998;64:169-72.

III. Anhang

Abbildungsverzeichnis

- 1.4.4.1: Abbildung 1.1.....	13
- 1.4.5.2: Abbildung 1.2.....	14
- 1.5: Abbildung 1.3.....	16
- 3.1.6: Abbildung 3.1.....	26
- 3.1.6: Abbildung 3.2.....	26
- 4.1.2.2: Abbildung 4.1.....	29
- 4.1.4: Abbildung 4.2.....	32
- 4.2.1.3: Abbildung 4.3.....	36
- 4.2.3: Abbildung 4.4.....	38
- 4.2.4: Abbildung 4.5.....	39
- 4.2.4: Abbildung 4.6.....	40
- 4.3.5: Abbildung 4.7.....	48

Tabellenverzeichnis

1.4: Tabelle 1.1.....	8
1.4.3: Tabelle 1.2.....	10
1.4.5.3: Tabelle 1.3.....	15
2.6: Tabelle 2.1.....	23
3.5: Tabelle 3.1.....	28
4.1.3: Tabelle 4.1.....	30
4.1.3: Tabelle 4.2.....	31
4.1.4: Tabelle 4.3.....	31
4.1.5: Tabelle 4.4.....	32
4.2.1.1: Tabelle 4.5.....	33
4.2.1.1: Tabelle 4.6.....	34
4.2.1.2: Tabelle 4.7.....	34
4.2.1.2: Tabelle 4.8.....	34
4.2.1.3: Tabelle 4.9.....	35
4.2.1.3: Tabelle 4.10.....	35

4.2.2: Tabelle 4.11.....	36
4.2.2: Tabelle 4.12.....	36
4.2.3: Tabelle 4.13.....	37
4.2.3: Tabelle 4.14.....	37
4.2.4: Tabelle 4.15.....	40
4.3: Tabelle 4.16.....	42
4.3.1: Tabelle 4.17.....	43
4.3.1.1: Tabelle 4.18.....	44
4.3.4: Tabelle 4.19.....	45
4.3.4.1: Tabelle 4.20.....	46
4.3.4.1: Tabelle 4.21.....	46
4.3.4.1: Tabelle 4.22.....	47
4.3.4.1.2: Tabelle 4.23.....	47

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Julia Katharina Aust
Geburtsdaten: 30.10.1981 in Bremen

Ausbildung und beruflicher Werdegang

1988 - 1992 Grundschole Bingen am Rhein
1992 - 2001 Stefan-George-Gymnasium, Bingen am Rhein
2001 – 2008 Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians Universität, München
Herbst 2008 Examen
März 2009 Approbation als Ärztin

Seit Mai 2009 Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Medizindidaktik und
Lehrassistenz, MeCuM Modul 5, Dr. von Haunersches Kinderspital
München

Wissenschaft

Promotionsthema Einfluss von Polymorphismen der Methylentetrahydrofolat Reduktase
sowie des Multi-Drug-Resistance Proteins auf die Therapie der
Rheumatoiden Arthritis mit Methotrexat.

Publikationen M. Heldwein, P. Zill, H. Plischke, J. Aust, R. Gruber
Association of the C28017T Polymorphism of the PADI4 Gene and
the Susceptibility to Rheumatoid Arthritis in a Caucasian Population.
Ann Rheum Dis, Jun 2005; 64: 377. Abstractband EULAR 2005,
EULAR 2005 Posterpräsentation
H. Plischke, J. Aust, S. Kabisch, H. Menninger, R. Gruber
MDR-1 C3435T Polymorphism dependent pharmacokinetics of
methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. Z Rheumatologie,
2005; 64, Suppl. 1, I/62, PD6-18