

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie
(Direktor: Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**ASSOZIATION GENETISCHER VARIANTEN VON ABC-
MEMBRANTRANSPORTERN SOWIE CYTOCHROM P4502C9
ZUR PHARMAKOTHERAPIERESISTENZ DER EPILEPSIE**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
THIES-HEINRICH JACOBSEN
aus Preetz

Kiel 2012

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Cascorbi

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Stephani

Tag der mündlichen Prüfung: 13.11.2012

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

gez.

Inhalt

1.	Einführung	3
1.1	Hintergrund der Studie	3
1.2	Ätiologie und Symptomatik der Epilepsie	5
1.3	Pathophysiologie	6
1.4	Therapie der Epilepsie	6
1.5	Unerwünschte Wirkungen der Epilepsie	9
1.6	Die Blut-Hirn-Schranke	10
1.7	Die ABC-Transporter-Familie	12
1.7.1	ABCB1 (P-Glykoprotein)	12
1.7.2	ABCC2 (MRP2)	14
1.8	Cytochrom P4502C9	14
2.	Zielstellung der Arbeit	16
3.	Material und Methoden	17
3.1	Patientenkollektiv	17
3.2	Genotypisierung	18
3.2.1	ABCB1-Genotypisierung	19
3.2.2	ABCC2-Genotypisierung	20
3.2.3	CYP2C9-Genotypisierung	20
4.	Statistische Analyse	23
5.	Ergebnisse	24
5.1	ABCB1	24
5.2	ABCC2	27
5.3	CYP2C9	31
6.	Diskussion	33
6.1	ABCB1	34
6.2	ABCC2	37
6.3	CYP2C9	41
7.	Zusammenfassung	44

Literatur

Erklärung

Danksagung

Lebenslauf

1. Einführung

1.1 Hintergrund der Studie

Epilepsien zählen zu den häufigsten chronischen Erkrankungen des zentralen Nervensystems. Die Prävalenz in der Bevölkerung liegt bei 1-2% (Browne and Holmes 2001). Der Begriff der Epilepsie umfasst eine Vielzahl von Krankheitsbildern, die hinsichtlich ihrer Art und Schwere sehr unterschiedlich ausgeprägt sein können. Allen Formen gemein ist das Auftreten von spontanen und sich wiederholenden epileptischen Anfällen (Fisher et al. 2005).

Das Mittel der Wahl bei Patienten mit Epilepsie ist die Pharmakotherapie. Obwohl eine Vielzahl von Medikamenten mit sehr unterschiedlichen Wirkstoffen und -mechanismen verfügbar ist, responieren nur etwa 47% auf das erste gewählte Antikonvulsivum, während etwa ein Drittel der Erkrankten pharmakotherapie-resistent bleibt (Kwan and Brodie 2000).

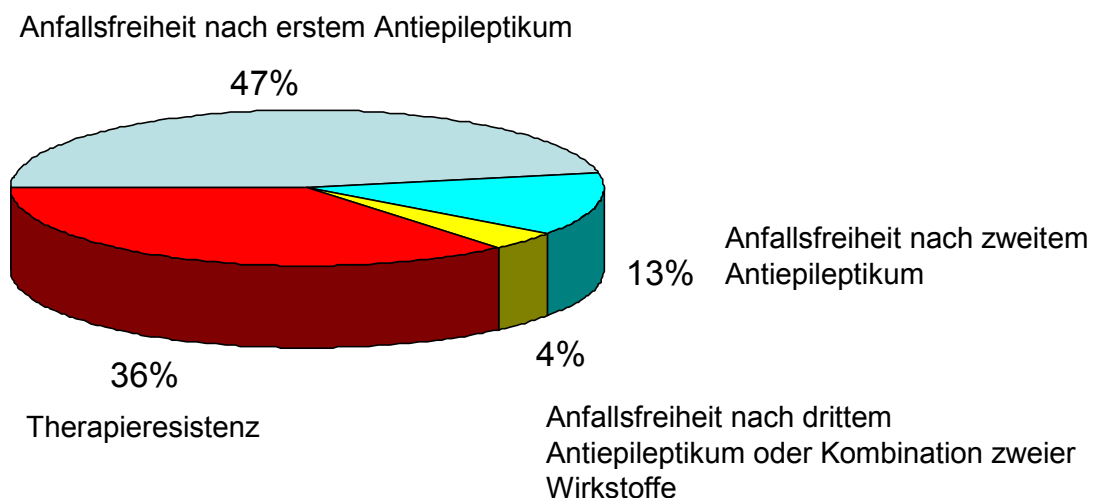


Abb. 1: Erfolgsrate der Epilepsiebehandlung mit Antikonvulsiva (Kwan und Brodie, 2000).

Auch der Einsatz mehrerer Wirkstoffe in unterschiedlichen Kombinationen führt in diesen Fällen nicht zu einem Erfolg. Die genauen Ursachen und Vorgänge, die zu dieser Pharmakoresistenz führen, sind weitgehend unbekannt. Ein Erklärungsversuch besteht in der Annahme, dass Antikonvulsiva nicht in ausreichendem Maße am Ort ihres Wirkens vorhanden sind, bedingt durch einen

erhöhten Ausstrom aus der Zelle zurück in die Blutgefäße. Insbesondere wird vermutet, dass der Effluxtransporter der ATP-Binding-Cassette-Transporterfamilie (ABC) P-Glykoprotein (P-gp), welcher durch das ABCB1-(MDR1)-Gen kodiert wird, sowie andere Transportproteine einen verstärkten aktiven Auswärtstransport von Antikonvulsiva an der Blut-Hirn-Schranke bedingen, und somit nicht ausreichende Wirkspiegel der Medikamente im Zentral-Nerven-System (ZNS), insbesondere im Bereich der epileptogenen Gehirnbereiche, bedingen (Potschka and Loscher 2001; Abbott et al. 2002; Potschka et al. 2002; Vogelgesang et al. 2004). Besonders die Beobachtung, dass Transportproteine der ABC-Familie in epilepsiegeschädigten Hirnarealen in erhöhtem Maße exprimiert sein können, festigt diese Vermutung (Dombrowski et al. 2001; Volk and Loscher 2005; Kubota et al. 2006). Als Ursachen dieser Überexpression werden u.a. Krämpfe (Volk et al. 2004), Induktion durch Antikonvulsiva (Giessmann et al. 2004), genetische Faktoren (Siddiqui et al. 2003; Zimprich et al. 2004) und gutartige Tumoren (Vogelgesang et al. 2004) vermutet.

Neben der Bioverfügbarkeit im Zentralnervensystem wird auch die systemische Verfügbarkeit von der Expression von Transportern im Intestinum und in der Niere beeinflusst. Darüber hinaus ist die intestinale, aber vor allem hepatische Elimination von Arznei- und Fremdstoffen durch Phase-I und Phase-II-Enzyme entscheidend. Besonders Enzymen der Cytochrom P450-Familie kommt eine wichtige Rolle zu. Hauptaufgabe dieser Enzyme ist die Oxydierung von Fremdstoffen, die eine erhöhte Hydrophilie bzw. Aktivierung für weitere Konjugationsreaktionen bedingen und eine erleichterte Ausscheidung über die Nieren erlauben. Einige Cytochrom P450-Enzyme weisen genetische Polymorphismen auf, die mit keiner oder einer verminderten Aktivität einhergehen. Darüber hinaus unterliegen Cytochrom P450-Enzyme Arzneimittelinteraktionen, die zu einer Inhibierung der Ausscheidung, aber auch durch Induktion zur Beschleunigung der Ausscheidung beitragen können. Antikonvulsiva können somit eine eingeschränkte Wirksamkeit aufgrund einer Überexpression von Auswärtstransportern wie P-Glykoprotein, aber auch durch beschleunigte Ausscheidung erfahren, andererseits kann eine verminderte Ausscheidung mit einem erhöhten Risiko unerwünschter Wirkungen einhergehen. Beide Phänomene können genetische und epigenetische Ursachen haben.

1.2 Ätiologie und Symptomatik der Epilepsie

Unter Epilepsie versteht man eine anfallsartig auftretende, spontan rezidivierende Störung der Hirnfunktion, in deren Verlauf es zu sehr unterschiedlichen motorischen, psychischen und vegetativen Erscheinungen kommen kann. Die Dauer der Anfälle reicht von einigen Sekunden bis zu mehreren Minuten, im Extremfall, dem Status epilepticus, sogar bis zu einer halben Stunde und mehr. Erst wenn auf einen einzelnen Anfall weitere folgen, ohne dass eine erkennbare Ursache vorliegt, spricht man von einer Epilepsie. Die Ursache für die gesteigerte Anfallsbereitschaft des Gehirns liegt in einer erhöhten Erregbarkeit der Gehirnzellen. Die Verbreitung dieses Krankheitsbildes liegt bei 1-2% weltweit und stellt somit nach dem Kopfschmerz die zweithäufigste chronische neurologische Erkrankung dar (Browne und Holmes 2001).

Eine allgemein gültige Erklärung für die Entstehung aller epileptischen Anfallsarten ist zum heutigen Zeitpunkt noch nicht verfügbar. Vielmehr spielen eine Reihe von Faktoren eine Rolle, die sowohl symptomatischer Natur, als auch genetisch bedingt sein können. Grundlegend unterscheidet man idiopathische, symptomatische und kryptogene Epilepsie. Bei der idiopathischen Epilepsie liegt dem Leiden eine nachgewiesene oder zumindest angenommene genetische Disposition zu Grunde, während bei der symptomatischen Epilepsie eine auslösende zerebrale Grunderkrankung vorliegt. Bei diesen Erkrankungen kann es sich um Traumata, Infektionen, Intoxikationen, oder Stoffwechselkrankheiten handeln. Die klassischen Befunde einer symptomatischen Epilepsie umfassen Hirnschäden, raumfordernde Prozesse oder degenerative Prozesse im Gehirn. In Fällen, in denen weder eine genetische Ursache, noch eine pathologische Veränderung im Gehirn festgestellt werden kann, spricht man von kryptogener Epilepsie. Es wird jedoch angenommen, dass bei dieser Form der endgültige Beweis einer Läsion mit aktuellen bildgebenden Verfahrenstechniken noch nicht erbracht werden kann, ihr Vorliegen aber sehr wahrscheinlich ist.

Bei der Beschreibung der Symptome wird unterschieden, ob die Anfälle fokalen Ursprungs sind, also von einem bestimmten Areal des Gehirns ausgehen, oder generalisiert auftreten. Der einfach fokale Anfall geht einher mit Muskelzuckungen, visuellen Erscheinungen oder Höreindrücken, je nach dem welches Areal im Gehirn

den Ausgangsort bildet. Dem Anfall geht häufig eine Aura voraus. Beim komplex fokalen Anfall verliert der Patient zusätzlich sein Bewusstsein. Wenn sich die Erregung der Nervenzellen vom Ursprungsort auf Nachbarregionen ausdehnt, kann es zum sekundär generalisierten Grand-Mal Anfall kommen.

Demgegenüber spricht man beim Fehlen eines Fokus von einem idiopathischen generalisierten Anfall. Die auftretenden Symptome betreffen hierbei den ganzen Körper.

Tab. 1: Spektrum der Symptome bei verschiedenen Arten der Epilepsie

Symptome	Erläuterung
Absencen	sekundenlange Bewusstseinsstörung, charakterisiert durch leeren Blick, begleitet von Muskelkontraktionen
Myoklonische Anfälle	spontane, bilaterale armbetonte Schüttelkrämpfe
Atonische Anfälle	spontane, kurzzeitige Erschlaffung der Rumpfmuskulatur mit Sturz und Bewusstseinsstörung
Tonische Anfälle	spontane Anspannung der Extremitäten, Einnehmen einer Haltungsschablone, nur partielle Amnesie

1.3 Pathophysiologie

Eine Epilepsie fokalen Ursprungs ist mit einer epileptogenen Läsion assoziiert, die als eine Art Schrittmacherzone fungiert. Der hier entstandene Anfall breitet sich über synaptisch verbundene Bereiche im Gehirn aus, wobei der Zustand der neuronalen Erregbarkeit einen entscheidenden Einfluss hat. Die Neurone weisen eine unphysiologische Instabilität des Membranpotentials auf und neigen daher zu Spontanentladungen, die über das normale Maß hinausgehen (Jeub et al. 2002). Als Ursache gelten Störungen von Membranstrukturen, Störungen des Ionenhaushaltes, Ungleichgewichte exzitatorischer Neurotransmitter sowie Mangel an inhibitorischen Regulationsmechanismen (Avanzini and Franceschetti 2003).

1.4 Therapie der Epilepsie

Die Pharmakotherapie mit Antiepileptika (Antikonvulsiva) gilt heute als der erste und bedeutendste Schritt bei der Behandlung der Epilepsie. Die Entscheidung zur

Medikation fällt häufig nach Auftreten des zweiten epileptischen Anfalls, da in diesem Fall die Diagnose einer manifesten Epilepsie sehr wahrscheinlich ist. Zu Beginn wird eine Monotherapie durchgeführt, wobei der Wirkstoff des Medikamentes abhängig ist von der Art der Epilepsie.

Tab. 2: Übersicht der einsetzbaren Medikamente zur Behandlung von fokalen und idiopathisch generalisierten Epilepsien (AWMF-Leitlinien-Register Nr. 030/041)

Therapie	derzeit gebräuchliche Antiepileptika
fokale Epilepsien	Lamotrigin, Levetiracetam, Carbamazepin, Valproat, Gabapentin, Topiramat, Oxcarbazepin
idiopathische generalisierte Epilepsien	Valproat (Grand-Mal), Ethosuximid (Absencen), Lamotrigin, Topiramat; als Reserve bei Pharmakoresistenz: Phenobarbital, Levetiracetam

Bringt das Medikament nicht die gewünschte Anfallsfreiheit, so wird die Therapie um ein zweites Präparat der ersten Wahl ergänzt. Liefert diese vorübergehende Kombinationstherapie gute Resultate, so wird sie beibehalten. Andernfalls wird das erste Antikonvulsivum abgesetzt. Das Ziel der medikamentösen Therapie besteht im Erreichen einer Anfallsfreiheit, oder zumindest in einer Senkung der Anfallsfrequenz auf ein für den Patienten erträgliches Maß. Dieses Ziel kann in 60-80% der Fälle erreicht werden, abhängig von der Art der Epilepsie. Ein Teil der Patienten bleibt jedoch therapieresistent, oder aber die notwendige Arzneimitteldosis ist so hoch, dass es zu unerwünschten und nicht tolerierbaren Wirkungen kommt, wie zum Beispiel Leber- und Niereninsuffizienz oder Einschränkung der Sehfähigkeit (bei Gabe von Vigabatrin) (Wild et al. 2009). Bei fokalen Epilepsien besteht bei Ausbleiben eines medikamentösen Behandlungserfolgs die Möglichkeit der chirurgischen Intervention, wenn die auslösende Läsion klar umschrieben ist und somit ohne großes Risiko entfernt werden kann. Bei idiopathischen Epilepsien ist die Eingrenzung des Entstehungsortes oftmals schwierig oder gar nicht möglich. Sollte nach prächirurgischer Evaluation mittels Anfallsbeobachtung, EEG, MRT, CT und funktionell bildgebender Verfahren (z.B. Aktivierungs-PET) dennoch ein auslösender

Lokus gefunden werden, so ist auch hier eine chirurgische Therapie möglich, sofern kein weiteres neurologisches Defizit zu erwarten ist.

Zur Behandlung der Epilepsie stehen verschiedenste Präparate zur Verfügung. Die Anforderungen an diese Antikonvulsiva sind umfangreich und häufig nicht alle gleichzeitig erreichbar. So muss vorrangig die Krampfbereitschaft des Gehirns unterdrückt oder zumindest herabgesetzt werden. Die übrige Motorik darf im Gegensatz jedoch nicht behindert werden, zudem sollten keine betäubenden oder einschläfernden Effekte eintreten. Da diese Medikamente häufig über Jahre vom Patienten eingenommen werden müssen, sind schwerwiegende Nebenwirkungen möglichst zu vermeiden. Da die Patienten in Hinblick auf Gewicht, Alter und Stoffwechselbedingung sehr unterschiedlich sind, müssen die Medikamentenwirkspiegel individuell eingestellt werden, so dass nach und nach ein Effekt eintritt, ohne dass die Nebenwirkungen einen Abbruch der Behandlung nötig machen. Es gilt daher, die höchstmögliche, krampfunterdrückende Dosis zu finden, bei der unerwünschte Wirkungen ausbleiben oder sich in einem tolerablen Rahmen befinden. Die Wirkweise der dafür zur Verfügung stehenden Medikamente umfasst im Wesentlichen die folgenden pharmakologischen Mechanismen:

- Hemmung schneller repetitiver Entladungen am spannungsabhängigen Natriumkanal. Die Umwandlung des inaktiven Zustandes des Natriumkanals in den aktiven wird verlangsamt. Phenytoin und Carbamazepin wirken weitgehend über diesen Weg. Phenytoin verhindert den Rückgang des Kanals in den Ruhezustand, so dass kein neues Aktionspotential ausgelöst werden kann. Diese Fähigkeit ist besonders bei hochfrequenter Depolarisation zu beobachten.
- Verstärkung der GABA-vermittelten Effekte. GABA bindet an den GABA A-Rezeptor, der die Öffnung eines Chloridkanals steuert und einen hemmenden Einfluss hat. Barbiturate, wie Phenobarbital, erhöhen die Affinität des Rezeptors für GABA, so dass sich die Öffnungsdauer des Chloridionenkanals stark verlängert. Benzodiazepine binden an einen eigenen Rezeptor des GABA-gesteuerten Chloridkanals, der sich von der Barbiturat-Bindungsstelle unterscheidet. Die Bindung resultiert in einer Erhöhung der Öffnungsfrequenz der Kanäle.

- Hemmung des exzitatorischen Transmitters Glutamat an verschiedenen Glutamatrezeptoren.
- Hemmung von Thalamus-Calcium-Strömen. Dieser besonders von Ethosuximid ausgelöste Effekt sorgt für eine Blockade von Calcium-Kanälen und hemmt so den Ca^{2+} -Einstrom in thalamischen Neuronen.
- Hemmung des Enzyms Carboanhydrase. Die Carboanhydrase katalysiert das Gleichgewicht von Kohlensäure und CH_3COO^- sowie H^+ . Wird die Carboanhydrase nun durch Medikamente wie Sultiam gehemmt, kommt es zu einer Ansäuerung des Gehirngewebes. Diese Ansäuerung, so wird vermutet, erhöht die Krampfschwelle.

In der folgenden Tabelle sind die gebräuchlichsten Medikamente und ihre Wirkmechanismen dargestellt. Medikamente können durchaus auf verschiedenen Wegen wirken.

Tab. 3: Angriffsort und Wirkungsweise gebräuchlicher Antikonvulsiva

Natriumkanal	GABA-Erhöhung	Glutamat-Hemmung	Ca-Kanal-blockade	Carboanhydrasehemmung
Benzodiazepin	Benzodiazepin	Felbamat	Ethosuximid	Acetazolamid
Carbamazepin	Phenobarbital	Topiramat	Gabapentin	Sultiam
Lamotrigin	Tiagabin		Pregabalin	Topiramat
Oxcarbazepin	Topiramat			
Phenobarbital	Valproat			
Phenytoin	Vigabatrin			
Topiramat				
Valproat				

1.5 Unerwünschte Wirkungen von Antikonvulsiva

Antikonvulsiva weisen häufig, neben ihrer gewünschten Funktion, ein hohes Potential an Nebenwirkungen auf. Da diese Medikamente in neuronale Abläufe im Gehirn eingreifen, ist es oft nicht zu vermeiden, dass unerwünschte motorische oder vegetative Erscheinungen auftreten. Diese Nebenwirkungen können so stark sein, dass der Wirkstoff gewechselt oder abgesetzt oder die medikamentöse Therapie überdacht werden muss. So lagen nach einer Studie von Bootsma et al. die

Abbruchraten für Topiramate bei 35,9%, von Lamotrigin bei 15,5% und von Levetiracetam bei 22,5% (2009). Arif et al. zeigten in ihrer Studie Abbruchraten bei Topiramate von 21,5%, womit auch in diesem Patientenkollektiv Topiramate die höchste Wahrscheinlichkeit für eine Unverträglichkeit aufwies. Für Valproat lag die Abbruchrate bei 8,3% (Arif et al. 2009). Bei dem Großteil der Patienten sind die Nebenwirkungen nur gering ausgeprägt, jedoch kann das Ergebnis ebenfalls als unbefriedigend empfunden werden. Die Beeinträchtigungen können sowohl physischer als auch psychischer Natur sein und sind abhängig von der Art des Medikaments. Häufig auftauchende Probleme sind Kopfschmerzen, allergische Reaktionen, Müdigkeit, Schwindel, Akne, depressive Verstimmungen und Bewegungsstörungen. Es können jedoch auch schwerwiegendere Nebenwirkungen auftreten, die den Patienten zusätzlich zu seiner Grunderkrankung stark belasten. So treten bei 30-40% der Patienten, die mit Vigabatrin behandelt werden, konzentrische Gesichtsfeldeinschränkungen auf, die nach Absetzen des Medikaments nicht reversibel sind (Jensen et al. 2002; Wild et al. 2009). Valproinsäure, das Mittel der Wahl bei idiopathisch generalisierter Epilepsie, führt in seltenen Fällen zu einem Leberzerfall mit letalem Ausgang (Koenig et al. 2006). Der in früherer Zeit häufig eingesetzte Stoff Phenobarbital gehört der Gruppe der Barbiturate an, er wirkt daher stark sedierend. Es besteht die Gefahr der Atemdepression. Zudem kann es nach dem Absetzen zu einem verstärkten epileptischen Anfall oder zu Entzugserscheinungen kommen.

Die Fülle der unerwünschten Wirkungen lässt den Wunsch nach einer individuellen und damit möglichst schonenden Pharmakotherapie verständlich erscheinen.

1.6 Die Blut-Hirn-Schranke

Bei der medikamentösen Behandlung der Epilepsie steht dem Erfolg in vielen Fällen eine anatomische Besonderheit im Weg: die Blut-Hirn-Schranke (BHS). Sie dient als Schutz des Gehirns vor toxischen Substanzen und stellt für eine Vielzahl von Wirkstoffen eine primär nicht permeable Barriere dar. Erst die Anwesenheit von speziellen Transportproteinen in dieser Barriere ermöglicht einen selektiven Einstrom in das cerebrale Gewebe.

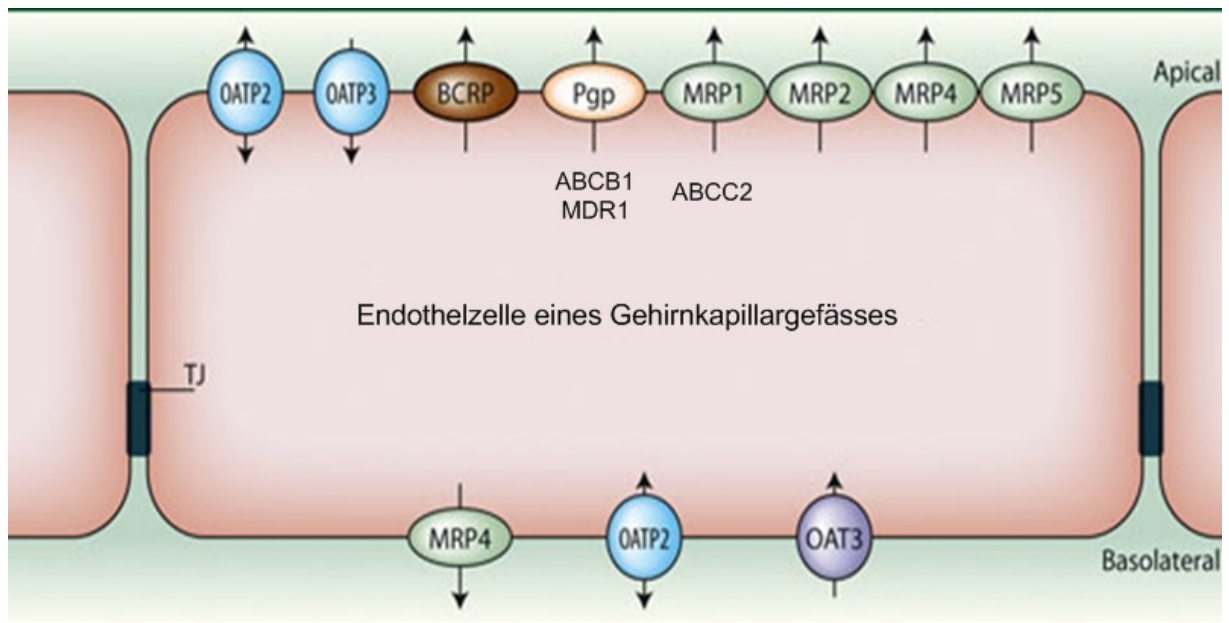


Abb. 2: Schema einer Kapillarendothelzelle: Die verschiedenen Transportproteine sind ihrer Lokalisation entsprechend eingezeichnet (TJ= tight junctions)
 (aus Löscher and Potschka, Nat Rev Neurosci 2005;6:591-602)

Die durch das Gewebe des Zentralnervensystems führenden Blutgefäße bilden mit ihren Endothelzellen die Blut-Hirn-Schranke. Diese Zellen sind durch besonders dichte tight junction miteinander verbunden, so dass ein Transport nur über die basale und apikale Membran erfolgen kann. Eine durchgehende Basalmembran und Perizyten verstärken den Effekt noch, wohingegen die die Kapillaren bedeckenden Astrozyten keinen wesentlichen Einfluss auf die Permeabilität haben.

Lipophile Stoffe diffundieren frei durch die BHS ins cerebrale Gewebe. Dadurch können O₂, CO₂ und Anästhetika ins Gehirn gelangen. Für hydrophile Stoffe und Elektrolyte ist die Barriere nicht passierbar, diese benötigen einen aktiven Transportmechanismus (Abbott et al. 2002). So sind in die BHS neben carriervermittelter Transportmechanismen auch energieabhängige, rezeptorvermittelte Transporter integriert. Diese transportieren, je nach Lokalisation, Stoffwechselprodukte ins Hirnparenchym oder zurück ins Lumen der Blutkapillaren. Die bekanntesten Vertreter dieser Transporter gehören zur Familie der ABC-Transporter, die im Folgenden genauer beschrieben wird.

Tab. 4: Übersicht der Medikamente, die als Substrat der Transportproteine ABCB1 und ABCC2 fungieren

Medikament	ABCB1	ABCC2
Carbamazepin	+?	+?
Phenytoin	+	+
Phenobarbital	+	-
Valproat	?	+
Topiramamat	+	?
Felbamat	+	-
Gabapentin	+	?
Lamotrigin	+	-

1.7 Die ABC-Transporter Familie

Zur Superfamilie der ABC (ATP-Bindung-Cassette)-Transporter gehört eine Reihe von Membranproteinen, die unter Verbrauch von Adenosin-Triphosphat verschiedenste Stoffwechselprodukte gegen einen Gradienten in oder aus pro- und eukaryontischen Zellen heraus befördern.

1.7.1 ABCB1 (P-Glykoprotein)

Das P-Glykoprotein wurde bereits 1976 von Juliano und Ling beschrieben. Bei der Untersuchung von mutierten Ovarialzellen bei Hamstern fiel ihnen eine Resistenz gegen Colchicin auf. Sie schrieben diese Resistenz einem Oberflächenglykoprotein zu und gaben ihm den Namen P-Glykoprotein, wobei das P für „permeability“ stand (Juliano and Ling 1976). Dieses Protein wurde in den folgenden Jahren nicht nur bei Tieren, sondern auch in menschlichen Zellen nachgewiesen (Thiebaut et al. 1987). So konnten Thiebaut et al. ein Vorkommen in biliären Kanalmembranen der Leber, in den Nieren, in Hodengewebe und im Intestinum zeigen. Von besonderer Bedeutung war die Entdeckung, dass P-gp in den Membranen der Kapillaren der Blut-Hirnschranke zu finden ist (Cordon-Cardo et al. 1989; Thiebaut et al. 1989).

Das humane P-gp ist ein 170 kDa großes Transmembranprotein, aufgebaut aus insgesamt 1280 Aminosäuren. Das Molekül ist symmetrisch aufgebaut. Die grobe Struktur besteht aus zwei hydrophoben Teilen, jedes davon gebildet von sechs transmembranären Domänen (TMD) mit insgesamt 610 Aminosäuren, jeweils gefolgt von einer hydrophilen nukleotidbindenden Region. Diese Region stellt den Anlagerungsort für ATP dar, das die Energie für den Transport liefert. Verbunden werden die beiden Hälften durch eine sechzig Aminosäuren starke „linker region“. Die zwölf TMD sind in einer röhrenartigen Form angeordnet (Loo and Clarke 2001) und in die apikale Membran integriert (Loo et al. 2004). Die Erforschung des genauen Aufbaus des Proteins ist in den vergangenen zehn Jahren stark vorangeschritten (Loo et al. 2004; Pleban et al. 2005), jedoch noch nicht abgeschlossen, so dass sich die Herstellung effektiver Inhibitoren weiterhin als schwierig erweist (Srinivas et al. 2006).

Das P-gp hat ein breites Spektrum von Substraten, das sich durch eine Vielfalt molekularer Strukturen auszeichnet. So transportiert das Protein Zytostatika, HIV-Proteaseinhibitoren, Steroidhormone, immunsuppressive Substanzen, Calcium-Kanal-Blocker, Dopamin-Antagonisten und Peptide.

Der genaue Funktionsmechanismus des P-Glykoproteins ist derzeit noch nicht geklärt. Es gibt drei Modelle, die dem aktuellen Forschungsstand am ehesten entsprechen: das Porenmodell, das Modell des „hydrophoben Staubsaugers“ („Hydrophobic vacuum cleaner“, HVC) und das Flippasemodell.

Beim Porenmodell geht man davon aus, dass ein Stoff aus dem Zytosol durch den röhrenförmigen Bereich des P-Glykoproteins in den Extrazellulärraum gepumpt wird. Bei der Version des „HVC“-Modells werden Substrate, nachdem sie in die Phospholipiddoppelschicht der Zellmembran gelangt sind, entlang derselben in Richtung des ABCB1-Kanals geleitet und von dort aus der Zelle transportiert. Das Substrat verlässt die Zelle, ohne das Zytosol erreicht zu haben. Diese Betrachtungsweise gilt zurzeit als die wahrscheinlichste.

Bei einer Flippase lagert sich das Substrat der inneren Membran an. Die Transporterpore wird durch eine Konformationsänderung nach Phosphorylierung zur äußeren Membran hin umgeklappt, wodurch das Substrat in den Extrazellulärraum gelangen kann.

Das ABCB1-Gen, durch welches P-gp codiert wird, weist eine Vielzahl von Varianten auf, von denen die ersten bereits 1994 beschrieben und gleichzeitig in den Zusammenhang mit Arzneimittelresistenz gebracht wurden (de Morais et al. 1994). In den Mittelpunkt des Interesses rückten dabei die SNPs 3435C>T und 2677G>T/A. 3435C>T korrelierte signifikant mit der intestinalen P-gp-Expression (Hoffmeyer et al. 2000). Studien ließen einen Zusammenhang erkennen zwischen Individuen, die homozygote Träger des C-Allels waren und ihrer erniedrigten Bioverfügbarkeit bezüglich bestimmter Medikamente (Hitzl et al. 2001).

1.7.2 ABCC2 (MRP2)

Neben P-Glykoprotein ist MRP2 (nach der neueren Nomenklatur ABCC2, früher multi-specific organic anion transporter MOAT genannt) von besonderer Bedeutung. ABCC2 ist wie P-gp in der apikalen Zellmembran von Sekretionsorganen wie der Leber, dem Darm, der Niere, der Blut-Hirn-Schranke und der Plazenta exprimiert und transportiert konjugierte endogene Stoffe wie z.B. Bilirubinglukuronid oder Arzneimittelkonjugate nach außen. Manche Arzneimittel werden auch direkt, ohne Konjugation, als Substrat erkannt. Ein typisches Krankheitssyndrom, das auf genetische Defekte des MRP2-Gens zurückzuführen ist, ist das Dubin-Johnson-Syndrom. Hier erscheint die Leber braun-schwarz verfärbt, die Patienten leiden unter einem Ikterus mit milder intermittierender Hyperbilirubinämie.

ABCC2 erleichtert den Transport einer Reihe von Zytostatika wie Cisplatin, Vinblastin, und Camptothecin-Derivate. ABCC2 ist wie P-gp über den Pregnan-X-Rezeptor induzierbar.

1.8 Cytochrom P450 2C9

Cytochrom P450 2C9 gehört zu einem geschlossenen Gencluster auf Chromosom 10 zusammen mit CYP2C8, 2C18 und 2C19. Ein Funktionsverlust des Enzyms CYP2C9 ist in einem Großteil der Fälle die Folge zweier Punktmutationen, die zu den Aminosäuretauschen Arg144Cys (CYP2C9*2) und Ile359Leu (CYP2C9*3) führen. Die Allelfrequenz in der deutschen Bevölkerung liegt bei etwa 11% bzw. 7%. Homozygote Träger, die phenotypisch zu den schlecht metabolisierenden Individuen gehören, haben eine Häufigkeit von 3,2%. In asiatischen Populationen wurde

weiterhin ein alternativer Ile359Thr Aminosäuretausch gefunden und als CYP2C9*4 bezeichnet. Bei Afro-Amerikanern ist darüber hinaus ein Polymorphismus im Exon 7 (2C9*5; Asp360Glu) bekannt, sowie ein Premature Stop Codon, welches aufgrund eines Deletionspolymorphismus 818delA keine Aktivität zeigt (2C9*6). Zum jetzigen Zeitpunkt sind beim Human Cytochrome (CYP) Allele Nomenclature Committee zwölf verschiedene Allele bekannt.

Neben Warfarin (in geringerem Maße Phenprocumon) werden von CYP2C9 viele nicht-steroidale Antiphlogistika wie Ibuprofen, Diclofenac und Meloxicam, orale Antidiabetika wie Tolbutamid und Glimenclamid, die Angiotensinrezeptor-antagonisten Irbesartan und Losartan sowie andere Medikamente wie Phenytoin metabolisiert.

Cytochrom P450 ist als Hämprotein an der Oxidierung von xenogenen und endogenen Substanzen beteiligt und somit einerseits für die Synthese von z.B. Hormonen verantwortlich, andererseits erleichtert die Hydroxylierung die Ausscheidung hydrophober Stoffwechselprodukte. Die Allele CYP2C9*2 und CYP2C9*3 weisen eine verminderte enzymatische Aktivität auf. Als Folge davon werden Stoffwechselprodukte in geringerem Maße aus dem Körper entfernt, wodurch das Risiko von unerwünschten Arzneimittelreaktionen steigt.

2. Zielstellung der Arbeit

Vor dem Hintergrund, dass einerseits eine Änderung der Aktivität von Effluxtransportern an der Blut-Hirn-Schranke und andererseits von metabolisierenden Enzymen der Leber die intrazerebrale Bioverfügbarkeit von Antikonvulsiva verändern und somit die Therapieresponse beeinflussen könnte, sollte die Hypothese überprüft werden, ob genetische Varianten der Transportproteine ABCB1 und ABCC2 oder des Cytochroms CYP2C9 mit der Pharmakotherapie-Resistenz assoziiert sind.

Hierzu sollten im Fall-Kontroll-Design 221 pädiatrische Epilepsie-Patienten in die Studie eingeschlossen werden, die retrospektiv in responsiv bzw. nicht-responsiv anhand anamnestischer Daten zur Auswahl der Medikation eingeteilt wurden. Die DNA dieser Patienten wurden auf die genetischen Polymorphismen 2677G>T/A und 3435C>T in ABCB1, -24C>T und 1249G>A in ABCC2 sowie 430 C>T und 1075A>C in CYP2C9 in DNA-Proben von 221 Patienten untersucht.

3. Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

In die Studie wurden Patienten der Klinik für Neuropädiatrie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel (Direktor Prof. Dr. med. U. Stephani) und dem Norddeutschen Epilepsiezentrum für Kinder und Jugendliche in Raisdorf, Schleswig-Holstein (Leitung Priv.-Doz. Dr. med. Rainer Boor) eingeschlossen. Eine Anzahl von 221 jugendlichen und erwachsenen Patienten (105 weiblich; durchschnittliches Alter: $14,5 \pm 6,54$ Jahre) mit einer gesicherten klinischen Diagnose einer generalisierten, einer partiellen, einer nicht klassifizierbaren Epilepsie oder eines Fieberkrampfes ging in die Studie ein. Geschlecht, Alter und Ethnizität jedes Patienten wurde dokumentiert und die Art des Anfalls von einem Facharzt für Pädiatrie festgestellt. Alle Patienten waren kaukasischer Herkunft. Die Patienten wurden in Gruppen nach nicht therapieresponsiv und therapieresponsiv eingeteilt. Dabei galten Patienten als nicht therapieresponsiv, die ein zweites Medikament aufgrund von ausbleibendem Effekt oder nicht akzeptabler Nebenwirkungen erhielten und wurden mit Patienten verglichen, die nur ein Medikament erhielten. Die Verteilung der Genotypen zwischen den beiden Gruppen wurde verglichen. Das gewählte Antikonvulsivum richtete sich nach dem zugrunde liegenden epileptischen Syndrom und entsprach den Richtlinien der Internationalen Liga gegen Epilepsie. Die individuelle Medikamentendosis richtete sich nach dem klinischen Ergebnis oder orientierte sich an gegebenenfalls ermittelten Plasmakonzentrationen. Die Anfälle wurden unterteilt in generalisiert, partiell, fiebrig und nicht klassifizierbar. Fieberkrämpfe wurden mit antiepileptischen Medikamenten behandelt, sofern es zu einem Status oder einer hohen Anfallsfrequenz kam. Ätiologisch fand eine Einteilung in symptomatisch, idiopathisch, fiebrig, kryptogen sowie nicht klassifizierbar statt. Die Einteilung stützte sich dabei auf den klinischen Verlauf, physische und neurologische Untersuchungen und bildgebende Verfahren wie Elektroenzephalographie, Computertomographie oder Magnetresonanztomographie.

Die Allelfrequenzen der Studiengruppe wurden mit einer unabhängigen zweiten Gruppe verglichen. Diese setzte sich zusammen aus 70 erwachsenen Patienten (35 weiblich ; durchschnittliches Alter: $41,9 \pm 11,5$ Jahre), die sich im Epilepsiezentrum der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums zu Greifswald aufgrund einer

medikamentös nicht zu therapierenden Epilepsie einem neurochirurgischen Eingriff unterziehen lassen mussten. Alle Patienten litten dabei an einer partiellen Epilepsie mit bekannter cerebraler Läsion. In den meisten Fällen war Carbamazepin das erste verabreichte Antikonvulsivum.

Zusätzlich wurden 242 gesunde Individuen (167 weiblich; durchschnittliches Alter: $27,0 \pm 6,77$ Jahre) aus der gleichen Region als Referenzgruppe für einen Vergleich der Genotypenverteilung hinzugezogen.

Die Patienten oder ihre gesetzlichen Vormünder erklärten sich schriftlich mit der Verwendung ihrer Daten einverstanden. Die Studie entspricht den Leitsätzen der Erklärung von Helsinki und wurde von der Kommission für Ethik der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel befürwortet.

3.2 Genotypisierung

Die DNA wurde aus venösen Blutproben mittels eines QIAamp DNA purification kit (Qiagen, Hilden, Germany) isoliert.

Die Polymorphismen in den Genen von ABCB1, ABCC2 und CYP2C9 wurden mittels Polymerasekettenreaktion und Restriktionsenzymverdau (PCR-RFLP) analysiert (Tab. 2). Jede Analyse erfolgte geblindet ohne Wissen um den Status des Patienten. Zufällig ausgewählte Proben wurden mittels DNA-Sequenzierung überprüft. Alle Proben lieferten ein übereinstimmendes Ergebnis mit denen des PCR-RFLP-Ergebnisses.

Die Durchführung eines Restriktionslängenpolymorphismus nach einer PCR-Amplifikation stellt eine kostengünstige Methode zur Identifizierung bekannter Polymorphismen dar. Dieser Methode liegt Folgendes zugrunde: Polymorphismen können dazu führen, dass an DNA-Strängen charakteristische Basensequenzen entstehen, die von Restriktionsenzymen erkannt werden und an dieser Stelle geschnitten werden. Im Vergleich zum DNA-Strang ohne Polymorphismus entstehen unterschiedlich lange Fragmente oder Fragmentmengen. Die Fragmente werden mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese separiert und können anhand des spezifischen Bandenmusters bestimmt werden.

3.2.1 ABCB1-Genotypisierung

Die Polymorphismen 3435C>T, 2677G>T und 2677G>A im ABCB1-Gen wurden nach bereits von Cascorbi beschriebenen Protokollen genotypisiert (Cascorbi et al. 2001).

Für Fragmente des Gens ABCB1, die den Polymorphismus in Exon 26 enthielten, wurde die PCR mit ABCB1 3435C>T forward und reverse Primern durchgeführt. ABCB1 2677G>A forward und reverse Primer wurden für die Amplifikation der ABCB1-Fragmente benutzt, die den SNP 2677G>A in Exon 21 enthielten. Für die Amplifikation der Fragmente, in denen der Polymorphismus 2677G>T vorkam, kam ein mismatch reverse Primer zur Anwendung, der beim Auftreten der Variante eine Ban I-Schnittstelle entfernt. Der ABCB1 2677G>T forward Primer war derselbe wie für 2677G>A.

Die DNA-Amplifikation wurde für jeden Ansatz unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Ansätze bestanden aus 200 nM des entsprechenden Primers (Tab. 6), 0,2 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂ und 0,5 Einheiten Taq-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) in einem Gesamtvolumen von 25 µl. Das PCR-Programm umfasste eine initiale Denaturierung bei 94°C für 2 Minuten, gefolgt von 35 Zyklen Denaturierung bei 94°C für 30 Sekunden, Anlagerung bei 60°C für 30 Sekunden und Elongation bei 72°C für 30 Sekunden. Die terminale Elongation fand bei 72°C für 7 Minuten statt. 12,5 µl des Amplifikationsproduktes ABCB1-3435C>T wurden über Nacht mit Hilfe des Enzyms Mbo I bei 37°C verdaut, so dass beim homozygoten CC-Wildtyp aus dem 197 Basenpaaren (bp) langen Fragment jeweils ein 158 bp und ein 39 bp langes Fragment entstanden. Das den 2677G>T-Polymorphismus enthaltende 224 bp lange PCR-Produkt wurde über Nacht mit dem Enzym Ban I bei 37°C inkubiert, so dass beim homozygoten GG-Wildtyp ein 198 bp und ein 26 bp langes Fragment entstanden. Das Amplifikat mit dem SNP ABCB1-2677G>A wurde über Nacht mit dem Enzym Bsr I bei 65°C verdaut. Beim Vorliegen der homozygoten AA-Variante entstanden dabei aus dem 220 bp langen Ausgangsprodukt 206 bp und 14 bp lange Fragmente. Die Fragmente, die nach dem Verdau mit den Enzymen Mbo I und Ban I entstanden, wurden mit einem 3%- bzw. 4%-igen Agarosegel aufgetrennt.

3.2.2 ABCC2-Genotypisierung

Es wurden die Polymorphismen -24CT in der 5'-untranslatierten Region und 1249G>A im Exon 10 des ABCC2-Gens untersucht.

Die PCR zur Identifizierung von -24C>T wurde mit 200 nM ABCC2 24C>T forward und reverse Primern (Tab. 5), 0,5 Einheiten Taq-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), 0,1 mM dNTPs, 1%-igem DMSO und 2,5 mM MgCl₂ in einem Gesamtvolumen von 25 µl durchgeführt. Im Thermocycler wurden folgende Einstellungen vorgenommen: Initiale Denaturierung bei 94°C für 2 Minuten, 35 Zyklen mit Denaturierung bei 94°C für 30 Sekunden, Anlagerung bei 55°C für 30 Sekunden und Elongation bei 72°C für 30 Sekunden. Die terminale Elongation fand bei 72°C für 7 Minuten statt. Das Produkt wurde über Nacht mit dem Enzym Bbs 1 verdaut, dabei entstanden 188 bp und 113 bp lange Fragmente beim homozygoten CC-Wildtyp. Die Fragmente wurden in einem 2%-igen Agarosegel aufgetrennt.

Die Herstellung eines PCR-Produktes für 1249G>A wurde erreicht mit 200 nM ABCC2-1249G>A forward (mismatch) und reverse Primern, 0,5 Einheiten Taq-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), 0,25 mM dNTPs und 2,5 mM MgCl₂ in einem Gesamtvolumen von 25 µl. Die Anlagerungstemperatur betrug in diesem Fall 60°C. Das PCR-Produkt wurde über Nacht mit dem Enzym Acl 1 verdaut bei 37°C, dabei entstanden 236 bp und 24 bp lange Fragmente in Anwesenheit des homozygoten GG-Wildtyp. Die Fragmente wurden in 3%-igem Agarosegel separiert.

3.2.3 CYP2C9-Genotypisierung

Für CYP2C9*2 (430C>T) und *3 (1075A>C) wurden die gleichen Ansätze hergestellt, lediglich die Primer unterscheiden sich (siehe Tabelle 5). Die 25µl-Ansätze enthielten je 2,5 µl MgCl₂ (50mM), 2,5 µl dNTP (2,5mM), 2,5 µl Puffer, jeweils 0,5µl forward und reverse primer(10µM), 0,1 µl Taq-Polymerase und 1,4 µl genomische DNA. Die Thermocyclersequenz bestand aus einem Hot Start (94°C für 5 min.), nachfolgend 35 Zyklen aus Denaturierung (94°C für 1 min.), Anlagerung (60°C für 1,5 min), Elongation (72°C für 0,5 min) und abschließender terminaler Elongation bei 72°C für 7 min. Der Verdau der PCR-Produktes fand über Nacht bei 37°C statt. Dazu wurden die Ansätze für CYP2C9*2 mit dem Enzym Ava II hergestellt, bei CYP2C9*3 diente Nsi I als Enzym. Für *2 waren bei Vorliegen des homozygoten Wildtyps zwei

Fragmente zu erwarten mit Basenpaarlängen von 527 und 164, bei *3 betragen die Längen 112 und 29 bp. Die Auftrennung erfolgte in einem 3%-igem Agarosegel.

*Tab. 5: Gene ABCB1, ABCC2, CYP2C9*2/*3: Primernamen, Primersequenzen, Restriktionsfragmentlängen zur Genotypisierung*

Gen	SNP	Primernamen	Primersequenz	Enzym	Fragment wt/mut
ABCB1	2677G>A	MDR-9	5'-TGCAGGCTATAGGTTCCAGG	Bsr I	220 206/ 14
		MDR-10	5'-GTTTGACTCACCTTCCCAG		
ABCB1	2677G>T	MDR-9	5'-TGCAGGCTATAGGTTCCAGG	Ban I	198/ 26 224
		MDR-10A	5'-TTTAGTTTGACTCACCTTCCCAGG		
ABCB1	3455C>T	MDR-11	5'-TGTTTTTCAGCTGCTTGATGG	Mbo I	158/ 39 197
		MDR-12	5'-AAGGACTGTATGTTGGCCTC		
ABCC2	-24C>T	MRP-2 Pro	5'-TAAATGGTTGGGATGAAAGG	Bsb I	188/113 301
		MRP2-ProR	5'-GCTTTAGACCAATTGCACATC		
ABCC2	-24C>T	MRP-2 Pro	5'-TAAATGGTTGGGATGAAAGG	Bsb I	188/113 301
		MRP2-ProR	5'-GCTTTAGACCAATTGCACATC		
CYP2C9*2	430C>T		5'-TACAAATACAATGAAAATATCATG	Ava II	527/164 691
			5'-CTAACAACCAGACTCATAATG		
CYP2C9*3	1075A>C		5'-AATAATAATATGCACGAGGTCCAGAGATGC	Nsi I	112/29 141
			5'-GATACTATGAATTTGGGACTTC		

Nach der Amplifikation und dem enzymatischen Verdau der DNA erfolgte die Identifizierung der Genotypen. Hierzu wird das Amplifikat mithilfe eines 3%-igen Agarosegels (Roti®GAROSE, Roth, Karlsruhe) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Elektrophoresekammern (Sub-Cell, Wide Mini Sub-Cell, Biorad, München, Deutschland) wurden zur Aufnahme der Gele mit 1 x TBE Laufpuffer (90 mM Tris-HCl, Sigma, Deisenhofen, Deutschland), 2 mM EDTA, pH 8,0 (Merck, Darmstadt) und 90 mM Borsäure (Sigma) gefüllt. DNA wurde dann in die entsprechenden Taschen des Gels pipettiert. Zur besseren Handhabung wird dabei ein Farbstoff (Blaumarker) im Verhältnis 1:10 der aufzutrennenden DNA zugefügt (Bluejuice™ Gel-Loading Buffer, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Damit die DNA-Fragmente durch das Gel wandern, wird an die Elektrophoresekammer eine Spannung von 120 Volt für 45-60 min. angelegt. Die im Spannungsfeld auf Grund ihrer Größenunterschiede unterschiedlich weit wandernden DNA-Fragmente lagern Ethidiumbromid (Sigma) ein, welches sich ebenfalls im Gel befindet. Da

Ethidiumbromid bei Einfall von ultraviolettem Licht fluoresziert, können die Fragmente mithilfe eines Imagers (Kodak Image Station 440 CF, Kodak, Stuttgart, Deutschland) sichtbar gemacht werden. Es entsteht das typische Bandenmuster. Zur Identifizierung der Fragmentgrößen wird das Gel zusätzlich mit einem Größenstandard (DNA-Stücke bekannter Größe) beladen. Bei dem in diesem Fall verwendeten Standard handelte es sich um pBR322 DNA /BsuRI (HaeIII) Marker 5, Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Die nachfolgende Abbildung zeigt ein typisches Bandenmuster, wie es nach Verdau am Imager betrachtet werden kann.

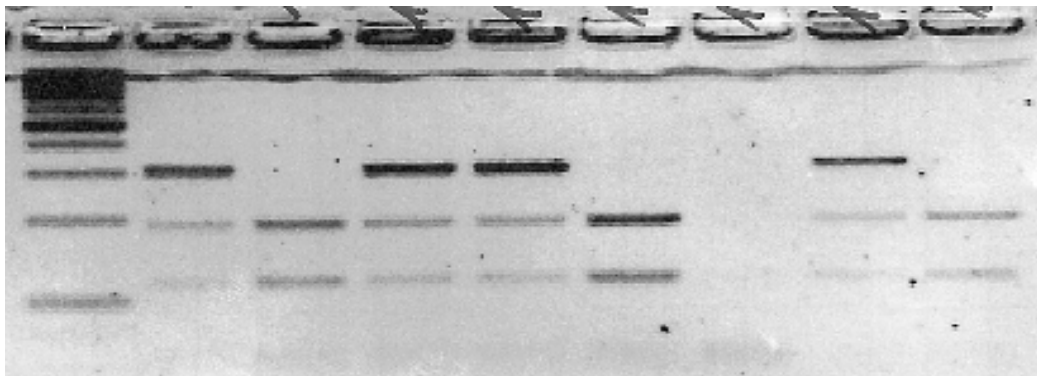


Abb. 3: Exemplarische Darstellung einer PCR/RFLP. Die linke Bahn zeigt eine 100-bp-DNA-Leiter zur Einordnung der Fragmentgröße.

4. Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit SPSS 15.0 (Chicago, USA) durchgeführt. Das Alter war normal verteilt, was durch einen Kolmogorov-Smirnov-Test bestätigt wurde. Die Genotypfrequenzen verschiedener Gruppen wurden mittels zweiseitigem Chi-Quadrat-Test bzw. einseitigen Fisher-Exact-Test verglichen. Die adjustierte Odds Ratios wurde mit binärer logistischer Regressionsanalyse ermittelt. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

5. Ergebnisse

Die Studiengruppe bestand aus 221 Patienten. 103 (46,6%) sprachen auf das Medikament der ersten Wahl an, während 118 (53,4%) nicht respondierten. Patienten, die auf das erste Medikament ansprachen, waren signifikant jünger (Durchschnittsalter 13,5 ±6,32 Jahre) als Patienten ohne Therapieerfolg (Durchschnittsalter 15,5±6,61 Jahre) (p=0,024) (Tab. 6).

Tab. 6: Demographische und klinische Merkmale von 221 juvenilen Epilepsiepatienten

	responsiv n (%)	nicht-responsiv n (%)
Alter (in Jahren)	13,5 (±6,32)	15,5 (±6,61)
Geschlecht		
Männlich	60 (58,3)	56 (47,5)
Weiblich	43 (41,7)	62 (52,5)
Anfallsart		
Generalisiert	52 (50,5)	53 (44,9)
Partiell	16 (15,5)	57 (48,3)
Fieberkrampf	27 (26,2)	1 (0,8)
nicht klassifizierbar	8 (7,8)	7 (5,9)
Ätiologie		
Symptomatisch	4 (3,9)	26 (22,0)
Idiopathisch	53 (51,5)	55 (46,6)
Fieber	27 (26,2)	1 (0,8)
Kryptogen	12 (11,7)	31 (26,3)
Nicht klassifizierbar	7 (6,8)	5 (4,2)
Antiepileptikum der 1. Wahl		
Valproat	48 (46,6)	48 (40,7)
Sultiam	7 (6,8)	15 (12,7)
Phenobarbital/Primidon	8 (7,8)	27 (22,9)
Carbamazepin	4 (3,9)	10 (8,5)
Oxcarbazepin	3 (2,9)	7 (5,9)
Lamotrigin	3 (2,9)	5 (4,2)
Verschiedene	30 (29,1)	6 (5,1)

Die demographische Verteilung der Studienteilnehmer zeigte eine nicht-signifikante Überrepräsentation von männlichen Individuen in der Gruppe der respondierenden Patienten. Partielle epileptische Syndrome waren häufiger bei nicht-respondierenden

Patienten. Weiterhin war festzustellen, dass auch symptomatische und kryptogene Epilepsien eher in der Gruppe der nicht respondierenden Patienten diagnostiziert wurden. Die häufigste Diagnose innerhalb der Studiengruppe war die idiopathisch generalisierte Epilepsie (47,5%). Das am meisten benutzte Antikonvulsivum zur Erstbehandlung der Epilepsie war Valproat (43,4%), gefolgt von Sultiam (10%), Phenobarbital (7,7%), Carbamazepin (6,3%), Oxcarbazepin (4,5%) und Lamotrigin (3,6%) (Tab.7). Die Verteilung der Genotypen eines jeden untersuchten Polymorphismus befand sich bei allen untersuchten Gruppen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (Tab. 7).

Tab. 7: Häufigkeit von CYP2C9-, ABCB1- und ABCC2-Allelen im Studienkollektiv von jungen Epilepsiepatienten , einer adulten Epilepsiepatienten, einer gesunden Kontrollgruppe und in einer HapMap-Referenzgruppe

	juvenile Epileptiker (n=221)	adulte therapie-resistente Epileptiker (n=70)	gesunde Probanden (n=242)	Kaukasier (HapMap)
CYP2C9*2 (430C>T) rs1799853	0,117	0,161	0,099	0,104
CYP2C9*3 (1075A>C) rs1057910	0,062	0,116	0,080	0,058
ABCB1 3435C>T rs1045642	0,545	0,586	0,508	0,457
ABCB1 2677G>T/A rs2032582	0,47/0,027	0,435/0,0	0,373/0,011	0,398/0,0
ABCC2 -24C>T rs717620	0,156	0,279	0,177	0,225
ABCC2 1249G>A rs2273697	0,254	0,287	0,240	0,233

5.1 ABCB1

Die Allelfrequenz der Genotypen ABCB1 3435C>T und 2677G>T/A unterschied sich nicht signifikant zwischen therapieresponsiven und nicht therapieresponsiven Individuen. Lediglich eine leichte Überrepräsentation des varianten 3435T-Allels bei den therapieresponsiven Patienten konnte beobachtet werden. Auch die Kombination der homozygoten und heterozygoten T-Träger erbrachte im Vergleich keine statistische Signifikanz (OR 0.65 (95% C.I. 0.34-1.24); p=0,19).

Tab. 8: Verteilung von ABCB1-Genotypen bei therapieresponsiven (n=103) und nicht therapieresponsiven Patienten (n=118)

SNP	responsiv %	nicht- responsiv %	OR	95%-C.I.	p-Wert
ABCB1 3435C>T					
C/C	19,4	28,8	-	-	-
C/T	44,7	39,8	0,64	0,32-1,28	0,21
T/T	35,9	31,4	0,62	0,29-1,31	0,21
C/T + T/T	80,6	71,2	0,65	0,34-1,24	0,19
ABCB1 2677G>T/A					
G/G	27,5	31,0	-	-	-
G/T, G/A	46,1	41,4	0,84	0,44-1,61	0,60
T/T, T/A, A/A	26,5	27,6	0,96	0,47-2,00	0,92
G/T, G/A + T/T, T/A, A/A	72,5	69,0	0,97	0,51-1,86	0,93

Um das Ergebnis zu verifizieren, wurde die Gruppe der responsiven Patienten der Gruppe der therapieresistenten erwachsenen Patienten gegenübergestellt. Auch hier ergaben sich keine Signifikanzen, weder bei heterozygoten T-Trägern (OR 1,67 (95% C.I. 0,70-4,03); p=0,25), noch bei homozygoten Trägern (OR 1,20 (95% C.I. 0,48-3,04); p=0,70), noch bei der Kombination beider (OR 1,46 (95% C.I. 0,64-3,35); p=0,37). Für ABCB1 2677 G>T/A waren ebenfalls keine Unterschiede vorhanden, die Verteilung war ähnlich dem Wildtyp. Ein dritter Vergleich stellte eine Gruppe gesunder Probanden den erwachsenen therapieresistenten Patienten gegenüber. Die Ergebnisse waren mit der vorherigen Versuchsreihe vergleichbar. Es wurden keine signifikanten Ergebnisse gefunden, weder für ABCB1 3455C>T, noch für ABCB1 2677G>T/A.

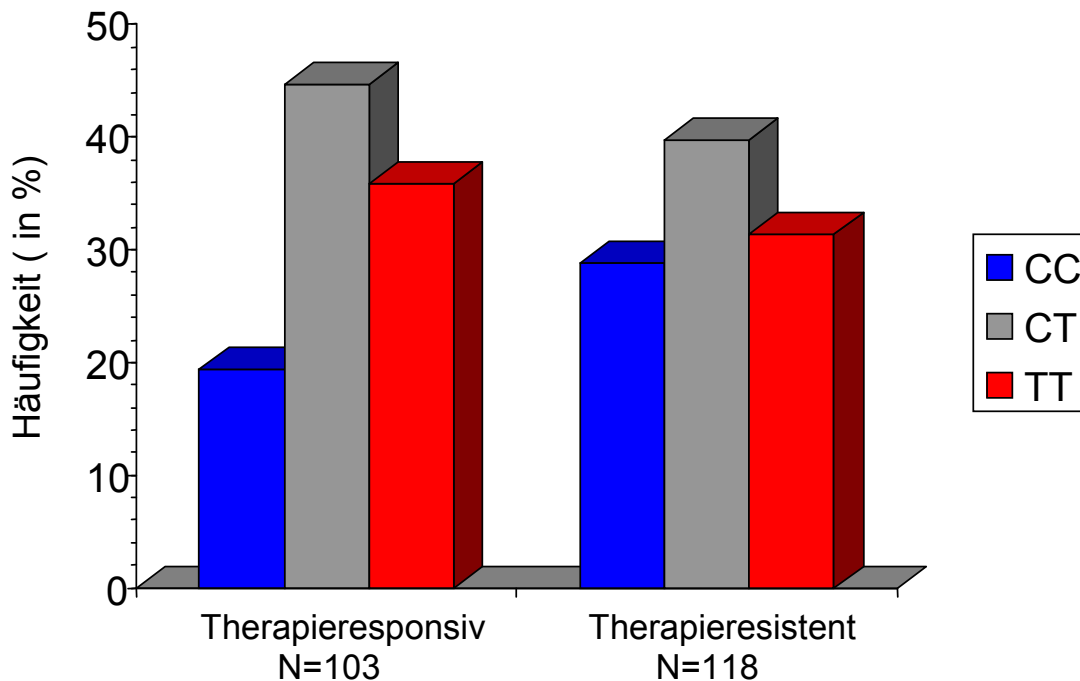


Abb. 4 : Verteilung der ABCB1 3435C>T Genotypen bei therapieresponsiven und therapieresistenten Individuen (N= Anzahl der Individuen)

5.2 ABCC2

Bezüglich des Effluxtransporters ABCC2, waren in der Gruppe der nicht-respondierenden Patienten die heterozygoten Träger des ABCC2 -24T-Allels signifikant häufiger vertreten (OR 2,24 (95% C.I. 1,19-4,23); $p=0,013$). Diese Signifikanz blieb auch bestehen, wenn in einem dominanten Modell die kombinierten Gruppen der homo- und heterozygoten varianten Allelträger mit den homozygoten Trägern des Wildtyps verglichen wurden (OR 2,15 (95% C.I. 1,16-3,99); $p=0,16$). Im rezessiven Modell blieb bei Trägern des T/T-Genotyps eine Signifikanz aus (OR 1,16 (95% C.I. 0,16-8,68); $p=0,88$). Betrachtete man das Patientenkollektiv unter Ausschluss der Patienten mit Fieberkrämpfen ($n=28$), so blieb der signifikante Unterschied der Genotypfrequenzen zwischen Respondern und Nicht-Respondern erhalten. Der Haplotyp ABCC2 -24CT/1249GA war ebenfalls signifikant in der Gruppe der Patienten überrepräsentiert, die auf das erste Medikament nicht ansprachen (OR 4,60 (95% C.I. 1,31-16,2); $p=0,018$). Bei Ausschluss der Patienten mit Fieberkrämpfen waren Individuen mit dem 1249AA Genotyp in der

therapieresistenten Gruppe unterrepräsentiert (OR 0,19 (95% C.I. 0,05-0,77); p=0,020).

In einem weiteren Strategieansatz wurde analog die Odds ratio bei Patienten berechnet, die auf das zweite, dritte und vierte Antikonvulsivum nicht ansprachen. Im dominanten Modell waren Träger des heterozygoten und homozygoten ABCC2 -24T-Allels im Vergleich zu Individuen mit homozygoten Wildtyp in der Gruppe der jungen Epileptiker, bei denen die ersten vier Medikamente keine Anfallsfreiheit herstellen konnten ebenfalls signifikant überrepräsentiert (Abb. 5)

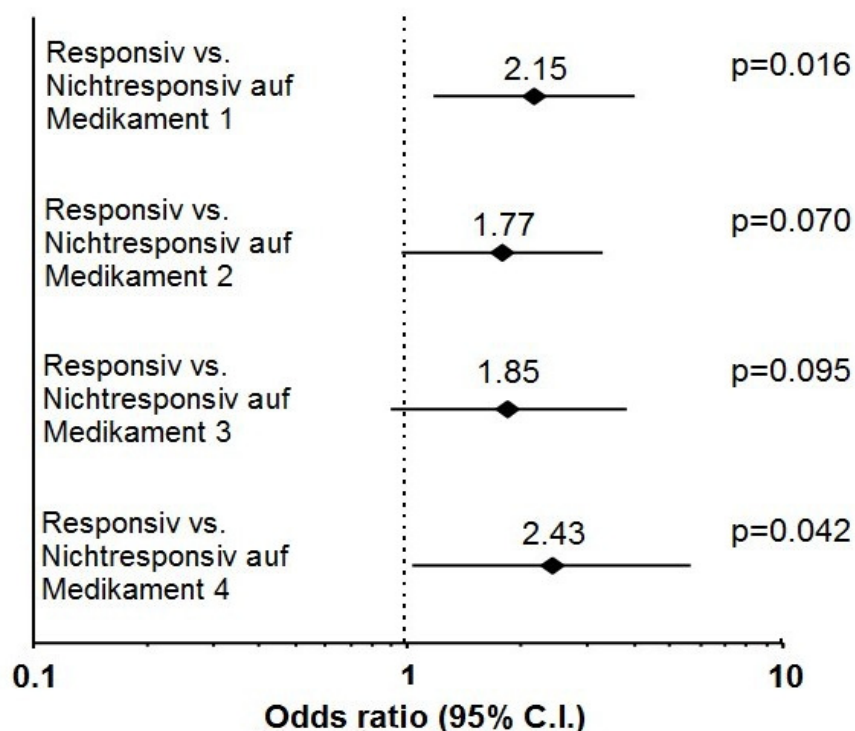


Abb. 5: Verteilung der heterozygoten oder homozygoten ABCC2 -24T varianten Allelträger zu homozygoten Wildtyppatienten im Vergleich zwischen responsiven und nicht responsiven Patienten. Abgebildet sind die nach Alter und Geschlecht adjustierten Odds ratios mit 95% Konfidenzintervall (C.I.) als Vergleich zwischen responsiven und nicht responsiven Patienten in Abhängigkeit vom ersten, zweiten, dritten und vierten Antiepileptikum.

Die Ergebnisse aus der Gruppe der jungen Epileptiker wurden durch eine Gegenüberstellung der jungen, therapieresponsiven Patienten und der Gruppe der erwachsenen Pharmakotherapie-resistenten Patienten untermauert. Auch in diesem

Fall waren die Träger des ABCC2 -24T-Allels, sowohl als heterozygote (OR 3,16 (95% C.I. 1,56-6,38); $p=0,001$) als auch homozygote Variante (OR 5,72 (95% C.I. 1,06-30,9); $p=0,043$), signifikant häufiger in der Gruppe der nicht therapieresponsiven Individuen zu finden, ebenso die kombinierte Gruppe aus Variantenträgern (OR 3,36 (1,71-6,59); $p<0,001$).

Der Vergleich zwischen erwachsenen Patienten mit therapieresistenter Epilepsie und gesunden Probanden der Kontrollgruppe lieferte ebenfalls signifikante Ergebnisse. Auch hier waren die Träger der ABCC2-24C>T-Variante häufiger in der Gruppe der nicht-respondierenden Probanden zu finden. Die Werte waren im Vergleich zum Wildtyp für heterozygote (OR 2,41 (95% C.I. 1,11-5,22); $p=0,026$) und die kombinierten hetero- und homozygoten Träger statistisch signifikant (OR 2,22 (95% C.I. 1,07-4,62); $p=0,033$), für homozygote Variantenträger alleine jedoch nicht (OR 1,43 (95% C.I. 0,36-5,76); $p=0,61$) (Abb. 6).

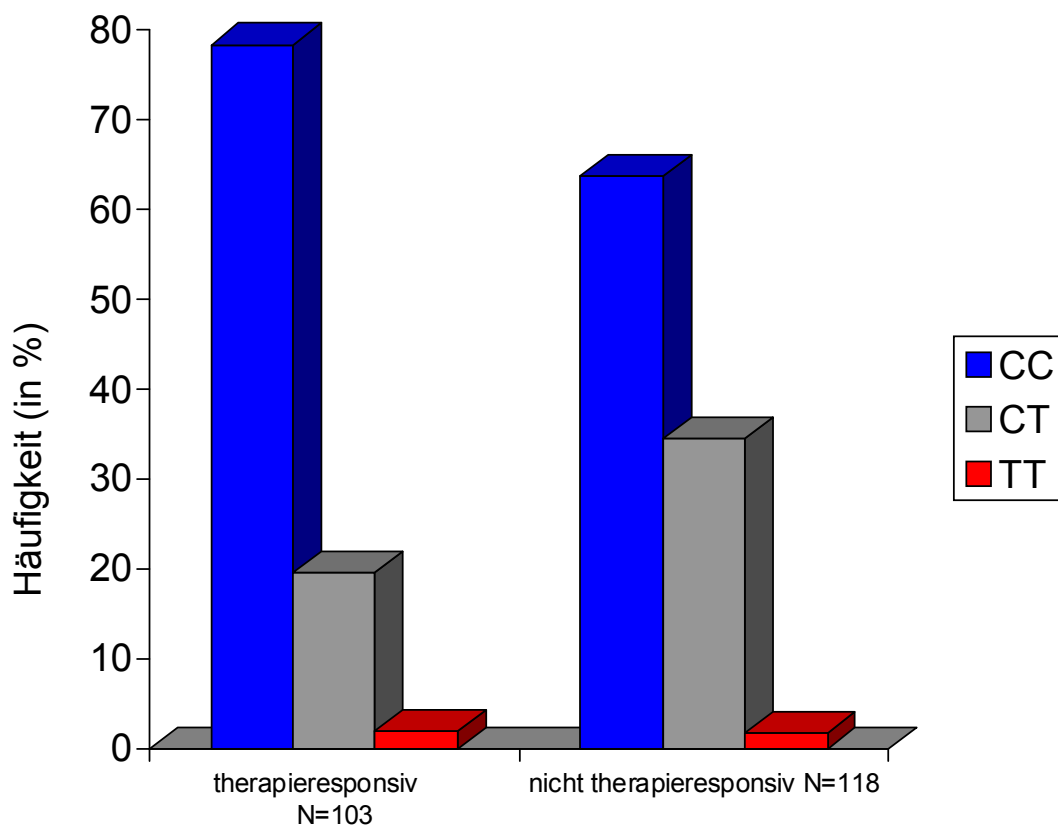


Abb. 6 : Verteilung der ABCC2-24C>T Genotypen bei therapieresponsiven und therapieresistenten Individuen (N= Anzahl der Individuen)

Die Untersuchung von ABCC2 1249G>A lieferte in der Gruppe der jungen Epilepsiepatienten keine signifikanten Unterschiede. Auch die Einbeziehung der erwachsenen, nicht therapieresponsiven Patienten führte zu keinem signifikanten Ergebnis. Allerdings konnte beim Vergleich von erwachsenen Epileptikern mit der gesunden Kontrollgruppe für den heterozygoten Genotyp G/A ein signifikant erhöhtes Vorkommen in der Gruppe der adulten Patienten gefunden werden (OR 2,22 (95% C.I. 1,02-4,84); $p=0,045$). Die Kombination der Genotypen ABCC2 -24CT und 1249GA zeigte ebenfalls eine starke Überrepräsentation in der Gruppe der adulten refraktären Probanden (OR 5,78 (95% C.I. 1,57-21,3); $p=0,008$).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weiterhin eine Reanalyse der ABCC2-mRNA-Expression in Hippocampus-Biopsaten von 22 Patienten mit adulter refraktärer Epilepsie in Bezug auf die Genotypen von ABCB1 und ABCC2 durchgeführt (Mosyagin et al. 2008). Diese ABCC2 mRNA-Expression variierte allerdings nicht stark zwischen den einzelnen ABCC2 -24C>T-Genotypen. Dagegen zeigte sich bei einem weiteren Vergleich ein Anstieg der mRNA-Expression des Transporters ABCB1 in Abhängigkeit vom ABCC2 -24T-Polymorphismus (Jonckheere-Terpstra-Test: $p=0,034$) (Abb. 7).

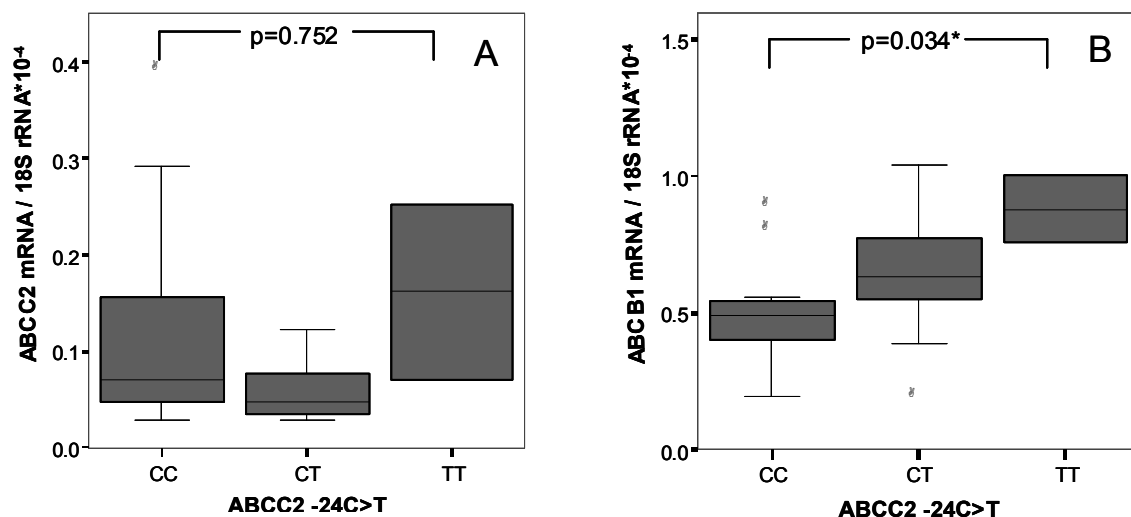


Abb. 7: Einfluss des SNP ABCC2 -24C>T auf die MRNA-Expressionslevel von ABCC2 und ABCB1 in Gewebeproben. Diese wurden im Rahmen von therapeutischen Operationen bei adulten Therapie-refraktären Epilepsiepatienten gewonnen (n=22). Die statistischen Vergleiche zwischen den Patienten mit ABCC2-24CC (n=11), -24CT (n=9) und -24TT (n=2) Genotyp wurden mit Jonckheere-Terpstra-Trend-Analyse durchgeführt.

5.3 CYP2C9

Die Untersuchung der CYP2C9-Polymorphismen brachte keine statistisch signifikanten Ergebnisse. Lediglich eine verminderte Anzahl an heterozygoten Trägern des CYP2C9*3-Allels in der Gruppe der therapieresponsiven Individuen wurde gefunden (OR 0,50 (95% C.I. 0,21-1,17); p=0,11) (Tab. 9). Bei Ausschluss der Patienten mit Fieberkrämpfen konnte eine verminderte Präsenz von heterozygoten CYP2C9*3-Trägern in der Gruppe der responsiven Patienten beobachtet werden (OR 0,34 (95% C.I. 0,14-0,81); p=0,015). Allerdings blieb das Ergebnis nicht signifikant, nachdem nur Patienten betrachtet wurden, die ein Medikament einnahmen, welches durch CYP2C9 metabolisiert wird.

Die weitere Betrachtung der Probanden mit juveniler Epilepsie erzielte keine statistisch signifikanten Schlüsse. Weder die Verteilung der heterozygoten (OR 1,10 (95% C.I. 0,55-2,18); p=0,79) noch der homozygoten CYP2C9*2-Variante (OR 1,35 (95% C.I. 0,12-15,6); p=0,81) zwischen therapieresponsiven und nicht therapieresponsiven Patienten waren signifikant, ebenso die Kombination der Genotypen C/T und T/T (OR 1,11 (95% C.I. 0,57-2,17); p=0,764). CYP2C9*3-Genotypen wiesen ebenfalls keine nennenswerten Abweichungen auf. Zudem waren keine Individuen mit homozygoten, varianten Genotyp in dieser Gruppe zu finden (Tab. 9).

Die Ergebnisse waren bei Gegenüberstellung von jungen responsiven Patienten mit adulten, therapieresistenten Patienten ähnlich und statistisch nicht signifikant. Gleiches gilt für den Vergleich von adulten, therapieresistenten Patienten und der Gruppe gesunder Probanden.

Tab. 9: Verteilung der Genotypen von ABCB1, ABCC2 und CYP2C9 bei therapieresponsiven (n=103) und nicht-responsiven Patienten (n=118)

SNP	Responsiv %	Resistent %	OR	95%-C.I.	p-Wert
CYP2C9*2 (430C>T)					
C/C	80.0	76.3	-	-	-
C/T	19.0	21.9	1.10	0.55-2.18	0.791
T/T	1.0	1.8	1.35	0.12-15.6	0.811
C/T + T/T	20.0	23.7	1.11	0.57-2.17	0.764
CYP2C9*3 (1075A>C)					
A/A	83.2	91.4	-	-	-
A/C	16.8	8.6	0.50	0.21-1.17	0.109
C/C	0.0	0.0	-	-	-

Die Daten wurden nach Alter und Geschlecht angepasst. Homozygote Wildtypträger dienten als Referenzgruppe.

Tab. 10: Verteilung der Genotypen von CYP2C9 bei therapieresponsiven Patienten (n=103) und adulten Patienten mit refraktärer Epilepsie (n=70)

SNP	Responsiv %	Resistent %	OR	95%-C.I.	p-Wert
CYP2C9*2 (430C>T)					
C/C	80,0	69,6	-	-	-
C/T	19,0	28,6	1,63	0,75-3,54	0,218
T/T	1,0	1,8	1,98	0,12-33,1	0,634
C/T + T/T	20,0	30,4	1,66	0,78-3,56	0,189
CYP2C9*3 (1075A>C)					
A/A	83,2	76,8	-	-	-
A/C	16,8	23,2	1,53	0,68-3,45	0,307
C/C	0,0	0,0	-	-	-

6. Diskussion

Bei der medikamentösen Behandlung der Epilepsie können etwa 30% der Patienten nur unzureichend therapiert werden. Die genauen Ursachen, die zu einer therapieresistenten Epilepsie führen, sind nicht im Detail bekannt. Interessanterweise zeigten nicht anfallsfreie Patienten eine Resistenz gegen viele, teilweise auch sehr unterschiedliche Wirkstoffe, so dass ein grundlegenderer Mechanismus in den Fokus der Nachforschungen rückte. Erste Hinweise auf mögliche Gründe für die großen individuellen Unterschiede, die zwischen einzelnen Patienten hinsichtlich ihres Behandlungserfolges bestehen, lieferten Studien Mitte der 90er Jahre, die sich grundlegend mit der Funktion von Transportproteinen beschäftigten. Diese zellmembranbasierten Effluxsysteme konnten in verschiedenen Körperregionen nachgewiesen werden, so zum Beispiel im Intestinaltrakt, in der Blut-Hirn-Schranke, in der Leber oder in den Nieren. Sie sind für den Transport von körpereigenen und körperfremden Stoffen über Zellmembranen hinweg verantwortlich. Diese Aufgabe ist für den Körper von großer Bedeutung, da so die Akkumulation von toxischen Stoffen im Zellinneren verhindert und ihre Ausscheidung im Zusammenspiel mit Enzymen des Phase I- und Phase II-Metabolismus ermöglicht wird. Da diese Proteine nahezu ubiquitär im Körper vorkommen und zudem ein weitreichendes Substratspektrum aufweisen, haben sie ebenfalls einen starken Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von Arzneimitteln. Gleichzeitig gibt es individuelle Unterschiede, was die Aktivität und Expression dieser Transporter angeht. Man geht heute davon aus, dass diesen Unterschieden unter anderem genetische Polymorphismen zugrunde liegen, die sich phenotypisch in unterschiedlich starker Transportaktivität ausprägen. Die Behandlung der Epilepsie betreffend stellt sich daher die Frage, ob diese genetischen Unterschiede zu einer veränderten Expression führen, die wiederum bewirkt, dass Antiepileptika in erhöhtem Maße aus Zielzellen im menschlichen Gehirn heraus transportiert werden und so eine reduzierte Wirkung und damit ein ausbleibender Therapieerfolg die Folge ist.

6.1 ABCB1

Das durch das Gen ABCB1 codierte P-Glykoprotein steht schon seit über zwei Dekaden im Mittelpunkt des Interesses, wenn es um die in der Erklärung der Pharmakoresistenz geht. Erste Hinweise auf die Bedeutung dieses Transporters lieferten Ergebnisse bei Untersuchungen von Krebspatienten. 1976 veröffentlichten Juliano und Ling Untersuchungsergebnisse, die veränderte Medikamentenpermeabilität in der Behandlung von Ovarialkrebs bei Hamstern beschrieben, welche durch P-gp bedingt war (Juliano and Ling 1976). Ito et al. beschrieben 1989 einen erhöhten Level von P-gp bei pharmakotherapieresistenten Patienten mit akuter Leukämie, ähnliche Ergebnisse fanden Marchi et al. (2005) bei akuter myelotischer Leukämie, Tishler et al. (1995) konnte einen Zusammenhang bei der Behandlung von neuroektodermalem Tumoren von Kindern zeigen. Da P-gp ein breit gefächertes Substratspektrum besitzt und auch am Transport von Zytostatika wie Vincristin, Vinblastin und Paclitaxel beteiligt ist, lag ein Zusammenhang zwischen einer Überexpression des Proteins und dem Ausbleiben eines Therapieerfolgs aufgrund erhöhten Effluxes der Wirkstoffe aus ihren Zielzellen nahe. Diese Annahme wurde anschließend zur Erklärung von Therapieversagen bei anderen Erkrankungen, zum Beispiel der Epilepsie, erweitert. Ebenfalls stellten Tishler et al. (1995) als erste eine Studie vor, in der bei Patienten, die sich aufgrund bestehender epileptischer Anfälle neurochirurgisch behandeln ließen, in 11 von 19 Fällen ein stark erhöhter MDR1-mRNA-Level, sowie in 14 Fällen erhöhte P-gp-Werte in Kapillarendothelzellen im Vergleich zu gesunden Probanden nachgewiesen werden konnte. Dombrowski et al. wiesen 2001 in epileptischem Kapillargewebe therapieresistenter Patienten eine signifikant höhere Expression von P-gp in der Blut-Hirn-Schranke als in Vergleichsgeweben derselben Patienten nach. Schon frühe Studien konnten zeigen, dass P-gp besonders in exkretorischen Geweben vorkommt, so dass dieses Protein einen protektiven Mechanismus besitzt. Neben dem Nachweis von P-gp im Gastrointestinaltrakt konnte es auch im Bereich der Blut-Hirn-Schranke nachgewiesen werden. Tanaka et al. (1994) zeigten bei ihren Versuchen an humanen Gliomzellen, dass P-gp im Bereich der luminalen Membran von Kapillarendothelzellen, die an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke maßgeblich beteiligt sind, vorkommt. Gleiche Ergebnisse lieferten Arbeiten von Hegmann et al.

(1992), Jette et al. (1993) und Hirohashi et al. (2000), um nur eine kleine Auswahl zu nennen.

Zur Erklärung einer Überexpression des Arzneimitteltransporters bei Epilepsiepatienten entwickelten sich in den letzten Jahren verschiedene Theorien. So gelangten Forschungsgruppen zu der Vermutung, dass epileptische Anfälle selbst zu einer Vermehrung von Transportern in Astroglia- und Kapillarendothelzellen führen können. Diese Vermutung legten Experimente an Ratten nahe, die nach einem künstlich ausgelösten Anfall genotypisch untersucht wurden. Es zeigten sich signifikant erhöhte MDR1-Gen-Level im Bereich des vom Anfall betroffenen Gebietes (Kwan et al. 2002), Sisodiya und Thom (2003) konnten eine Erhöhung von ABCB1 und ABCC1 im neuronalen Gewebe eines im Status epilepticus verstorbenen Patienten nachweisen. Volk et al. (2005) zeigten eine Erhöhung der P-gp-Level nach induzierten Anfällen bei Ratten in verschiedenen Geweben des epileptogenen Areals, darunter in Endothelzellen, in Neuronen sowie in parenchymalen und perivaskulären Astrocyten, wobei ein Nachweis in den einzelnen Geweben stark von der immunhistochemischen Technik abhing. Marchi et al. (2004) konnten zeigen, dass in Kapillargewebe, welches bei chirurgischen Eingriffen an Epilepsiekranken gewonnen wurde, ein höherer Gehalt an MDR1 zu finden war als in vergleichbarem gesunden Gewebe. Eine aktuelle Arbeit aus dem Jahr 2009 konnte bei epilepsiekranken Hunden einen Anstieg des P-gp-Levels nach einem Anfall im Vergleich zu gesunden Hunden nachweisen, wobei in diesem Versuch die Anfälle spontan auftraten und nicht induziert werden mussten (Pekcec et al. 2009).

Weiterhin nimmt man an, dass auch die Behandlung mit Antiepileptika selbst zu einer Überexpression von Transportern führen kann. Bei Astrocyten-Zellkulturen von Ratten wurde nach einer Behandlung mit verschiedenen Antiepileptika (Phenytoin, Phenobarbital und Valproat in therapeutischen Dosen) innerhalb von 30 Tagen ein signifikanter Anstieg des P-gp-Levels nachgewiesen (Lu et al. 2004). Im duodenalen Gewebe beschrieben Giessmann et al. (2004) nach Gabe des Medikaments Carbamazepin eine Erhöhung der MDR1-mRNA-Level, zusammen mit einer erhöhten renalen Clearance des Substrates Talinolol. Die Absorption war gleichzeitig erniedrigt. Die Vermutung liegt in diesem Fall nahe, dass ein Anstieg der

Transportproteine im Verdauungstrakt zu einem verstärkten Ausscheiden von Antiepileptika führen kann, so dass keine ausreichenden Wirkspiegel erreicht werden.

Beide Ursachen für eine verminderte oder nicht stattfindende Arzneimittelwirkung erklären jedoch nicht den Umstand, warum ähnliche Patienten mit vergleichbarer Anfallscharakteristik und Medikamentenanamnese sehr unterschiedliche Therapieverläufe aufweisen. Es wurde daher schon früh angenommen, dass individuelle Unterschiede im Hinblick auf das Vorhandensein von Transportproteinen wie dem P-Glykoprotein durch genetische Mutationen, sogenannten Single Nucleotide Polymorphisms, begründet sind. Es wurden verschiedene Varianten im Gen MDR1 gefunden, die mit einer Überexpression korrelierten. Der SNP 3435C>T wurde unter anderem von Hoffmeyer et al. untersucht. Die Studie zeigte, dass Träger der 3435CC-Variante eine signifikant höheren P-gp-Proteinexpression in duodenalem Gewebe, sowie einen damit zusammenhängenden niedrigeren Plasmaspiegel an zuvor oral verabreichtem Digoxin aufwiesen, als Träger der TT-Variante (Hoffmeyer et al. 2000)

Hitzl et al. (2001) zeigten bei ihren Versuchen, dass homozygote Träger des SNPs einen niedrigeren Efflux des Substrates Rhodamin aus CD56+ Natural Killer Zellen hatten als CC-tragende Individuen, sowie eine geringere mRNA-Expression. Die Anwendung und Untersuchung dieser Erkenntnisse im Hinblick auf die Epilepsie nahmen Siddiqui et al. vor. Es wurden 315 Patienten auf ihren Genotyp hin untersucht und in therapieresistent und therapieresponsiv eingeteilt. In der Gruppe der schwer zu therapierenden Patienten kam der 3435CC-Polymorphismus signifikant häufiger vor als bei anfallsfreien Patienten (Siddiqui et al. 2003), so dass der Schluss nahe lag, dass Träger des Wildtyps bei Eintreten einer Epilepsie mit einer höheren Wahrscheinlichkeit eine Therapieresistenz aufweisen. Der Einfluss des 3435C>T-SNPs auf Konzentrationen von Antikonvulsiva wurde in einer Arbeit von Basic et al. (2008) beschrieben. Bei 60 Patienten mit Epilepsie wurde die zirkulierende Menge Phenobarbital in der cerebrospinalen Flüssigkeit sowie die Anfallshäufigkeit gemessen und mit dem Genotyp verglichen. Es zeigten sich erniedrigte Medikamentenspiegel und erhöhte Anfallsfrequenz bei Auftreten des CC-Wildtyps.

Wir konnten bei den von uns in die Studie aufgenommenen Individuen keine Signifikanz zwischen dem Vorhandensein des 3435C>T-Polymorphismusses und dem Ansprechen auf eine Pharmakotherapie feststellen. Es zeigt sich dabei, dass die Ergebnisse zu diesem SNP sehr unterschiedlich ausfallen und eine abschließende Beurteilung seiner Bedeutung schwierig ist. Untersuchungen von Sills et al. an 400 Patienten kamen bei Einteilung in therapieresistent und -responsiv ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die Verteilung des ABCB1 3435 C>T-Genotyps keinen signifikanten Unterschied zeigte (Sills et al. 2005). In einem weiteren, 207 Individuen großen Patientenkollektiv konnte kein Zusammenhang zwischen Genotyp und Therapieerfolg nachgewiesen werden (Kim et al. 2006), zum gleichen Ergebnis kam eine Arbeit von Basic et al. (2006). Leschziner et al. (2007) konnten bei ihren Untersuchungen ebenfalls keine Korrelation finden. Eine Studie an einer irischen, 440 Individuen umfassenden Patientengruppe konnte frühere Ergebnisse zum SNP 3435CT nicht bestätigen (Shahwan et al. 2007). In einer weiteren Studie aus dem Jahr 2009 konnte ebenfalls kein Zusammenhang zwischen Varianten bei ABCB1, ABCC2 und ABCG2 sowie einer Therapieresistenz gezeigt werden (Kim et al. 2009). Allerdings wird in diesem Zusammenhang wichtig, die Ethnizität der untersuchten Gruppen voneinander zu trennen. Inwiefern die koreanischen Probanden der Kim-Studie mit kaukasischen Individuen vergleichbar sind, und ob bestimmte SNP in unterschiedlichen Rassen gleiche phenotypische Auswirkungen haben, muss kritisch hinterfragt werden. Nakamura et al. fanden in ihrer Studie heraus, dass in Duodenumbiopsaten von 13 Japanern der Level an mRNA höher war bei Trägern des 3435TT als in 3435CT oder 3435CC (Nakamura et al. 2002), ein Ergebnis, das im Gegensatz zu Studien an Kaukasiern steht. Dafür spricht eine weitere Arbeit, in der Seo et al. bei japanischen Epileptikern einen Einfluss des Polymorphismus an Position 3435 nachweisen konnten, allerdings mit dem Ergebnis der höheren Wahrscheinlichkeit eines Therapiemisserfolges bei Trägern des TT-Genotypes (Seo et al. 2006).

6.2 ABCC2

Neben dem ABCB1 gelangen der Membrantransporter ABCC2 (MRP2, Multidrug resistance protein 2) und seine Polymorphismen zunehmend in den Fokus neuerer

Untersuchungen zur Pharmakoresistenz. ABCC2 ist in zahlreichen Geweben aufzufinden, unter anderem in der Leber, der Niere und im Verdauungstrakt, ist aufgrund seiner Lokalisation an der apikalen, dem Lumen zugewandten Seite von Zellen an der Ausscheidung von konjugierten und sulfatierten Metaboliten beteiligt und dient somit dem Schutz der Zellen vor Intoxifikation und kanzerogenen Stoffen.

Bei unseren Untersuchungen konnten wir einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem -24C>T SNP in der 5'-UTR des ABCC2-Gens und dem Ausbleiben eines Therapieerfolges nachweisen. Träger der -24T-Variante waren in der Gruppe der nicht-respondierenden Patienten signifikant überrepräsentiert. Diese Überrepräsentierung fand sich auch im Vergleich von 70 erwachsenen Epilepsiepatienten, die an einer therapieresistenten Epilepsie litten und sich einem neurochirurgischen Eingriff unterzogen hatten, und einer 242 Individuen umfassenden Gruppe gesunder Probanden.

Die funktionelle Bedeutung des SNP -24CT ist erst in einer kleineren Zahl von Publikationen beschrieben worden. Unter anderem konnte durch eine in unserem Institut durchgeführte Arbeit gezeigt werden, dass das Vorhandensein des SNP in vitro zu einer reduzierten mRNA-Expression im Nierengewebe und zu einer geringeren Transportrate führt (Haenisch et al. 2007). In einer weiteren Untersuchung aus dem Jahr 2006 kamen die Autoren zu dem Ergebnis, dass bei der Behandlung von an akuter lymphoblastischer Leukämie erkrankten Frauen die Patientinnen eine doppelt so hohe Plasmakonzentration von Methotrexat nach 36 bis 48 Stunden aufwiesen, wenn sie Träger der -24T-Variante waren (Rau et al. 2006), so dass auch hier die Annahme erlaubt scheint, wonach eine Veränderung der Transportrate des Proteins mit der Variante -24 in der 5'-UTR des ABCC2-Gens korreliert. Weiterhin ergab eine Untersuchung von 95 nierentransplantierten Patienten, dass Träger der Variante -24C>T eine geringere orale Clearance für das Immunsuppressivum Mycophenolsäure hatten als Individuen mit homozygotem Wildtyp. Die Träger des SNP waren somit durch länger anhaltende Mycophenolsäure-Plasmaspiegel besser vor Abstoßungsreaktionen gegen das Transplantat geschützt (Naesens et al. 2006). Eine Arbeit von Choi et al. aus dem Jahr 2007 bringt den Polymorphismus in der Promoterregion von ABCC2 in Zusammenhang mit durch Gallensäure ausgelösten hepatotoxischen Effekten. Bei der Untersuchung von 94 Patienten zeigte sich, dass das Auftreten von Haplotypen,

die den SNP enthielten, stark mit der Erkrankung einer Hepatitis einherging. Es konnte gezeigt werden, dass mehrere SNPs in der Promoterregion des Gens als hinweisende Faktoren für das Auftreten einer toxischen Leberschädigung dienen. Zusätzlich war die Promoteraktivität im Beisein eines bestimmten -24C>T-Haplotypes um 39% reduziert (Choi et al. 2007). Abschließend fand sich in einer anderen Untersuchung bei Patienten mit Diclofenac verursachter Hepatitis eine signifikant erhöhte Rate des -24C>T Basenaustausches (Daly et al. 2007).

Unsere Daten legen den Schluss nahe, dass ein Basenaustausch in der Promoterregion des ABCC2-Gens ebenfalls für eine veränderte Transportrate für Antikonvulsiva verantwortlich ist und somit hinweisend auf eine Therapieresistenz sein kann. Eine direkte Übernahme der oben angeführten Erkenntnisse anderer Autoren gestaltet sich allerdings etwas schwierig, da diese konträr zur generellen Annahme der transportervermittelten Therapieresistenz sind. Träger des -24T-Allels weisen demnach eine reduzierte Transportfähigkeit auf, diese geht einher mit höheren Wirkspiegeln in den Zielzellen. Bei der Therapieresistenz der Epilepsie wird dagegen von einer gesteigerten Transportrate ausgegangen, die einen Abtransport des Antikonvulsivums aus dem Zielorgan zur Folge hat. Ein Erklärungsansatz kann sein, dass die verminderte Transportrate dazu führt, dass Wirkstoffe in zu hohem Maße in Zielzellen akkumulieren und dabei zu starken Nebenwirkungen oder toxischen Reaktionen führen, wie die Arbeit von Daly und Aithal zeigt. Derartige Reaktionen können im gewünschten Zielorgan des Pharmakons auftreten, aber auch in Zellen des Körpers, die man nicht beeinflussen will. Die Konsequenz der Nebenwirkung kann die Absetzung des Wirkstoffes sein, bevor er in für die Behandlung des epileptischen Leidens ausreichenden Plasmaspiegeln vorhanden ist.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass der untersuchte Polymorphismus selbst nicht allein für das Therapieversagen verantwortlich ist, jedoch in enger Verbindung zu einem weiteren SNP steht, welcher wiederum funktionelle Bedeutung hat oder den Effekt modulieren kann. Die Auswertung unserer Daten lieferte einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus im ABCC2-Gen und dem heterozygoten oder homozygoten Variantenträger für das CYP2C9-Gen. Die Variantenträger haben im Gegensatz zum homozygoten Wildtyp eine eingeschränkte

Metabolisierungsrate (van der Weide et al. 2001), welche wiederum im Zusammenhang mit schweren Medikamentennebenwirkungen durch zu hohe Wirkspiegel steht (Mamiya et al. 1998; Brandolese et al. 2001). Ein Therapieversagen könnte in diesem Fall also darauf zurückzuführen sein, dass das Medikament abgesetzt werden muss, da es zu unerwünschten Nebenwirkungen kommt. Diese Argumentation ist bei Antikonvulsiva allerdings von schwachem Wert, da von den Antikonvulsiva nur Phenytoin als Substrat für die Metabolisierung durch CYP2C9 dient. Dieses wird aber in der heutigen Therapie der Epilepsie kaum noch genutzt und war auch in unserem Patientenkollektiv schwach vertreten.

Es stellt sich auch die Frage, inwieweit der Transporter ABCC2 in den für die Therapie der Epilepsie relevanten Organen exprimiert wird, sprich ob der Transporter im Bereich der Blut-Hirn-Schranke lokalisiert ist. Die zuvor genannten Arbeiten zum -24CT-SNP beschrieben das Auftreten in Geweben von Leber und Niere. In der Blut-Hirn-Schranke konnte MRP2 zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht nachgewiesen werden, sofern es sich bei den Individuen nicht um an Epilepsie Erkrankte handelte (Nies et al. 2004). Dagegen konnte ABCC2 in epileptogenen Biopsaten bereits nachgewiesen werden, so unter anderem in Endothelzellen von Ratten nach künstlich hervorgerufenen epileptischen Anfällen (Hoffmann et al. 2006), oder bei Patienten mit Hippocampussklerose (Kubota et al. 2006). Unsere Studie kann in diesem Zusammenhang keine Daten liefern, da sämtliche genetischen Informationen aus Blutproben gewonnen wurden. Biopsate aus erkrankten Hirnarealen, die eine mRNA-Genlokalisierung zuließen, standen nicht zur Verfügung, da es sich bei den Individuen der Probandendatei um größtenteils medikamentös behandelte Patienten handelte, die sich keiner epilepsiebedingten Operation unterziehen mussten.

Eine Reihe von Antiepileptika wird durch die ABC-Transporterfamilie transportiert. In unserem Patientenkollektiv war Valproat das am häufigsten verschriebene Medikament, sowohl bei therapieresistenten als auch bei therapieresponsiven Personen, bedingt durch den überwiegenden Anteil an Individuen, die an generalisierter idiopathischer Epilepsie erkrankt sind. Neue Studien kommen in diesem Zusammenhang zu dem Ergebnis, dass Valproat kein Substrat von ABCC2 ist, und konnten das sowohl in vivo als auch in vitro belegen (Baltés et al. 2007). Hingegen zeigten frühere Arbeiten, dass zumindest in Kapillarendothelzellen von

Kühen der Transport von Valproat über ABCC2 stattfindet (Gibbs et al. 2004). Zwischen den Spezies herrschen somit bezüglich der Substratspezifität der Transporter einige Unterschiede (Baltes et al. 2007).

Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, ob das erhöhte Auftreten der Variante ABCC2-24CT bei therapieresistenten Individuen an anderer Stelle Veränderungen hervorruft oder mit ihnen im Gleichgewicht steht, die dann erst primär für einen verstärkten Arzneimitteltransport verantwortlich sind. Eine Arbeit von Hoffmann et al. (2007) zeigte bei speziellen ABCC2-Knockout-Mäusen einen signifikanten Anstieg von P-gp im Bereich der Blut-Hirn-Schranke nach induzierten Anfällen. Da in diesen Mäusen der ABCC2 -Transport nicht gegeben ist, scheint durch eine Erhöhung des P-gp-Levels versucht zu werden, den Schutz des Gehirns vor toxischen Stoffen aufrechtzuerhalten. Ufer et al. konnten in ihrem Patientenkollektiv ebenfalls feststellen, dass bei therapieresistenten Epileptikern mit dem Genotyp -24TT die ABCB1- mRNA-Expression signifikant höher war als bei Individuen mit dem hetero- oder homozygoten Wildtyp. Somit bliebe ein Effekt auch für Substrate erklärbar, die nicht von ABCC2 transportiert werden.

Abgeschwächt werden die genannten Beobachtungen durch eine Studie, durchgeführt an erwachsenen japanischen Individuen, welche zum größten Teil an partieller Epilepsie erkrankt waren. Hier zeigten sich keine Korrelationen zwischen -24CT und dem Auftreten einer therapieresistenten Epilepsie (Seo et al. 2008). Inwiefern diese Ergebnisse auf Kaukasier angewendet werden kann, bleibt zu diskutieren.

6.3 Cytochrom P450 2C9

Für die Wirkung eines Medikamentes spielt neben der Aufnahme in den Körper und dem Transport in die Zielorgane auch deren Verstoffwechslung eine entscheidende Rolle. Dabei werden Substrate zunächst oxidiert, reduziert und hydrolysiert (Phase-I-Reaktion) und danach konjugiert und glykolytiert (Phase-II-Reaktion). Die Stoffe werden dadurch wasserlöslich und können ausgeschieden werden. Die wichtigsten Enzyme der Phase-I-Reaktion sind die Isoformen der Cytochrom P450-Häm-Monooxygenasen. Für den menschlichen Medikamentenmetabolismus sind unter anderem die Isoenzyme CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9 und CYP2C19 von großer Bedeutung. Zum Substratpool dieser Enzyme zählen ebenfalls die Antiepileptika.

Daher können Veränderungen der Enzymaktivität in der Gruppe der Cytochrome weitreichende Auswirkungen auf den Effekt einer antikonvulsiven Therapie haben.

Das in dieser Arbeit untersuchte Cytochrom CYP2C9 weist neben dem Wildtyp CYP2C9*1 zum jetzigen Zeitpunkt mindestens 34 weitere Allele auf (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles/>, Stand Juli 2011).

Studien zu den verschiedenen Polymorphismen konnten zeigen, dass Abweichungen vom Wildtypen zu einer reduzierten oder gänzlich ausbleibenden Enzymaktivität führen (Takanashi et al. 2000). Bei den varianten Allelen *2 und *3 werden durch Punktmutationen Aminosäuren ausgetauscht, bei CYP2C9*2 ein Arginin durch Cystein (R144C), bei CYP2C9*3 befindet sich statt des Isoleucins ein Leucin an Position 359 (I359L). Die dadurch entstehenden Enzyme besitzen nur 12% bzw. 5% der Aktivität des Wildtyps.

Zu den Substraten des CYP2C9 gehört das Antiepileptikum Phenytoin, wodurch die Variabilität des CYP2C9 eine Bedeutung für die Behandlung von Epileptikern bekommt. Patienten, die mutierte CYP2C9-Allele aufweisen, können den Wirkstoff langsamer abbauen als Wildtypträger. Als Folge bleiben die Plasmaspiegel über einen prolongierten Zeitraum auf hohem Niveau oder der Wirkspiegel erreicht kurz nach Aufnahme des Medikamentes einen im Vergleich zum Wildtypträger stark erhöhten Wert. Langsammetabolisierer benötigen daher vergleichsweise niedrigere Mengen des Wirkstoffes. Van der Weide et al. zeigten bei Patienten mit mutierten Enzymen, dass eine therapeutische Serumkonzentration schon mit einer Phenytoindosierung erreicht werden konnte, die um 37% niedriger gewählt war als die Standarddosis für Patienten mit CYP2C9*1 (van der Weide et al. 2001). Vergleichbare Ergebnisse brachte eine Studie, in der ein homozygoter Träger des *3-Allels stark erniedrigte Clearance-Werte für Phenytoin besaß (Kidd et al. 2001). In extremen Fällen besteht die Gefahr einer Intoxikation, da die Metabolisierungsrate so gering sein kann, dass schon bei einer Standarddosis kritische Serumspiegel erreicht werden (Ninomiya et al. 2000; Brandolese et al. 2001).

In dieser Arbeit haben wir untersucht, ob die Anwesenheit der SNPs CYP2C9*2 sowie CYP2C9*3 einen Einfluß auf den Therapieerfolg bei Epilepsiekranken hat. Es konnten jedoch keine signifikante Assoziation gefunden werden. Tendenziell waren heterozygote Träger von CYP2C9*2 häufiger in der Gruppe der therapieresistenten

Patienten vertreten. Individuen des homozygoten Wildtyps waren häufiger bei den leicht therapierbaren Patienten zu finden. Bei Patienten mit CYP2C9*3-Allel waren die Träger eher in der Gruppe der therapieresponsiven Individuen zu finden. Der Effekt, der durch Anwesenheit eines Polymorphismus ausgelöst wird, nämlich die reduzierte Aktivität des Enzyms, hatte also widersprüchliche Folgen. Bei Annahme eines positiven Einflusses von verminderter Enzymaktivität auf die Therapierbarkeit einer Epilepsie läge es nahe, dass sowohl CYP2C9*2 als auch CYP2C9*3 häufiger bei therapieresponsiven Patienten anzutreffen sind. Durch den langsameren Abbau des Wirkstoffes bleiben die Serumspiegel über längere Zeit im therapeutischen Bereich und führen so zu einer ausgeprägteren Antwort des Körpers. Umgekehrt ist ein ausbleibender Erfolg bei Vorhandensein mindestens eines SNPs denkbar. Wie in den Arbeiten von Ninomiya et al. und Brandolese et al. gezeigt, kann die reduzierte Aktivität des Cytochroms dazu führen, dass die Serumspiegel Werte erreichen, die zu starken Vergiftungen oder Nebenwirkungen führen können. In diesen Fällen muss das Medikament abgesetzt werden.

Eine nähere Betrachtung der verschiedenen Allelkombinationen brachte keine Ergebnisse. Die Phänotypen Excessive Metabolizer und Poor Metabolizer waren in keiner Patientengruppe überrepräsentiert.

In unserem Patientenkollektiv war der Einfluss eines SNP auf den Therapieerfolg nicht erkennbar. Dies mag mit der eher untergeordneten Rolle zu tun haben, die der Wirkstoff Phenytoin als Medikament in unserer Patientengruppe spielt.

7. Zusammenfassung

Ein Drittel aller an Epilepsie erkrankten Patienten bleibt nach Beginn einer Therapie pharmakoresistent, die zur Behandlung eingesetzten Antikonvulsiva zeigen keinen oder nur geringen Effekt oder verursachen starke Nebenwirkungen, so dass sie abgesetzt werden müssen. Trotz einer Vielzahl von neuen Medikamenten mit unterschiedlichen pharmakologischen Wirkungsweisen hat sich diese Situation in den letzten Jahren nicht bedeutend geändert. Als Erklärung für die Pharmakoresistenz rückten zunehmend zelluläre Arzneimitteltransporter in den Fokus der Forschung. Diese Transportproteine waren im Vorfeld bei der Behandlung von Tumoren entdeckt worden und bedingen einen Auswärtstransport von Medikamenten aus den Zielzellen und somit eine geringe Wirksamkeit. Die Effizienz und Exprimierung der Proteine war dabei abhängig von genetischen Polymorphismen, das heißt, dass bei Vorhandensein einer bestimmten Mutation im Genom eine veränderte Transportrate beobachtet werden konnte. Bei der Übertragung dieser Ergebnisse auf die Therapie der Epilepsie kam man zu der Annahme, dass diese genetischen Unterschiede von Transportern in der Blut-Hirn-Schranke zu einem unterschiedlich stark ausgeprägten aktiven Auswärtstransport von Antikonvulsiva aus dem Hirnparenchym führen. Insbesondere wurden in diesem Zusammenhang die ABC-Transportproteine – unter ihnen das P-Glykoprotein und MRP2 – und ihre Polymorphismen untersucht. Die Ergebnisse der durchgeführten Studien konnten allerdings bis heute keinen zweifelsfreien Beweis dafür erbringen, dass bestimmte genetische Mutationen einen Effekt auf die Transportrate von Membranproteinen haben.

Im Rahmen dieser Arbeit untersuchten wir 221 adoleszente Patienten aus pädiatrischen Einrichtungen in Kiel und Raisdorf in Hinblick auf den Zusammenhang zwischen Polymorphismen in ABCB1 und ABCC2 und dem Auftreten einer Pharmakoresistenz. Gleichzeitig interessierte uns, inwiefern genetische Unterschiede von Cytochrom CYP2C9 und die daraus resultierenden Metabolisierungsraten des Enzyms einen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit bestimmter Antikonvulsiva haben.

Die Resultate bei der Untersuchung von ABCB1 führten zu keinem signifikanten Ergebnis. Lediglich eine leichte Überrepräsentation von Trägern des varianten Allels 3435T bei erfolgreich therapierten Patienten konnte beobachtet werden.

Grundsätzlich unterschieden sich die Allelfrequenzen von 3435C>T und 2677G>T/A nicht in Hinblick auf therapieresistent und therapieresponsiv. Die Ergebnisse bekräftigen damit aktuelle vergleichbare Studien, die für diesen Polymorphismus keine große Relevanz bei der medikamentösen Behandlung der Epilepsie sehen.

Die Untersuchungen für das Cytochrom CYP2C9 lieferten ebenfalls keine statistisch signifikanten Ergebnisse. Es konnte lediglich eine vergleichsweise höhere Anzahl von heterozygoten Trägern des CYP2C9*3 Allels bei erfolgreich therapierten Patienten gezeigt werden. Obwohl in neueren Studien der Zusammenhang zwischen Polymorphismen bei CYP2C- Enzymen und gesteigerten Wirkspiegeln und der damit verbundenen erhöhten Wahrscheinlichkeit für starke Nebenwirkungen klar gegeben war, hat unsere Arbeit diese Beobachtung nicht bestätigen können. Sicherlich haben dazu die relativ geringen Fallzahlen beigetragen.

Diese Studie konnte als erste einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem ABCC2 -24T-Allel und Therapieresistenz bei der pharmakologischen Behandlung von Epileptikern nachweisen. Frühere Arbeiten zeigen, dass der SNP zu einer verminderten mRNA-Expression und zu geringeren Transportraten führt, was den Schluss zulässt, dass die Mutation zu höheren Wirkspiegeln in den Zielzellen führt und damit eigentlich einen positiven Effekt auf die Therapie haben müsste. Das in dieser Arbeit gezeigte gegenteilige Resultat könnte mit unerwünschten Medikamentenwirkungen und toxischen Reaktionen aufgrund einer Überdosierung durch fehlende Ausschleusung des Medikaments erklärt werden. Eine andere Erklärung wäre bei einer Reduktion der Transportrate des ABCC2 die zur Kompensation gesteigerte Expressionsrate eines anderen Transporters. Tatsächlich konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass die mRNA-Level für ABCB1 am höchsten bei therapieresistenten Patienten mit ABCC2-24TT-Genotyp waren.

Literatur

Abbott, N. J., Khan, E. U., Rollinson, C. M., Reichel, A., Janigro, D., Dombrowski, S. M., Dobbie, M. S. and Begley, D. J. (2002). Drug resistance in epilepsy: the role of the blood-brain barrier. Novartis Found Symp. **243**: 38-47; discussion 47-53, 180-5.

Arif, H., Buchsbaum, R., Weintraub, D., Pierro, J., Resor, S. R., Jr. and Hirsch, L. J. (2009). "Patient-reported cognitive side effects of antiepileptic drugs: predictors and comparison of all commonly used antiepileptic drugs." Epilepsy Behav **14**(1): 202-9.

Avanzini, G. and Franceschetti, S. (2003). "Cellular biology of epileptogenesis." Lancet Neurol **2**(1): 33-42.

Baltes, S., Fedrowitz, M., Tortos, C. L., Potschka, H. and Loscher, W. (2007). "Valproic acid is not a substrate for P-glycoprotein or multidrug resistance proteins 1 and 2 in a number of in vitro and in vivo transport assays." J Pharmacol Exp Ther. **320**(1): 331-43. Epub 2006 Oct 16.

Baltes, S., Gastens, A. M., Fedrowitz, M., Potschka, H., Kaefer, V. and Loscher, W. (2007). "Differences in the transport of the antiepileptic drugs phenytoin, levetiracetam and carbamazepine by human and mouse P-glycoprotein." Neuropharmacology **52**(2): 333-46.

Basic, S., Hajnsek, S., Bozina, N., Filipcic, I., Sporis, D., Mislov, D. and Posavec, A. (2008). "The influence of C3435T polymorphism of ABCB1 gene on penetration of phenobarbital across the blood-brain barrier in patients with generalized epilepsy." Seizure **17**(6): 524-30.

Basic, S., Hajnsek, S., Poljakovic, Z. and Basic, M. (2006). "Lack of association between the C3435T polymorphism in the human multidrug resistance (MDR1) gene and response to antiepileptic drug treatment." Epilepsia. **47**(2): 449; author reply 450.

- Bootsma, H. P., Ricker, L., Hekster, Y. A., Hulsman, J., Lambrechts, D., Majoie, M., Schellekens, A., de Krom, M. and Aldenkamp, A. P. (2009). "The impact of side effects on long-term retention in three new antiepileptic drugs." Seizure **18**(5): 327-31.
- Brandolese, R., Scordo, M., Spina, E., Gusella, M. and Padrini, R. (2001). "Severe phenytoin intoxication in a subject homozygous for CYP2C9*3." Clin Pharm Ther **70**(4): 391-94.
- Browne, T. R. and Holmes, G. L. (2001). "Epilepsy." N Engl J Med **344**(15): 1145-51.
- Cascorbi, I., Gerloff, T., Johne, A., Meisel, C., Hoffmeyer, S., Schwab, M., Schaeffeler, E., Eichelbaum, M., Brinkmann, U. and Roots, I. (2001). "Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects." Clin Pharm Ther **69**(3): 169-174.
- Choi, J. H., Ahn, B. M., Yi, J., Lee, J. H., Nam, S. W., Chon, C. Y., Han, K. H., Ahn, S. H., Jang, I. J., Cho, J. Y., Suh, Y., Cho, M. O., Lee, J. E., Kim, K. H. and Lee, M. G. (2007). "MRP2 haplotypes confer differential susceptibility to toxic liver injury." Pharmacogenet Genomics. **17**(6): 403-15.
- Cordon-Cardo, C., O'Brien, J. P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J. L., Melamed, M. R. and Bertino, J. R. (1989). "Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(2): 695-8.
- Daly, A. K., Aithal, G. P., Leathart, J. B., Swainsbury, R. A., Dang, T. S. and Day, C. P. (2007). "Genetic susceptibility to diclofenac-induced hepatotoxicity: contribution of UGT2B7, CYP2C8, and ABCC2 genotypes." **132**(1): 272-281.
- Dombrowski, S. M., Desai, S. Y., Marroni, M., Cucullo, L., Goodrich, K., Bingaman, W., Mayberg, M. R., Bengezi, L. and Janigro, D. (2001). "Overexpression of multiple drug resistance genes in endothelial cells from patients with refractory epilepsy." Epilepsia **42**(12): 1501-6.

- Fisher, R. S., van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P. and Engel, J., Jr. (2005). "Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)." Epilepsia **46**(4): 470-2.
- Gibbs, J. P., Adeyeye, M. C., Yang, Z. and Shen, D. D. (2004). "Valproic acid uptake by bovine brain microvessel endothelial cells: role of active efflux transport." Epilepsy Res **58**(1): 53-66.
- Giessmann, T., May, K., Modess, C., Wegner, D., Hecker, U., Zschiesche, M., Dazert, P., Grube, M., Schroeder, E., Warzok, R., Cascorbi, I., Kroemer, H. K. and Siegmund, W. (2004). "Carbamazepine regulates intestinal P-glycoprotein and multidrug resistance protein MRP2 and influences disposition of talinolol in humans." Clin Pharmacol Ther **76**(3): 192-200.
- Haenisch, S., Zimmermann, U., Dazert, E., Wruck, C. J., Dazert, P., Siegmund, S., Kroemer, H. K., Warzok, R. W. and Cascorbi, I. (2007). "Influence of polymorphisms of ABCB1 and ABCC2 on mRNA and protein expression in normal and cancerous kidney cortex." **7**(1): 56-65.
- Hegmann, E. J., Bauer, H. C. and Kerbel, R. S. (1992). "Expression and functional activity of P-glycoprotein in cultured cerebral capillary endothelial cells." Cancer Res **52**(24): 6969-75.
- Hirohashi, T., Suzuki, H., Chu, X. Y., Tamai, I., Tsuji, A. and Sugiyama, Y. (2000). "Function and expression of multidrug resistance-associated protein family in human colon adenocarcinoma cells (Caco-2)." **292**(1): 265-270.
- Hitzl, M., Drescher, S., van der, K. H., Schaffeler, E., Fischer, J., Schwab, M., Eichelbaum, M. and Fromm, M. F. (2001). "The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56+ natural killer cells." **11**(4): 293-298.
- Hoffmann, K., Gastens, A. M., Volk, H. A. and Loscher, W. (2006). "Expression of the multidrug transporter MRP2 in the blood-brain barrier after pilocarpine-induced seizures in rats." Epilepsy Res **69**(1): 1-14.

- Hoffmann, K. and Loscher, W. (2007). "Upregulation of brain expression of P-glycoprotein in MRP2-deficient TR(-) rats resembles seizure-induced up-regulation of this drug efflux transporter in normal rats." Epilepsia. **48**(4): 631-45.
- Hoffmeyer, S., Burk, O., von Richter, O., Arnold, H. P., Brockmoller, J., John, A., Cascorbi, I., Gerloff, T., Roots, I., Eichelbaum, M. and Brinkmann, U. (2000). "Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3473-8.
- Jensen, H., Sjo, O., Uldall, P. and Gram, L. (2002). "Vigabatrin and retinal changes." Doc Ophthalmol **104**(2): 171-80.
- Jette, L., Tetu, B. and Beliveau, R. (1993). "High levels of P-glycoprotein detected in isolated brain capillaries." Biochim Biophys Acta **1150**(2): 147-54.
- Jeub, M., Beck, H., Siep, E., Ruschenschmidt, C., Speckmann, E. J., Ebert, U., Potschka, H., Freichel, C., Reissmuller, E. and Loscher, W. (2002). "Effect of phenytoin on sodium and calcium currents in hippocampal CA1 neurons of phenytoin-resistant kindled rats." **42**(1): 107-116.
- Juliano, R. L. and Ling, V. (1976). "A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants." Biochim Biophys Acta **455**(1): 152-62.
- Kidd, R. S., Curry, T. B., Gallagher, S., Edeki, T., Blaisdell, J. and Goldstein, J. A. (2001). "Identification of a null allele of CYP2C9 in an African-American exhibiting toxicity to phenytoin." Pharmacogenetics. **11**(9): 803-8.
- Kim, D. W., Kim, M., Lee, S. K., Kang, R. and Lee, S. Y. (2006). "Lack of association between C3435T nucleotide MDR1 genetic polymorphism and multidrug-resistant epilepsy." Seizure. **15**(5): 344-7. Epub 2006 Mar 20.
- Kim, D. W., Lee, S. K., Chu, K., Jang, I. J., Yu, K. S., Cho, J. Y. and Kim, S. J. (2009). "Lack of association between ABCB1, ABCG2, and ABCC2 genetic

polymorphisms and multidrug resistance in partial epilepsy." Epilepsy Res **84**(1): 86-90.

Koenig, S. A., Buesing, D., Longin, E., Oehring, R., Haussermann, P., Kluger, G., Lindmayer, F., Hanusch, R., Degen, I., Kuhn, H., Samii, K., Jungck, A., Bruckner, R., Seitz, R., Boxtermann, W., Weber, Y., Knapp, R., Richard, H. H., Weidner, B., Kasper, J. M., Haensch, C. A., Fitzek, S., Hartmann, M., Borusiak, P., Muller-Deile, A., Degenhardt, V., Korenke, G. C., Hoppen, T., Specht, U. and Gerstner, T. (2006). "Valproic acid-induced hepatopathy: nine new fatalities in Germany from 1994 to 2003." Epilepsia **47**(12): 2027-31.

Kubota, H., Ishihara, H., Langmann, T., Schmitz, G., Stieger, B., Wieser, H. G., Yonekawa, Y. and Frei, K. (2006). "Distribution and functional activity of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in human brain microvascular endothelial cells in hippocampal sclerosis." Epilepsy Res **68**(3): 213-28.

Kwan, P. and Brodie, M. J. (2000). "Early identification of refractory epilepsy." N Engl J Med. **342**(5): 314-9.

Kwan, P., Sills, G. J., Butler, E., Gant, T. W., Meldrum, B. S. and Brodie, M. J. (2002). "Regional expression of multidrug resistance genes in genetically epilepsy-prone rat brain after a single audiogenic seizure." Epilepsia **43**(11): 1318-23.

Leschziner, G. D., Andrew, T., Leach, J. P., Chadwick, D., Coffey, A. J., Balding, D. J., Bentley, D. R., Pirmohamed, M. and Johnson, M. R. (2007). "Common ABCB1 polymorphisms are not associated with multidrug resistance in epilepsy using a gene-wide tagging approach." Pharmacogenet Genomics **17**(3): 217-20.

Loo, T. W., Bartlett, M. C. and Clarke, D. M. (2004). "Processing mutations located throughout the human multidrug resistance P-glycoprotein disrupt interactions between the nucleotide binding domains." J Biol Chem **279**(37): 38395-401.

- Loo, T. W. and Clarke, D. M. (2001). "Determining the dimensions of the drug-binding domain of human P-glycoprotein using thiol cross-linking compounds as molecular rulers." J Biol Chem **276**(40): 36877-80.
- Lu, Y., Yan, Y. and Wang, X. F. (2004). "Antiepileptic drug-induced multidrug resistance P-glycoprotein overexpression in astrocytes cultured from rat brains." Chin Med J (Engl) **117**(11): 1682-6.
- Mamiya, K., Ieiri, I., Shimamoto, J., Yukawa, E., Imai, J., Ninomiya, H., Yamada, H., Otsubo, K., Higuchi, S. and Tashiro, N. (1998). "The effects of genetic polymorphisms of CYP2C9 and CYP2C19 on phenytoin metabolism in Japanese adult patients with epilepsy: studies in stereoselective hydroxylation and population pharmacokinetics." Epilepsia. **39**(12): 1317-23.
- Marchi, N., Hallene, K. L., Kight, K. M., Cucullo, L., Moddel, G., Bingaman, W., Dini, G., Vezzani, A. and Janigro, D. (2004). "Significance of MDR1 and multiple drug resistance in refractory human epileptic brain." **2**: 37.
- Naesens, M., Kuypers, D. R., Verbeke, K. and Vanrenterghem, Y. (2006). "Multidrug resistance protein 2 genetic polymorphisms influence mycophenolic acid exposure in renal allograft recipients." **82**(8): 1074-1084.
- Nakamura, T., Sakaeda, T., Horinouchi, M., Tamura, T., Aoyama, N., Shirakawa, T., Matsuo, M., Kasuga, M. and Okumura, K. (2002). "Effect of the mutation (C3435T) at exon 26 of the MDR1 gene on expression level of MDR1 messenger ribonucleic acid in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects." **71**(4): 297-303.
- Nies, A. T., Jedlitschky, G., Konig, J., Herold-Mende, C., Steiner, H. H., Schmitt, H. P. and Keppler, D. (2004). "Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain." Neuroscience **129**(2): 349-60.
- Ninomiya, H., Mamiya, K., Matsuo, S., Ieiri, I., Higuchi, S. and Tashiro, N. (2000). "Genetic polymorphism of the CYP2C subfamily and excessive serum

- phenytoin concentration with central nervous system intoxication." Ther Drug Monit **22**(2): 230-2.
- Pekcec, A., Unkruer, B., Stein, V., Bankstahl, J. P., Soerensen, J., Tipold, A., Baumgartner, W. and Potschka, H. (2009). "Over-expression of P-glycoprotein in the canine brain following spontaneous status epilepticus." Epilepsy Res **83**(2-3): 144-51.
- Pleban, K., Kopp, S., Csaszar, E., Peer, M., Hrebicek, T., Rizzi, A., Ecker, G. F. and Chiba, P. (2005). "P-glycoprotein substrate binding domains are located at the transmembrane domain/transmembrane domain interfaces: a combined photoaffinity labeling-protein homology modeling approach." Mol Pharmacol **67**(2): 365-74.
- Potschka, H., Fedrowitz, M. and Loscher, W. (2002). "P-Glycoprotein-mediated efflux of phenobarbital, lamotrigine, and felbamate at the blood-brain barrier: evidence from microdialysis experiments in rats." Neurosci Lett **327**(3): 173-6.
- Potschka, H. and Loscher, W. (2001). "In vivo evidence for P-glycoprotein-mediated transport of phenytoin at the blood-brain barrier of rats." Epilepsia **42**(10): 1231-40.
- Rau, T., Erney, B., Gores, R., Eschenhagen, T., Beck, J. and Langer, T. (2006). "High-dose methotrexate in pediatric acute lymphoblastic leukemia: impact of ABCC2 polymorphisms on plasma concentrations." **80**(5): 468-476.
- Seo, T., Ishitsu, T., Oniki, K., Abe, T., Shuto, T. and Nakagawa, K. (2008). "ABCC2 haplotype is not associated with drug-resistant epilepsy." J Pharm Pharmacol **60**(5): 631-5.
- Seo, T., Ishitsu, T., Ueda, N., Nakada, N., Yurube, K., Ueda, K. and Nakagawa, K. (2006). "ABCB1 polymorphisms influence the response to antiepileptic drugs in Japanese epilepsy patients." Pharmacogenomics. **7**(4): 551-61.
- Shahwan, A., Murphy, K., Doherty, C., Cavalleri, G. L., Muckian, C., Dicker, P., McCarthy, M., Kinirons, P., Goldstein, D. and Delanty, N. (2007). "The

- controversial association of ABCB1 polymorphisms in refractory epilepsy: an analysis of multiple SNPs in an Irish population." Epilepsy Res **73**(2): 192-8.
- Siddiqui, A., Kerb, R., Weale, M. E., Brinkmann, U., Smith, A., Goldstein, D. B., Wood, N. W. and Sisodiya, S. M. (2003). "Association of multidrug resistance in epilepsy with a polymorphism in the drug-transporter gene ABCB1." N Engl J Med. **348**(15): 1442-1448.
- Siddiqui, A., Kerb, R., Weale, M. E., Brinkmann, U., Smith, A., Goldstein, D. B., Wood, N. W. and Sisodiya, S. M. (2003). "Association of multidrug resistance in epilepsy with a polymorphism in the drug-transporter gene ABCB1." N Engl J Med **348**(15): 1442-8.
- Sills, G. J., Mohanraj, R., Butler, E., McCrindle, S., Collier, L., Wilson, E. A. and Brodie, M. J. (2005). "Lack of association between the C3435T polymorphism in the human multidrug resistance (MDR1) gene and response to antiepileptic drug treatment." Epilepsia. **46**(5): 643-7.
- Sisodiya, S. M. and Thom, M. (2003). "Widespread upregulation of drug-resistance proteins in fatal human status epilepticus." Epilepsia **44**(2): 261-4.
- Srinivas, E., Murthy, J. N., Rao, A. R. and Sastry, G. N. (2006). "Recent advances in molecular modeling and medicinal chemistry aspects of phosphoglycoprotein." Curr Drug Metab **7**(2): 205-17.
- Takanashi, K., Tainaka, H., Kobayashi, K., Yasumori, T., Hosakawa, M. and Chiba, K. (2000). "CYP2C9 Ile359 and Leu359 variants: enzyme kinetic study with seven substrates." Pharmacogenetics **10**(2): 95-104.
- Tanaka, Y., Abe, Y., Tsugu, A., Takamiya, Y., Akatsuka, A., Tsuruo, T., Yamazaki, H., Ueyama, Y., Sato, O., Tamaoki, N. and et al. (1994). "Ultrastructural localization of P-glycoprotein on capillary endothelial cells in human gliomas." Virchows Arch **425**(2): 133-8.
- Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M. M., Pastan, I. and Willingham, M. C. (1987). "Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-

- glycoprotein in normal human tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(21): 7735-8.
- Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M. M., Pastan, I. and Willingham, M. C. (1989). "Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein." J Histochem Cytochem **37**(2): 159-64.
- Tishler, D. M., Weinberg, K. I., Hinton, D. R., Barbaro, N., Annett, G. M. and Raffel, C. (1995). "MDR1 gene expression in brain of patients with medically intractable epilepsy." **36**(1): 1-6.
- van der Weide, J., Steijns, L. S., van Weelden, M. J. and de Haan, K. (2001). "The effect of genetic polymorphism of cytochrome P450 CYP2C9 on phenytoin dose requirement." Pharmacogenetics **11**(4): 287-91.
- Vogelgesang, S., Kunert-Keil, C., Cascorbi, I., Mosyagin, I., Schroder, E., Runge, U., Jedlitschky, G., Kroemer, H. K., Oertel, J., Gaab, M. R., Pahnke, J., Walker, L. C. and Warzok, R. W. (2004). "Expression of multidrug transporters in dysembryoplastic neuroepithelial tumors causing intractable epilepsy." Clinical Neuropathology **23**(5): 223-231.
- Volk, H. A., Burkhardt, K., Potschka, H., Chen, J., Becker, A. and Loscher, W. (2004). "Neuronal expression of the drug efflux transporter P-glycoprotein in the rat hippocampus after limbic seizures." Neuroscience **123**(3): 751-759.
- Volk, H. A. and Loscher, W. (2005). "Multidrug resistance in epilepsy: rats with drug-resistant seizures exhibit enhanced brain expression of P-glycoprotein compared with rats with drug-responsive seizures." Brain **128**(Pt 6): 1358-68.
- Wild, J. M., Chiron, C., Ahn, H., Baulac, M., Bursztyjn, J., Gandolfo, E., Goldberg, I., Goni, F. J., Mercier, F., Nordmann, J. P., Safran, A. B., Schiefer, U. and Perucca, E. (2009). "Visual field loss in patients with refractory partial epilepsy treated with vigabatrin: final results from an open-label, observational, multicentre study." CNS Drugs **23**(11): 965-82.

Zimprich, F., Sunder-Plassmann, R., Stogmann, E., Gleiss, A., Dal Bianco, A.,
Zimprich, A., Plumer, S., Baumgartner, C. and Mannhalter, C. (2004).
"Association of an ABCB1 gene haplotype with pharmacoresistance in
temporal lobe epilepsy." Neurology **63**(6): 1087-1089.

Danksagung

An dieser Stelle danke ich allen, die es mir ermöglicht haben, meine Promotion in die Tat umzusetzen.

Herrn Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi danke ich für die Bereitstellung des anspruchsvollen und interessanten Themas sowie für das damit verbundene Angebot, diese Promotion in seinem Institut durchzuführen. Seine freundliche Art und die permanente Unterstützung haben maßgeblich dazu beigetragen, dass ich diese Arbeit am Schluss doch noch zu Ende bringen konnte.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. Mike Ufer, der mir in den Anfängen am Institut alles Wichtige für die Arbeit im Labor mit auf den Weg gegeben hat. Zudem hat er wichtige Bausteine zur Probandendatei beigesteuert und hat damit geholfen, den Grundstein für diese zu legen.

Ebenso bin ich den Herren Dres. Igor Mosyagin und Sierk Haenisch am Institut für Pharmakologie zu Dank verpflichtet, da sie mir sowohl bei inhaltlichen Fragen als auch bei den Arbeiten im Labor mit Rat und Tat zur Seite standen. Herr Dr. Mosyagin half mir besonders dabei, ein für einen Laien zügiges Arbeitstempo beim Herstellen von Reaktionsansätzen zu entwickeln.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ulrich Stephani für die freundliche Unterstützung, die mir von ihm persönlich und von seiner Klinik entgegen gebracht wurde. Erst der Zugang zu umfangreichen Patientendaten aus der Klinik für Neuropädiatrie ermöglichte diese Arbeit. Das umfangreiche Wissen Herrn Prof. Stephanis war zudem Grundlage bei der Entscheidungsfindung in vielen Detailfragen.

Herrn Priv. Doz. Dr. Rainer Boor danke ich für die Unterstützung im Norddeutschen Therapiezentrum für Epilepsie in Raisdorf, in dem die Probandendatei um wichtige Patientenfälle erweitert werden konnte. Zudem gewährte es mir einen interessanten Einblick in die nötige und aufwändige, intensive Betreuung von an schwerer Epilepsie erkrankter Menschen.

Frau Dr. Hiltrud Muhle gebührt mein Dank für ihre Bemühungen, die Probandendatei im Bezug auf Diagnose, Therapieverlauf und Resultat so detailliert und umfassend wie möglich zu gestalten, so dass diese Arbeit mit einem interessanten Ergebnis abgeschlossen werden konnte.

Ich danke Frau Marion Pauer für die Mithilfe im Labor des pharmakologischen Instituts.

Ich danke Frau Rosenfeld-Jakob im Sekretariat des pharmakologischen Instituts für die Bearbeitung jedes eventuell angefallenen, von mir verursachten Papierkrams.

Ich danke meinen Eltern für jahrzehntelange Unterstützung, ohne die ich das alles nicht geschafft hätte.

Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Die Stellen, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinne nach entnommen sind, habe ich in jedem Falle durch Angabe der Quelle als Entlehnung kenntlich gemacht.

Ort, Datum

Thies-Heinrich Jacobsen

Lebenslauf

Thies-Heinrich Jacobsen

Geboren am 13.01.1978 in Preetz

Hochschulausbildung

1998-2004 Studiengang Zahnmedizin, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Abschluss: **Staatsexamen**

Berufliche Tätigkeit

Jan. 2006 Assistenz Zahnarzt in der Zahnarztpraxis Joachim Unger, Schleswig

Jan. 2007 Assistenz Zahnarzt in der Zahnarztpraxis Dr. H.U. Albrecht, Kiel

Okt. 2008 Angestellter Zahnarzt in der Zahnarztpraxis Dr. H.U. Albrecht, Kiel

Jan. 2011 Gründung der Praxisgemeinschaft Dr. Albrecht/Jacobsen in Kiel

Schulbildung

1984-1988 Grundschule Schellhorn

1988-1997 Friedrich-Schiller-Gymnasium, Preetz

Abschluss: **Abitur**

Wehrdienst

1997-1998 Grundwehrdienst in Schleswig

Publikationen

Ufer M, Mosyagin I, Muhle H, Jacobsen T, Haenisch S, Häsler R, Faltraco F, Remmler C, von Spiczak S, Kroemer HK, Runge U, Boor R, Stephani U, Cascorbi I. [Non-response to antiepileptic pharmacotherapy is associated with the ABCC2 - 24C>T polymorphism in young and adult patients with epilepsy.](#) Pharmacogenet Genomics. 2009;19:353-62.