

Aus der ehemaligen Abteilung experimentelle und klinische Neuroimmunologie
(Prof. Dr. med. R. Gold)
im Institut für Multiple-Sklerose-Forschung
der Universitätsmedizin Göttingen

**ABC-Transporter-Gen-Polymorphismen sind
potentielle pharmakogenetische Marker der
Ansprechrate auf Mitoxantron in der Behandlung
der Multiplen Sklerose**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von Steffi Cotte
aus Leinefelde
Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. Frömmel

I. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Chan

II. Berichterstatter/-in: Prof. Dr. med. Brockmüller

III. Berichterstatter/-in: Prof. Dr. med. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Februar 2012

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Teil A: Zusammenfassung	4
1 Einleitung	4
2 Material und Methoden	8
2.1 <i>ABCB1</i> - und <i>ABCG2</i> -Genotypisierung in Multiple-Sklerose-Patienten und gesunden Kontrollpersonen und Quantifizierung der Boten-Ribonukleinsäure-Expression humaner Zellen und Gewebe.....	8
2.2 <i>In-vitro</i> -Mitoxantron-Efflux/-Zelltod-Assay in CD56 ⁺ -Zellen von Multiple- Sklerose- Patienten und gesunden Kontrollen	10
2.3 <i>In-vivo</i> -Analyse: Induktion der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis, Mitoxantron-Behandlung und Histologie.....	22
2.4 Retrospektive klinische Korrelation funktionell-relevanter Einzelbasenaustausche in <i>ABC</i> -Transportern mit der therapeutischen Mitoxantron-Ansprechrates	22
2.5 Statistische Auswertung	24
3 Ergebnisse und Diskussion.....	26
3.1 <i>ABCB1</i> - und <i>ABCG2</i> -Transporter sind hoch polymorph in Multiple-Sklerose- Populationen aus zentral-europäischer Abstammung ohne große Unterschiede im Vergleich zu gesunden Spendern	26
3.2 Verschiedene, potentiell von der Mitoxantron-Therapie beeinflusste Gewebe und Organe zeigen eine hohe <i>ABCB1</i> -/ <i>ABCG2</i> -Boten-Ribonukleinsäure-Expression.....	29
3.3 Der <i>ABCB1</i> -/ <i>ABCG2</i> -Transporter-Genotyp bestimmt <i>in vitro</i> den Mitoxantron-Efflux und den Mitoxantron-induzierten Zelltod in Multiple-Sklerose-Patienten und gesunden Spendern.....	30
3.4 Der <i>Abc</i> -Transporter-Genotyp beeinflusst die therapeutische Ansprechrates auf Mitoxantron in der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis	34
3.5 Der <i>ABC</i> -Transporter-Genotyp hat einen Effekt auf das therapeutische Ansprechen von Mitoxantron.....	34
4 Zusammenfassung	38
5 Literaturverzeichnis.....	39
Teil B: Publikation	53
Teil C: Darlegung des Eigenanteils.....	68

Abkürzungsverzeichnis

A	Amper
ABC	<i>Adenosinetriphosphate-binding-cassette</i> , Adenosintriphosphat-Bindungskassette
<i>ad.</i>	Auffüllen auf
ATP	Adenosintriphosphat
°C	Grad Celsius
CO ₂	Kohlendioxid
DEX	Dexamethason
Δ	Delta
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDSS	<i>Expanded Disability Status Scale</i> , Skala zum Status des Behinderungsgrades in Multipler Sklerose
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> , Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer, Durchflusszytometer
FCS	<i>Fresh Calf Serum</i> , frisches Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>Forward Light Scatter</i> , Vorwärtsstreulicht
g	Gramm
GS	Glukokortikosteroid
h	Stunden
Hz	Hertz
KOF	Körperoberfläche
kW	Kilowatt
m ³	Kubikmeter
mm ²	Quadratmillimeter
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorter</i>

mbar	Millibar
<i>MDR</i>	<i>Multi-Drug-Resistance</i> , Resistenz gegenüber verschiedenen Medikamenten
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
mg/m ²	Milligramm pro Quadratmeter
mg/kg	Milligramm pro Kilogramm
µg	Mikrogramm
µM	Mikromolar
min	Minuten
ml	Milliliter
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MP	Methylprednisolon
<i>mRNA</i>	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
<i>MSFC</i>	<i>Multiple Sclerosis Functional Composite</i> -Skala, klinische Verlaufsskala der Multiplen Sklerose
MX	Mitoxantron
n	Anzahl
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
ns	nicht signifikant
<i>PBS</i>	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Lösung
<i>PCR</i>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PPMS	primär progrediente Multiple Sklerose
RNS	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
<i>SNP</i>	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> , Einzelbasenaustausch

<i>SSC</i>	<i>Side Light Scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
V	Volt
x	multipliziert mit
%	Prozent
*	Stopp

Teil A: Zusammenfassung

1 Einleitung

Bereits vor mehr als 100 Jahren beschrieben Charcot, Carswell und Cruveilhier die klinischen und pathologischen Charakteristika der Multiplen Sklerose (MS) (Pearce 2005). Die MS stellt mit einem Lebenszeitrisiko von eins zu 400 die potentiell häufigste, behindernde, neurologische Erkrankung im jungen Erwachsenenalter dar (Compston und Coles 2008, Flachenecker 2006). Insbesondere aufgrund histopathologischer und tierexperimenteller Befunde wird die MS als eine chronische autoimmune Erkrankung angesehen.

Pathogenetisch führen initial autoimmun-entzündliche Prozesse wie fokale Infiltrationen aus Lymphozyten und Makrophagen im zentralen Nervensystem (ZNS) zu einer Demyelinisierung wie von Compston und Coles (2008) und Noseworthy et al. (2000) zusammengefasst. Es kommt zur Schädigung des Axons und Bildung astrozytischer Narben. Zu Beginn ist die Entzündungsreaktion transient und eine Remyelinisierung findet statt, die jedoch nicht dauerhaft ist.

Die Ätiologie ist vermutlich multifaktorieller Genese. So ist die individuelle genetische Prädisposition neben dem Einfluss von Umweltfaktoren bedeutsam (Compston und Coles 2008, Kenealy et al. 2003).

Die Symptome der MS variieren in Abhängigkeit der Lokalisation der entzündlichen Plaques im ZNS und sind wie diese definitionsgemäß zeitlich und örtlich disseminiert (Frohman et al. 2006, Polman et al. 2005). Sie umfassen häufig eine Optikusneuritis, motorische Beeinträchtigungen, Harnblasenfunktionsstörungen und sexuelle Dysfunktionen und eine Ataxie (Keegan und Noseworthy 2002). Die hohe klinische Vielfältigkeit spiegelt sich in verschiedenen Verlaufsformen der Erkrankung wider sowie in definierten molekular-pathologisch abgrenzbaren Subtypen (Frohman et al. 2006, Keegan und Noseworthy 2002, Lublin und Reingold 1996, Lucchinetti et al. 2000).

Die bisher überwiegend evidenzbasierte und neuroimmunologische Therapie zielt auf die besondere Bedeutung autoimmun-entzündlicher Prozesse in der Pathogenese der MS ab (Hemmer et al. 2006, MSTKG et al. 2008). Pharmakologisch-therapeutische Herangehensweisen basieren auf folgenden Prinzipien: neben der Akut-/Schubtherapie und der symptomatischen Behandlung bilden verlaufsmodifizierende Langzeittherapien die Hauptmöglichkeiten (MSTKG und Rieckmann 2006). Ansätze für eine individualisierte Therapie anhand von Surrogatparametern oder genetischen Profilen erscheinen besonders erstrebenswert.

Mitoxantron (MX) ist ein antineoplastisches Anthrazendionderivat und ein hocheffektives, immunoaktives Agens in der Behandlung der aktiven MS (Durr et al. 1983, Hartung et al. 2002). Neben der onkologischen Indikation dient MX als evidenzbasierte Eskalationstherapie in der MS. Die Anwendung ist begrenzt auf klinisch hoch aktive schubförmige und sekundär-progrediente Verläufe, im Fall von Versagen oder Intoleranz gegenüber vorangegangenen immunmodulatorischen Behandlungen. Darüber hinaus ist es als Therapeutikum der ersten Wahl für maligne MS-Formen zugelassen (Boster et al. 2008, Esposito et al. 2010, Gonsette 2007, Hartung et al. 2002, Rieckmann 2006).

Neben anderen fassten Neuhaus et al. (2007) die funktionellen Effekte von MX zusammen: MX führt zur Hemmung der Nukleinsäuresynthese. Einerseits interkaliert es mit der Desoxyribonukleinsäure (DNS) und verursacht andererseits über eine Interaktion mit der Topoisomerase II Einzel- und Doppelstrangbrüche. Darüber hinaus wirkt MX immunsuppressiv, indem es die Proliferation und Funktion von B- und T-Zellen sowie von Makrophagen beeinflusst (Neuhaus et al. 2005). Kopadze et al. beobachteten bereits 2006, dass MX die Migration inflammatorischer Zellen in das ZNS und direkt im ZNS senken kann. Weiterhin moduliert MX das Zytokin-Netzwerk und hemmt gamma-Interferon, Tumornekrosefaktor-alpha und Interleukin 2 und 10 (Fidler et al. 1986).

Wie bei anderen Anthrazyklin-verwandten Substanzen ist die Therapiedauer mit MX insbesondere durch die Kardiotoxizität bei circa 0.1% der Patienten auf zwei bis drei Jahre limitiert (Ghalie et al. 2002). Es besteht eine Assoziation der Nebenwirkungen mit der kumulativen Dosis. Deshalb ist derzeit die MX-Therapie bis zu einer kumulativen Gesamtdosis von 140 mg/m^2 Körperoberfläche unter engmaschiger kardiologischer Kontrolle zugelassen. Dabei handelt es sich um eine maximal erlaubte Gesamtdosis während der Lebenszeit (Cohen und Mikol 2004). Das Risikoprofil umfasst außerdem eine Knochenmarksdepression, eine therapieassoziierte akute Leukämie und eine gonadale Dysfunktion. Laut einem Report des therapeutischen und technologischen Untersuchungs-Subkomitees der Amerikanischen Akademie für Neurologie (2010) ist die Gefahr einer systolischer Dysfunktion mit circa 12% und einer Leukämie mit 0.8% sogar höher als bisher angenommen (Marriott et al. 2010). Trotz der limitierten Anwendungsdauer erleiden einige Patienten bereits bei niedrigen Dosierungen kardiale oder hämatologische Nebenwirkungen. Es wurden auch Spätmanifestationen mehrere Jahre nach Abschluss der Therapie beschrieben (Morrissey et al. 2005, Paul et al. 2007). Im Gegensatz dazu sprechen einige Patienten im klinischen Alltag nur unzureichend auf eine hohe MX-Dosierung an. Prädiktoren, die eine Optimierung, eine individualisierte Dosierung und Risikostratifizierung, aber auch eine bessere Verträglichkeit dieser hochwirksamen Therapie ermöglichen, könnten potentiell zu längeren Behandlungsintervallen führen (Kieseier und Jeffery 2010). Das ist ein wichtiges Ziel, da bisher noch über evidenzbasierte Strategien nach der Ausschöpfung der kumulativen Lebenszeitdosis von MX und der Fortführung einer Immuntherapie debattiert wird (Boster et al. 2008, Gold und Rieckmann 2007).

Potentielle Kandidaten für solche Prädiktoren könnten Mitglieder der Adenosintriphosphat-Bindungskassette (*Adenosinetriphosphate-binding cassette, ABC*)-Transporter-Genfamilie sein, die zum Detoxifikationssystem des menschlichen Körpers gehören (Schinkel und Jonker 2003). Sie stellen einen pleiotropen *Multi-Drug-Resistance (MDR, Resistenz gegen verschiedene Medikamente)*-Mechanismus dar, der die Zellen vor endo- und exogenen toxischen Substanzen schützt. Dieses wird über einen energieabhängigen Efflux gegen einen Konzentrationsgradienten ermöglicht (Higgins 1992, Sarkadi et al. 2004, Schinkel und Jonker 2003).

Die weit verbreiteten, primär in der apikalen Plasmamembran lokalisierten Transporter erlangen eine besondere Bedeutung im ZNS, aber auch in sekretorischen Organen wie der Leber oder im kapillaren Endothel von beispielsweise Herz und Testis (Cascorbi 2006, Gottesman et al. 2002, Homolya et al. 2011, Schinkel und Jonker 2003).

Die *ABC*-Proteine bestehen aus einer einzelnen Polypeptidkette (ganzer Transporter) oder aus zwei separaten Proteinen (Halbtransporter), die sich zusammenlagern müssen, um eine funktionelle Aktivität zu erlangen. Sie setzen sich in der funktionell aktiven Einheit aus mindestens vier Domänen zusammen: zwei ATP-Bindungskassetten und zwei transmembranäre Anteile. Wenn ATP bindet, dimerisieren zwei ATP-Bindungskassetten. Die Hydrolyse von ATP zu ADP stellt Energie zur Dissoziation der Kassetten zur Verfügung. Mit einem Wechsel/*Switch* der transmembranären Domäne wird der Medikamenten-Efflux herbeigeführt (Hermann et al. 2006, Ni et al. 2010).

Die *ABC*-Transporter regulieren den Transport von strukturell verschiedenen Stoffen. Dadurch kontrollieren sie wichtige pharmakologische Eigenschaften, wie die orale Bioverfügbarkeit sowie die hepatobiliäre, intestinale und renale Elimination (Gottesman et al. 2002, Schinkel und Jonker 2003). Löscher und Potschka (2005) und Hermann et al. (2006) fassten zusammen, dass es bei unterschiedlichen neurologischen Erkrankungen zur Steigerung der *ABC*-Transporter-Expression im ZNS kommen kann, wie zum Beispiel bei der Schizophrenie, Depression, Epilepsie und bei zerebralen Ischämien oder ZNS-Karzinomen. Daraus resultierte ein schlechtes Ansprechen auf die entsprechende medikamentöse Behandlung. Weiterhin berichten sie, dass im Maus-Modell eine Deaktivierung der *ABC*-Transporter zu einer erhöhten Akkumulation von diversen Medikamenten führte. Aktuell haben sich tierexperimentell in der Behandlung der Depression erste Erfolge bei der Steigerung der Medikamenten-Effektivität unter Inhibition des *ABC*-vermittelten Effluxes ergeben (Uhr et al. 2008).

Ein gut bekannter *ABC*-Transporter ist das P-Glykoprotein, das in überexprimierenden, Chemotherapie-resistenten Krebszellen identifiziert wurde. Dieser durch das *ABCB1*-Gen kodierte Transporter steht in Verbindung mit einer Resistenz gegen Medikamente wie MX (Juliano und Ling 1976, Marzolini et al. 2004, Roninson et al. 1986, Shen et al. 1986). Daneben beeinflusst es als immunmodulierendes Molekül die Funktion dendritischer Zellen (Kooij et al. 2009). Eine nicht P-Glykoprotein-vermittelte Resistenz gegen hohe MX-Dosen

fürte in den frühen 1990er Jahren zur Entdeckung eines neuen Efflux-Transporters. Drei Gruppen klonierten unabhängig voneinander das heute als *ABCG2* bezeichnete Gen (Robey et al. 2007). Doyle et al. entdeckten es 1998 als Brustkrebs-Resistenz-Protein (*breast cancer resistance protein, BRCP*), Allikmets et al. beschrieben im selben Jahr das Plazenta-spezifische *ABC*-Protein (*ABCP*) und ein Jahr später nannten es Miyake et al. *MX*-Resistenz-Protein (*MRP*).

Die *ABCB1*- und *ABCG2*-Transporter überlappen sich in ihrer Lokalisation und Substratspezifität (Leslie et al. 2005). Es wurden verschiedene Einzelbasenaustausche (*Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs*) in der kodierenden Sequenz der *ABC*-Transporter beschrieben, die Einfluss auf die Transporterfunktion haben.

In Voruntersuchungen konnte *ex vivo* ein präferentieller Zelltod in $CD19^+$ -B-Zellen von *MX*-behandelten MS-Patienten beobachtet werden mit relativ geringeren Zelltodraten in $CD56^+$ -Natürlichen-Killer-Zellen. Diese relative Selektivität in der Induktion vom B-Zelltod wird als ein wesentlicher immunologischer Wirkmechanismus der *MX*-Therapie diskutiert (Chan et al. 2005). Darüber hinaus wurde in diesen Untergruppen peripherer Blut-Leukozyten eine unterschiedliche *ABC*-Transporter-Boten-Ribonukleinsäure (*messenger ribonucleic acid, mRNA*)-Expression beobachtet (Scharenberg et al. 2002). Es zeigte sich eine höhere Expression auf $CD56^+$ -Zellen als auf unsortierten mononukleären Zellen und deutlich mehr im Vergleich zu $CD19^+$ -B-Zellen. Darauf basierend entwickelten wir die Hypothese, dass die *ABC*-Transporter-Funktion in eine unterschiedliche *MX*-Suszeptibilität involviert sein könnte. Dieser Effekt könnte sich nicht nur auf zellulärer Ebene, sondern auch auf den Gesamtorganismus auswirken.

In der vorliegenden Analyse untersuchten wir die Prävalenz und den funktionellen Einfluss von *ABCB1*- und *ABCG2*-*SNPs* in MS-Patienten mit verschiedenen genetischen Hintergründen. Es wurde eine retrospektive, multizentrische Prüfung durchgeführt. Der Einfluss der *ABCB1*- und *ABCG2*-*SNPs* auf die klinische und paraklinische Ansprechrate sowie die Nebenwirkungen der Behandlung mit *MX* beziehungsweise einer Kombination von *MX* mit Glukokortikosteroiden (*GS*) wurde untersucht. Die Ergebnisse werden durch experimentelle Daten unterstützt. Es wurde *in vitro* der Einfluss der Transporteraktivität auf die *MX*-Akkumulation in peripheren mononukleären Leukozyten von MS-Patienten und Probanden analysiert. In *in-vivo*-Experimenten in *Abcg2-Knock-Out*-Tieren wurde ebenfalls die Rolle des *ABCG2*-Transporters auf die *MX*-Therapie untersucht in der chronischen experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (*EAE*), die ein etabliertes Tiermodell der MS darstellt.

2 Material und Methoden

2.1 *ABCB1*- und *ABCG2*-Genotypisierung in Multiple-Sklerose-Patienten und gesunden Kontrollpersonen und Quantifizierung der Boten-Ribonukleinsäure-Expression humaner Zellen und Gewebe

Die Genotypisierung von 832 MS-Patienten aus drei deutschen Kliniken (MS-Ambulanz, Universitätsmedizin Göttingen, Göttingen, Anzahl (n)=166; Abteilung Neurologie, Universität Rostock, Rostock, n=423; Abteilung Neurologie, Marianne Strauß Klinik, Berg, n=194) und einem spanischen Zentrum (Abteilung Neurologie, *Hospital Universitari Vall d'Hebron*, Barcelona, n=49) wurde nach schriftlicher Patientenzustimmung entsprechend der Deklaration von Helsinki und Zustimmung der lokalen Ethikkommission durchgeführt. Kontrollproben wurden von Blutspendern der lokalen Blutbank (Blutspendedienst, Universitätsmedizin Göttingen, Göttingen, n=191) (von Ahsen et al. 2000) und von Freiwilligen (Göttingen, Bochum n=73) ohne Anamnese einer neurologischen Erkrankung bezogen.

Für die Genotypisierung wurde genomische DNS aus 5ml Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Blut isoliert unter Verwendung des *Puregene DNA Purification Kits* entsprechend den Herstellerangaben. Folgende *SNPs* wurden untersucht: Für *ABCG2* fokussierten wir uns auf V12M, Q141K, Q126* (*=Stopp), E334*, R482G, R482T und für *ABCB1* auf 3435C>T und 2677G>T (Tabelle 1). Sie wurden vorhergehend in Populationen mit unterschiedlichem ethnischen Hintergrund identifiziert und als funktionell-relevant beschrieben (Bosch et al. 2005, Mizuarai et al. 2004, Sakaeda et al. 2003, Schwab et al. 2003). Die *TaqMan*TM Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction, PCR*) wurde für *ABCG2*-V12M (Referenz *SNP* rs2231137) und -Q141K (rs2231142) auf einem 7500 *Real Time PCR System* (*Applied Biosystems*, Darmstadt, Germany) durchgeführt unter Verwendung des *Platinum qPCR Super Mix-UDG* (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). Der *SNP ABCB1*-3435C>T (rs1045642) (ganze Kohorte) und -2677G>T (MX-behandelte Kohorte, rs2032582) wurde mit einem *LightCycler Realtime PCR*-System analysiert unter Zuhilfenahme von Hybridisierungsproben wie in von Ahsen et al. (2001) vorbeschrieben.

Tabelle 1: Oligonukleotide zur Identifizierung von Einzelbasenaustauschen in ABCB1- und ABCG2-Genen und Primer zur Quantifizierung der Expression der Boten-Ribonukleinsäure

Die polymorphen Nukleotide sind unterstrichen. * bedeutet Stopp.

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')
ABCB1-Transporter	
3435C>T vorwärts	CTCTGGTGGCCAGAAACAAC
3435C>T rückwärts	GGTGAGCAATCACAATGCAG
2677G>T vorwärts	AGCAAATCTTGGGACAGGAAT
2677G>T rückwärts	TCAATCTTTAGTTTACTCACCTT
2677G>T Probe 1	TCTTATCTTTCAGTGCTTGTCCAGAC-ROX
2677G>T Probe 2	Fluorescein-CCAGCACCTTCTAGTTCT-Phosphat
ABCG2-Transporter	
V12 vorwärts	AACTCTCCAGATGTCTTCCAGTAATG
V12 rückwärts	TTAACACAGCTCCTTCAGTAAATGC
V12 Wildtyp	FAM-TATCCCA <u>G</u> TGTCACAAG-MGB
V12M	VIC-TTTATCCCA <u>A</u> TGTCACAAG-MGB
Q126 vorwärts	CGACCTGCCAATTTCAAATGTA
Q126 rückwärts	TTACCCATATAGAAACAGAGGAAACAGA
Q126 Wildtyp	FAM-TACGTGGT <u>A</u> CAAGTAAGTA-MGB
Q126*	VIC-TACGTGGT <u>A</u> TAAGTAAGTAT-MGB
Q141 vorwärts	GATGATGTTGTGATGGGCACTCT
Q141 rückwärts	CATAGTTGTTGCAAGCCGAAGAG
Q141 Wildtyp	FAM-AGAAA <u>A</u> CTTACAGTTCTCAG-MGB
Q141K	VIC-AGAAA <u>A</u> CTTAAAGTTCTCAGCAG-MGB
E334 vorwärts	CCAAGCAGGATAAGCCACTCA
E334 rückwärts	TCAGCTTTTGTCTCTTTGTAGAAGGA
E334 Wildtyp	FAM-TTAGCG <u>G</u> AGATTTAT-MGB
E334*	VIC-AATTAGCG <u>T</u> AGATTTATGTCA-MGB

R482 vorwärts	CTACAGAGTGTCATCTTATTTTCCTTGGA
R482 rückwärts	TGTCCTTTTTTGTGTTTACATACTTACC
R482 Wildtyp	FAM-ATTACCCATGAGGATGTT-MGB
R482G	VIC-CCCATGGGGATGTT-MGB
R482T	VIC-TTACCCATGACGATGTT-MGB
Kontrollprobe	
RNA-Polymerase II vorwärts	GCACCACGTCCAATGACAT
RNA-Polymerase II rückwärts	GTGCGGCTGCTTCCATAA

Die Quantifizierung der *ABCB1*- und *ABCG2*-mRNA-Expression erfolgte in verschiedenen humanen Zellen und Geweben. Nach der Isolation der Ribonukleinsäure (RNS) und der reversen Transkription (Chan et al. 2003, Kruse et al. 2001) erfolgte die relative Quantifizierung der *ABC*-mRNA-Expression unter Verwendung der $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Δ delta) (Livak und Schmittgen 2001). Für die Bestimmung der *ABCG2*-mRNA-Expression wurde der *QuantiTect Primer Assay Hs_ABCG2_SG_1* in Kombination mit dem *QuantiTect SYBR Green PCR Kit* verwendet. Mit Hilfe der *Platinum qPCR Super Mix-UDG* und *SYBR Green* wurde *ABCB1*- und die RNS-Polymerase-II-mRNA-Expression analysiert. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 1 detailliert aufgeführt. Die mRNA der RNS-Polymerase II diente als endogene Kontrolle (Radonić et al. 2004). Als Kalibratorprobe wurde die humane epitheliale Brustkrebs-Zelllinie MCF7 mit stabiler *ABC*-mRNA-Expression herangezogen.

2.2 *In-vitro*-Mitoxantron-Efflux/-Zelltod-Assay in CD56⁺-Zellen von Multiple-Sklerose-Patienten und gesunden Kontrollen

Der *in-vitro*-MX-Efflux/-Zelltod-Assay basiert auf der Messung des fluoreszenten, intrazellulären MX im Durchflusszytometer (Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer, *Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS*) unter Verwendung eines 635nm Lasers mit einer roten Diode und einem 670nm Bandbreitenfilters (Chan et al. 2005). Mit dieser Methode wird die gleichzeitige Erfassung von Größe (Vorwärtsstreulicht, *Forward Light Scatter, FSC*), Granularität (Seitwärtsstreulicht, *Side Light Scatter, SSC*) und Fluoreszenzfarben ermöglicht. Der Assay wurde in *ABCB1*- und *ABCG2*-hochexprimierenden CD56⁺-Zellen durchgeführt (Chaudhary et al. 1992, Klimecki et al. 1994, Scharenberg et al. 2002).

2.2.1 Material, *Software* und entsprechende Bezugsquelle

Chemikalien, Färbemittel und Inhibitoren

Albumin Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Annexin-V-FITC	Roche Biochemica, Mannheim, Deutschland

Calciumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dexa-Ratiopharm (Dexamethason-dihydrogenphosphat-Dinatrium)	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat (Titrierkomplex 3)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
fetal-bovines Serum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
HEPES	Invitrogen (Gibco), Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lymphozyten-Separationsmedium (LSM 1077)	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
Mitoxantron	Gry Pharma, Kirchzarten, Deutschland
Natriumazid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natrium-Hydrogencarbonat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<i>Insteamed Medium</i> RPMI 1640	Gibco BRL, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>SYBR Green</i>	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Trypan-Blau-Lösung	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
Urbason soluble (Methylprednisolon-21-hydrogensuccinat)	Sanofi-Aventis, Frankfurt, Deutschland

Tabelle 2: Hemmstoffe der ABC-Transporter (¹Robey et al. 2007, ²Schinkel und Jonker 2003, ³González-Lobato et al. 2010)

Hemmstoff	Transporter-Spezifität	Konzentration im <i>in-vitro</i> -Assay	Wirkmechanismus	Bezugsquelle
Elacridar/ GF120918	ABCB1 ABCG2	2.5µM	ABCB1 und ABCG2 Substrat, Konverter ^{1,2}	Glaxo Smith Kline, Collegeville, PA, USA
PSC-833/ Valspodar/ PKF215-833	ABCB1	2.5µM	ABCB1 Substrat (hohe Affinität, langsamer Transport und Freilassung) ²	Novartis, Basel, Schweiz
FTC/ Fumitremorgin C	ABCG2	10µM	Hemmung der ATPase-Aktivität ^{1,2,3}	Alexis Biochemicals, Lörrach, Deutschland

Antikörper

Monoklonaler Antikörper Maus-anti-human CD56⁺ (PE-konjugiert, Klon B159, Maus IgG1κ)
BD PharMingen, San Diego, CA, USA

Monoklonaler Antikörper Maus-anti-human CD56⁺ MicroBeads (Maus IgG1)
Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

Monoklonaler IgG-Isotyp-Standard (PE-konjugiert, Klon MOPC-21, Maus IgG1κ)
BD PharMingen, San Diego, CA, USA

Lösungen, Puffer und Medien

Annexin-V-Puffer

1ml 1M HEPES/NaOH

10ml 1.4M NaCl

0.5ml 1M CaCl₂

ad. 100ml H₂O bidestilliert

pH-Wert 7.4

1M CaCl₂

11.1g CaCl₂

ad. 100ml H₂O bidestilliert

FACS-Puffer

1xPBS

0.1% BSA

0.1% Natriumazid

Lymphozyten-Separationsmedium

Fertiglösung

MACS-Puffer

500ml 1xPBS

0.5% Bovines Serum Albumin

2mM EDTA

pH-Wert 7.2

1.4M NaCl

8.18g NaCl

ad. 100ml H₂O bidestilliert

10xPBS

400g NaCl

10g KCl

71g Na₂HPO₄

69g NaH₂PO₄·xH₂O

ad. 5000ml H₂O bidestilliert

pH-Wert 6.7

RPMI 1640, 10% FCS

41.6 g *Insteamed Medium* RPMI 1640

22g NaHCO₃

ad. 10ml H₂O bidestilliert

pH-Wert 7.4 (Einstellung mit NaOH oder HCl)

10% inaktiviertes FCS (bei 56°C für 30min im Wasserbad erwärmen)

Kits

<i>ABCG2-mRNA-Expression QuantiTect Primer Assay Hs_ABCG2_SG_1</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>Platinum qPCR SuperMix-UDG</i>	Invitrogen (Gibco), Karlsruhe, Deutschland
<i>Puregene DNA Purification Kit</i>	Genra System, Minneapolis, MN, USA
<i>QuantiTect SYBR Green PCR</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland

Geräte

Bunsenbrenner (Typ: Flammy S)	Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen, Deutschland
Durchflusszytometer (Typ: BD FACSCalibur, Basic 4-Color Flow Cytometer)	BD Immuncytometry Systems, San Jose, CA, USA
Kälttruhe (Typ: Liebherr Premium Kombi, Kühl- und Gefriereinheit -80°C)	Liebherr Hausgeräte, Ochsenhausen, Deutschland
Kohlendioxid-Brutschrank (Modellnummer 300M)	MMM-Group, Planegg, Deutschland
Kühlgerät (Typ: Liebherr Premium Kombi, Kühl- und Gefriereinheit -20°C)	Liebherr Hausgeräte, Ochsenhausen, Deutschland
Phasenkontrastmikroskop	Carl Zeiss AG, Deutschland
<i>LightCycler realtime PCR-System</i>	Roche Biochemicals, Mannheim, Deutschland
<i>7500 RealTime PCR-System</i>	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Sterilbank (Typ: Hera Safe)	Kendro, Langenselbold, Deutschland
Vacuum-Pumpsystem (Typ: BVC 21, 1.9m ³ /h, 100mbar, 230V, 50/60Hz, 1.1A)	Vacuubrand, Wertheim, Deutschland
Vortex-Genie (Typ: G-560E, 230/240 V, 0.5 A, 50Hz)	Schütt Labortechnik, Heidelberg, Deutschland
Wasserbad (Typ: A100, 230V, 50/60Hz, 1.6kW)	Lauda, Lauda-Königshofen, Deutschland
Wasser-Bidestgerät (Typ: Destamat)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge (Typ: Multifuge 1S-R, kinetische Energie: 34.3kJ, Leistung: 1.52kW)	Kendro, Langenselbold, Deutschland

Labormaterialien

Combitips plus (0.5ml, 1ml, 2.5ml, 5ml, 10ml)	Eppendorf-Netheler GmbH, Hamburg, Deutschland
Desinfektionsspray	Braun, Melsungen, Deutschland
EDTA-Monovetten (9ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Einmalpipetten (serologisch, 5ml, 10ml, 25ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
FACS-Rundboden-Falkon (Polystyrol, 5ml)	BD Falkon, Schütt Labortechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland
Gewebekulturplatte (6-Loch, 24-Loch)	Cellstar, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Gewebekulturschale (60x15mm, 100x20mm)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Handschuhe (aus Nitril, Typ: Nitra-TEX EP)	Ansell, München, Deutschland
Handschuhe (Peha-soft (puderfrei))	Hartmann, Heidenheim, Deutschland
Kanister (Typ: Behroplast)	Behr-Labortechnik, Düsseldorf, Deutschland
Kanülen mit Adapter (Typ: Multifly)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<i>MACS-Multi Stand</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
<i>MACS-Separationssäulen (MS, LS)</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
<i>Mini-MACS-Separationseinheit</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Neubauer-Zählkammer (0.100MM, 0.0025mm ²)	Optik Labor, Friedrichsdorf, Deutschland
Papiertücher (Typ: Cloths-Quarter Fold Pack/ Wypall X70)	Kimberly-Clark (Professional), Koblenz, Deutschland
Parafilm (10cmx38m)	Pechiney (Plastic Packaging), Chicago, IL, USA
Pasteur-Pipette	Hirschmann EM, Eberstadt, Deutschland
Pipetten (Glas, 5ml, 10ml, 20ml)	Hirschmann EM, Eberstadt, Deutschland
Pipetten (serologisch, 5ml, 10ml)	BD Falkon, Schütt Labortechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland

Pipettierhilfe (Typ: Pipetboy acu)	Integra Bioscience GmbH, Fernwald, Deutschland
Pipettierhilfe (Typ: Dispenser Multipette [®] plus)	Eppendorf-Netheler GmbH, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitze (10µl, 200µl, 1000µl Hubvolumen)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Falkon-Ständer	BD Falcon, Schütt Labortechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland und Eppendorf-Netheler GmbH, Hamburg, Deutschland
Rollenpflaster (Typ: Leukoplast)	BSN medical, Hamburg, Deutschland
Schraubflaschen (vierkantig, weithalsig, aus Kalk-Soda-Glas, 100ml, 250ml, 500ml, 1000ml)	Schott Duran, Wertheim/ Main, Deutschland
Stauschlauch	Prämeta, Troisdorf, Deutschland
Steril-Filter Steritop (0.22µm, GP Express PLUS Membrane)	Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland
<i>Timer</i>	Oregon Scientific, Neu-Isenburg, Deutschland
Vacutainer CPT/Na-Citrat	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Zentrifugenfalkon (15ml, 50ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugen Falkon (Typ: Safe-Lock Tubes, 1.5ml, 2ml)	Eppendorf-Netheler GmbH, Hamburg, Deutschland

Software

<i>BD-Cell Quest Pro-Software</i> (Version: 348193)	BD Immuncytometry Systems, San Jose, CA, USA
<i>Graph Pad Prism 4-Software</i>	Graph Pad Software Inc., CA, USA
<i>Microsoft Office Professional Edition 2003</i>	Microsoft, Deutschland
<i>SDS-Sequence Detection-Software</i> (Version: 1.2, 7500 System SDS Software)	Applied Biosystem, Foster City, CA, USA
<i>Win MDI</i> (Version: 2.8)	Windows Multiple Document Interface
<i>SPSS</i> (Version: 16.0)	SPSS GmbH Software, München, Deutschland

2.2.2 Zellseparation der humanen CD56⁺-Zellen

Es wurde darauf geachtet, dass die Spender zum Zeitpunkt der Blutentnahme stets infektfrei waren und zuvor keine Medikamente eingenommen hatten. Die CD56⁺-Zellen wurden aus 10ml EDTA-Blut isoliert unter Zuhilfenahme der Ficoll-Hypaque-Technik für die Separation von mononukleären Zellen (Lymphozyten-Separationsmedium LSM 1077, PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich). Im Anschluss wurde das MACS-Verfahren (*Magnetic Activated Cell Sorter*) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben angewendet (Geiselhart et al. 1996-1997).

Die Ficoll-Hypaque-Isolation stellt eine mögliche Technik für die Separation von mononukleären Zellen aus Vollblut dar und trennt die Zellen über einen Flüssigkeits-Dichte-Gradienten mit Hilfe eines Mediums aus Ficoll und Natrium-Metrisoat- oder Natrium-Diatrisoat-Lösung (Böyum 1968, Fotino et al. 1971, Ting und Morris 1971). Für die Aufreinigung der mononukleären Zellen wurde das antikoagulierte Blut aus einer 10ml EDTA-Monovette in ein mit 10ml 1xphosphatgepufferter Salzlösung (*Phosphate Buffered Saline, PBS*) befülltes 50-ml-Falkon-Röhrchen gegeben. 10ml Trennmedium wurden vorsichtig unter das Gemisch geschichtet. Beim Pipettieren des Blutes wurden stets Einmal-Pipetten verwendet. Das Gemisch wurde für 20min bei 1600rpm (*rounds per minute*, Umdrehungen pro Minute) und 20°C zentrifugiert, wobei zur besseren Schichtausbildung die Zentrifugenbremse ausgestellt wurde. Der hohe Zuckergehalt des Trennmediums bewirkte das Absetzen der Erythrozyten, da diese aufgrund der eisenhaltigen Häm-Gruppe schwerer sind als die anderen Blutzellen. Die obere, gelbe Schicht setzte sich aus dem Blutplasma zusammen, die zur Hälfte verworfen wurde, gefolgt von einer grauen Interphase, in der sich die mononukleären Zellen befanden. Darunter bildete das Trennmedium eine milchig, weiße Phase aus, unter der sich die rot-schwarze Schicht der Erythrozyten befand. Bei genauerer Betrachtung konnte man direkt auf der Erythrozytenschicht eine weitere, sehr dünne, weiß-graue Schicht erkennen, die die Granulozyten enthielt. Die Schicht der mononukleären Zellen wurde mit einer 5ml Einmal-Pipette vorsichtig und möglichst ohne das zytotoxische Ficoll abgetragen und in ein 50-ml-Falkon-Röhrchen überführt. Im Anschluss an zwei Reinigungsschritte wurde die Zellsuspension auf 2×10^6 Zellen pro Milliliter RPMI (Roswell Park Memorial Institut) 1640/10% FCS (*Fresh Calf Serum*, frisches Kälberserum)-Medium verdünnt und auf Eis beziehungsweise in Gewebekulturplatten (24-Loch, 1×10^6 Zellen pro Loch) im CO₂- Brutschrank gelagert. Als Variation wurde 15ml steriles 1xPBS mit frischem Blut aus zwei EDTA-Monovetten vermischt und mit 12ml Lymphozytenseparationsmedium unterschichtet.

Zur Trennung der Zellen für die Quantifizierung der *ABCBI*- und *ABCG2-mRNA*- Expression wurden die BD-Vacutainer-CPT-Zellpräparation-Falkons mit Natriumcitrat verwendet. Diese kombinieren ein Blut-Sammel- Falkon, das Citrat als Antikoagulanzen enthält, mit einem Ficoll-Hypaque-Medium, das durch eine Polyester-Gel-Barriere separiert wird. Nach der Blutentnahme in das Falkon wurde dieses innerhalb von zwei Stunden entsprechend den Herstellerangaben zentrifugiert und aufgearbeitet.

Zur Isolation der *ABCBI*- und *ABCG2*-hochexpmierenden $CD56^+$ -Zellen wurde das *MACS*-Verfahren (*Magnetic activated cell sorter*) entsprechend den Herstellerangaben angewendet. 10^7 mononukleären Zellen wurden in 1ml *MACS*-Puffer gereinigt. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Zellplättchen in 1-2ml *MACS*-Puffer resuspendiert und erneut für 10min bei 300xg (Erdsanziehungskraft) und 4°C zentrifugiert. Je 10^7 Zellen wurden in 80µl *MACS*-Puffer resuspendiert und mit 20µl *Micro-beads* für 15min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach zwei Reinigungsschritten in 1-2ml *MACS*-Puffer für 10^7 Zellen und einer erneuten Zentrifugation (300xg, 10min, 4°C) wurden 10^7 Zellen in 500µl *MACS*-Puffer resuspendiert. Zwischenzeitlich wurde das *MACS-Multi Stand* mit Magnet und Säule aufgebaut. Die Säule wurde mit 500µl *MACS*-Puffer durchspült und der Überstand in ein darunter befindliches 50-ml-Falkon-Röhrchen aufgefangen. Im Anschluss wurde die Zellsuspension auf die Säulen pipettiert, wobei die mit *Micro-beads*-markierten Zellen in der Säule hängen blieben. Nach drei weiterem Durchspülungen der Säulen mit 500µl *MACS*-Puffer wurde diese von der Wand entfernt und in ein 15-ml-Falkon-Röhrchen gestellt. Mit 1000µl Puffer und unter zur Hilfenahme des Stopfens wurden die Zellen herausgespült. Die Zellsuspension wurde auf 2×10^6 Zellen pro Milliliter RPMI/10% FCS-Medium verdünnt und auf Eis beziehungsweise in einer Gewebekulturplatte im CO₂-Brutschrank gelagert (24-Loch-Gewebekulturplatten, 1×10^6 Zellen pro Loch). Es wurde darauf geachtet, dass die verwendeten Lösungen auf 4°C vorgekühlt waren, die Zellen zwischenzeitlich möglichst auf Eis gelagert wurden und schnell gearbeitet wurden um unspezifische Zellbindungen zu vermeiden.

Zum Nachweis der erfolgreichen magnetischen Zelltrennung diente die durchflusszytometrisch-ermittelte Reinheitskontrolle. Hierfür wurde zur Bestimmung des Fluoreszenzspektrums der Zellen eine Probe mit 1×10^6 (\times =multipliziert mit) Zellen in 250µl *FACS*-Puffer mit dem Durchflusszytometer analysiert (Negativprobe). Gemessen wurde dies im Kanal des *FSCs* gegen das Phycoerythrin (PE, FL-2), dem vom Hersteller verwendeten Fluoreszenz-Farbstoff des Antikörpers (Abbildung 1). Die gleiche Zellzahl wurde zusätzlich mit der entsprechend vom Hersteller angegebenen Menge monoklonalem Immunglobulin G-Isotypkontrolle des Antikörpers markiert. Es diente zum Ausschluss der unspezifischen Bindungen des Antikörpers. Als Resultat konnte ein Quadrant festgelegt werden, der die gewünschte Zellpopulation beinhaltet. Eine dritte Probe wurde mit dem Fluoreszenz-markiertem monoklonalen Antikörper Maus-anti-human $CD56^+$ markiert. Damit konnte die zu ermittelnde Zellpopulation und entsprechend die Reinheit des *MACS*-Verfahrens dargestellt werden.

Für die Markierung wurden 2 bis 10×10^5 Zellen in ein *FACS*-Rundbodenfalkon-Röhrchen überführt und in *FACS*-Puffer (1x*PBS*), 0.1% bovines Serumalbumin, 0.1% Natriumazid) gereinigt (siehe nächster Abschnitt). Die *PBS*-Lösung wurde zuvor zehnfach konzentriert angesetzt und entsprechend vor dem Gebrauch verdünnt. Sie enthielt eine Mischung aus 400g Natriumchlorid (NaCl), 10g Kaliumchlorid (KCl), 71g Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄) und 69g Natriumdihydrogenphosphat (NaH₂PO₄·xH₂O), die auf 5000ml mit

bidestilliertem Wasser (H₂O) aufgefüllt wurde (pH-Wert 6.7). Nach der Reinigung wurde der zelluläre Überstand in 100µl *FACS*-Puffer resuspendiert und mit 10µl des Fluoreszenzmarkiertem monoklonalen Antikörpers Maus-anti-human CD56⁺ (PE-konjugiert, Klon B159, Maus Immunglobulin G1 *kappa*, Becton Dickinson PharMingen, Becton Dickinson Bioscience Pharmingen, San Diego, CA, USA) beziehungsweise der monoklonalen Immunglobulin G-Isotypkontrolle (Phycoerythrin-konjugiert, Klon MOPC-21, Maus Immunglobulin G1 *kappa*, Becton Dickinson PharMingen, Becton Dickinson Bioscience Pharmingen, San Diego, CA, USA) des Antikörpers für 30min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Herangehensweise beruhte auf Empfehlungen des Herstellers. Danach folgten zwei Reinigungsschritte, bei denen die Zellen in einem *FACS*-Rundbodenfalkon-Röhrchen mit 4ml *FACS*-Puffer gewaschen wurden. Im Anschluss wurden die Zellen in 250µl *FACS*-Puffer resuspendiert.

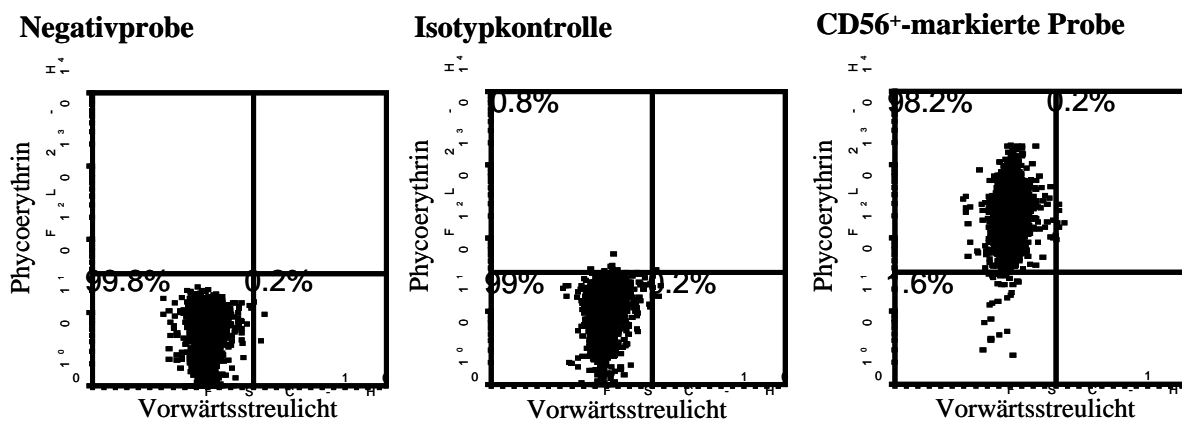
Die Reinigung beziehungsweise das Waschen von Zellen erfolgte folgendermaßen: Die Zellen wurden in ein 50-ml-Falkon-Röhrchen überführt und mit entsprechendem Medium aufgefüllt. Anschließend wurden die Falkon-Röhrchen für 8min bei 4°C und 1200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Falkon-Röhrchen auf einem Papiertuch abgetropft. Der auf dem Boden des Falkon-Röhrchens befindliche zelluläre Überstand wurde erneut durch Auf- und Abpipettieren beziehungsweise durch Vortexen in 50ml Medium resuspendiert und der Vorgang einmal wiederholt.

Bei allen Zwischenschritten wurden die Proben auf Eis und im Dunkeln gelagert. Die Messung erfolgte am Becton Dickinson *FACS Calibur* mit einer Mindestzellzahl von 5000 Ereignissen unter Ausschluss von Zelltrümmern im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht. Die Auswertung erfolgte über die *Software WinMDI (Microsoft)* oder *Cell-Quest-Pro* (Becton Dickinson).

Abbildung 1: Reinheitskontrolle der CD56⁺-Zellen: Darstellung einer FACS-Messung

Die CD56⁺-Zellen wurden unter Verwendung der Ficoll-Hypaque- und der MACS-Technik aus EDTA-Blut gewonnen. Die Reinheitskontrolle erfolgte mittels FACS-Messung. Die Negativprobe zeigt die unmarkierten Zellen. Mit Hilfe der Markierung mit der entsprechenden monoklonalen Immunglobulin G-Isotypkontrolle des Antikörpers konnten unspezifische Bindungen ausgeschlossen werden und ein Quadrant festgelegt werden, in dem sich ausschließlich die gesuchte Zellpopulation der CD56⁺-positiven Zellen befanden.

Die Darstellung erfolgte im Kanal des Vorwärtsstreulichts (FSC, Abszisse) und der Fluoreszenzfarbe des Antikörpers (Phycoerythrin, FL2, Ordinate). In den Quadranten ist der prozentuale Anteil der einzelnen Zellen dargestellt. Im vorliegenden Beispiel enthält die gewonnene Zellpopulation einen Anteil von 98.2% CD56⁺-Zellen.



2.2.3 Mitoxantron-Efflux-Assay

Nach der Aufreinigung der Zellen wurde der MX-Efflux-/Zelltod-Assay durchgeführt. Dieser basierte auf der Modifikation vorbeschriebener Protokolle (Hitzl et al. 2001) und erfolgte in der Gegenwart/Abwesenheit von spezifischen ABC-Transporter-Inhibitoren in etablierten Konzentrationen (Tabelle 2).

Es wurden 600 000 Zellen (2 000 000 Zellen pro 1ml RPMI 1640/10% FCS-Medium) mit/ohne Inhibitorlösung in 15-ml-Falkon-Röhrchen für 15min im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ präinkubiert. Anschließend wurde die 1µM MX-Lösung (Gry Pharma, Kirchzarten, Deutschland) zugegeben und eine erneute Inkubation für 30min bei 37°C und 5% CO₂ durchgeführt. Die MX-Konzentration korrespondiert mit der Serumkonzentration nach intravenöser Administration von 12mg/m² Körperoberfläche (KOF) (Hu et al. 1992).

Für den anschließenden MX-Efflux wurden die Zellen gereinigt wie vorhergehend beschrieben. Dann erfolgte die Resuspension in 4ml, bei 37°C vorgewärmtem Medium RPMI 1640/10% FCS entsprechend mit/ohne Inhibitor. Das Gemisch wurde in 6-Loch-Gewebekulturplatten überführt, um für weitere 10min inkubiert (37°C/5% CO₂) zu werden.

Ebenfalls wurde der Effekt von GSs (Methylprednisolon (MP), Sanofi-Aventis, Frankfurt, Deutschland; Dexamethason (DEX), Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) auf die MX-Akkumulation und den Zelltod untersucht. Nach einer Präinkubation (50µM, 60min) erfolgte, der oben beschriebene MX-Efflux in Gegenwart des entsprechenden GS (abgewandelt nach Pavék et al. 2005).

Nach einem Waschvorgang wurden mit Hilfe der Propidiumiodid-Färbung (PI, 0.1 µg/ml, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) Zellen mit einer beschädigten Plasmamembranintegrität ausgeschlossen (typischerweise <1.6%). Die Markierung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben. Hierfür wurden 2 bis 10x10⁵ Zellen in ein *FACS*-Rundbodenfalkon-Röhrchen überführt und mit 1x*PBS* gereinigt. Der nach der Zentrifugation gebildete zelluläre Überstand wurde in 100µl 1x*PBS*-Puffer und 20µl PI (Vorverdünnung 50µg/ml) resuspendiert und für 10min auf Eis und unter Lichtausschluss inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut zentrifugiert, mit 1x*PBS* gereinigt und in 250µl 1x*PBS* resuspendiert. Ein Minimum von 5 000 PI-negativen Zellen wurde durchflusszytometrisch (*FACSCalibur/Cell Quest-Software*, Becton Dickinson) analysiert.

2.2.4 Mitoxantron-Zelltod-Assay

Die Analyse des Zelltods basiert auf dem MX-Efflux-Assay. Zu Beginn erfolgte die Präinkubation von 600 000 Zellen in RPMI 1640/10% *FCS* mit/ohne Inhibitorlösung für 15min, 37°C/5% CO₂ mit der sich anschließenden Zugabe der 1µM MX-Lösung. Nun erfolgte wahlweise eine Inkubation der Zellen mit MX für 30 (n=6 Individuen) beziehungsweise 60min (n=4) bei 37°C/5% CO₂. Dann wurden die Proben über Nacht mit/ohne Inhibitorlösung in 4ml RPMI 1640/10% (37°C/5% CO₂) in 6-Loch-Gewebekulturplatten inkubiert.

Die Bestimmung der Anzahl früh-apoptotischer Zellen erfolgte mittels einer Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierten Annexin-V-Färbung (Roche Biochemicals, Mannheim, Deutschland). Eine simultane DNS-Markierung mit PI, das nicht Zellmembran-permeabel ist, trennte früh-apoptotische von spät-apoptotischen und früh-nekrotischen Zellen (Vermees et al. 1995).

Die Markierung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben. Es wurden 2 bis 10x10⁵ Zellen in ein *FACS*-Rundbodenfalkon-Röhrchen überführt und mit Annexin-V-Puffer gereinigt. Der Annexin-V-Puffer setzte sich aus 1ml 1M HEPES Natriumhydroxid (NaOH) (pH-Wert 7.4), 10ml 1.4M Natriumchlorid (NaCl) und 0.5ml 1M Calciumchlorid (CaCl₂) zusammen, das auf 100ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt wurde. Der nach der Zentrifugation entstandene zelluläre Überstand wurde anschließend in 100µl Annexin-V-Bindungspuffer, 2.5µl Annexin-V-FITC und 20µl PI (Vorverdünnung 50µg/ml) resuspendiert und für 10min auf Eis und unter Lichtausschluss inkubiert. Nun wurden die Zellen erneut zentrifugiert, mit Annexin-V-

Bindungspuffer gereinigt und in 250µl Annexin-V-Bindungspuffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die *FACS*-Messung.

2.3 *In-vivo*-Analyse: Induktion der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis, Mitoxantron-Behandlung und Histologie

Die Tierexperimente als *in-vivo*-Analyse wurden zuvor durch die Tierschutzbeauftragten der Medizinischen Fakultät Göttingen und dem Herrn Regierungspräsidenten von Braunschweig geprüft und genehmigt. Die *Abcg2-Knock-Out*-Tiere wurden zum C57BL/6-Hintergrund zurückgekreuzt und die entsprechenden Geschwister-Kontrollmäuse (*littermates*) von Harlan (Borchen, Deutschland) erworben.

Die Anästhesie der Mäuse erfolgte mit 10µl/g Körpergewicht *intraperitoneal* eines Gemisches aus 2ml Ketamin, 500µl Xylazin/Rompun und 10ml Natriumchlorid. Zur Initiierung der EAE wurden sie immunisiert mit einer *subkutanen* Injektion rechts und links des Schwanzes von je 50µg einer Mischung aus Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein-, MOG₃₅₋₅₅-Peptid und kompletten Freund Adjuvanz. Zusätzlich erhielten die Tiere an Tag null und zwei 200ng Pertussistoxin *intraperitoneal* (*List Biological Laboratories*, Campbell, CA, USA). Sie wurden täglich verblindet gewogen und nach ihrem klinischen Verlauf beurteilt. Die Schwere der Erkrankung wurde anhand einer Skala untersucht, die von 0 bis 10 reicht (Hartung et al. 1988): 0, gesund; 1, reduzierter Tonus der Schwanzspitze; 2, schlaffer Schwanz; 3, Gangataxie, wackelnder Gang; 4, Stand- und Gangataxie; 5, Parese eines Beines bis leichte Paraparese; 6, mittelschwere Paraparese oder Plegie eines Hinterbeines; 7, schwere Paraparese oder Paraplegie; 8, Tetraparese, Bewegung nur schleichend; 9, schwere Tetraparese, moribund; 10, tot. Bei Krankheitsbeginn an Tag zwölf bis 14 und an Tag 16 wurde MX injiziert (0.5mg/kg Körpergewicht). Die Rückenmarkquerschnitte der an Tag 23 oder 29 perfundierten Mäuse wurden mit *Luxol fast blue* gefärbt. Mit Hilfe der *Image Processing Software* und einem Olympus-Mikroskop wurden die demyelinisierenden Areale als prozentualer Anteil von der gesamten weißen Substanz berechnet.

2.4 Retrospektive klinische Korrelation funktionell-relevanter Einzelbasenaustausche in ABC-Transportern mit der therapeutischen Mitoxantron-Ansprechrage

Die retrospektive, klinische Analyse der MX-Ansprechrage wurde von verschiedenen Untersuchern durchgeführt und verblindet ausgewertet. Patientenproben wurden genotypisiert für *ABCB1-2677G>T*, *-3435C>T* und *ABCG2-V12M*, *-Q141K* und anschließend mit den klinischen Daten korreliert.

Bei allen Patienten wurde eine gesicherte MS diagnostiziert entsprechend den Poser- oder McDonald-Kriterien (McDonald et al. 2001, Poser et al. 1983). Es wurden Patienten mit einem schubförmigen, einem sekundär progredienten oder einem atypischen Krankheitsverlauf (Neuromyelitis optica/Devic-Syndrom, n=1) sowie eine mögliche MS (nach den Poser-Kriterien) eingeschlossen. Die Behandlung erfolgte nach etablierten

Protokollen, wobei 85.1% des Gesamtkollektivs und alle nach der Ansprechrate analysierten MX-Monotherapie Patienten die MX-Zyklen dreimonatlich erhielten. Die restlichen 14.9% wurden mit einer initial dreimaligen monatlichen Behandlung therapiert, gefolgt von drei Monaten Therapieabstand. (Edan et al. 1997, Hartung et al. 2002) Patienten mit einer primär progredienten MS (PPMS) wurden aufgrund eines unterschiedlichen Pathomechanismus, der der Erkrankung zugrunde liegt, sowie fehlender Daten zur therapeutischen Effektivität von MX von der Analyse ausgeschlossen (Stüve et al. 2004).

155 Patienten (Göttingen n=11, Rostock n=37, Berg n=107) wurden mit einer MX-Monotherapie *intravenös* (5-12mg/m² KOF) in drei-monatlichen Abständen entsprechend des MIMS (Mitoxantron in Multipler Sklerose)-Protokolls behandelt (Hartung et al. 2002). In dieser Kohorte wurde eine GS-Puls Therapie lediglich während der Exazerbationen verabreicht. Weitere 154 Patienten erhielten eine MX/GS-Kombinationstherapie (Göttingen/Rostock n=57, Barcelona n=46, Berg n=51, MX/GS). Die deutschen MX/GS-Patienten wurden mit drei-monatlichen MX-Zyklen in Kombination mit einer drei- bis fünftägigen Behandlung mit 1g MP intravenös therapiert. Die spanischen MX/GS-Patienten erhielten im Gegensatz 4mg DEX *intravenös* gefolgt von den MX-Infusionen. Die ersten drei MX-Zyklen wurden in dieser Kohorte monatlich verabreicht und alle weiteren in drei Monatsintervallen. Die Entscheidung für die MX/GS-Kombination erfolgte aus klinischen Gründen, wie zum Beispiel kontinuierlicher klinischer Aktivität trotz bestehender MX-Therapie oder besserer Tolerabilität.

Die klinische Analyse nach der Ansprechrate auf MX entsprechend in Responder oder Non-Responder wurde mit Hilfe von quantitativen Skalen als Einteilungskriterien durchgeführt (Tabelle 3): *Expanded Disability Status Score (EDSS)*-Stabilität/Verbesserung (im Fall von Therapieversagen wurde die *EDSS*-Verschlechterung um einen Punkt ($EDSS < 6.0$) beziehungsweise um 0.5 Punkte ($EDSS \geq 6.0$) gewertet; n=165 bestätigt an mindestens zwei verschiedenen Zeitpunkten mit einem Mindestabstand von drei Monaten), Verbesserung der Schubrate, Stabilität/Verbesserung der *Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC)*-Skala, magnetresonanztomografischer Aktivität (MRT, Gadolinium-Aufnahme) und einer ärztlichen Einschätzung der Krankheitsprogression. Bei 63 Patienten dienten zusätzlich motorisch-evozierte Potentiale als Bestätigung der Einteilung nach der Therapie-Ansprechrate (Untersuchung der zentralen motorischen Leitungszeit, Amplitude und Konfiguration). Mindestens 150 der 309 Patienten erfüllten für die Klassifikation mehr als eines der genannten Kriterien. Die Einteilung erfolgte größtenteils nach zwölf Monaten (89.3% der Patienten). Wenn zu diesem Zeitpunkt ausreichende klinische Daten fehlten, wurden sie nach neun Monaten Therapie (10%) erhoben. Für weitere 0.7% wurde die Ansprechrate am Therapieende ermittelt (21-24 Monate).

Tabelle 3: Übersicht der Einteilungskriterien

Einteilungskriterien mit deren Hilfe Multiple-Sklerose-Patienten nach der Mitoxantron-Ansprechrage klassifiziert wurden (n=309) und entsprechende Patientenzahl, für die dieses Merkmal herangezogen wurde.

Einteilungskriterium	Patientenzahl
EDSS	294
Schubrate	110
MSFC-Skala	10
MRT-Aktivität	15
Krankheitsprogression	157
motorisch-evozierte Potentiale	63

Eine separate Gruppe von Patienten mit schwerwiegenden kardiologischen (n=28, echokardiographisch dargestellte linksventrikuläre Dysfunktion, kongestive Herzinsuffizienz, mediane kumulative MX-Dosis 72mg/m²) oder hämatologischen Nebenwirkungen (n=8, therapieassoziierte Leukämie, Agranulozytose, mediane kumulative MX-Dosis 72mg/m²) wurde ebenfalls retrospektiv mit dem ABC-Transporter-Genotyp korreliert. Proben von zehn dieser Patienten mit einer MX-assoziierten Kardiotoxizität wurden separat von einem Berliner Zentrum bereitgestellt (*NeuroCure Clinical Research Center*, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Deutschland).

2.5 Statistische Auswertung

Die beschreibende Statistik wurde als Median und entsprechendes 25. und 75. Perzentil dargestellt. Die entsprechenden Daten wurden unter Verwendung des exakten Wilcoxon-Tests verglichen. Die Analyse der *in-vitro*-Apoptose-Raten erfolgte mit Hilfe der einseitigen Varianzanalyse unter Verwendung des *post-hoc-Student-Newman-Keuls-Test* für Gruppierungen. Die p-Werte wurden zweiseitig dargestellt.

Kreuztabellen der Forschungsdaten führten oft zu Zellen mit einer erwarteten Frequenz von kleiner als fünf. Dafür wurde die exakte Inferenzstatistik verwendet. Das war der exakte *Fisher`s-Test* für die 2x2-Fälle, der *Fisher-Freeman-Halton-Test* für die 2x3-Fälle und der exakte *Cochran-Armitage-Test* für Trends der Genotypenteilung in dem zusätzlichen Modell 0-1-2.

Die exakte Statistik wurde unter Zuhilfenahme von *SPSS 16* für Windows berechnet. Das exakte Quotenverhältnis/*Odds Ratio* für die Assoziation zwischen Responder/Non-Responder und der *Genetic Burden Score* für den Vergleich unterschiedlicher *ABCBI/ABCG2*-Genotyp-

Konstellationen wurde in R 2.9.0 unter Verwendung des *Elrm Package* (Zamar et al. 2007) mit einer *Markov Chain Size* von 2.5e6 berechnet.

Der *Cochran-Armitage*-Test wurde mit einseitigen p-Werten berechnet, da nur eine Richtung des Trends von Interesse war und die Plausibilität aus den *in-vitro*- und *EAE-in-vivo*-Ergebnissen resultierte (Zheng et al. 2003, Zheng 2008).

Die Inhibition des MX-Effluxes durch GSs wurde unter Verwendung der *Kolmogorov-Smirnov*-Statistik D getestet (Leith et al. 1999). Um Unterschiede im EAE-Kurs durch den *Mann-Whitney U*-Test zu bestimmen, wurde die Analyse vom Einsetzen der Erkrankung bis zum Ende der Beobachtung anstatt von individuellen Zeitpunkten durchgeführt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 ABCB1- und ABCG2-Transporter sind hoch polymorph in Multiple-Sklerose- Populationen aus zentral-europäischer Abstammung ohne große Unterschiede im Vergleich zu gesunden Spendern

Bei der Genotypisierung haben wir uns auf die prominentesten *SNPs* der ABCB1- und ABCG2-Transporter konzentriert, die in vorherigen Prüfungen funktionellen Einfluss auf den MX-Transport zeigten (Gottesman et al. 2002, Schinkel und Jonker 2003). Den am besten validierten Effekt auf die Medikamenten-Disposition hat die *ABCB1*-3435C>T-Mutation. Sie ist assoziiert mit der Transporter-Funktion und deren Expressionshöhe im Duodenum (Hoffmeyer et al. 2000, Sakaeda et al. 2003). Der genaue Wirkmechanismus ist jedoch unklar, da es sich um eine intronische Mutation handelt. Die 2677G>T *ABCB1*-Mutation, die zu einem Aminosäure-Austausch führt, ist im funktionellen Vergleich weniger relevant (Kerb 2006, Schwab et al. 2003). Es wird jedoch eine klinische Bedeutung vermutet, da sie die ATPase-Aktivität und Substratspezifität verschiedener Medikamente beeinflusst (Sakurai et al. 2007). Von sechs untersuchten *ABCG2*-*SNPs* (V12M, Q141K, Q126*, E334*, R482G, R482T) konnten lediglich zwei Polymorphismen in unserer MS-Population detektiert werden. Der *SNP* V12M führt zu einer veränderten apikalen Plasmamembranlokalisation im ABCG2-Transporter und Q141K zu einer erniedrigten ATPase-Aktivität (Bosch et al. 2005, Mizuarai et al. 2004).

Die klinischen Basischarakteristika der MS-Patienten und der gesunden Kontrollen sind in Tabelle 4 sowie in Tabelle 1 im Teil B aufgeführt. Bei den Kontrollen handelt es sich vor allem um gut voruntersuchte Blutspender. Sie wurden nicht in Geschlecht und Alter übereinstimmend mit den MS-Patienten selektiert und gesammelt, deshalb sind sie jünger als die untersuchten MS-Patienten.

Tabelle 4: Zusammenfassung der klinischen Charakteristika der ABCB1- und ABCG2-genotypisierten Multiple-Sklerose-Kohorte (Barcelona, Berg, Göttingen, Rostock) und des Kontrollkollektivs (Bochum, Göttingen)

m steht für männlich, w für weiblich. ¹unter Berücksichtigung eines transsexuellen Patienten (weiblich zu männlich). Erstmanifestation fehlend für n=54 Patienten, Erstdiagnose fehlend für n=198. Die atypischen Fälle (n=6) sind Patienten mit einer Neuromyelitis optica/Devic-Syndrom. Der Krankheitsverlauf fehlt von einem Patienten (Göttingen)

	Multiple-Sklerose-Patienten	Kontrollpersonen
Geschlecht, Anzahl (%)	m: 268 (32.2), w ¹ : 564 (67.8)	m: 152 (57.6), w: 112 (42.4)
Alter, Median (25%-75% Perzentile)	45 (38-52)	38 (30-46)
Erstmanifestation, Median (25%-75% Perzentile)	31 (24-39)	
Erstdiagnose, Median (25%-75% Perzentile)	34 (27-42)	
Verlaufsform, Anzahl (%)		
Schubförmig wiederkehrend	423 (50.8)	
Sekundär progredient	346 (41.6)	
Primär progredient	56 (6.7)	
Atypisch	6 (0.7)	
Gesamt	832	264

Wie in Abbildung 2A im Teil B dargestellt, wurde der ABC-Transporter-vermittelte MX-Efflux in MS-Patienten mit wildtypischen ABCB1/ABCG2-Allelen (ABCB1-2677GG, -3435CC, ABCG2-12VV, -141QQ) mit einem MS-Patienten, Träger für Allelvarianten in beiden Genen (ABCB1-2677TT, -3435TT, ABCG2-12VM, 141QQ) verglichen. Die Zellen mit den wildtypischen Sequenzen zeigten unter Verwendung des dualen ABCB1-/ABCG2-Inhibitors Elacridar einen höheren MX-Efflux als der letztere Genotyp. Der wildtypische Genotyp wurde deshalb als ABCB1/ABCG2-**H**(*igh* Efflux) bezeichnet, während der Genotyp mit heterozygot oder homozygot mutierten Allelvarianten in beiden Genen, ABCB1/ABCG2-**L**(*ow* Efflux) genannt wurde (Tabelle 5).

Tabelle 5: Überblick zur Nomenklatur der Allelkombinationen resultierend aus dem in-vitro-Mitoxantron- und Zelltod-Assay und damit der funktionellen Transporteraktivität

Genotyp	Allele	Transporterfunktion	Bezeichnung
SNPs in <i>ABCB1</i> und <i>ABCG2</i>	<i>ABCB1</i> -2677GG, -3435CC, <i>ABCG2</i> -12VV, -141QQ	hoch/ <i>high</i> Efflux	<i>ABCB1/ABCG2-H</i>
SNPs entweder in <i>ABCB1</i> oder <i>ABCG2</i>		intermediär/ <i>intermediate</i> Efflux	<i>ABCB1/ABCG2-I</i>
keine SNPs in <i>ABCB1</i> und <i>ABCG2</i>	<i>ABCB1</i> -2677TT, -3435TT, <i>ABCG2</i> -12VM, -141QQ	niedrig/ <i>low</i> Efflux	<i>ABCB1/ABCG2-L</i>

Lediglich 14.8% der MS-Patienten zeigten *ABCB1/ABCG2-L*-Allele in beiden Transportern (*ABCB1*-2677GG, -3435CC, *ABCG2*-12VV, -141QQ) (Tabelle 2, Teil B: Publikation). 22.2% waren heterozygot oder homozygot mutiert für die Kombination von Allelvarianten in *ABCB1* und *ABCG2* (*ABCB1/ABCG2-I*, *ABCB1*-2677TT, -3435TT, *ABCG2*-12VM, 141QQ) und schließlich 63.1% der Fälle in entweder *ABCB1* oder *ABCG2* (*ABCB1/ABCG2-H*).

Zwischen MS-Patienten und gesunden Kontrollen wurden für die Allelfrequenzen *ABCB1*-3435C>T und -2677G>T keine Unterschiede detektiert. Für die SNPs des *ABCG2*-Transporters war die Häufigkeit der verschiedenen Allele im V12-Kodon mit 0.03% bei den MS-Patienten und 0.05% bei den gesunden Spendern sehr niedrig ($p=0.023$). Dieser Unterschied kann am besten durch die hohe Varianz erklärt werden, die bei dem selten vorkommenden Allel in dem kleinen untersuchten Kollektiv zu erwarten ist. Es wurden keine gegensätzlichen Genotypfrequenzen für Q141K entdeckt.

Auch im Vergleich der Allelfrequenzen der MS-Kohorte und dem gesunden Kontrollkollektiv mit der *HapMap-CEU*-Population (Das Internationale *HapMap*-Konsortium 2007) zeigten sich keine Abweichungen. Die Genotypverteilung der unselektierten MS-Kohorte (Göttingen, Rostock) stimmte mit der MX-behandelten MS-Kohorte (Barcelona, Berg) überein.

Es wurde ein hoher Grad des *Linkage Disequilibriums* zwischen *ABCG2*-V12M und -Q141K (*Linkage Disequilibrium*=0.854) detektiert, was definitionsgemäß auf eine häufige Kombination der beiden SNPs hinweist. Die Ursache könnte sowohl in der gemeinsamen Geschichte der Mutationen und der Rekombinationen zu finden sein als auch in zugrundeliegenden anderen Faktoren, wie beispielsweise einem Gendrift oder dem Wachstum einer Population (Gaunt et al. 2007).

Die Ergebnisse zeigen, dass potentiell funktionelle Allelvarianten für *ABCB1* und *ABCG2*, häufig bei MS-Patienten vorkommen, vermutlich aber ohne eine Rolle in der Krankheitssuszeptibilität zu spielen.

3.2 Verschiedene, potentiell von der Mitoxantron-Therapie beeinflusste Gewebe und Organe zeigen eine hohe *ABCB1*-/*ABCG2*-Boten-Ribonukleinsäure-Expression

Es konnte eine hohe *ABCB1*-/*ABCG2*-*mRNA*-Expression in verschiedenen, potentiell von der MX-Therapie beeinflussten Zellen und Geweben nachgewiesen werden (Abbildung 1, Teil B: Publikation). So zeigte die Analyse der *ABC*-Transporter-*mRNA* eine 3.9-fach höhere *ABCG2*-Expression in Immunzellen (CD56⁺-Zellen) im Vergleich zu unsortierten mononukleären Leukozyten. Diese Ergebnisse bestätigen vorhergehende Untersuchungen von Scharenberg et al. (2002) und führten zur Verwendung von CD56⁺-Zellen in den *in-vitro*-Experimenten. Ebenfalls wurde eine hohe *ABCG2*-*mRNA*-Expression in humanen ZNS-Zellen, vor allem im frontalen, kortikalen Gehirngewebe (53-fach höher im Vergleich zu mononukleären Leukozyten), Oligodendrozyten (19-fach) und Mikroglia (17-fach) beobachtet, was eine Bedeutung der Transporter beispielsweise in der Behandlung neurologischer Erkrankungen nahe legt. Auch im humanen Myokard (16-fach höher im Vergleich zu mononukleären Leukozyten) und im Lebergewebe (76-fach) konnte eine hohe Expression detektiert werden. Da das Herzgewebe eine wichtige Rolle im Nebenwirkungsspektrum der MX-Therapie spielt, ist dieses Ergebnis bedeutsam. Die hepatobiliäre Ausscheidung ist ein Eliminationsweg von MX aus dem menschlichen Körper (Neuhaus et al. 2007). Deshalb könnte die *ABC*-Transporter-Expression in der Leber Einfluss auf die Pharmakokinetik von MX nehmen. Alle untersuchten Zellen und Gewebe zeigten ähnliche Ergebnisse bei der Analyse der *ABCB1*-*mRNA*-Expression mit den höchsten Werten in CD56⁺-Zellen, Oligodendrozyten, der Leber und dem Kortex.

In einer Subanalyse wurden die unterschiedlichen Allele *ABCB1*-3435C>T (-CC n=14, -CT n=36, -TT n=11) und *ABCG2*-V12M (-VV n=21, -VM n=10) und -Q141K (-QQ n=21, -QK n=25) mit der Höhe *mRNA*-Transporterexpression korreliert. Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede detektiert. Darüber hinaus konnten keine Hinweise für eine mögliche Genotyp-abhängige Expression gefunden werden, wie näher von Hitzl et al. (2004) oder Moriya et al. (2002) beschrieben. Diesbezüglich und im Hinblick auf einen Vergleich der *mRNA*-Expression von gesunden Spendern und MS-Patienten sind weitere Untersuchungen nötig, da eine Regulation der Transporter durch das Krankheitsgeschehen (Evseenko et al. 2007, Jansen et al. 2003, Tamura et al. 2006, van de Ven et al. 2009) oder die Gabe von MX (Nieth und Lage 2005), aber auch durch andere Medikamente (zum Beispiel Demeule et al. 1999) nicht ausgeschlossen werden kann.

Die Proteinexpression von *ABCB1* und *ABCG2* wurde nicht separat untersucht wie beispielsweise von Owen et al. (2005). Die Ergebnisse hätten keine weiteren Rückschlüsse auf die Funktionalität der Transporter geboten. Für diesen Nachweis entwickelten wir den MX-Efflux- und -Zelltod-Assay.

3.3 Der *ABCB1*/*ABCG2*-Transporter-Genotyp bestimmt *in vitro* den Mitoxantron-Efflux und den Mitoxantron-induzierten Zelltod in Multiple-Sklerose-Patienten und gesunden Spendern

In der vorliegenden retrospektiven Prüfung wurde in Immunzellen (CD56⁺-Zellen) der Nachweis erbracht, dass der *ABCB1*/*ABCG2*-Genotyp *in vitro* Einfluss auf den MX-Efflux und MX-induzierten Zelltod in MS-Patienten und gesunden Spendern nimmt.

Es wurde besonders darauf geachtet, dass die Patientenproben stets parallel und gleich behandelt wurden. Das Resultat war eine Reproduzierbarkeit des Vergleichs zwischen *ABCB1*/*ABCG2*-**L**- und *ABCB1*/*ABCG2*-**H**-Spender trotz der Varianz im Bioassay und interindividuellen Schwankungen der MX-Akkumulation.

Der ABC-Transporter-vermittelte MX-Efflux in MS-Patienten mit *ABCB1*/*ABCG2*-**H**-Allelen zeigte unter Verwendung des dualen *ABCB1*/*ABCG2*-Inhibitors Elacridar einen höheren MX-Efflux als Individuen mit *ABCB1*/*ABCG2*-**L**-Allelen (Abbildung 2A, Teil B: Publikation)). Nachdem ein gleichförmiges Verhalten des Genotyp-abhängigen MX-Efflux beobachtet und der Nachweis des Wirkprinzips in MS-Patienten erbracht wurde, schlossen wir zusätzlich gesunde Spender in die Analyse ein.

Die Abbildung 2B im Teil B fasst die kumulativen Daten von zwölf Individuen (sechs Paare mit unterschiedlichem Genotyp) zusammen. Der ABC-vermittelte MX-Efflux des *ABCB1*/*ABCG2*-**L**-Genotyps war um 37.7% geringer (mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) 164.3) als bei entsprechenden Trägern des **-H**-Genotyps (MFI 263.5, p=0.031). Erste Daten weisen darauf hin, dass Individuen, die entweder in *ABCB1* oder *ABCG2* polymorph sind, einen intermediären MX-Efflux aufweisen (*ABCB1*/*ABCG2*-**I**(*ntermediate* Efflux), Tabelle 5). Die Rangfolge des ABC-medierten MX-Effluxes, die aus den *ABCB1*/*ABCG2*-**H**/**I**/**L**-Genotypen resultieren, argumentiert für den Einfluss der ABCB1- und ABCG2-Transporter auf die MX-Akkumulation.

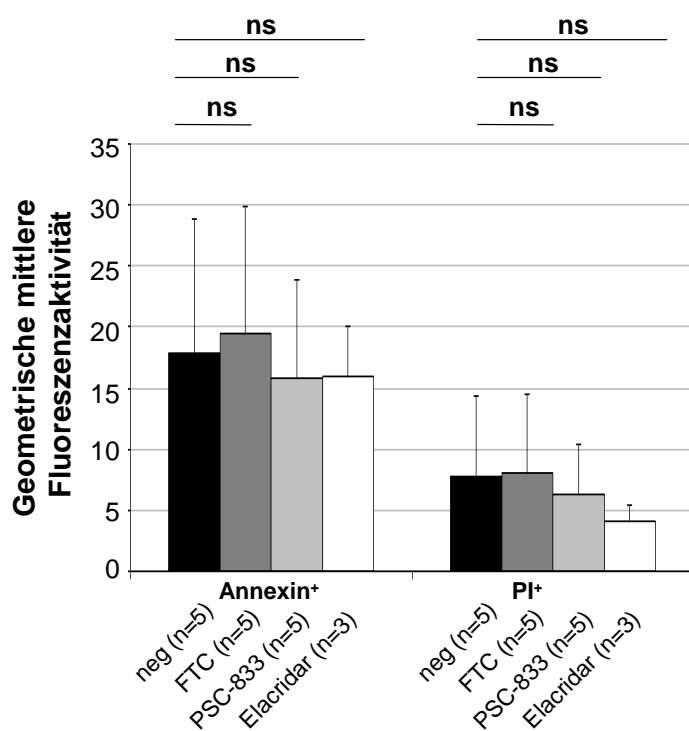
Die Hemmung mit den monospezifischen Inhibitoren PSC-833 (ABCB1-selektiv) und Fumitremorgin C (ABCG2-selektiv) führte nicht zu signifikanten Unterschieden des MX-Effluxes zwischen *ABCB1*/*ABCG2*-**L**- und **-H**-Genotypträgern. Es zeichnete sich bei der Verwendung von PSC-833 allerdings ein statistischer Trend mit p=0.062 entsprechend der Hemmung mit dem dualen Inhibitor Elacridar ab. Da die Unterschiede erst unter Zuhilfenahme des ABCB1- und ABCG2-Hemmstoffs Elacridar signifikant wurden, wird eine zusammenhängende Rolle von ABCB1 und ABCG2 beim MX-Efflux vermutet. Die Ergebnisse bestätigen den Effekt in transgenen Mäusen, in denen die Transporter eine additive, funktionell nicht-redundante Protektion gegen den MX-induzierten Zelltod bilden (Zhou et al. 2003).

Weitere Hinweise auf die funktionelle Relevanz der untersuchten *SNPs* konnte mit Hilfe des MX-induzierten Zelltods in MS-Patienten und gesunden Spendern erbracht werden.

In Vorexperimenten wurde ein toxischer Effekt der Inhibitoren auf die CD56⁺-Zellen ausgeschlossen (Abbildung 2).

Abbildung 2: Erste Daten: Ausschluss der Toxizität der Inhibitoren

Nach Zugabe von Fumitremogin C oder PSC-833 ($n=5$, ein Multiple-Sklerose-Patient/vier gesunde Spender; drei Träger des ABCB1/ABCG2-**H**-Genotyps, zwei gesunde Spender Träger des ABCB1/ABCG2-**L**-Genotyps) beziehungsweise von Elacridar (ein MS-Patient/zwei gesunde Spender; zwei Träger des ABCB1/ABCG2-**H**-Genotyps, ein gesunder Spender Träger des ABCB1/ABCG2-**L**-Genotyps) wurden keine Differenzen der geometrischen mittleren Fluoreszenzintensität der Zelltodrate (Annexin-V⁺-Zellen und PI⁺-Zellen) im Vergleich zu einer unbehandelten Probe (Negativprobe, neg) detektiert. Die CD56⁺-Zellen durchliefen den Mitoxantron-Efflux-Assay ohne Zugabe von Mitoxantron. Anschließend wurden sie mit den entsprechenden Inhibitoren über Nacht inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Fisher's exakt-Test, zweiseitig. ns bedeutet nicht signifikant.

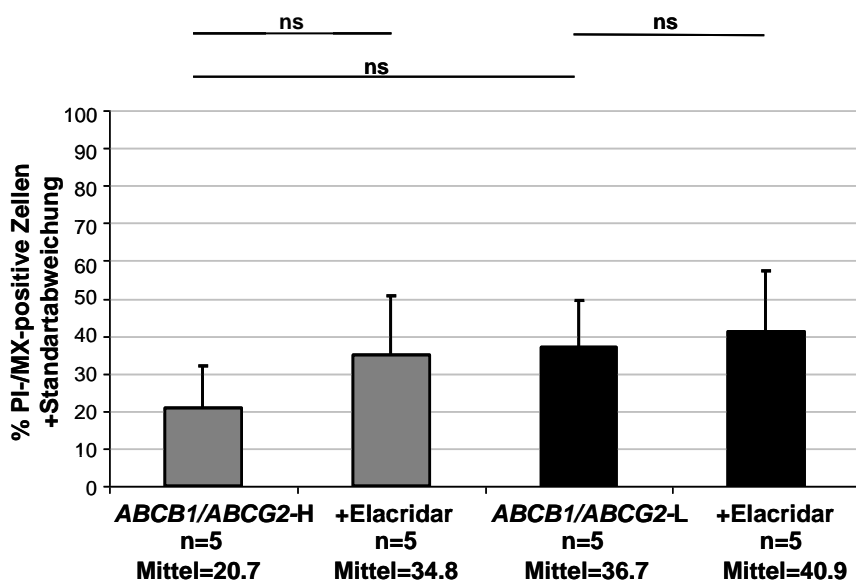


Im MX-Efflux-Assay konnte eine erhöhte intrazelluläre MX-Akkumulation in ABCB1/ABCG2-**L**-MS-Patienten im Vergleich zu ABCB1/ABCG2-**H**-MS-Patienten nachgewiesen werden. Die Auswirkung der Genotyp-abhängigen unterschiedlichen intrazellulären MX-Ansammlung zeigte sich in den Zelltod-Assay-Experimenten: Die ABCB1/ABCG2-**L**-MS-Patienten, die intrazellulär, quantitativ mehr MX aufwiesen, hatten auch eine höhere Zelltodrate (MX⁺/Annexin-V⁺-Zellen) im Vergleich zu ABCB1/ABCG2-**H**-

MS-Patienten. Erneut wurden ähnliche Effekte bei gesunden Spendern beobachtet (Abbildung 3A, Teil B: Publikation). Zusammenfassend erbrachte die Analyse von einem MS-Patienten-Paar und vier Paaren gesunder Kontrollen folgende Ergebnisse: *ABCB1/ABCG2-L*-Individuen besaßen 22.9% mehr $\text{MX}^+/\text{Annexin-V}^+$ - (Abbildung 3B, Teil B: Publikation, $p < 0.05$) und 16.1% mehr MX^+/PI^+ -doppelt-positive Zellen (Abbildung 3, $p = \text{nicht signifikant (ns)}$) als Träger des *ABCB1/ABCG2-H*-Genotyps.

Abbildung 3: Der ABCB1/ABCG2-Genotyp bestimmt den Mitoxantron-induzierten Zelltod in Multiple-Sklerose-Patienten und gesunden Spendern: In vorläufigen Experimenten folgt die Höhe der MX^+/PI^+ -doppelt-positiven Zellen der Höhe der $\text{MX}^+/\text{Annexin-V}^+$ -doppelt-positiven Zellen

Träger des *ABCB1-/ABCG2-L*-Genotyps zeigten höhere Anteile spät-apoptotischer und früh-nekrotischer Zellen (MX^+/PI^+), die Mitoxantron enthalten, im Vergleich zu Individuen mit dem *-H*-Genotyp ($p = \text{ns}$, Anova). Jeder Genotyp enthält einen Multiple-Sklerose-Patienten und vier gesunde Spender. Die FACS-Messung erfolgte 24 Stunden nach dem Mitoxantron-Efflux entsprechend mit beziehungsweise ohne den dualen *ABCB1/ABCG2*-Inhibitor Elacridar. Dargestellt sind die Mittelwerte der prozentualen Anteile MX^+/PI^+ -doppelt-positiver Zellen mit der Standardabweichung (Ordinate) für die Träger des *ABCB1-/ABCG2-L* und des *H*-Genotyps (Abszisse).



Darüber hinaus führte die Inhibition des MX-Effluxes durch den *ABCB1/ABCG2*-Inhibitor Elacridar zur Steigerung des Zelltods in *ABCB1/ABCG2-H*-Individuen um 21.9% ($\text{MX}^+/\text{Annexin-V}^+$ -Zellen, $p < 0.05$). Dieser Anstieg betrug lediglich 3.5% in den *-L*-genotypisierten Individuen ($p = \text{ns}$) (Abbildung 3B, Teil B: Publikation). Die Anzahl der spät-apoptotischen und früh-nekrotischen Zellen (MX^+/PI^+) verhielt sich im Trend gleichförmig

(Abbildung 3). Da die Wirkung auf den dualen Hemmstoff Elacridar zurückzuführen ist, weist dies auf einen *ABC*-Transporter-vermittelten Effekt hin. Der untersuchte Zeitpunkt umfasst das Apoptoseprogramm der Zellen, dass innerhalb von vier bis fünf Stunden beendet wird. Sogar hier gezeigte kleine quantitative Differenzen des Zelltodes können in bestimmten Geweben unter definierten Bedingungen zu den in der Studie analysierten Zeitpunkten zu einem großen Zellverlust über die Zeit führen (Bursch et al. 1990).

Die Ergebnisse argumentieren für eine unterschiedliche Suszeptibilität des MX-induzierten Zelltods abhängig vom entsprechenden *ABCB1/ABCG2*-Transporter-Genotyp. Vermutlich ist dies bedingt durch die Höhe der MX-Akkumulation.

Die klinisch weit verbreitete Anwendung der MX/GS-Kombination folgt der empirischen Rationale einer potentiellen Steigerung der Effektivität und Tolerabilität (Morrissey et al. 2005). Zingler et al. (2005) berichteten über eine bessere Verträglichkeit der kombinierten MX/GS-Therapie mit weniger Nebenwirkungen wie Müdigkeit und Abgeschlagenheit. Das führt letztlich zur Erhöhung der Kooperation der Patienten im Rahmen der Therapie.

Dies veranlasste uns dazu, in einem nächsten Schritt den Einfluss von den GSs MP und DEX auf die intrazelluläre MX-Akkumulation und den MX-induziertem Zelltod zu untersuchen. In *CD56⁺*-Zellen von Individuen mit *ABCB1/ABCG2-H*-Gensequenzen inhibierten sowohl MP als auch DEX signifikant den MX-Efflux (Abbildung 3C, Teil B: Publikation). Dies resultiert vermutlich aus komplexen GS-Interaktionen mit *ABC*-Transportern, im Besonderen die Inhibition der ATPase-Aktivität der *ABC*-Transporter durch Steroide (nicht genomischer Effekt), die Rolle der GS als Substrat oder der Einfluss auf die Regulation der *ABC*-Transporter-Expression (Evseenko et al. 2007, Jansen et al 2003, Kim und Benet 2004, Pavek et al. 2005, Schmid et al. 2000). Nach 24h führte die zusätzliche Inkubation mit MP zu einem Anstieg von 8% der *MX⁺/Annexin-V⁺*-Zellen in *ABCB1/ABCG2-H*-Genträgern und mit DEX von 2.9%. Dieser Effekt war vermutlich abhängig von der Hemmung des MX-Effluxes und nicht direkt GS-vermittelt, da nur vernachlässigbare Unterschiede in zwei entsprechenden *ABCB1/ABCG2-L*-Individuen beobachtet wurden (für MP +0.52% *MX⁺/Annexin-V⁺*-Zellen, für DEX +2.0%). Hypothetisch könnte der auf *in-vitro*-Ebene beobachtete Effekt zu einer höheren Effektivität von MX führen. Andererseits könnte eine Risikostratifizierung von Nebenwirkungen zumindest in unterschiedlichen *ABC*-Genotyp-Subpopulationen erfolgen.

Der mögliche Einfluss weiterer Faktoren, wie zum Beispiel die potentielle Prädominanz eines *ABC*-Transporters *in vivo* oder die Rolle anderer Mechanismen kann durch die vorliegenden Experimente nicht ausgeschlossen werden und bedarf weiterer Erforschung. Beispielsweise könnten andere *MDR*-Transporter, wie *ABCC1*, von Bedeutung sein (Borst und Elferink 2002, Morrow et al. 2006).

Die Transporter-Expression könnte durch die MX-Gabe beeinflusst worden sein, wie 2005 von Nieth und Lage beschrieben. Dieser Störfaktor kann vermutlich durch den begrenzten zeitlichen Verlauf des Experimentes ausgeschlossen werden, da die durchschnittliche Zeit von der Induktion bis hin zur Expression auf der Zelloberfläche die Dauer des Versuchs übersteigt.

Aktuell fehlt es darüber hinaus an validen Daten zu möglichen Arzneimittelinteraktionen. Potentielle Kandidaten dafür sind 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten wie beispielsweise Ondansetron. Er wird regelmäßig im Rahmen der MX-Infusionen als potentes Antiemetikum verabreicht und ist ein bekanntes Substrat des ABCB1-Transporters (Babaoglu et al. 2005, Schinkel et al. 1996). Ebenso wurde in den letzten Jahren eine Hemmung dieses Transporters durch den Protonenpumpeninhibitor Pantoprazol diskutiert (Pauli-Magnus et al. 2001).

3.4 Der *Abc*-Transporter-Genotyp beeinflusst die therapeutische Ansprechrate auf Mitoxantron in der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis

Um die funktionelle Signifikanz des *Abc*-Transporter-Genotyps näher zu untersuchen wurde eine *in-vivo*-Analyse durchgeführt. Hierfür verwendeten wir ein etabliertes Tiermodell der MS in Mäusen: die chronische EAE. Sie spiegelt die wichtigsten Meilensteine der Erkrankung wider und ähnelt den pathologischen Grundlagen der MS. (beispielsweise zusammengefasst von Mix et al. 2008) Für die Behandlung der EAE wird MX hocheffektiv eingesetzt (Weilbach et al. 2004).

In *Abcg2-Knock-Out*-Mäusen und entsprechenden wildtypischen Tieren wurde die Ansprechrate der Behandlung der EAE auf die MX-Therapie analysiert. Unter Verwendung einer subtherapeutisch, niedrig titrierten MX-Dosis von 0.5mg/kg, die nicht effizient in Wildtyp-Tieren ist, konnten der Krankheitsverlauf und die Histopathologie in *Abcg2-Knock-Out*-Mäusen enorm verbessert werden (Abbildung 4, Teil B: Publikation). Damit konnte *in vivo* eine funktionelle Relevanz der ABCG2-Transporter nachgewiesen werden. Das ähnelt den Resultaten von Zhou et al. (2003), die eine differenzierte Sensibilität von MX in hämatopoetischen Zellen von *Abcb1/Abcg2-Knock-Out*-Mäusen zeigen. Die Ergebnisse argumentieren darüber hinaus dafür, dass der ABCG2-Transporter eine Hauptrolle bei den Behandlungserfolgen der EAE mit MX spielt. Kodaira et al. (2010) konnten eine Kooperation von ABCB1 und ABCG2 in kinetischen Analysen der Mitoxantron-Penetration über die Blut-Hirn- und Blut-Testis-Schranke im Mausmodell nachweisen.

3.5 Der *ABC*-Transporter-Genotyp hat einen Effekt auf das therapeutische Ansprechen von Mitoxantron

In einer retrospektiven Analyse wurde der Einfluss des *ABC*-Transporter-Genotyps auf die therapeutische Ansprechrate mit MX untersucht. Obwohl klinische Charakteristika, die mit einem bevorzugten Response assoziiert sind, bereits identifiziert wurden (zum Beispiel das Alter zu Therapiebeginn, der Krankheitsverlauf/die Schubrate, die Basis-EDSS) (Le Page et

al. 2007), gibt es bisher keine Biomarker, die einen klinischen Effekt beziehungsweise ein individuelles Risiko-Profil vorhersagen können. In der vorliegenden Prüfung konnte gezeigt werden, dass die MX-Responder überrepräsentiert waren unter den *ABCB1/ABCG2-L*-Patienten in der MX-Monotherapie-Gruppe, die in den *in-vitro*-Experimenten die höhere MX-Akkumulation aufwiesen. Im Vergleich dazu sprachen die *ABCB1/ABCG2-H*-Genotypträger weniger gut auf die MX-Therapie an.

Für die Klassifikation nach der Ansprechrate auf die MX-Therapie wurden konservative, klinische Untersuchungskriterien und standardisierte Parameter gewählt wie die *EDSS*, die Schubrate und die *MSFC*-Skala, assistiert von elektrophysiologischen und magnetresonanztomografischen Daten. Die quantitative Erfassung klinischer Befunde erfolgt im neurologischen Alltag mit Hilfe etablierter Verlaufsskalen wie der *EDSS* und der *MSFC*-Skala (MSTKG und Rieckmann 2006). Die *EDSS* bildet den Goldstandard bei der Bestimmung des Behinderungsgrades anhand acht funktioneller Systeme: Pyramidenbahn, Kleinhirn, Hirnstamm, Sensorium, Blasen- und Mastdarmfunktion, Sehfunktion, zerebrale Funktion und andere Systeme (Kurtzke 1983). Die *MSFC*-Skala erhebt Daten über eine zeitlich ermittelte Gehstrecke (7.6m), einen Steckbretttest nach der Zeit zur Quantifizierung der Armfunktion und einen Aufmerksamkeits-/Konzentrationstest, der *Paced Auditory Serial Addition*-Test. Sie erlaubt einen inter- und intraindividuellen Vergleich (Cutter et al. 1999, Schwid et al. 2002). Wenn vorhanden wurden zusätzlich motorisch evozierte Potentiale zur Bestätigung der Einteilung untersucht. Diese umfasste eine Analyse der zentral-motorischen Leitungszeit, der Amplitude und der Konfiguration.

Als Resultat standen von 323 vollständig genotypisierten und mit MX behandelten Patienten 309 aus vier Zentren zur Verfügung.

Es wurde eine weitere Untergruppierung in eine MX-Monotherapie- und eine MX/GS-Kombinationstherapie-Kohorte vorgenommen. Dies erfolgte angesichts der deutlichen Effekte von GSs auf den MX-Efflux *in vitro* sowie grundlegend unterschiedlicher Behandlungsregime und Basischarakteristika der Gruppen (Tabelle 4, Teil B: Publikation).

Insgesamt profitierten 68.6% der MX-behandelten Kohorte von der Therapie. 78.1% der MX-Monotherapie-Patienten (n=155) wurden als Responder klassifiziert und lediglich 31.4% als Non-Responder (Tabelle 3A, Teil B: Publikation). Die *ABCB1/ABCG2-H*-Genotyp-Träger zeigten die niedrigste Ansprechrate (15/24, 62.5%). Die Träger der Allelvarianten in entweder *ABCB1* oder *ABCG2* (*ABCB1/ABCG2-I*) nahmen eine intermediäre Position ein (78/98, 79.6%). 28 von 33 Patienten (84.8%) mit dem *ABCB1/ABCG2-L*-Genotyp respondierten auf MX (p=0.039). Das Quotenverhältnis/*Odds Ratio* für die positive Behandlungsansprechrate zwischen *ABCB1/ABCG2-H*- und *-I*-Genotyp betrug 1.9 (95% Konfidenzintervall 1.0-3.5) und entsprechend 3.5 zwischen dem *ABCB1/ABCG2-H*- und *-L*-Genotyp. Das bedeutet, dass der Zusammenhang zwischen ABC-Transporter-Genotyp und dem Ansprechen auf die MX-Therapie höher bei Trägern des *ABCB1/ABCG2-H*-Genotyps ist im Vergleich zu den Trägern

des **-I-** oder **-L-**Genotyps. Zur strikten Kontrolle des Typ Eins Fehlers wurde der exakte Test als stringente statistische Untersuchung ausgewählt.

Bei der Analyse der Basisdaten der MX-Monotherapie-Gruppe zeigte sich eine niedrigere MX-Dosis der Behandlungs-Responder im Vergleich zu den Non-Respondern zum Zeitpunkt der Klassifikation (Tabelle 4, Teil B: Publikation). Da die niedrigeren Dosen in der Responder-Gruppe gefunden wurden, bestätigt dies die Validität des *ABC*-Genotyp-Effekts. Darüber hinaus wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Basischarakteristika der Responder und Non-Responder beobachtet. Zu den potentiellen Störfaktoren würden zum Beispiel das Alter oder die Krankheitsdauer bis zur MX-Therapie, die Basis-*EDSS* beziehungsweise der Verlaufstyp/der Krankheitsaktivität zählen (Le Page et al. 2007). Eine prospektive Validierung dieser Ergebnisse in einer größeren Kohorte ist trotzdem erstrebenswert, um ausführlichere Rückschlüsse ziehen zu können.

In der MX/GS-Kombinationstherapie-Kohorte respondierte 59.1% der Patienten. Es konnte kein klarer Genotyp-abhängiger Effekt beobachtet werden (Tabelle 3B, Teil B: Publikation). Bereits innerhalb dieser Gruppen gab es große Unterschiede in den Behandlungsprotokollen und der Basischarakteristika der Patienten, so dass keine weiteren sicheren Schlussfolgerungen gezogen werden können.

Eine prospektive, multizentrische Bestätigungsprüfung wurde 2009 in Deutschland von unserer Gruppe mit einer Prüfungsdauer von drei Jahren eingeleitet. In dieser soll die Rekrutierung einer größeren und homogenen Patienten-Gruppe im Rahmen des Kompetenznetzwerkes Multiple Sklerose und entsprechender Kontrollen erfolgen („*ABC* in Multipler Sklerose“). Es soll unter anderem potentiellen Störfaktoren und gleichförmigen Behandlungsprotokollen Rechnung getragen werden.

Der unterschiedliche MX-Efflux könnte auch mit Organ-spezifischen Nebenwirkungen einhergehen. Deshalb wurde eine separate Kohorte mit kardiologischen und hämatologischen Nebenwirkungen selektiert und bezüglich der *ABC*-Transporter-Genotyp-Verteilung analysiert. Statistische Auswertungen dieser Gruppe sind jedoch durch kleine Anzahlen und heterogene Behandlungsschemata begrenzt aussagekräftig.

Auf einem deskriptiven Level zeigten 30 von insgesamt 36 Patienten heterozygote Allelvarianten in mindestens einem *ABC*-Transporter-Gen, was vergleichbar mit den Genotypfrequenzen der gesamten MS-Population war. Bei Patienten mit schweren Nebenwirkungen wurde im Vorfeld häufig eine MX/GS-Kombinationstherapie durchgeführt: elf von 28 Patienten mit kardiologischen Nebenwirkungen einschließlich Herzversagen und sieben von acht Patienten mit schweren hämatologischen Nebenwirkungen einschließlich Therapie-assoziiertes Leukämie.

Von zehn separat gesammelten Proben des Berliner Zentrums zeigten drei einen signifikanten Abfall der echokardiografischen linksventrikulären Ejektionsfraktion ($\geq 10\%$) und sechs

Patienten eine diastolische Dysfunktion. Eine Patientin mit einem in unserer unselektierten MS-Kohorte seltenen *ABC*-Genotyp entwickelte ungewöhnlich schwere Nebenwirkungen (0.55%, Tabelle 2, Teil B: Publikation): Die 28-jährige MS-Patientin mit einem schubförmig wiederkehrenden Verlaufstyp erlitt ein schweres Herzversagen nach bereits 24mg/m² KOF MX (biventrikuläre Ejektionsfraktion 10%, Multi-Organ-Versagen, Biopsie-Exklusion aus anderen Gründen) (Dörr et al. 2010). Die Patientin ist Trägerin eines Genotyps mit einer extrem niedrigen Häufigkeit in unserer MS-Kohorte. Sie besitzt homozygote Allelvarianten in beiden untersuchten *Gen-loci* der *ABCB1*- und *ABCG2*-Transporter und zusätzlich in einer Allelvariante in einem weiteren *ABC*-Transporter namentlich *ABCC2* (rs717620) (*ABCB1*-2677 TT, 3435 TT, *ABCG2*-141KK, *ABCC2*-CT). MX ist auch ein bekanntes Substrat des *ABCC2*-Transporters (Schinkel und Jonker 2003). Dieser Fallbericht steigert das Interesse an der Assoziation der *ABC*-Transporter-Genpolymorphismen mit ungewöhnlich schweren Nebenwirkungen in der Behandlung der MS mit MX.

Meissner et al. berichteten 2004 und 2006 von einer unterschiedlichen Expression von *ABCB1*- und *ABCG2*-Transportern im gesunden und kranken humanen Herz, was einen möglichen Einfluss der Transporter bei dem Krankheitsgeschehen vermuten lässt. *ABC*-Transporter-Genotyp abhängige Effekte wurden bereits von Wojnowski et al. (2005) beschrieben mit einer Anthrazyklin-induzierten Kardiotoxizität in Non-Hodgkin-Lymphom-Patienten. In dieser Kohorte könnte allerdings eine Vielzahl anderer Risikofaktoren für die Entwicklung einer Kardiotoxizität eine Rolle gespielt haben (zum Beispiel mediastinale Bestrahlung, zusätzliche Behandlung mit kardiotoxischen Substanzen und hohes Alter der Patienten). MS-Patienten sind jedoch typischerweise jünger, kardiologisch gesund und nicht andersweitig vorbehandelt. *In-vitro*-Untersuchungen könnten potentiell die These bekräftigen, dass der *ABC*-Genotyp ein Risiko-Biomarker für schwerwiegende Nebenwirkungen in der Behandlung der MS mit MX sein kann. Obwohl dies durchaus durchführbar für die Kardiomyozytenfunktion scheint, gibt es bisher kein geeignetes *in-vitro*-Modell, um die hämatologischen Nebenwirkungen zu untersuchen. In diesem Kontext ist eine von Hasan et al. (2008) veröffentlichte Prüfung von Interesse für die MS. Sie zeigt, dass in der MX-Therapie-assoziierten akuten promyelozytischen Leukämie in MS-Patienten bevorzugte Stellen bei der Schädigung der DNS existieren. Dieses könnte dazu führen, dass sich nach der Medikamenten-Exposition vor allem dieser bestimmte Subtyp der Leukämie entwickelt.

Das Vorkommen von schwerwiegenden kardiologischen und hämatologischen Nebenwirkungen während der MX/GS-Kombinationstherapie in Verbindung mit den entsprechenden Genotypen verlangt eindeutig eine prospektive Evaluation.

4 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Häufigkeit von *ABC*-Transporter-Genpolymorphismen, der Transporter-Expression auf potentiellen Zielorganen der Mitoxantron-Therapie, der funktionellen Rolle *in vitro* und *in vivo* und eine retrospektive, klinische Analyse des potentiellen Einflusses auf die Mitoxantron-Ansprechrates in Multipler Sklerose.

Es konnte eine hohe Prävalenz von funktionell relevanten Allelvarianten in *ABC*-Transporter-Genen von Multiple-Sklerose-Patienten detektiert werden, die den Mitoxantron-Efflux und den Mitoxantron-induzierten Zelltod in Immunzellen *in vitro* bestimmen. Eine hohe *ABC*-Transporter-*mRNA*-Expression im ZNS- sowie im kardialen Gewebe argumentiert für die Relevanz der *ABC*-Transporter bei Mitoxantron-behandelten Multiple-Sklerose-Patienten. In Mitoxantron-behandelten *Abcg2-Knock-Out*-EAE-Mäusen konnte *in vivo* ein funktioneller Einfluss der *ABC*-Transporter-Genpolymorphismen gezeigt werden. In einer retrospektiven, klinischen Assoziation wurde ein Zusammenhang zwischen dem Ansprechen auf die Mitoxantron-Therapie und dem *ABC*-Transporter-Genotyp detektiert in Multiple-Sklerose-Patienten. Träger des *ABCB1/ABCG2-H*-Genotyps, deren Immunzellen *in vitro* einen höheren Mitoxantron-Efflux und damit verbunden eine höhere Transporteraktivität zeigten, wiesen eine niedrigere positive Mitoxantron-Behandlungsansprechrates/Response auf im Vergleich zu Trägern des *-I-* oder *-L-*Genotyps. Daneben konnte eine *in-vitro*-Inhibition des Mitoxantron-Effluxes durch Glukokortikosteroide nachgewiesen werden, die klinisch oft in Kombination mit Mitoxantron verwendet werden.

Zusammengefasst, eröffnen unsere Daten die Möglichkeit, das individuelle Risiko-/Benefit-Profil von Mitoxantron zu optimieren und damit die therapeutische Effektivität zu steigern. Auf der Grundlage solcher potentiellen pharmakogenetischen Biomarker könnte beispielsweise direkt Einfluss auf die individuelle Titration der Dosis, der Intervalle oder der Sicherheitsüberwachung genommen werden. Das ist von besonderem Interesse, da nicht erwartet wird, dass in naher Zukunft Mitoxantron durch andere Substanzen ersetzt werden kann und Untersuchungen zur Optimierung der Mitoxantron-Therapie, wie die additive Gabe von kardioprotektiven Agenzien, noch im experimentellen Stadium sind (Bernitsas et al. 2006, Weilbach et al. 2004, Zecca et al. 2011).

Die vorliegende Arbeit bildet die Grundlage einer bereits eingeleiteten prospektiven Untersuchung des Kompetenznetzwerks Multiple Sklerose („*ABC* in Multipler Sklerose“). Daneben findet aktuell eine retrospektive Prüfung der Ansprechrates Mitoxantron-behandelter primär progredienter Multiple-Sklerose-Patienten in Abhängigkeit von klinischen Charakteristika und *ABC*-Transporter-Genpolymorphismen statt. Weitere Analysen könnten explizitere Untersuchungen der Patienten mit schwerwiegenden unerwünschten Ereignissen unter Mitoxantron-Therapie sowie die Rolle weiterer *ABC*-Transporter, wie *ABCC2*, umfassen.

5 Literaturverzeichnis

(Allikmets et al. 1998) = Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V, Dean M (1998): A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res* 58, 5337-5339

(Babaoglu et al. 2005) = Babaoglu MO, Bayar B, Aynacioglu AS, Kerb R, Abali H, Celik I, Bozkurt A (2005): Association of the ABCB1 3435C>T polymorphism with antiemetic efficacy of 5-hydroxytryptamine type 3 antagonists. *Clin Pharmacol Ther* 78, 619-626

(Bernitsas et al. 2006) = Bernitsas E, Wei W, Mikol DD (2006): Suppression of mitoxantrone cardiotoxicity in multiple sclerosis patients by dexrazoxane. *Ann Neurol* 59, 206–209

(Borst und Elferink 2002) = Borst P, Elferink RO (2002): Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* 71, 537-592

(Bosch et al. 2005) = Bosch TM, Kjellberg LM, Bouwers A, Koeleman BP, Schellens JH, Beijnen JH, Smits PH, Meijerman I (2005): Detection of single nucleotide polymorphisms in the ABCG2 gene in a Dutch population. *Am J Pharmacogenomics* 5, 123-131

(Boster et al. 2008) = Boster A, Edan G, Frohman E, Javed A, Stuve O, Tselis A, Weiner H, Weinstock-Guttman B, Khan O (2008): Intense immunosuppression in patients with rapidly worsening multiple sclerosis: treatment guidelines for the clinician. *Lancet Neurol* 7, 173–183

(Böyum 1968) = Böyum A (1968): Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyteaggregating agents. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 97, 31-50

(Bursch et al. 1990) = Bursch W, Paffe S, Putz B, Barthel G, Schulte-Hermann R (1990): Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and in altered hepatic foci of rats. *Carcinogenesis* 11, 847–853

(Cascorbi 2006) = Cascorbi I (2006): Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacol Ther* 112, 457-473

(Chan et al. 2003) = Chan A, Seguin R, Magnus T, Papadimitriou C, Toyka KV, Antel JP, Gold R (2003): Phagocytosis of apoptotic inflammatory cells by microglia and its therapeutic implications: termination of CNS-autoimmune inflammation and modulation by interferon-beta. *Glia* 43, 231–242

(Chan et al 2005.) = Chan A, Weilbach FX, Toyka KV, Gold R (2005): Mitoxantrone induces cell death in peripheral blood leucocytes of multiple sclerosis patients. *Clin Exp Immunol* 139, 152–158

(Chaudhary et al. 1992) = Chaudhary PM, Mechetner EB, Roninson IB (1992): Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes. *Blood* 80, 2735-2739

(Cohen und Mikol 2004) = Cohen BA, Mikol DD (2004): Mitoxantrone treatment of multiple sclerosis: safety considerations. *Neurology* 63, 28–32

(Compston und Coles 2008) = Compston A, Coles A (2008): Multiple sclerosis. *Lancet* 372, 1502-1517

(Cutter et al. 1999) = Cutter GR, Baier ML, Rudick RA, Cookfair DL, Fischer JS, Petkau J, Syndulko K, Weinshenker BG, Antel JP, Confavreux C et al. (1999): Development of a multiple sclerosis functional composite as a clinical trial outcome measure. *Brain* 122, 871-882

(Das Internationale *HapMap* Konsortium 2007) = The International HapMap Consortium (2007): A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 449, 851–862

(Demeule et al. 1999) = Demeule M, Jodoin J, Beaulieu E, Brossard M, Béliveau R (1999): Dexamethasone modulation of multidrug transporters in normal tissues. *FEBS Lett* 15, 208-214

(Dörr et al. 2010) = Dörr J, Bitsch A, Schmailzl KJ, Chan A, von Ahsen N, Hummel M, Varon R, Lill CM, Vogel HP, Zipp F et al. (2010): Severe cardiac failure in a multiple sclerosis patient following low-dose mitoxantrone treatment. *Neurology* 74, 934

(Doyle et al. 1998) = Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD (1998): A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15665-15670

(Durr et al. 1983) = Durr FE, Wallace RE, Citarella RV (1983): Molecular and biochemical pharmacology of mitoxantrone. *Cancer Treat Rev* 10, 3-11

(Edan et al. 1997) = Edan G, Miller D, Clanet M, Confavreux C, Lyon-Caen O, Lubetzki C, Brochet B, Berry I, Rolland Y, Froment JC et al. (1997): Therapeutic effect of mitoxantrone combined with methylprednisolone in multiple sclerosis: a randomised multicentre study of active disease using MRI and clinical criteria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 62, 112–118

(Esposito et al. 2010) = Esposito F, Radaelli M, Martinelli V, Sormani MP, Martinelli Boneschi F, Moiola L, Rocca MA, Rodegher M, Comi G (2010): Comparative study of mitoxantrone efficacy profile in patients with relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* 16, 1490-1499

(Evseenko et al. 2007) = Evseenko DA, Paxton JW, Keelan JA (2007): Independent Regulation of Apical and Basolateral Drug Transporter Expression and Function in Placental Trophoblasts by Cytokines, Steroids, and Growth Factors. *Drug Metab Dispos* 35, 595-601

(Fidler et al. 1986) = Fidler JM, DeJoy SQ, Gibbons JJ (1986) : Selective immunomodulation by the antineoplastic agent mitoxantrone. I. Suppression of B lymphocyte function. *J Immunol* 137, 727–732

(Flachenecker 2006) = Flachenecker P (2006): Epidemiology of neuroimmunological diseases. *J Neurol* 253, 2-8

(Fotino et al. 1971) = Fotino M, Merson EJ, Allen FH Jr (1971): Micromethod for rapid separation of lymphocytes from peripheral blood. *Ann Clin Lab Sci* 1,131-133

(Frohman et al. 2006) = Frohman EM, Racke MK, Raine CS (2006): Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* 354, 942-955

(Gaunt et al. 2007) = Gaunt T, Rodriguez S, Day I (2007): Cubic exact solutions for the estimation of pairwise haplotype frequencies: implications for linkage disequilibrium analyses and a web tool 'CubeX'. *BMC Bioinformatics* 8, 428

(Geiselhart et al. 1996-1997) = Geiselhart A, Neu S, Buchholz F, Lang P, Niethammer D, Handgretinger R (1996-1997): Positive selection of CD56+ lymphocytes by magnetic cell sorting. *Nat Immun* 15, 227-233

(Ghalie et al. 2002) = Ghalie RG, Edan G, Laurent M, Mauch E, Eisenman S, Hartung HP, Gonsette RE, Butine MD, Goodkin DE (2002): Cardiac adverse effects associated with mitoxantrone (Novantrone) therapy in patients with MS. *Neurology* 59, 909–913

(Gold und Rieckmann 2007) = Gold R, Rieckmann P (2007): Fortschritte im Verständnis von Pathogenese und Immuntherapie der Multiplen Sklerose. *Nervenarzt* 78, 15-26

(Gonsette 2007) = Gonsette RE (2007): Compared benefit of approved and experimental immunosuppressive therapeutic approaches in multiple sclerosis. *Expert Opin Pharmacother* 8, 1103–1116

(González-Lobato et al. 2010) = González-Lobato L, Real R, Prieto JG, Alvarez AI, Merino G (2010): Differential inhibition of murine Bcrp1/Abcg2 and human BCRP/ABCG2 by the mycotoxin fumitremorgin C. *Eur J Pharmacol* 644, 41-48

(Gottesman et al. 2002) = Gottesman MM, Fojo T, Bates SE (2002): Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2, 48-58

(Hartung et al. 1988) = Hartung HP, Schäfer B, Heininger K, Stoll G, Toyka KV (1988): The role of macrophages and eicosanoids in the pathogenesis of experimental allergic neuritis. Serial clinical, electrophysiological, biochemical and morphological observations. *Brain* 111, 1039–1059

(Hartung et al. 2002) = Hartung HP, Gonsette R, König N, Kwiecinski H, Guseo A, Morrissey SP, Krapf H, Zwingers T; Mitoxantrone in Multiple Sclerosis Study Group (MIMS) (2002): Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebocontrolled, double blind, randomised multicentre trial. *Lancet* 360, 2018–2025

(Hasan et al. 2008) = Hasan SK, Mays AN, Ottone T, Ledda A, La Nasa G, Cattaneo C, Borlenghi E, Melillo L, Montefusco E, Cervera J et al. (2008): Molecular analysis of t(15;17) genomic breakpoints in secondary acute promyelocytic leukemia arising after treatment of multiple sclerosis. *Blood* 112, 3383–3390

(Hemmer et al. 2006) = Hemmer B, Nessler S, Zhou D, Kieseier B, Hartung HP (2006): Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol* 2, 201–211

(Hermann et al. 2006) = Hermann DM, Kilic E, Spudich A, Kramer SD, Wunderli-Allenspach H, Bassetti CL (2006): Role of drug efflux carriers in the healthy and diseased brain. *Ann Neurol* 60, 489–498

(Higgins 1992) = Higgins CF (1992): ABC TRANSPORTERS: From Microorganisms to Man. *Ann Rev Cell Biol* 8, 67–113

(Hitzl et al. 2001) = Hitzl M, Drescher S, van der Kuip H, Schäffeler E, Fischer J, Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF (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. *Pharmacogenetics* 11, 293–298

(Hoffmeyer et al. 2000) = Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M et al. (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 USA* 97, 3473–3478

(Homolya et al. 2011) = Homolya L, Orbán TI, Csanády L, Sarkadi B (2011): Mitoxantrone is expelled by the ABCG2 multidrug transporter directly from the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* 1808: 154–163

(Hu et al. 1992) = Hu OY, Chang SP, Law CK, Jian JM, Chen KY (1992): Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies with mitoxantrone in the treatment of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 69, 847–853

(Jansen et al. 2003) = Jansen G, Scheper RJ, Dijkmans BA (2003): Multidrug resistance proteins in rheumatoid arthritis, role in disease-modifying antirheumatic drug efficacy and inflammatory processes: an overview. *Scand J Rheumatol* 32, 325-336

(Juliano und Ling 1976) = Juliano RL, Ling V (1976): A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 455, 152-162

(Keegan und Noseworthy 2002) = Keegan BM, Noseworthy JH (2002): Multiple sclerosis. *Annu Rev Med* 53, 285-302

(Kenealy et al. 2003) = Kenealy SJ, Pericak-Vance MA, Haines JL (2003): The genetic epidemiology of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 143, 7-12

(Kerb 2006) = Kerb R (2006): Implications of genetic polymorphisms in drug transporters for pharmacotherapy. *Cancer Lett* 234, 4-33

(Kieseier und Jeffery 2010) = Kieseier BC, Jeffery DR (2010): Chemotherapeutics in the treatment of multiple sclerosis. *Ther Adver Neurol Disord* 3, 277-291

(Kim und Benet 2004) = Kim WY, Benet LZ (2004): P-glycoprotein (P-gp/MDR1)-mediated efflux of sex-steroid hormones and modulation of P-gp expression in vitro. *Pharm Res* 21, 1284-1293

(Klimecki et al. 1994) = Klimecki WT, Futscher BW, Grogan TM, Dalton WS (1994): P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers. *Blood* 83, 2451-2458

(Kodaira et al. 2010) = Kodaira H, Kusuhara H, Ushiki J, Fuse E, Sugiyama Y (2010): Kinetic analysis of the cooperation of P-glycoprotein (P-gp/Abcb1) and breast cancer

resistance protein (Bcrp/Abcg2) in limiting the brain and testis penetration of erlotinib, flavopiridol, and mitoxantrone. *J Pharmacol Exp Ther* 333, 788-796

(Kooij et al. 2009) = Kooij G, Backer R, Koning JJ, Reijerkerk A, van Horssen J, van der Pol SM, Drexhage J, Schinkel A, Dijkstra CD, den Haan JM, Geijtenbeek TB, de Vries HE (2009): P-glycoprotein acts as an immunomodulator during neuroinflammation. *PLoS One* 4, 8212

(Kopadze et al. 2006) = Kopadze T, Dehmel T, Hartung HP, Stüve O, Kieseier BC (2006): Inhibition by mitoxantrone of in vitro migration of immunocompetent cells: a possible mechanism for therapeutic efficacy in the treatment of multiple sclerosis. *Arch Neurol* 63, 1572–1578

(Kruse et al. 2001) = Kruse N, Moriabadi NF, Toyka KV, Rieckmann P (2001): Characterization of early immunological responses in primary cultures of differentially activated human peripheral mononuclear cells. *J Immunol Methods* 247, 131-139

(Kurtzke 1983) = Kurtzke JF (1983): Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33, 1444-1452

(Leith et al. 1999) = Leith CP, Kopecky KJ, Chen IM, Eijdem L, Slovak ML, McConnell TS, Head DR, Weick J, Grever MR, Appelbaum FR et al. (1999): Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Blood* 94, 1086–1099

(Le Page et al. 2007) = Le Page E, Leray E, Taurin G, Coustans M, Chaperon J, Morrissey SP, Edan G (2007): Mitoxantrone as induction treatment in aggressive relapsing remitting multiple sclerosis: treatment response factors in a 5-year follow-up observational study of 100 consecutive patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79, 52–56

(Leslie et al. 2005) = Leslie EM, Deeley RG, Cole SP (2005): Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol* 204, 216-237

(Livak und Schmittgen 2001) = Livak KJ, Schmittgen TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 25, 402-408

(Löscher und Potschka 2005) = Löscher W, Potschka H (2005): Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat Rev Neurosci* 6, 591–602

(Lublin und Reingold 1996) = Lublin FD, Reingold SC (1996): Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 46: 907–911

(Lucchinetti et al. 2000) = Lucchinetti CF, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000): Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47, 707-717

(Marriott et al. 2010) = Marriott JJ, Miyasaki JM, Gronseth G, O'Connor PW; Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology (2010): Evidence Report: The efficacy and safety of mitoxantrone (Novantrone) in the treatment of multiple sclerosis: Report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 74, 1410-1411

(Marzolini et al. 2004) = Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB (2004): Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 75, 13-33

(McDonald et al. 2001) = McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC et al. (2001): Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50, 121-127

(Meissner et al. 2004) = Meissner K, Jedlitschky G, Meyer zu Schwabedissen H, Dazert P, Eckel L, Vogelgesang S, Warzok RW, Böhm M, Lehmann C, Wendt M et al. (2004): Modulation of multidrug resistance P-glycoprotein 1 (ABCB1) expression in human heart by hereditary polymorphisms. *Pharmacogenetics* 14, 381-385

(Meissner et al. 2006) = Meissner K, Heydrich B, Jedlitschky G, Meyer Zu Schwabedissen H, Mosyagin I, Dazert P, Eckel L, Vogelgesang S, Warzok RW et al. (2006): The ATP-binding cassette transporter ABCG2 (BCRP), a marker for side population stem cells, is expressed in human heart. *J Histochem Cytochem* 54, 215-221

(Miyake et al. 1999) = Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R, Cristensen B, Brangi M, Greenberger L, Dean M, Fojo T et al. (1999): Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res* 59, 8-13

(Mix et al. 2008) = Mix E, Meyer-Rienecker H, Zettl UK (2008): Animal models of multiple sclerosis for the development and validation of novel therapies-potential and limitations. *J Neurol* 6, 7-14

(Mizuarai et al. 2004) = Mizuarai S, Aozasa N, Kotani H (2004): Single nucleotide polymorphisms result in impaired membrane localization and reduced atpase activity in multidrug transporter ABCG2. *Int J Cancer* 109, 238–246

(Moriya et al. 2002) = Moriya Y, Nakamura T, Horinouchi M, Sakaeda T, Tamura T, Aoyama N, Shirakawa T, Gotoh A, Fujimoto S, Matsuo M et al. (2002): Effects of polymorphisms of MDR1, MRP1, and MRP2 genes on their mRNA expression levels in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. *Biol Pharm Bull* 25, 1356-1359

(Morrissey et al. 2005) = Morrissey SP, Le Page E, Edan G (2005): Mitoxantrone in the treatment of multiple sclerosis. *Int MS J* 12, 74–87

(Morrow et al. 2006) = Morrow CS, Peklak-Scott C, Bishwokarma B, Kute TE, Smitherman PK, Townsend AJ (2006): Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1, ABCC1) Mediates Resistance to Mitoxantrone via Glutathione-Dependent Drug Efflux. *Mol Pharmacol* 69, 1499-1505

(MSTKG und Rieckmann 2006) = Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe (MSTKG), Rieckmann P (2006): Immunmodulatorische Stufentherapie der Multiplen Sklerose. *Nervenarzt* 77, 1506-1518

(MSTKG et al. 2008) = Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe (MSTKG), Wiendl H, Toyka KV, Rieckmann P, Gold R, Hartung HP, Hohlfeld R (2008): Basic and escalating immunomodulatory treatments in multiple sclerosis: current therapeutic recommendations. *J Neurol* 255, 1449-1463

(Neuhaus et al. 2005) = Neuhaus O, Wiendl H, Kieseier BC, Archelos JJ, Hemmer B, Stüve O, Hartung HP (2005): Multiple sclerosis: Mitoxantrone promotes differential effects on immunocompetent cells in vitro. *J Neuroimmunol* 168, 128-137

(Neuhaus et al. 2007) = Neuhaus O, Kieseier BC, Hartung HP (2007): Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the interferon-betas, glatiramer acetate, and mitoxantrone in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 259, 27-37

(Ni et al. 2010) = Ni Z, Bikadi Z, Rosenberg MF, Mao Q (2010): Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Curr Drug Metab* 11, 603-617

(Nieth und Lage 2005) = Nieth C, Lage H (2005): Induction of the ABC-transporters Mdr1/P-gp (Abcb1), mrpl (Abcc1), and bcrp (Abcg2) during establishment of multidrug resistance following exposure to mitoxantrone. *J Chemother* 17, 215-223

(Noseworthy et al. 2000) = Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG (2000): Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343, 938-952

(Owen et. al. 2005) = Owen A, Goldring C, Morgan P, Chadwick D, Park BK, Pirmohamed M (2005): Relationship between the C3435T and G2677T(A) polymorphisms in the ABCB1 gene and P-glycoprotein expression in human liver. *Br J Clin Pharmacol* 59, 365-370

(Paul et al. 2007) = Paul F, Dörr J, Würfel J, Vogel HP, Zipp F (2007): Early mitoxantrone-induced cardiotoxicity in secondary progressive multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78, 198–200

(Pauli-Magnus et al. 2001) = Pauli-Magnus C, Rekersbrink S, Klotz U, Fromm MF (2001): Interaction of omeprazole, lansoprazole and pantoprazole with P-glycoprotein. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 364, 551-557

(Pavek et al. 2005) = Pavek P, Merino G, Wagenaar E, Bolscher E, Novotna M, Jonker JW, Schinkel AH (2005): Human breast cancer resistance protein: interactions with steroid drugs, hormones, the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridine, and transport of cimetidine. *J Pharmacol Exp Ther* 312, 144–152

(Pearce 2005) = Pearce JM (2005): Historical descriptions of multiple sclerosis. *Eur Neurol* 54, 49-53

(Polman et al. 2005) = Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Metz LM, McFarland HF, O'Connor PW et al. (2005): Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol* 58, 840-846

(Poser et al. 1983) = Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, Johnson KP, Sibley WA, Silberberg DH, Tourtellotte WW (1983): New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 13, 227-231

(Radonić et al. 2004) = Radonić A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A (2004): Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 313, 856-862

(Rieckmann et al. 2004) = Rieckmann P, Toyka KV, Bassetti C, Beer K, Beer S, Buettner U, Chofflon M, Götschi-Fuchs M, Hess K, Kappos L et al. (2004): Escalating immunotherapy of multiple sclerosis—new aspects and practical application. *J Neurol* 251, 1329–1339

(Robey et al. 2007) = Robey RW, Polgar O, Deeken J, To KW, Bates SE (2007): ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance. *Cancer Metastasis Rev* 26, 39–57

(Roninson et al. 1986) = Roninson IB, Chin JE, Choi KG, Gros P, Housman DE, Fojo A, Shen DW, Gottesman MM, Pastan I (1986): Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 4538-4542

(Sakaeda et al. 2003) = Sakaeda T, Nakamura T, Okumura K (2003): Pharmacogenetics of MDR1 and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs. *Pharmacogenomics* 4, 397-410

(Sakurai et al.2007) = Sakurai A, Onishi Y, Hirano H, Seigneuret M, Obanayama K, Kim G, Liew EL, Sakaeda T, Yoshiura K, Niikawa N et al. (2007): Quantitative structure--activity relationship analysis and molecular dynamics simulation to functionally validate nonsynonymous polymorphisms of human ABC transporter ABCB1 (P-glycoprotein/MDR1). *Biochemistry* 46, 7678-7693

(Sarkadi et al. 2004) = Sarkadi B, Ozvegy-Laczka C, Német K, Váradi A (2004): ABCG2 - a transporter for all seasons. *FEBS Lett* 567, 116-120

(Scharenberg et al. 2002) = Scharenberg CW, Harkey MA, Torok-Storb B (2002): The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood* 99, 507-512

(Schinkel und Jonker 2003) = Schinkel AH, Jonker JW (2003): Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev* 55, 3-29

(Schinkel et al. 1996) = Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L (1996): P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest* 97, 2517-2524

(Schmid et al. 2000) = Schmid D, Burmester GR, Tripmacher R, Kuhnke A, Buttgerit F (2000): Bioenergetics of human peripheral blood mononuclear cell metabolism in quiescent, activated, and glucocorticoid-treated states. *Biosci Rep* 20, 289-302

(Schwab et al. 2003) = Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF (2003): Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43, 285-307

(Schwid et al. 2002) = Schwid SR, Goodman AD, McDermott MP, Bever CF, Cook SD (2002): Quantitative functional measures in MS: what is a reliable change? *Neurology* 58, 1294-1296

(Shen et al. 1986) = Shen DW, Fojo A, Chin JE, Roninson IB, Richert N, Pastan I, Gottesman MM (1986): Human multidrug-resistant cell lines: increased *mdr1* expression can precede gene amplification. *Science* 232, 643-645

(Stüve et al. 2004) = Stüve O, Kita M, Pelletier D, Fox RJ, Stone J, Goodkin DE, Zamvil SS (2004): Mitoxantrone as a potential therapy for primary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* 10, 58–61

(Tamura et al. 2006) = Tamura A, Watanabe M, Saito H, Nakagawa H, Kamachi T, Okura I, Ishikawa T (2006): Functional validation of the genetic polymorphisms of human ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCG2: identification of alleles that are defective in porphyrin transport. *Mol Pharmacol* 70, 287-296

(Ting und Morris 1971) = Ting A, Morris PJ (1971): A technique for lymphocyte preparation from stored heparinized blood. *Vox Sang* 20, 561-563

(Uhr et al. 2008) = Uhr M, Tontsch A, Namendorf C, Ripke S, Lucae S, Ising M, Dose T, Ebinger M, Rosenhagen M, Kohli M et al. (2008): Polymorphisms in the drug transporter gene ABCB1 predict antidepressant treatment response in depression. *Neuron* 57, 203–209

(van de Ven et al. 2009) = van de Ven R, Oerlemans R, van der Heijden JW, Scheffer GL, de Gruij TD, Jansen G, Scheper RJ (2009): ABC drug transporters and immunity: novel therapeutic targets in autoimmunity and cancer. *J Leukoc Biol* 86, 1-13

(Vermes et al. 1995) = Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C (1995): A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *J Immunol Meth* 184, 39-51

(von Ahsen et al. 2000) = von Ahsen N, Lewczuk P, Schutz E, Oellerich M, Ehrenreich H (2000): Prothrombin activity and concentration in healthy subjects with and without the prothrombin G20210A mutation. *Thromb Res* 99, 549–556

(von Ahsen et al. 2001) = von Ahsen N, Richter M, Grupp C, Ringe B, Oellerich M, Armstrong VW (2001): No influence of the MDR-1 C3435T polymorphism or a CYP3A4 promoter polymorphism (CYP3A4-V allele) on dose-adjusted cyclosporin A trough

concentrations or rejection incidence in stable renal transplant recipients. *Clin Chem* 47, 1048–1052

(Weilbach et al. 2004) = Weilbach FX, Chan A, Toyka KV, Gold R (2004): The cardioprotector dexrazoxane augments therapeutic efficacy of mitoxantrone in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol* 135, 49–55

(Wojnowski et al. 2005) = Wojnowski L, Kulle B, Schirmer M, Schlüter G, Schmidt A, Rosenberger A, Vonhof S, Bickeböller H, Toliat MR, Suk EK et al. (2005): NAD(P)H oxidase and multidrug resistance protein genetic polymorphisms are associated with doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Circulation* 112, 3754–3762

(Zamar et al. 2007) = Zamar D, McNeney B, Graham J (2007): elrm: Software implementing exact-like inference for logistic regression models. *J Stat Software* 21, 1–18

(Zecca et al. 2011) = Zecca C, Petrini L, Limoni C, Staedler C, Gobbi C (2011): Tolerability and acceptance of prolonged low/delayed mitoxantrone regimens in patients with worsening multiple sclerosis. *Eur Neurol* 65, 40-45

(Zheng et al. 2003) = Zheng G, Freidlin G, Zhaohai L, Gastwirth JL (2003): Choice of scores in trend tests for case-control studies of candidate-gene associations. *Biometrical J* 45, 335–348

(Zheng 2008) = Zheng G (2008): Analysis of ordered categorical data: two score-independent approaches. *Biometrics* 64, 1276–1279

(Zhou et al. 2003) = Zhou S, Zong Y, Lu T, Sorrentino BP (2003): Hematopoietic cells from mice that are deficient in both Bcrp1/Abcg2 and Mr1a/1b develop normally but are sensitized to mitoxantrone. *BioTechniques* 35, 1248–1252

(Zingler et al. 2005) = Zingler VC, Strupp M, Jahn K, GroßA, HohlfeldR, Brandt T (2005): Kombinierte Mitoxantron-/Methylprednisolon-Behandlung bei primär und sekundär chronisch progredienter Multipler Sklerose. *Nervenarzt* 76, 740–747

Teil B: Publikation

Cotte S, von Ahsen N, Kruse N, Huber B, Winkelmann A, Zettl UK, Starck M, König N, Tellez N, Dörr J, Paul F, Zipp F, Lühder F, Koepsell H, Pannek H, Montalban X, Gold R und Chan A (2009): ABC-transporter gene-polymorphisms are potential pharmacogenetic markers for mitoxantrone response in multiple sclerosis. *Brain* 132, 1-14

Brain Advance Access published July 15, 2009

doi:10.1093/brain/awp164

Brain 2009; Page 1 of 14 | 1

BRAIN
A JOURNAL OF NEUROLOGY

ABC-transporter gene-polymorphisms are potential pharmacogenetic markers for mitoxantrone response in multiple sclerosis

S. Cotte,^{1,2,*} N. von Ahsen,^{3,*} N. Kruse,^{1,*} B. Huber,^{1,2} A. Winkelmann,⁴ U. K. Zettl,⁴ M. Starck,⁵ N. König,⁵ N. Tellez,⁶ J. Dörr,^{7,8} F. Paul,^{7,8} F. Zipp,⁸ F. Lühder,¹ H. Koepsell,⁹ H. Pannek,¹⁰ X. Montalban,⁶ R. Gold² and A. Chan²

1 Institute for MS-Research, Medical Faculty, University of Göttingen and Gemeinnützige Hertie-Stiftung, Göttingen, Germany

2 Department of Neurology, Ruhr University, St. Josef-Hospital, Bochum, Germany

3 Department of Clinical Chemistry, Medical Faculty, University of Göttingen, Göttingen, Germany

4 Department of Neurology, University of Rostock, Rostock, Germany

5 Marianne-Strauß Klinik, Berg, Germany

6 Unit of Clinical Neuroimmunology, Department of Neurology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

7 NeuroCure Clinical Research Center, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

8 Cecile Vogt Clinic for Neurology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

9 Department of Anatomy and Cell Biology, University of Würzburg, Würzburg, Germany

10 Department of Presurgical Evaluation and Epilepsy Surgery, Bethel Epilepsy Center, Bielefeld, Germany

*These authors have contributed equally to this work.

Correspondence to: Andrew Chan, MD,
Department of Neurology,
Ruhr University,
St. Josef-Hospital,
Gudrunstr. 56,
D-44791 Bochum,
Germany
E-mail: andrew.chan@rub.de

Escalation therapy with mitoxantrone (MX) in highly active multiple sclerosis is limited by partially dose-dependent side-effects. Predictors of therapeutic response may result in individualized risk stratification and MX dosing. ATP-binding cassette-transporters ABCB1 and ABCG2 represent multi-drug resistance mechanisms involved in active cellular MX efflux. Here, we investigated the role of ABC-gene single nucleotide polymorphisms (SNPs) for clinical MX response, corroborated by experimental *in vitro* and *in vivo* data. Frequencies of ABCB1 2677G>T, 3435C>T and five ABCG2-SNPs were analysed in 832 multiple sclerosis patients (Germany, Spain) and 264 healthy donors. Using a flow-cytometry-based *in vitro* assay, MX efflux in leukocytes from individuals with variant alleles in both ABC-genes (designated genotype ABCB1/ABCG2-Low), 22.2% of patients) was 37.7% lower than from individuals homozygous for common alleles (ABCB1/ABCG2-High). $P < 0.05$, 14.8% of patients), resulting in genotype-dependent MX accumulation and cell death. Addition of glucocorticosteroids (GCs) inhibited MX efflux *in vitro*. ABC-transporters were highly expressed in leukocyte subsets, glial and neuronal cells as well as myocardium, i.e. cells/tissues potentially affected by MX therapy. *In vivo* significance was further corroborated in experimental autoimmune encephalomyelitis in *Abcg2*^{-/-} animals. Using a MX dose titrated to be ineffective in wild-type animals, disease course and histopathology in *Abcg2*^{-/-} mice were strongly ameliorated. Retrospective clinical analysis in MX monotherapy patients ($n = 155$)

Received November 9, 2008. Revised May 14, 2009. Accepted May 15, 2009.

© The Author (2009). Published by Oxford University Press on behalf of the Guarantors of Brain. All rights reserved.
For Permissions, please email: journals.permissions@oxfordjournals.org

used expanded disability status scale, relapse rate and multiple sclerosis functional composite as major outcome parameters. The clinical response rate [overall 121 of 155 patients (78.1%)] increased significantly with genotypes associated with decreasing ABCB1/ABCG2-function [ABCB1/ABCG2-H 15/24 (62.5%) responders, ABCB1/ABCG2-I (intermediate) 78/98 (79.6%), ABCB1/ABCG2-L 28/33 (84.8%), exact Cochran-Armitage test $P=0.039$]. The odds ratio for response was 1.9 (95% CI 1.0–3.5) with each increase in ABCB1/ABCG2 score (from ABCB1/ABCG2-H to –I, and –I to –L). In 36 patients with severe cardiac or haematological side effects no statistically relevant difference in genotype frequency was observed. However, one patient with biopsy proven cardiomyopathy only after 24 mg/m² MX exhibited a rare genotype with variant, partly homozygous alleles in 3 ABC-transporter genes. In conclusion, SNPs in ABC-transporter genes may serve as pharmacogenetic markers associated with clinical response to MX therapy in multiple sclerosis. Combined MX/GC-treatment warrants further investigation.

Keywords: multi-drug resistance transporter; escalation therapy; pharmacogenetics; experimental autoimmune encephalomyelitis
Abbreviations: ABC = ATP-binding cassette transporter; ATP = adenosine triphosphate; CNS = central nervous system; EAE = experimental autoimmune encephalomyelitis; EDSS = expanded disability status scale; GC = glucocorticosteroid; MSFC = multiple sclerosis functional composite; MX = mitoxantrone; SNP = single nucleotide polymorphism

Introduction

The anthracenedione mitoxantrone (MX) is recommended as an escalation therapy for highly active multiple sclerosis in case of failure or intolerance to previous immunomodulatory treatment or as first line therapy for malignant multiple sclerosis (Rieckmann et al., 2004; Morrissey et al., 2005; Boster et al., 2008). This clinical restriction accounts for the risk profile of MX, most importantly cardiotoxicity, bone marrow depression, therapy related acute leukaemia and gonadal dysfunction (Cohen and Mikol, 2004). Cardiotoxicity with symptomatic congestive heart failure in ~0.1% of patients is typically related to higher MX doses, restricting its lifetime cumulative use to a maximum of 140 mg/m² of body surface area (Ghalib et al., 2002). However, early cardiotoxicity at much lower dosages and late manifestations even several years after cessation of therapy have been described (Morrissey et al., 2005; Paul et al., 2007). Thus, biomarkers that allow individualized risk stratification are urgently needed. In addition, response predictors that permit individualized dosing may potentially lead to longer treatment intervals, an important issue since optimal therapy after lifetime MX dosage is exhausted is still under debate (Boster et al., 2008).

ATP-binding cassette (ABC)-transporters protect cells from endo- or exogenous toxic substances by energy-dependent efflux against a concentration gradient (Schinkel and Jonker, 2003; Robey et al., 2007). Widely expressed, ABC-transporters play a major role in drug absorption, distribution and excretion. In the central nervous system (CNS), they influence the accumulation of different relevant pharmacological substances e.g. in brain cancer, infections, epilepsy and psychiatric diseases; and current efforts aim at inhibiting ABC-mediated drug efflux with the rationale to enhance drug efficacy (Loscher and Potschka, 2005; Hermann et al., 2006; Uhr et al., 2008). Multi-drug-resistance phenotype was first described for chemotherapy-resistant cancer cells overexpressing P-glycoprotein encoded by the *ABCB1* gene, for which MX is a known substrate. Subsequent description of non-P-glycoprotein-mediated drug resistance to MX led to the discovery of a novel gene, amongst

others initially termed MX-resistance gene, now assigned the name *ABCG2* (Robey et al., 2007). On the basis of our observation of differential immune cell death of MX-treated multiple sclerosis patients *ex vivo* (Chan et al., 2005), we hypothesized that variable ABC-transporter function could be involved in differential MX susceptibility on a cellular level but also in individual patients. Here we set out to investigate the functional role of *ABCB1*- and *ABCG2*-single nucleotide polymorphisms (SNPs) in different multiple sclerosis populations. The predictive role of these SNPs for clinical treatment, response and side effects to MX in multiple sclerosis was examined in a retrospective fashion and further supported by experimental data. Additional proof *in vivo* was obtained in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an established animal model reflecting major pathogenetic hallmarks of multiple sclerosis.

Materials and Methods

ABCB1 and ABCG2 genotyping in multiple sclerosis patients and healthy controls

Genotyping of 832 multiple sclerosis patients from three sites in Germany (Göttingen, $n=166$; Rostock, $n=423$, Berg, $n=194$) and one site in Spain (Barcelona, $n=49$) (Table 1) was performed after informed consent according to the Declaration of Helsinki and approval by local ethics committees. Control samples were obtained from blood donors of the local blood bank (Göttingen, $n=191$) (von Ahnen et al., 2000) and volunteers (Göttingen, Bochum $n=73$) without history of neurological disease. TaqManTM PCR was performed for *ABCG2* V12M (reference SNP rs2231137) and Q141K (rs2231142) using Platinum qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) on a 7500 Real Time PCR system (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). *ABCB1* 3435C>T genotyping (rs1045642) (whole cohort) and *ABCB1* 2677G>T (MX-treated cohort, rs2032582) was performed as described before (von Ahnen et al., 2001) and detailed in the supplementary table.

Table 1 Clinical characteristics of multiple sclerosis-cohorts genotyped for ABCB1 and ABCG2 (Göttingen, Rostock, Barcelona, Berg)

	All centres	Barcelona, Spain	Göttingen, Germany	Berg, Germany	Rostock, Germany
Gender, n (%)	Male: 268 (32.2); female 563 ^a (67.7)	Male: 22 (44.9); female: 27 (55.1)	Male: 52 (31.3); female: 114 (68.7)	Male: 87 (44.8); female: 106 ^b (54.6)	Male: 107 (25.3); female: 316 (74.7)
Age, median (25th–75th percentile)	45 (37–52)	39 (34–46)	44 (37–51)	47 (41–53)	46 (38–53)
Age at disease onset, median (25th–75th percentile)	31 (24–39)	n.a.	30.5 (24–40)	31 (25–37)	31 (24–39)
Age at disease diagnosis, median (25th–75th percentile)	35 (28–43)	24 (20.3–33)	35 (29–42)	n.a.	35 (27–43)
Disease course, n (%)					
Relapsing remitting	418 (50.3)	22 (44.9)	92 (56.4)	23 (11.9)	281 (66.4)
Secondary progressive	342 (41.2)	27 (55.1)	47 (28.3)	145 (74.7)	123 (29.1)
Primary progressive	65 (7.8)		24 (14.5)	25 (12.9)	16 (3.8)
Atypical	6 (0.7)		2 (1.2)	1 (0.5)	3 (0.7)
Missing	1 (0.1)		1 (0.6)		
Total	832	49	166	194	423

Atypical cases include neuromyelitis optica as well as possible multiple sclerosis.

^a Excluding one transsexual patient (female to male).

^b Excluding one transsexual patient (female to male).

Quantification of ABCB1 and ABCG2 mRNA expression from human cells and tissues

Primary human adult glial cells (microglia, oligodendrocytes, astrocytes) of >95% purity were isolated from surgical resectates obtained from the treatment of nontumour-related intractable epilepsy as described before (Chan *et al.*, 2003). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated using BD vacutainer CPT/Na-citrate (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). Human CNS frontal cortex total RNA was purchased from Ambion (Huntingdon, United Kingdom). cDNA from cardiac tissue was from explanted organs of heart transplant recipients, hepatocyte cDNA originated from the resection margin of liver tumours. Relative quantification of ABC mRNA expression using the $\Delta\Delta C_T$ method employed RNA polymerase II mRNA as endogenous control. Human epithelial breast cancer cell line MCF7 (DSMZ, Braunschweig, Germany) with stable ABC mRNA expression served as calibrator sample (Robey *et al.*, 2007). For quantification of ABCG2 mRNA-expression QuantiTect Primer Assay Hs_ABCG2_SG_1 was used (Qiagen, Hilden, Germany) with QuantiTect SYBR Green PCR kit. ABCB1-RNA polymerase II mRNA expression was investigated using Platinum qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) supplemented with SYBR Green (Molecular Probes, Eugene, OR, USA, see also supplementary table).

In vitro MX efflux/cell-death assay

MX efflux was investigated in freshly isolated CD56⁺ NK-cells (>98% purity, magnetic cell sorting (MACS), Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) following a modification of a previously described protocol (Hitzl *et al.*, 2001). The assay is based on flow cytometric quantification of intracellular MX (Chan *et al.*, 2005) in the presence or absence of specific inhibitors of ABC-transporters at established concentrations (Elacridar/GF120918, specific for ABCB1 and ABCG2, 2.5 μ M, GlaxoSmithKline, Collegeville, PA), PSC-833/Valspodar, ABCB1-specific (2.5 μ M, PKF215-833, Novartis, Basel, Switzerland),

fumitremorgin C, ABCG2-specific (10 μ M, FTC, Alexis Biochemicals, Lörrach, Germany) (Schinkel and Jonker, 2003; Robey *et al.*, 2007). 600 000 cells (RPMI 1640/10% FCS) were pre-incubated (15 min, 37°C/5% CO₂) with respective inhibitors followed by 1 μ M MX (Gry Pharma, Kirchzarten, Germany, 30 min, 37°C/5% CO₂), corresponding to the serum concentration after intravenous administration of 12 mg/m² MX (Hu *et al.*, 1992). For MX efflux, washed cells were resuspended in 4 ml 37°C pre-warmed medium, with or without inhibitor and incubated for another 10 min (37°C/5% CO₂). Glucocorticosteroid effects (GC, methylprednisolone/MP, Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany; dexamethasone/DEX, Ratiopharm GmbH, Ulm, Germany) on MX accumulation and cell death were investigated after pre-incubation (25–100 μ M, 60 min) (Pavek *et al.*, 2005) followed by MX efflux as indicated above in the presence of respective GC. After washing, propidium-iodide staining (PI, 0.1 μ g/ml, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) excluded cells with impaired plasma membrane integrity (typically <1.6%). A minimum of 5000 PI-negative cells were analysed using FACSCalibur/Cell Quest-software (Becton Dickinson). Cell-death analysis (AnnexinV-FITC, PI, Roche Biochemicals, Mannheim, Germany) was performed after MX incubation (30 or 60 min) and MX efflux followed by overnight incubation (37°C, 5% CO₂).

Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis, MX treatment and histology

All animal experiments were approved by responsible authorities in Lower Saxony, Germany. Abcg2^{-/-} animals were backcrossed to C57BL/6 background for at least eight generations, control mice were purchased from Harlan (Borchen, Germany). Mice were anaesthetized with ketamine-hydrochloride (Inresa, Freiburg, Germany) and xylazine-hydrochloride (CEVA, Düsseldorf, Germany) in 0.9% NaCl and immunized subcutaneously (sc) with 50 μ g myelin oligodendrocyte glycoprotein MOG_{35–55} peptide in PBS, emulsified in an equal volume of complete Freund's adjuvant (CFA) containing *Mycobacterium*

tuberculosis HB7RA (Difco, Detroit MI, USA, 1 mg/ml). Pertussis toxin (ListBiological Laboratories, Campbell, CA, USA; 200 ng i.p.) was given on days 0 and 2. Animals were weighed and scored daily in a blinded fashion using the following clinical score: 0 normal, 1 reduced tail tone; 2 limp tail, impaired righting; 3 absent righting; 4 gait ataxia; 5 mild paraparesis; 6 moderate paraparesis; 7 severe paraparesis/paraplegia; 8 tetraparesis; 9 moribund; and 10 death. MX was injected intravenously (iv) after disease onset on days 12–14 and 16 (0.5 mg/kg body weight). Three-micrometre spinal cord paraffin cross-sections from animals perfused on day 23 or 29 were stained with Luxol fast blue. Demyelinated areas were calculated as percentage from total white matter (minimal 4, in most cases six spinal cord sections per animal) as analysed by ImageProcessing software on a Olympus microscope.

Retrospective clinical correlation of genotype and MX response

Patient samples were genotyped for *ABCB1* 2677G>T, 3435C>T, *ABCG2* V12M and Q141K and retrospectively correlated with clinical MX response. Genotyping and assessment of clinical responses were performed blinded from each other by different investigators. All patients (Table 3) had been diagnosed according to Poser-/McDonald-criteria (Poser and Brinar, 2004) and had been treated with MX following established protocols (Edan et al., 1997; Hartung et al., 2002). Due to presumably different pathogenesis and lack of therapeutic MX efficacy, primary progressive multiple sclerosis patients were not included in the analyses (Stüve et al., 2004). One hundred and fifty-five patients (Göttingen $n=11$, Rostock $n=37$, Berg $n=107$) had received MX monotherapy every 3 months following the MIMS protocol (Hartung et al., 2002). In this cohort, GC pulse therapies were only given during exacerbations. One hundred and fifty-four patients had undergone MX/GC combination therapy (Göttingen/Rostock $n=57$, Barcelona $n=46$, Berg $n=51$). Of these, German MX/GC patients had received methylprednisolone 1 g i.v. over 3–5 days in combination with MX every 3 months. Spanish MX/GC patients had received 4 mg dexamethasone i.v. immediately before three MX infusions every month, followed by three monthly intervals. Decision for MX/GC combination was on clinical grounds, e.g. continuous clinical activity or better tolerability. To assess therapy response, at least one of the following criteria had to be fulfilled: expanded disability status scale (EDSS) stability/improvement (in case of non-responders: EDSS deterioration of 1 point (EDSS < 6.0) or 0.5 points (EDSS ≥ 6.0)) (number of patients classified according to this criterion $n=294$, $n=165$ confirmed at minimum 2 different time points); improvement of relapse rate ($n=110$); multiple sclerosis functional composite (MSFC) stability/improvement ($n=10$) or magnetic resonance imaging activity (Gd-enhancement, $n=15$); and lack of disease progression as determined by the physician ($n=157$, of these 150 fulfilled at least one other criterion). For most of the patients, assessment was based on several of these criteria. Where applicable, magnetic motor evoked potentials (MEP, assessment of central motor conduction time, amplitude and configuration, $n=63$) served to confirm assignment to response groups. Treatment response was analysed after 12 months on treatment (89.3% of the patients). If sufficient data was lacking at 12 months, data after 9 months treatment (10%) was analysed. If neither data after 12 nor 9 months was available, response was assessed at the end of treatment (21–24 months, 0.7% of patients). Patients with severe cardiac ($n=28$, median cumulative MX dosage 72 mg/m², 56–93; 25th–75th percentile) and patients with haematological side effects ($n=8$, therapy associated

leukaemia, agranulocytosis, median cumulative MX dosage 72 mg/m², 72–72), were retrospectively correlated with *ABC*-transporter genotype. Of these, samples from 10 patients with MX-associated cardiotoxicity were collected separately from the Berlin site. In this group, one patient had developed a severe, biopsy-proven cardiotoxicity already after 24 mg/m² (Dörr et al., 2009), three patients a significant decrease of echocardiographic LVEF (>10%), and six patients a diastolic dysfunction.

Statistical analysis

Descriptive statistics were reported as median and 25th and 75th percentile unless stated otherwise. Continuous data were compared using the exact Wilcoxon test. Apoptosis rates *in vitro* were analysed by one way analysis of variance using the post-hoc Student–Newman–Keuls test for grouping. *P*-values were reported two-sided if not reported otherwise. Cross-tabulation of research data often led to cells with expected frequencies of <5. Therefore exact statistics were used for inference. Fisher's exact test was used for the 2 × 2 case, the Fisher–Freeman–Halton test for the 2 × 3 case and the exact Cochran–Armitage test for trend on genotype scores in the additive model 0–1–2. Exact statistics were calculated as implemented in SPSS 16 for Windows. The exact-like odds-ratio for the association between response/non-response and the genetic burden score (*ABCB1/ABCG2*-H/-U/-L) was calculated in R 2.9.0 using the *elm* package (Zamar et al., 2007) with a Markov chain size of 2.5e6. The Cochran–Armitage test reports the one-sided *P*-value because only one direction of trend was of interest and plausible given the *in vitro* and experimental autoimmune encephalomyelitis *in vivo* results (Zheng et al., 2003; 2008). Inhibition of MX efflux by GCs was tested using the Kolmogorov–Smirnov (KS) statistic *D* (KS *D*) (Leith et al., 1999). To determine differences in experimental autoimmune encephalomyelitis course by Mann–Whitney U-test, analysis was performed from onset of disease until the end of observation rather than for individual time points.

Results

ABCB1 and *ABCG2* are highly polymorphic in multiple sclerosis populations of central European ancestry with no major differences to healthy donors

Clinical data of the 832 multiple sclerosis patients genotyped are given in Table 1. Of five different *ABCG2* SNPs with potential functional significance investigated, only reference SNP (rs) 2231137 (C>A) leading to a V12M substitution and rs2231142 (C>A) resulting in a Q141K substitution were observed. As detailed in Table 2, 14.8% multiple sclerosis patients were homozygous for the common alleles both for *ABCB1* and *ABCG2* (wild type). In contrast, 22.2% were at least heterozygous for variant alleles in both *ABCB1* and *ABCG2*. Total 63.1% of the patients were at least heterozygous for variant alleles in either *ABCB1* or *ABCG2*. All SNPs were found to be in Hardy–Weinberg equilibrium. For *ABCB1* 2677G>T and 3435C>T no

Table 2 Genotyping of multiple sclerosis patients and healthy controls for ABCB1 and ABCG2

	Healthy donors	Multiple sclerosis patients	P	HapMap data
ABCG2-12VV	237 (89.8%)	784 (94.2%)		58 (96.7%)
ABCG2-12VM	26 (9.8%)	47 (5.6%)		2 (3.3%)
ABCG2-12MM	1 (0.4%)	1 (0.1%)		0 (0.0%)
Frequency of WT allele (SD)	0.95 (0.010)	0.97 (0.004)		
Total	264 (100.0%)	832 (100.0%)	0.023	60 (100.0%)
ABCG2-141QQ	214 (81.1%)	658 (79.1%)		89 (78.8%)
ABCG2-141QK	46 (17.4%)	163 (19.6%)		23 (20.4%)
ABCG2-141KK	4 (1.5%)	11 (1.3%)		1 (0.9%)
Frequency of WT allele (SD)	0.90 (0.014)	0.89 (0.008)		
Total	264 (100.0%)	832 (100.0%)	0.746	113 (100.0%)
ABCB1-2677GG	63 (30.7%)	105 (29.8%)		22 (19.5%)
ABCB1-2677GT	99 (48.3%)	178 (50.6%)		62 (54.9%)
ABCB1-2677TT	43 (21.0%)	69 (19.6%)		29 (25.7%)
Frequency of WT allele (SD)	0.55 (0.025)	0.55 (0.019)		
Total	205 (100.0%)	352 (100.0%)	0.856	113 (100.0%)
ABCB1-3435CC	58 (22.0%)	187 (22.6%)		33 (29.2%)
ABCB1-3435CT	136 (51.5%)	414 (50.1%)		63 (55.8%)
ABCB1-3435TT	70 (26.5%)	225 (27.2%)		17 (15.0%)
Frequency of WT allele (SD)	0.48 (0.021)	0.48 (0.012)		
Total	264 (100.0%)	826 (100.0%)	0.939	113 (100.0%)
Common alleles ABCB1 and ABCG2 (ABCB1/ABCG2-H)	28 (13.7%)	52 (14.8%)		
At least heterozygous for variant allele in either ABCB1 or ABCG2 (ABCB1/ABCG2-I)	135 (65.9%)	222 (63.1%)		
At least heterozygous for variant alleles in ABCB1 and ABCG2 (ABCB1/ABCG2-L)	42 (20.5%)	78 (22.2%)		
Total	205 (100.0%)	352 (100.0%)	0.834	

Data from the International HapMap CEU database are shown for comparison, n (%). Fisher's exact test for genotypic difference between multiple sclerosis patients and healthy controls.

difference could be detected between the multiple sclerosis populations and healthy donors. For ABCG2, the frequency of variant allele V12-codon was very low with 0.03% in multiple sclerosis patients and 0.05% in healthy donors ($P=0.023$), whereas no difference was observed for Q141. There was no difference in genotype frequencies between unselected multiple sclerosis cohorts (Göttingen, Rostock) and MX-treated multiple sclerosis cohorts (Barcelona, Berg). A high degree of linkage disequilibrium was found between ABCG2 V12M and Q141K [linkage D' = 0.854, (Gaunt et al., 2007)]. These findings demonstrate that potentially functionally variant alleles for ABCB1 and ABCG2 occur frequently in our multiple sclerosis cohorts without indication of a role in disease susceptibility.

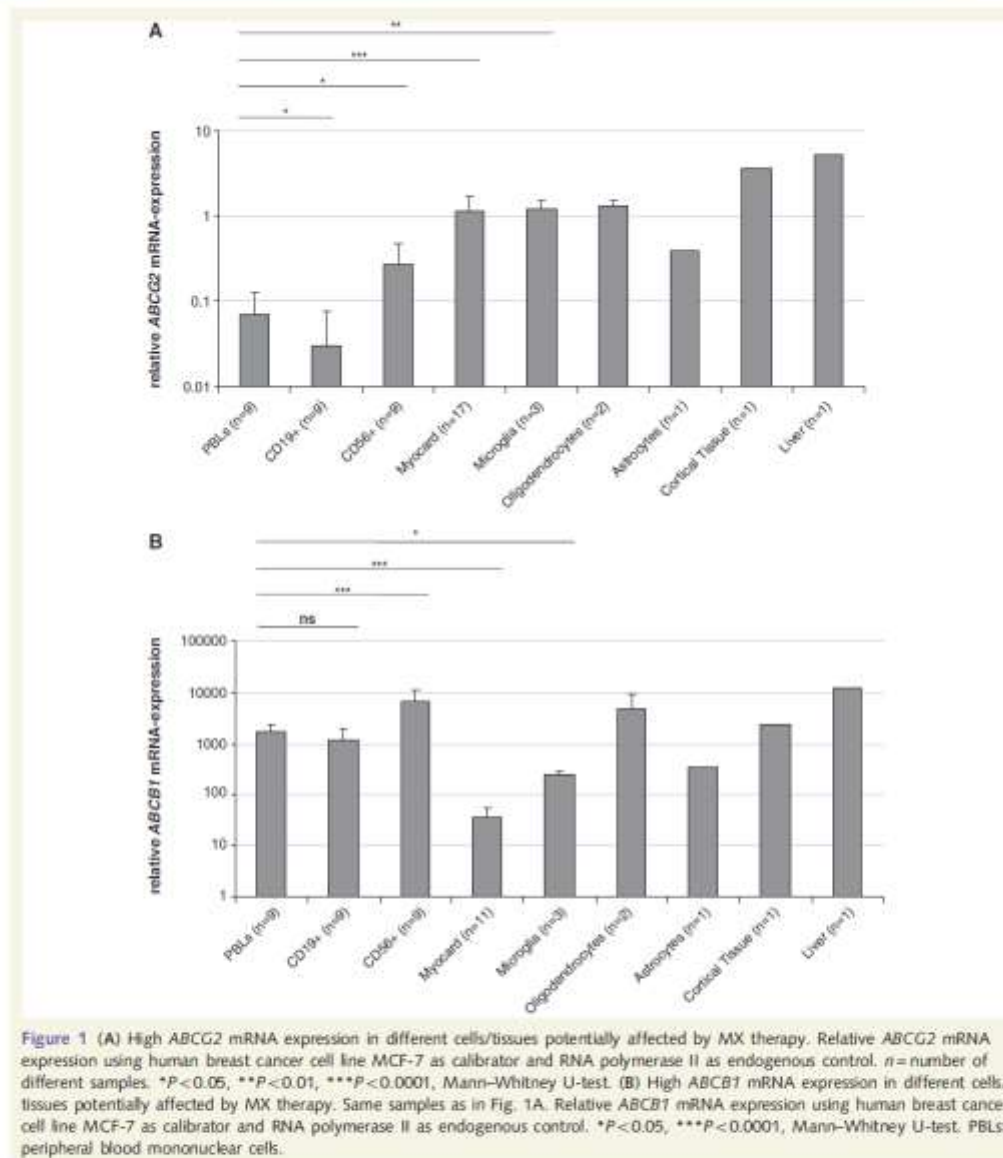
High ABCB1-/ABCG2 mRNA expression in different cells/organs potentially affected by MX therapy

Analysis of ABC-transporter mRNA expression showed 3.9-fold higher ABCG2 expression of CD56⁺ cells than unsorted peripheral blood mononuclear cells and even more in comparison to CD19⁺ B-cells (Fig. 1A). High ABCG2 mRNA expression

was also observed in human CNS-cells, especially human frontal cortical brain tissue (53-fold in comparison to peripheral blood mononuclear cells), oligodendrocytes (19-fold), and microglia (17-fold). Also human myocardium (16-fold in comparison to peripheral blood mononuclear cells) and liver tissue (76-fold) demonstrated high expression. As depicted in Fig. 1B, all investigated cells exhibited also high ABCB1 mRNA expression, with highest values in CD56⁺ cells, oligodendrocytes, liver and cortex.

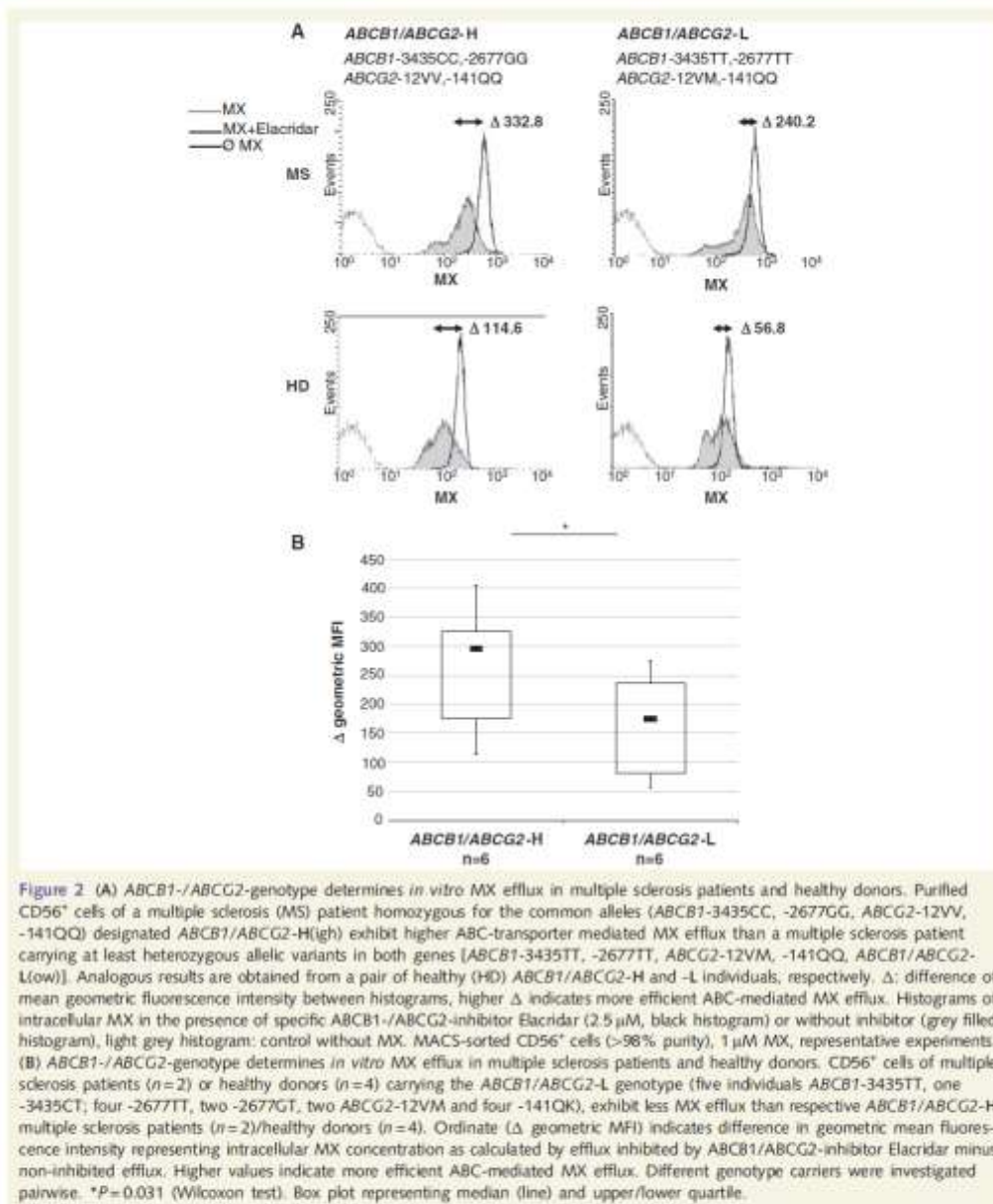
ABCB1/ABCG2 genotype determines in vitro MX efflux and MX-induced cell death in multiple sclerosis patients and healthy donors

As depicted in Fig. 2A, ABC-transporter-mediated MX efflux was compared in CD56⁺ cells of a multiple sclerosis patient with the common ABCB1/ABCG2 alleles (ABCB1-2677GG, -3435CC, ABCG2-12VV, -141QQ, wild type) with a patient carrying variant alleles in both genes (ABCB1-2677TT, -3435TT, ABCG2-12VM, -141QQ). Using the dual ABCB1-/ABCG2-inhibitor Elacridar wild-type sequences determined higher MX efflux in comparison to the latter genotype. The wild-type genotype was therefore designated



ABCB1/ABCG2-H(igh) efflux in contrast to genotypes with at least heterozygous variant alleles in both genes, designated genotype ABCB1/ABCG2-L(ow efflux). The same effect of genotype-dependent MX efflux was observed in healthy individuals (Fig. 2A), enabling us to investigate additional healthy controls after proof of principle in multiple sclerosis patients. Figure 2B depicts cumulative

data for 12 individuals (six pairs of different genotypes) with 37.7% lower ABC-mediated MX efflux in ABCB1/ABCG2-L genotypes [mean fluorescence intensity (MFI) 164.3] than in respective individuals with -H genotype (MFI 263.5, P = 0.031). In preliminary experiments, individuals polymorphic in either ABCB1 or ABCG2 exhibited intermediate MX efflux [ABCB1/ABCG2-K(Intermediate)]



efflux, data not shown]. In comparison to the dual ABCB1/ABCG2-inhibitor Elacridar, genotype dependent reduction of MX efflux was less pronounced using the ABCB1-selective inhibitor PSC-833 (P=0.062, n=5 pairs of different genotypes). No clear effect was

observed using the ABCG2-specific inhibitor FTC alone (data not shown).

As depicted in Fig. 3A, increased intracellular MX accumulation in an ABCB1/ABCG2-L multiple sclerosis patient results in greater

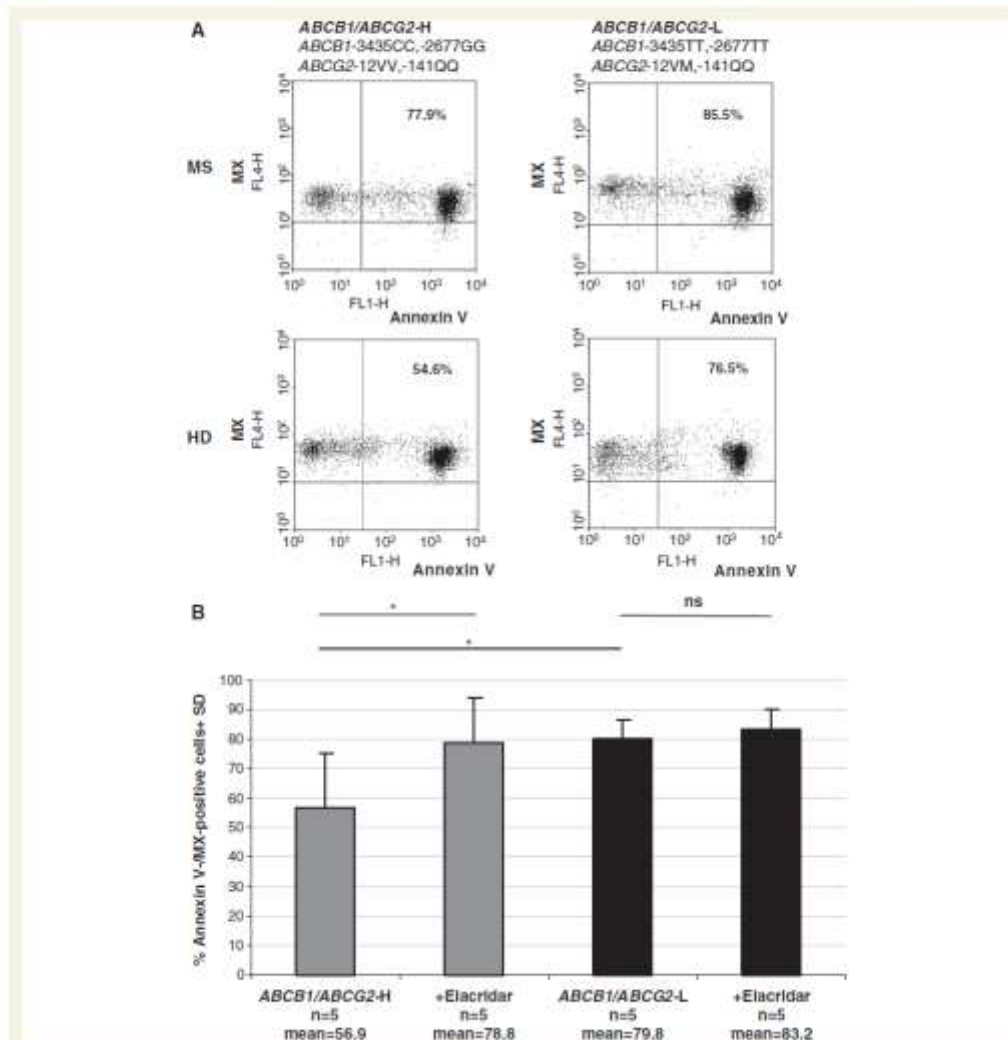


Figure 3 (A) *ABCB1/ABCG2*-genotype determines MX-induced cell death in multiple sclerosis patients and healthy donors. CD56⁺ cells of a *ABCB1/ABCG2-L* multiple sclerosis (MS) patient demonstrate higher proportion of MX-containing, dying cells (MX⁺/AnnexinV⁺) than cells of a *ABCB1/ABCG2-H* multiple sclerosis patient. Similar results are obtained for healthy donors (HD) of respective genotypes. Twenty-four hours after MX efflux, representative experiments. (B) *ABCB1/ABCG2*-genotype determines MX-induced cell death in multiple sclerosis patients and healthy donors. *ABCB1/ABCG2-L* gene carriers exhibit higher proportions of MX-containing, dying cells (MX⁺/AnnexinV⁺) than *ABCB1/ABCG2-H*-genotype individuals ($P < 0.05$, Anova). This is due to *ABCB1/ABCG2*-genotype, since inhibition of MX efflux in CD56⁺ cells of *ABCB1/ABCG2-H* gene carriers by dual *ABCB1/ABCG2*-inhibitor Elacridar leads to higher proportion MX⁺/AnnexinV⁺-cells ($P < 0.05$) than in *ABCB1/ABCG2-L* patients ($P = NS$). Each genotype: 1 multiple sclerosis patient, 4 healthy donors (24h after MX efflux). (C) GCs inhibit MX efflux. MX efflux from CD56⁺ cells of an *ABCG2-/ABCB1-H* healthy individual is inhibited by methylprednisolone (MP) or dexamethasone (DEX). Histograms of intracellular MX in the presence of MP or DEX (50 μ M, black histogram) in comparison to MX efflux without GC (grey filled histograms). Light grey histogram: control without MX. Δ : difference of mean geometric fluorescence intensity representing intracellular MX concentration as calculated by efflux inhibited by GC minus non-inhibited efflux. D: Kolmogorov-Smirnov test statistics. One representative experiment of three (two healthy donors, one multiple sclerosis patient). * $P < 0.05$.

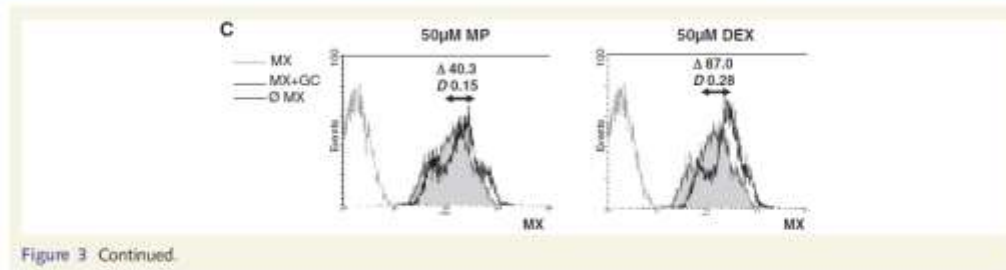


Figure 3 Continued.

proportion of cell death (MX⁺/AnnexinV⁺-cells) as compared to an ABCB1/ABCG2-H multiple sclerosis patient. Again, similar effects were observed in healthy donors (Fig. 3A). Analysing one pair of multiple sclerosis patients and four pairs of healthy controls, individuals with ABCB1/ABCG2-L genotypes had 22.9% more MX⁺/AnnexinV⁺ (Fig. 3B, $P < 0.05$) and 16.1% more MX⁺/PI⁺ double positive cells (data not shown) than individuals carrying the ABCB1/ABCG2-H genotype. Inhibition of MX efflux by dual ABCB1/ABCG2-inhibitor Elacridar led to increased cell death in ABCB1/ABCG2-H individuals by 21.9% (MX⁺/AnnexinV⁺ cells, $P < 0.05$), whereas this increase was only 3.5% in the L-genotype individuals (NS), arguing for differential susceptibility to MX-induced cell death dependent on respective ABCB1/ABCG2-transporter genotypes presumably via differential MX accumulation.

In clinical practice, MX is often combined with GCs (Morrissey et al., 2005). Thus, we next examined the influence of the GCs methylprednisolone (MP) and dexamethasone (DEX) on intracellular MX accumulation and MX-induced cell death. In CD56⁺ cells of individuals with ABCB1/ABCG2-H gene sequences, both methylprednisolone and dexamethasone significantly inhibited MX efflux (Fig. 3C). After 24 h the addition of methylprednisolone led to an increase of 8% MX⁺/AnnexinV⁺ cells in ABCB1/ABCG2-H gene carriers ($n = 2$). This increase was presumably due to inhibition of MX efflux and not to direct GC-mediated cell death, since only negligible changes (+0.52% MX⁺/AnnexinV⁺ cells) were seen in ABCB1/ABCG2-L individuals ($n = 2$).

Abc-transporter genotype determines therapeutic response to MX in experimental autoimmune encephalomyelitis

To further elucidate functional significance of Abc-transporter genotype *in vivo*, treatment response to MX in *Abcg2*^{-/-} mice was compared to respective wild-type animals in chronic MOG₃₅₋₅₅ EAE. MX therapeutically administered after onset of disease was down-titrated to a dose just not efficient in wild-type animals as compared to respective sham-treated controls (Fig. 4A). In contrast, using this suboptimal MX dose, experimental autoimmune encephalomyelitis in *Abcg2*^{-/-} mice was strongly ameliorated ($P < 0.001$). Effects on clinical course were also mirrored histologically with strongly reduced spinal cord demyelination in MX-treated

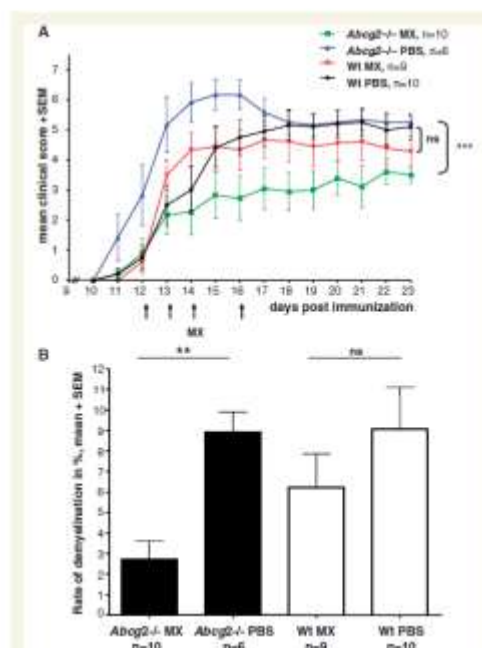


Figure 4 (A) MX in suboptimal dose ameliorates clinical EAE in *Abcg2*^{-/-} but not wild-type mice. Clinical disease course in C57Bl/6 wild-type (wt) animals is not altered using suboptimal MX dose (0.5 mg/kg body weight, i.v., Days 12–14 and 16, indicated by arrows) but strongly ameliorated in *Abcg2*^{-/-} mice in comparison to respective PBS-treated controls: $n = 9/10$ for MX-treated *Abcg2*^{-/-} and C57Bl/6 wt mice, $n = 6$ for PBS-treated *Abcg2*^{-/-} controls. Data pooled from two independent experiments showing analogous results. NS: P not significant (wt MX versus wt PBS), $***P < 0.001$ (*Abcg2*^{-/-} MX versus *Abcg2*^{-/-} PBS), Mann-Whitney U-test. (B) MX in suboptimal dose ameliorates demyelination in *Abcg2*^{-/-} EAE but not wild-type mice. Spinal cord demyelination (Luxol fast blue staining) in wt animals is not significantly altered using suboptimal MX dose, but strongly reduced in *Abcg2*^{-/-} mice in comparison to respective PBS-treated controls. Data from two independent experiments, NS: P not significant, $**P < 0.01$, Mann-Whitney U-test.

Abcg2^{-/-} mice ($P < 0.01$), whereas wild-type animals treated with the suboptimal MX dose did not exhibit major differences in comparison to the respective sham-treated controls (NS). In spinal cord of wild-type animals mRNA expression of the *ABCB1* mouse analogue *Mdr1a/1b* and *Abcg2* was not altered during experimental autoimmune encephalomyelitis with or without MX treatment (peak of disease and chronic phase, data not shown).

Effects of ABC-transporter genotype on therapeutic response to MX

Of 353 fully genotyped MX-treated patients, data of 339 patients fulfilled strict assessment criteria for response classification. Given presumably different pathogenesis/MX response, PPMS patients were not included in the analyses. Thus, 309 MX-treated patients from four centres were retrospectively analysed using quantitative parameters such as EDSS, relapse rate and MSFC as main outcome parameters. Of patients from all cohorts (MX monotherapy, MX/GC combination therapy), 68.6% responded to MX, whereas 31.4% were classified as non-responders. Among patients receiving MX monotherapy ($n = 155$) 78.1% were responders (Table 3, panel A). In MX monotherapy patients carrying the *ABCB1/ABCG2*-H genotype had the lowest responder rate (15/24, 62.5%), carriers of variant alleles in either *ABCB1* or *ABCG2* (*ABCB1/ABCG2*-I) exhibited an intermediate response (78/98, 79.6%), whereas 28/33 (84.8%) with *ABCB1/ABCG2*-L genotype were MX responders ($P = 0.039$). Odds ratio for positive treatment response between *ABCB1/ABCG2*-H and -I-genotype was 1.9 (95% CI 1.0–3.5) and accordingly 3.5 between *ABCB1/ABCG2*-H and -L-genotype. As shown in Table 4, baseline data for the MX monotherapy group demonstrated a lower MX dosage for treatment responders at the time point of response classification. Other potential confounders such as age or disease duration at MX

Table 3 Association of ABC-transporter genotype with therapeutic response to MX monotherapy, exact Cochran-Armitage test ($P = 0.039$) (panel A), or MX/GC combination therapy ($P = 0.348$) (panel B)

	Total, n (%)	Responder, n (%)	Non-Responder, n (%)
A: MX monotherapy			
<i>ABCB1/ABCG2</i> -H	24 (15.5)	15 (62.5)	9 (37.5)
<i>ABCB1/ABCG2</i> -I	98 (63.2)	78 (79.6)	20 (20.4)
<i>ABCB1/ABCG2</i> -L	33 (21.3)	28 (84.8)	5 (15.2)
Total	155	121 (78.1)	34 (21.9)
B: MX/GC combination therapy			
<i>ABCB1/ABCG2</i> -H	21 (13.6)	12 (57.1)	9 (42.9)
<i>ABCB1/ABCG2</i> -I	100 (64.9)	58 (58.0)	42 (42.0)
<i>ABCB1/ABCG2</i> -L	33 (21.4)	21 (63.6)	12 (36.4)
Total	154	91 (59.1)	63 (40.9)

Retrospective analysis using EDSS, relapse rate and MSFC as main outcome parameters to define responders and non-responders, respectively. Analysis for patients carrying *ABCB1/ABCG2*-H genotype (common alleles in both genes), *ABCB1/ABCG2*-I (at least heterozygous for variant alleles in either *ABCB1* or *ABCG2*), or *ABCB1/ABCG2*-L (at least heterozygous for variant allele in *ABCB1* and *ABCG2*).

treatment, baseline expanded disability status scale or disease course/activity were not significantly different between responders and non-responders. Given profound effects of GCs on *in vitro* MX efflux as well as markedly different treatment protocols and baseline characteristics between MX-mono- and MX/GC combination therapy groups (Table 4), the MX/GC combination therapy group was analysed separately. Patients receiving MX/GC combination had a 59.1% response rate (Table 3, panel B). In the MX/GC combination therapy cohort no clear genotype-dependent effect could be observed (Table 3, panel B). However, major differences in treatment protocols and baseline characteristics already within this group preclude further firm conclusions.

Since altered MX efflux could also be related to organ-specific side effects, genotype distribution was analysed for severe cardiac or haematological side effects. While 30 of these 36 patients were at least heterozygous for variant alleles in at least one ABC-gene, in this relatively small cohort there was no statistically relevant difference in genotype frequency compared to the total multiple sclerosis population investigated. MX/GC combination therapy was often found in the cases with severe side effects: 11 of 28 patients with cardiac side effects had received GC/MX combination therapy and the same held true for seven of eight patients with severe haematological side effects. In one case, unusually severe side effects were associated with an ABC-genotype rarely found in the total multiple sclerosis-cohort: a 28-year-old female RRMS patient developed severe cardiac failure already after 24 mg/m² MX (biventricular ejection fraction 10%, multi-organ failure, biopsy exclusion of other causes (Dörr et al., 2009)). The patient exhibited a genotype with homozygous variant alleles in two *ABCB1*- and one *ABCG2*-locus examined, in addition to a variant allele in the ABC-transporter *ABCC2* (*rs171620*) (*ABCB1* -2677TT, -3435TT, *ABCG2*-141KK, *ABCC2*-116CT). This genotype was very unusual among our unselected multiple sclerosis patients (0.55%, Table 2).

Discussion

Our main findings are a high prevalence of functionally relevant variant alleles in ABC-transporter genes in multiple sclerosis patients that determine MX efflux and MX-induced cell death in immune cells. High ABC-transporter mRNA expression argues for a functional role also in CNS- and cardiac tissue. *In vivo* relevance was corroborated in MX-treated *Abcg2*^{-/-} experimental autoimmune encephalomyelitis mice. ABC-transporter genotype was associated with clinical response to MX therapy in multiple sclerosis. GCs that are clinically often used in combination inhibit *in vitro* MX efflux, suggesting synergistic effects at least in a sub-population of patients.

We have focussed on the most prominent ABC-transporters previously demonstrated to influence MX transport (Schinkel and Jonker, 2003). The *ABCB1* 3435C>T polymorphism is associated with intestinal expression levels and function and has the best validated effect on drug disposition (Hoffmeyer et al., 2000). For *ABCG2*, only V12M and Q141K polymorphisms could be detected, *in vitro* leading to disruption of apical membrane localization (V12M) or decreased ATPase function (Q141K)

Table 4 Baseline characteristics according to MX monotherapy and MX/GC combination therapy, respectively

	MX monotherapy			MX/GC combination therapy		
	Responder n = 121 (78.1%)	Non-Responder n = 34 (21.9%)	P	Responder n = 91 (59.1%)	Non-Responder n = 63 (40.9%)	P
Gender			0.310			0.033
Male, n (%)	45 (37.2)	9 (26.5)		33 (36.3)	34 (54.0)	
Female, n (%)	76 (62.8)	25 (73.5)		58 (63.7)	29 (46.0)	
Centre			0.041			<0.001
Barcelona, Spain	0	0		23	23	
Göttingen, Germany	6	5		8	1	
Rostock, Germany	33	4		41	7	
Berg, Germany	82	25		19	32	
Age at disease onset, median (25th–75th percentile)	30 (23–39)	32 (26–39)	0.367	29 (22–35)	33 (27–39)	0.028
Age at disease diagnosis, ^a median (25th–75th percentile)	39 (31–47)	36 (28–44)	0.494	32 (24–40)	26 (22–37)	0.094
Disease course, n (%)			1.000			0.230
Relapsing-remitting	17 (14.0)	4 (11.8)		23 (25.3)	10 (15.9)	
Secondary progressive	102 (84.3)	30 (88.2)		68 (74.7)	53 (84.1)	
Atypical	2 (1.7)	0 (0)				
Active patients, n (%)	64 (52.9)	16 (47.1)	0.566	31 (34.1)	30 (47.6)	0.097
Age at first MX infusion, median (25th–75th percentile)	43 (37–50)	42 (37–48)	0.445	42 (33–49)	39 (31–47)	0.189
Duration of disease at time point of first MX infusion (disease onset), median (25th–75th percentile)	11 (6–18)	9 (3–15)	0.112	16 (7–23)	9 (6–18)	0.027
Duration of disease at time point of first MX infusion (disease diagnosis), ^a median (25th–75th percentile)	7 (3–10)	6 (1–9)	0.477	4 (0–11)	0 (0–3)	0.001
EDSS at treatment onset, median (25th–75th percentile)	6.0 (4.0–6.5)	5.5 (4.3–6.0)	0.288	6.0 (4.5–6.5)	5.5 (4.0–6.0)	0.093
Number of cycles at time point of response- classification, median (25th–75th percentile)	5 (5–5)	5 (5–5)	0.459	6 (5–6)	5 (5–6)	0.580
MX dosage at time point of response classification mg/m ² body surface, median (25th–75th percentile)	60 (49–60)	60 (60–60)	0.030	60 (48–72)	60 (60–72)	0.007
Cumulative MX dosage mg/m ² body surface, median (25th–75th percentile)	90 (60–114)	90 (60–119)	0.920	72 (54–100)	72 (72–119)	0.419

Atypical disease course includes neuromyelitis optica.

^a Data not available for centre Berg.

(Mizuarai *et al.*, 2004). No major differences in genotype frequencies were found in comparison to healthy donors and our data compared well to the HapMap CEU population (The International HapMap Consortium, 2007). Small differences in frequency of *ABCG2* variant allele V12 may best be explained by high variation that is expected for a low frequency allele in a relatively small sample. Therefore, our data does not indicate a role for ABC-transporters for disease susceptibility.

Functional significance of ABC-transporter genotypes was demonstrated in immune cells from multiple sclerosis patients and healthy controls. Cells from *ABCB1/ABCG2-L* genotype patients had lower *in vitro* MX efflux in comparison to *ABCB1/ABCG2-H* carriers. Higher MX-induced cell death in *ABCB1/ABCG2-L* in comparison to *ABCB1/ABCG2-H* and increase of MX-induced cell death after inhibition of both transporters only in *ABCB1/ABCG2-H* but not *ABCB1/ABCG2-L* further supports

functional relevance of investigated SNPs. Given rapid completion of the apoptotic cell death programme within 4–5 h, at least in certain tissues and under defined conditions, even small quantitative differences in cell death at a given time point as shown here will account for major cell loss over time (Bursch *et al.*, 1990). Genotype-dependent effects were demonstrated after inhibition of both *ABCB1/ABCG2*, while differences using monospecific inhibitors were less pronounced. This indicates an additive role of *ABCB1* and *ABCG2* in MX efflux, similar to effects in transgenic mice in which these transporters provide additive, functionally non-redundant protection against MX-induced cell death (Zhou *et al.*, 2003). No conclusion can be drawn from our data with regard to potential predominance of an ABC-transporter and the participation of additional mechanisms (e.g. other MDR transporters). However, even in animals deficient only in *Abcg2* we could observe strong effects on therapeutic MX efficacy, arguing for a major role of this transporter.

Thus, together with unchanged mRNA expression of these ABC-transporters in experimental autoimmune encephalomyelitis, no further evidence of redundancy could be observed. In our animal experimental approach we tried to mirror the hypothesis that individuals with ABC-L genotype may respond to lower MX dosages than other genotypes. Since MX is highly efficacious in different EAE-models (Weilbach et al., 2004) we down titrated the concentration to a dosage not effective any more in wild-type animals. However, this dosage is fully effective in respective *Abcg2*-ko animals. Whereas the animal knock out situation may not be equivalent to gene polymorphisms, both functionally relevant ABCG2-SNPs identified here interfere with either expression/localization and/or activity of the transporter. The level of functional inactivation differs widely (approximately factor 2–5) in a cell-type specific manner (e.g. malignant cells, transfectants) (Mizuara et al., 2004). Thus, we believe that mechanistic conclusions can be drawn from our *in vivo* animal model.

Presumed drug targets of MX in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis include peripheral immune cells, the blood-brain barrier and CNS effects *in situ* (Kopatzke et al., 2006; Duddy et al., 2007). Initial observations of preferential cell death of CD19⁺ cells from MX-treated multiple sclerosis patients with relative sparing of CD56⁺ cells (Chan et al., 2005) led to our hypothesis that ABC-transporters critically influence MX effects. Here, CD56⁺ cells showed highest ABC-transporter expression in comparison to CD19⁺ cells and unsorted peripheral blood mononuclear cells. Recently, preferential MX-induced cell death of CD19⁺/CD27⁺ memory B cells has been described, presumably altering the dysregulated B-cell cytokine network found in multiple sclerosis patients (Duddy et al., 2007), however ABC-transporter expression has not been investigated in these cells yet. High *ABCB1*/*ABCG2*-mRNA expression in CNS-tissue, myocardium and liver indicate relevant functional roles at these sites, where MX is detected up to 9 months after infusion (Morrissey et al., 2005).

MX is approved for highly active relapsing and secondary progressive multiple sclerosis, with some authors promoting early use to halt aggressive disease (Gonsette, 2007). Whereas clinical characteristics that are associated with favourable therapeutic response have been identified (e.g. age at start of treatment, disease course/relapse rate, baseline EDSS) (Le Page et al., 2007), thus far there are no biomarkers that predict clinical efficacy and individual risk profile. Here, in MX monotherapy, *ABCB1*/*ABCG2*-L patients were overrepresented among MX responders, whereas *ABCB1*/*ABCG2*-H genotype carriers were less likely MX responders. Different MX dosages between treatment responders and non-responders in MX monotherapy argue for validity of ABC-genotype effects, since lower dosage was found in the responder group. No statistically significant differences were observed for other potential confounders (e.g. duration of disease, baseline expanded disability status scale, disease course/activity) (Le Page et al., 2007). However, potential confounders were not controlled for in this retrospective association with limited patient numbers available for extensive analysis even from four major academic multiple sclerosis centres. Clinical assessment was conservative with semiquantitative parameters, assisted by electrophysiological or magnetic resonance imaging data. As a result, of the genotyped MX-treated patients,

data from 95.7% of patients were eligible. Due to strong effects of GC on MX efflux *in vitro*, as well as profoundly different treatment regimen and baseline characteristics, subgrouping of MX monotherapy and MX/GC combination therapy cohorts was performed. This is further supported by demonstration of complex GC interactions with ABC-transporters (e.g. inhibition, acting as substrate, regulation of ABC-transporter expression) (Pavek et al., 2005). Finally, the most stringent statistical approach using exact tests to strictly control for type I error was chosen. A prospective, multicentre confirmation study with recruitment of a large and homogenous patient group with control of potential confounders and unbiased treatment protocols will be implemented in Germany in 2009 by our group with a study duration of 3 years.

The clinically widely used GC/MX combination follows the empirical rationale of potentially increased efficacy and tolerability (Morrissey et al., 2005). Here, we demonstrate an inhibitory effect of methylprednisolone and dexamethasone on MX efflux *in vitro*, leading to increased MX-induced cell death without additional GC-induced cell death. Hypothetically, this could lead to higher efficacy but also higher risk of side effects, at least in a subpopulation e.g. characterized by ABC-genotype. Different response rates between MX monotherapy and MX/GC combination therapy groups, as well as different baseline characteristics precluded confirmation of this hypothesis. However, the occurrence of major cardiac or haematological side effects during MX/GC combination therapy in conjunction with respective genotypes clearly warrants prospective evaluation. Statistical analysis in our patient group with severe side effects is limited by small numbers and heterogeneous treatment schemes. On a descriptive level a case of very early biopsy proven MX-associated cardiotoxicity with variant, in majority homozygous alleles in three ABC-transporter genes was identified (Dörr et al., 2009). At least in our multiple sclerosis cohorts, frequency of this particular genotype was extremely low, further raising interest in the association with this unusually severe side effect. ABC-transporter genotype-dependent effects have been described in anthracycline-induced cardiotoxicity in non-Hodgkin lymphoma patients (Wojnowski et al., 2005). However, in this cohort multiple other risk factors for cardiotoxicity may play a role (e.g. mediastinal irradiation, cotreatment with cardiotoxic agents and older age). In contrast, multiple sclerosis patients are typically younger, not treated in a polypragmatic approach and cardiologically otherwise healthy. Therefore, a larger prospective trial will be necessary to address these issues in multiple sclerosis appropriately. The corroboration of ABC-genotypes as risk biomarkers could be supported by *in vitro* investigations. While this appears feasible for cardiomyocyte function, thus far there is no *in vitro* model for haematological side effects. In this context, recently described potential genetic hotspots in treatment-related leukaemia in multiple sclerosis are of interest (Hasan et al., 2008).

In conclusion, our data opens the possibility to optimize individual risk/benefit profiles based on pharmacogenetic markers which may have a direct impact e.g. for individualized titration of dosages, intervals and safety monitoring. This is of particular interest since MX is not expected to be replaced by other substances in the near future and approaches to optimization of MX treatment such as addition of cardioprotective agents are still experimental (Weilbach et al., 2004; Bernitsas et al., 2006).

Supplementary material

Supplementary material is available at *Brain* online.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr Phuc Nguyen and Prof. G. Hasenfuß, Department of Cardiology and Pneumology, University of Göttingen for generously providing cDNA from cardiac tissue. PSC-833/Valspodar was a generous gift from Novartis, Nürnberg, Germany. Elacridar/GF121908 from GlaxoSmithKline (Collegeville, PA). Nicole Grimm (University of Göttingen) provided some MEP data. Dr I. Haubitz, A. Rosenberger (Department of Genetic Epidemiology, University of Göttingen) and Dr Lehr gave expert statistical advice. *Abcg2*^{-/-} mice were provided by Dr S. Zhou, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN. We thank S. Ruhmann, K. Hofmann and S. Hartung for expert technical assistance.

Funding

Merck Serono, Germany.

References

- Bermislas E, Wei W, Mikol DD. Suppression of mitoxantrone cardiotoxicity in multiple sclerosis patients by dexrazoxane. *Ann Neurol* 2006; 59: 206–9.
- Boster A, Edan G, Frohman E, Javed A, Stuve O, Tselis A, et al. Intense immunosuppression in patients with rapidly worsening multiple sclerosis: treatment guidelines for the clinician. *Lancet Neurol* 2008; 7: 173–83.
- Bursch W, Pafle S, Putz B, Barthel G, Schulte-Hermann R. Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and in altered hepatic foci of rats. *Carcinogenesis* 1990; 11: B47–53.
- Chan A, Seguin R, Magnus T, Papadimitriou C, Toyka KV, Antel JP, et al. Phagocytosis of apoptotic inflammatory cells by microglia and its therapeutic implications: termination of CNS autoimmune inflammation and modulation by interferon-beta. *Glia* 2003; 43: 231–42.
- Chan A, Weibach FX, Toyka KV, Gold R. Mitoxantrone induces cell death in peripheral blood leucocytes of multiple sclerosis patients. *Clin Exp Immunol* 2005; 139: 152–8.
- Cohen BA, Mikol DD. Mitoxantrone treatment of multiple sclerosis: safety considerations. *Neurology* 2004; 63: S28–32.
- Dörr J, Bitsch A, Schmalz KJ, Chan A, von Ahnen N, Meyer R, et al. Severe cardiac failure in a multiple sclerosis patient following low-dose mitoxantrone treatment. *Neurology* 2009; in press.
- Duddy M, Niño M, Adatia F, Hebert S, Freedman M, Adkins H, et al. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J Immunol* 2007; 178: 6092–99.
- Edan G, Miller D, Clanet M, Confavreux C, Lyon-Caen O, Lubetzki C, et al. Therapeutic effect of mitoxantrone combined with methylprednisolone in multiple sclerosis: a randomised multicentre study of active disease using MRI and clinical criteria [see comments]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997; 62: 112–8.
- Gaunt T, Rodriguez S, Day I. Cubic exact solutions for the estimation of pairwise haplotype frequencies: implications for linkage disequilibrium analyses and a web tool 'CubeX'. *BMC Bioinformatics* 2007; 8: 428.
- Ghalee RG, Edan G, Laurent M, Mauch E, Eisenman S, Hartung HP, et al. Cardiac adverse effects associated with mitoxantrone (Novantrone) therapy in patients with MS. *Neurology* 2002; 59: 909–13.
- Gonsette RE. Compared benefit of approved and experimental immunosuppressive therapeutic approaches in multiple sclerosis. *Expert Opin Pharmacother* 2007; 8: 1103–16.
- Hartung HP, Gonsette R, König N, Kwiecinski H, Guseo A, Morrissey SP, et al. Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double blind, randomised multicentre trial. *Lancet* 2002; 360: 2018–25.
- Hasan SK, Mays AN, Ottone T, Ledda A, La NG, Cattaneo C, et al. Molecular analysis of t(15;17) genomic breakpoints in secondary acute promyelocytic leukemia arising after treatment of multiple sclerosis. *Blood* 2008; 112: 3383–90.
- Hermann DM, Klic E, Spudich A, Kramer SD, Wunderl-Allerspach H, Bassetti CL. Role of drug efflux carriers in the healthy and diseased brain. *Ann Neurol* 2006; 60: 489–98.
- Hitzl M, Drescher S, van der Kuip H, Schäffler E, Fischer J, Schwab M, et al. 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. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 293–8.
- Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, et al. 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 USA* 2000; 97: 3473–8.
- Hu OY, Chang SP, Law CK, Jian JM, Chen KY. Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies with mitoxantrone in the treatment of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 1992; 69: 847–53.
- Kopadze T, Dehmel T, Hartung HP, Stuve O, Kieseier BC. Inhibition by mitoxantrone of *in vitro* migration of immunocompetent cells: a possible mechanism for therapeutic efficacy in the treatment of multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2006; 63: 1572–8.
- Le Page E, Leray E, Taurin G, Coustans M, Chaperon J, Morrissey SP, et al. Mitoxantrone as induction treatment in aggressive relapsing remitting multiple sclerosis: treatment response factors in a 5-year follow-up observational study of 100 consecutive patients. *J Neurol Neurosurg Psych* 2007; 79: 52–6.
- Leith CP, Kopecky KJ, Chen IM, Ejdems L, Slovak ML, McConnell TS, et al. Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Blood* 1999; 94: 1086–99.
- Loscher W, Potschka H. Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 591–602.
- Mizuarai S, Aozasa N, Kotani H. Single nucleotide polymorphisms result in impaired membrane localization and reduced atpase activity in multidrug transporter ABCG2. *Int J Cancer* 2004; 109: 238–46.
- Morrissey SP, Le Page E, Edan G. Mitoxantrone in the treatment of multiple sclerosis. *Int MS J* 2006; 12: 74–87.
- Paul F, Dörr J, Würfel J, Vogel HP, Zipp F. Early mitoxantrone-induced cardiotoxicity in secondary progressive multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; 78: 198–200.
- Pavek P, Merino G, Wagenaar E, Bolscher E, Novotna M, Jonker JW, et al. Human breast cancer resistance protein: interactions with steroid drugs, hormones, the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, and transport of cimetidine. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 312: 144–52.
- Poser CM, Brinar VV. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: an historical review. *Clin Neurol Neurosurg* 2004; 106: 147–58.
- Rieckmann P, Toyka KV, Bassetti C, Beer K, Beer S, Buettnner U, et al. Escalating immunotherapy of multiple sclerosis—new aspects and practical application. *J Neurol* 2004; 251: 1329–39.
- Robey RW, Polgar O, Deeken J, To KW, Bates SE. ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26: 39–57.

- Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55: 3-29.
- Stüve O, Kita M, Pelletier D, Fox RJ, Stone J, Goodkin DE, et al. Mitoxantrone as a potential therapy for primary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* 2004; 10 Suppl 1: S58-S61.
- The International HapMap Consortium. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 2007; 449: 851-62.
- Uhr M, Tontsch A, Namendorf C, Ripke S, Lucae S, Ising M, et al. Polymorphisms in the drug transporter gene ABCB1 predict antidepressant treatment response in depression. *Neuron* 2008; 57: 203-9.
- von Ahnen N, Lewczuk P, Schutz E, Oellerich M, Ehrenreich H. Prothrombin activity and concentration in healthy subjects with and without the prothrombin G20210A mutation. *Thromb Res* 2000; 99: 549-56.
- von Ahnen N, Richter M, Grupp C, Ringe B, Oellerich M, Armstrong VW. No influence of the MDR-1 C3435T polymorphism or a CYP3A4 promoter polymorphism (CYP3A4-V allele) on dose-adjusted cyclosporin A trough concentrations or rejection incidence in stable renal transplant recipients. *Clin Chem* 2001; 47: 1048-52.
- Weilbach FX, Chan A, Toyka KV, Gold R. The cardioprotector dexrazoxane augments therapeutic efficacy of mitoxantrone in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol* 2004; 135: 49-55.
- Wojnowski L, Kulle B, Schirmer M, Schlüter G, Schmidt A, Rosenberger A, et al. NAD(P)H oxidase and multidrug resistance protein genetic polymorphisms are associated with doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Circulation* 2005; 112: 3754-62.
- Zamar D, McNeney B, Graham J. elm: Software implementing exact-like inference for logistic regression models. *J Stat Software* 2007; 21: 1-18.
- Zheng G. Analysis of ordered categorical data: two score-independent approaches. *Biometrics* 2008; 64: 1276-9.
- Zheng G, Freidlin G, Zhaohai L, Gastwirth JL. Choice of scores in trend tests for case-control studies of candidate-gene associations. *Biometrical J* 2003; 45: 335-48.
- Zhou S, Zong Y, Lu T, Sorrentino BP. Hematopoietic cells from mice that are deficient in both Bcrp1/Abcg2 and Mr1a/1b develop normally but are sensitized to mitoxantrone. *BioTechniques* 2003; 35: 1248-52.

Teil C: Darlegung des Eigenanteils

Adenosinetriphosphate-binding-casette (ABC)-Transporter stellen eine Form der *Multi-Drug-Resistance* dar. Sie beeinflussen die Pharmakologie und Toxikologie diverser Substanzen. Die Transporter spielen unter anderem eine potentielle Rolle bei der Entwicklung von Resistenzen gegen Chemotherapeutika sowie bei der Limitierung der Penetration verschiedener Medikamente in das zentrale Nervensystem.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Häufigkeit von *ABC*-Genpolymorphismen, der Transporter-Expression auf Zielorganen der Mitoxantron-Therapie in der Multiplen Sklerose, der funktionellen Rolle der Transporter *in vitro* und *in vivo* und eine retrospektive, klinische Analyse des potentiellen Einflusses auf die Mitoxantron-Ansprechrates in Multipler Sklerose. Die Untersuchung wurde unter der Leitung von PD Dr. med. A. Chan in der ehemaligen Abteilung „experimentelle und klinische Neuroimmunologie, Universitätsmedizin Göttingen und gemeinnützige Hertie-Stiftung“ begonnen und nach Wechsel von PD Dr. med. Chan an die Ruhr Universität beendet.

Die der Untersuchung zugrunde liegende Hypothese, dass *ABC*-Transporter zelluläre Effekte von Mitoxantron kritisch verändern könnten, wurde von Herrn PD Dr. med. A. Chan (vormals ehemalige Abteilung „experimentelle und klinische Neuroimmunologie, Universitätsmedizin Göttingen und gemeinnützige Hertie-Stiftung“, Göttingen; aktuell Neurologische Klinik, Ruhr Universität, St. Josef-Hospital, Bochum, Direktor Prof. Dr. med. R. Gold) aufgestellt.

Die Einleitung basiert auf Literaturrecherchen durch die Autorin der Promotion Frau S. Cotte. Die weiteren Erstautoren Herr Dr. rer. nat. N. Kruse (Abteilung Neuropathologie, Medizinische Fakultät, Universität Göttingen, Göttingen) und Herr Prof. Dr. med. N. von Ahsen (Abteilung Klinische Chemie, Medizinische Fakultät, Universität Göttingen, Göttingen) beteiligten sich mit hilfreichen Anregungen.

Die Häufigkeit von zwei *ABCB1*- und fünf *ABCG2*-Einzelbasenaustauschen in 842 Multiple-Sklerose-Patienten aus Deutschland und Spanien und 264 gesunden Spendern wurde von Herrn Dr. rer. nat. N. Kruse, Herrn Prof. Dr. med. N. von Ahsen und Frau S. Cotte wie folgend aufgeführt analysiert: Die Isolation der genomischen Desoxyribonukleinsäure erfolgte im Zentrum Barcelona (Dr. med. N. Tellez, Prof. Dr. med. X. Montalban, Einheit klinische Neuroimmunologie, Abteilung Neurologie, *Hospital Universitario Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona*, Spanien, n=49), Berg (gesammelt von Dr. med. M. Starck, Dr. med. N. König, Marianne-Strauß Klinik, Berg, isoliert von Prof. Dr. med. N. v. Ahsen, n=194), Berlin (Dr. med. J. Dörr, Prof. Dr. med. F. Paul, Prof. Dr. med. F. Zipp, *NeuroCure Clinical Research Center*, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, n=10), Rostock (Dr. med. A. Winkelmann, Prof. Dr. med. U. K. Zettl, Abteilung Neurologie, Universität Rostock, Rostock, n=423) und Göttingen/Bochum (Dr. rer. nat. N. Kruse, n=112; Frau S. Cotte, n=54). Bei der von Herrn Dr. rer. nat. N. Kruse (n=858, Barcelona, Berlin, Göttingen/Bochum, Rostock) und von Frau S. Cotte (n=54, Göttingen) durchgeführten Genotypisierung für *ABCG2* wurden

folgende sechs Einzelbasenaustausche fokussiert: V12M, Q141K, Q126* (*=Stopp), E334*, R482G, R482T. Die *ABCB1*-3435C>T (ganze Kohorte) und -2677G>T (MX-behandelte Kohorte) sowie die vorbeschriebenen *ABCG2*- (n=194, Berg) Einzelbasenaustausche wurden von Herrn Prof. Dr. med. N. von Ahsen genotypisiert. Die zugehörigen Abschnitte der Publikation (Material und Methoden, Ergebnisse, Diskussion) sowie Tabelle 2 der Publikation und Tabelle 1 der Dissertation wurden angefertigt in Zusammenarbeit von Herrn Dr. rer. nat. N. Kruse, Herrn Prof. Dr. med. N. von Ahsen und Frau S. Cotte.

In einem weiteren Schritt konnte von Herrn Dr. rer. nat. N. Kruse und Frau S. Cotte nachgewiesen werden, dass *ABC*-Transporter vor allem in Zellen/Geweben, die potentiell von der Mitoxantron-Therapie betroffen sind, auf Boten-Ribonukleinsäure-Ebene hoch exprimiert werden. Die komplementäre Desoxyribonukleinsäure aus kardialem Gewebe wurde freundlicherweise von Dr. med. Phuc Nguyen and Herrn Prof. Dr. med. G. Hasenfuß (Abteilung Kardiologie und Pneumologie, Universitätsmedizin Göttingen, Göttingen) zur Verfügung gestellt. Die Hepatozyten stammten aus makroskopisch unauffälligen Resektionsrändern von Lebertumoren, offeriert von Herrn Prof. Dr. med. N. von Ahsen. Die zur Quantifizierung benötigten peripheren mononukleären Blutzellen wurden in der Multiple-Sklerose-Ambulanz, Universitätsmedizin, Göttingen unter Herrn Prof. Dr. med. R. Gold von Herrn Dr. rer. nat. N. Kruse und Frau S. Cotte gesammelt. Die primär humanen Gliazellen stammten aus chirurgischen Resektaten, die Herr Dr. med. H. Pannek (Evangelisches Krankenhaus, Bielefeld) zusammentrug. Die Isolierung der komplementären Desoxyribonukleinsäure aus diesen Zellen/Geweben, die Aufreinigung der Ribonukleinsäure, die reverse Transkription und die relative Quantifizierung der *ABC*-Boten-Ribonukleinsäure-Expression wurde von Herrn Dr. rer. nat. N. Kruse mit Unterstützung von Frau S. Cotte durchgeführt. Diese beiden erstellten auch die entsprechenden Abschnitte der Publikation sowie die Abbildung 1 der Publikation.

Der funktionelle Einfluss der *ABC*-Transporter-Gen-Polymorphismen wurde auf experimenteller *in-vitro*-Ebene von Frau S. Cotte untersucht. Auf der Grundlage von Vorarbeiten der Gruppe und nach einer ausführlichen Literaturrecherche entwickelte sie einen durchflusszytometrisch-basierten Mitoxantron-Efflux- und -Zelltod-Assay. Nachdem die Assays in Vorexperimenten in unsortierten mononukleären Blutzellen etabliert wurden, erfolgte die Analyse in *ABCB1*- und *ABCG2*- hochexprimierenden CD56⁺-Natürlichen-Killer-Zellen. Die Erarbeitung der in der Publikation aufgeführten Experimente (Mitoxantron-Efflux-Assays in Multiple-Sklerose-Patienten und gesunden Spendern (n=6), Zelltod-Assays (n=5)) wurde von der Autorin der Promotion durchgeführt. Sie verfasste die entsprechenden Abschnitte aus Material und Methoden, dem Ergebnisteil und der Diskussion und entwarf die Abbildungen 2 und 3 der Publikation sowie die Abbildungen 1 bis 3 und die Tabellen 2 und 5 der Dissertation mit Hilfe der Microsoft-Office Excel-, -Power Point- (2003) und Win MDI-Software 2.8 (2000).

Die Untersuchung der *in-vivo*-Signifikanz der Mitoxantron-Wirkung in der chronischen, experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis in *Abcg2-Knock-Out*-Tieren und die

Erstellung der dazugehörigen Abschnitte sowie der Abbildung 4 der Publikation erfolgte durch Herrn B. Huber im Rahmen von dessen Dissertationsvorhaben unter Anleitung von Herrn Dr. rer. nat. F. Lühder (ehemalige Abteilung „experimentelle und klinische Neuroimmunologie, Universitätsmedizin Göttingen und gemeinnützige Hertie-Stiftung“, Göttingen).

In einer retrospektiven, klinischen Analyse wurde die Ansprechrate Mitoxantron-therapierter Multiple-Sklerose-Patienten mit den zuvor funktionell untersuchten *ABC*-Gen-Polymorphismen von Frau S. Cotte unter Supervision von Herrn PD Dr. med. A. Chan korreliert. Das Design der retrospektiven Prüfung wurde von der Autorin der Promotion in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. med. N. von Ahsen entwickelt. Die Datenauswertung erfolgte für insgesamt 188 Multiple-Sklerose-Patienten der Göttinger Multiple-Sklerose-Ambulanz von Frau S. Cotte. Die weiteren Epikrisen wurden in Form eines Reports in den entsprechenden Zentren erhoben (Barcelona n=49, Dr. med. N. Tellez, Prof. Dr. med. X. Montalban; Berlin n=10, Dr. med. J. Dörr, Dr. med. F. Paul, Dr. med. F. Zipp; Berg n=194, Dr. med. M. Starck, Dr. med. N. König; Rostock n=123, Dr. med. A. Winkelmann, Prof. Dr. med. U.K. Zettl). Die klinischen Daten der insgesamt 564 Multiple-Sklerose-Patienten wurden unter Koordination von Frau S. Cotte zusammengetragen und von dieser mit Hilfe konservativer Parameter bezüglich der Mitoxantron-Ansprechrate klassifiziert. Ergänzend wurde zur Response-Einteilung die Auswertung motorisch-evozierter Potentiale herangezogen, die für das Göttinger Patientenkollektiv (n=8) freundlicherweise von N. Grimm (ehemalige Abteilung „experimentelle und klinische Neuroimmunologie, Universitätsmedizin Göttingen und gemeinnützige Hertie-Stiftung“, Göttingen) zur Verfügung gestellt wurde. Die Daten der 36 Patienten, die schwere kardiale und hämatologische Nebenwirkungen entwickelten, wurden ebenfalls wie vorhergehend beschrieben gesammelt (Barcelona n=14, Berg n=7, Berlin n=10, Göttingen/Bochum n=4, Rostock n=1) und auf *ABC*-Polymorphismen untersucht. Die Abschnitte der klinischen Analyse sowie die Tabellen 1, 3 und 4 der vorliegenden Publikation und die Tabellen 3 und 4 der Dissertation wurden von Frau S. Cotte unter Korrektur und mit Ergänzung von Herrn Prof. Dr. med. N. von Ahsen verfasst und erstellt.

Die beschreibende Statistik der Publikation wurde von den Autoren, die die entsprechenden Experimente und Auswertungen durchführten nach Rücksprache mit Herrn Prof. Dr. med. N. von Ahsen erstellt. Ergänzend gaben Frau Dr. I. Haubitz, Herr A. Rosenberger (Abteilung genetische Epidemiologie, Universitätsmedizin Göttingen) und Herr Dr. Lehr professionelle, statistische Ratschläge.

.....
federführender Autor der Publikation

PD Dr. med. A. Chan

.....
Autorin der Promotion

S. Cotte

Danksagung

Es ist eine schöne Tradition, sich nach Abschluss der Doktorarbeit auf die vielen Menschen zu besinnen, die hilfreich und unterstützend wirkten.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. R. Gold und Herrn PD Dr. med. A. Chan für die Anregung und Ermöglichung dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. med. R. Gold danke ich darüber hinaus für die freundliche Aufnahme in das ehemalige Institut für Multiple-Sklerose-Forschung der Universitätsmedizin Göttingen sowie für die interessierte Unterstützung und Förderung, die mir entgegengebracht wurde.

Besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. A. Chan für die hervorragende, engagierte und geduldige Betreuung meines Dissertationsvorhabens, für die stete Diskussionsbereitschaft und dafür, dass er mich bei meinen ersten Schritten in der „Welt der Forschung“ begleitete.

Herrn Prof. Dr. med. N. von Ahsen danke ich für die andauernde interessierte Unterstützung und Diskussionsbereitschaft. Ich empfinde es als eine große Ehre, dass ich mit Herrn PD Dr. med. A. Chan und Herrn Prof. Dr. med. N. von Ahsen zusammenarbeiten und von ihnen lernen durfte.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. N. Kruse werde ich immer dankbar für die Einführung in die Laborarbeit sowie die fortlaufende Unterstützung auf dem Gebiet der Genotypisierung und Quantifizierung sein.

Auch allen nicht genannten Mitarbeitern des ehemaligen Instituts für Multiple-Sklerose-Forschung der Universitätsmedizin Göttingen gilt mein Dank für ein sehr angenehmes und motivierendes Arbeitsklima und für die vielen kleinen Hilfen.

Ich danke Herrn Dr. phil. K. H. Stubenrauch, D. Grey, S. Kirtscher und H. Franz für die korrigierenden Anmerkungen zur äußeren Form des Manuskripts.

Lebenslauf

Steffi Cotte

Alfred-Kästner-Straße 14

04275 Leipzig

Telefonnummer: 0341-2230177 oder 0176-21302605

E-Mail Adresse: stefficotte@web.de

Am 29.01.1984 wurde ich, Steffi Cotte, in Leinefelde, Thüringen als drittes Kind meiner Eltern geboren. Ich bin deutsche Staatsbürgerin. Ich bin unverheiratet und Mutter eines Sohns, Jonathan Cotte, der am 22.09.2009 geboren wurde.

Von September 1990 bis 1994 habe ich die Konrad-Hentrich-Grundschule in Leinefelde besucht, bevor ich für weitere acht Jahre Schülerin des Gottfried-Wilhelm-Leibniz-Gymnasiums in Leinefelde wurde. Im Juni 2002 habe ich die allgemeine Hochschulreife erlangt.

Von Oktober 2002 bis Mai 2009 habe ich Humanmedizin studiert an der Georg-August-Universität zu Göttingen, wobei ich im September 2004 das erste Staatsexamen, Physikum und im Mai 2009 das zweite Staatsexamen erfolgreich absolvierte. Am 19.06.2009 wurde mir die Approbation als Ärztin erteilt.

Mein Praktisches Jahr habe ich von Februar bis Juni 2008 in der Allgemeinchirurgie des *Hospital Universitario Virgen Macarena* in Sevilla, Spanien und von Juni bis Oktober 2008 in der Inneren Medizin der Geriatrischen Universitätsklinik des Ziegler Spitals in Bern, Schweiz verbracht. Von Oktober 2008 bis Januar 2009 war ich in der Neurologie im *National Hospital for Neurology and Neurosurgery*, Queen Square in London, Großbritannien tätig.

Weitere klinische Tätigkeiten beschränken sich auf im Rahmen des Studiums stattgefundene Blockpraktika und Famulaturen.

Zwischen Februar und Oktober 2006 habe ich mein Studium für ein experimentelles Forschungspraktikum im Rahmen meines Dissertationsvorhabens unterbrochen. Die thematische Auseinandersetzung mit ABC-Transportern und Mitoxantron in Multipler Sklerose erfolgte unter der Betreuung von Herrn PD Dr. med. A. Chan im ehemaligen Institut für Multiple-Sklerose-Forschung (Direktor Herr Prof. Dr. med. R. Gold) der Universitätsmedizin zu Göttingen. Als Ergebnis habe ich im September 2006 die ECTRIMS in Madrid, Spanien besucht, auf der ein Poster mit dem Titel „*ABC-transporter gene-polymorphisms as potential predictors of therapeutic efficacy of mitoxantrone in MS*“ vorgestellt wurde. Im September 2007 habe ich das Thema auf dem Kongress der Deutschen

Gesellschaft für Neurologie in Berlin und im April 2008 auf dem Kongress der *American Academy of Neurology* in Chicago, IL, USA präsentiert. Am 15.07.2009 wurde ein Artikel mit dem Thema „*ABC-transporter gene polymorphisms are potential pharmacogenetic markers for mitoxantrone in multiple sclerosis*“ bei Brain (Impact-Faktor 9.603) publiziert.

Von Oktober 2002 bis August 2009 habe ich als Aushilfskraft in einer gynäkologischen Praxis gearbeitet. Weiterhin war ich von Juli bis Oktober 2007 als hilfswissenschaftliche Mitarbeiterin mit dem Führen der Multiple-Sklerose-Datenbank der ehemaligen Multiple-Sklerose-Ambulanz der Universitätsmedizin in Göttingen beauftragt. In den Jahren 2004 bis 2006 nahm ich ehrenamtlich an der Organisation und Planung des jährlich stattfindenden Teddy-Bär-Krankenhauses sowie des Aktionstages der Medizin der Universitätsmedizin in Göttingen teil.

Von September 2009 bis September 2010 befand ich mich in der Erziehungszeit meines Kindes. Darüber hinaus beteiligte ich mich an der Erstellung eines weiteren Manuskriptes mit dem Thema „Therapieeffekt von Mitoxantron bei primär progredienter Multiple Sklerose in Abhängigkeit von ABC-Transporter-Gen-Polymorphismen“.

Seit dem 27.09.10 bin ich als Assistenzärztin und wissenschaftliche Mitarbeiterin tätig in der Klinik und Poliklinik für Neurologie des Universitätsklinikums Leipzig (Leitung von Herrn Prof. Dr. med. J. Claßen). Im Besonderen obliegt mir die Betreuung der Neuroimmunologischen Ambulanz (unter Herrn PD Dr. med. F. Then Bergh). Am 8./9.10.10 absolvierte ich erfolgreich einen Kurs zur Prüffärztin (*good clinical practice*) am Koordinierungszentrum klinischer Studien in Leipzig (KKSL). Seit Ende 2010 bin ich als Prüffärztin für verschiedene klinische *multi-centre* und Klinik-eigene Studien mit Multiple Sklerose-Patienten tätig.