

Aus dem Institut für Klinische Chemie am Campus Lübeck  
des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein  
Leiter: Prof. Dr. med. M. Seyfarth  
und der Sektion Medizin der Universität zu Lübeck  
Vorsitz: Prof. Dr. med. F. Hohagen

---

**Thiopurin-S-Methyltransferase-Defizienz**  
**Ein Methodenvergleich**  
**in der**  
**Routinelabordiagnostik**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von  
Shahpour Reza Sharifzadeh  
aus Teheran

Lübeck 2011

1. Berichtstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Dirk Hartwig
  2. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Christian Schultz
- Tag der mündlichen Prüfung: 02.11.2011
- Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 02.11.2011

Meinen Eltern

# Inhaltverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>I</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 Thiopurine .....	1
1.2 Pharmakokinetik und Pharmakodynamik der Thiopurine .....	4
1.3 Thiopurin-S-Methyltransferase.....	9
1.4 TPMT-Polymorphismus.....	10
1.5 Methoden zur TPMT-Diagnostik.....	13
1.5.1 Funktionsweise der HPLC-Analytik.....	13
1.5.1.1 Gradienten- und Isokratische HPLC.....	15
1.5.1.2 Normal- und Umkehrphasenchromatographie .....	15
1.5.2 Polymerasekettenreaktion .....	16
1.5.2.1 Aufbau des LightCycler® Instruments .....	17
1.5.2.2 Arbeitsweise des LightCycler® Instruments .....	17
1.5.2.3 LightCycler®-Detektionsprinzip.....	18
1.5.2.4 Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) .....	19
1.5.2.5 Color-Compensation-Calibration-Datei (CCC-Datei) .....	21
1.6 Zielsetzung .....	22
<b>2 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>23</b>
2.1 Materialien und Bezugsquellen .....	23
2.1.1 Geräte.....	23
2.1.2 Software .....	23
2.1.3 Verbrauchsmaterialien .....	24
2.1.4 Chemikalien und Reagenzien .....	24
2.2 Methoden.....	25
2.2.1 Phänotypisierung (TPMT-Aktivitätsbestimmung) .....	25

2.2.1.1	Stammlösungen.....	26
2.2.1.2	Thioguanin(6-TG)-Lösung.....	26
2.2.1.3	Methylthioguanin-Kalibrator .....	27
2.2.1.4	S-Adenosyl-L-Methionin (AdoMet) .....	27
2.2.1.5	Patienten-Hämolysat .....	27
2.2.1.6	Kontroll-Hämolysat .....	28
2.2.1.7	Hämoglobin-Bestimmung.....	28
2.2.1.8	Probenansatz .....	29
2.2.1.9	Eiweißfällung .....	29
2.2.1.10	HPLC-Analyse der Proben .....	30
<b>2.2.2</b>	<b>Genotypisierung .....</b>	<b>30</b>
2.2.2.1	DNA-Extraktion .....	30
2.2.2.2	TPMT PCR-Ansatz .....	31
2.2.2.3	Qualitätskontrolle .....	32
2.2.2.4	TPMT PCR-Protokoll .....	32
<b>2.3</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Phänotypisierung (TPMT-Aktivitätsbestimmung) .....</b>	<b>35</b>
3.1.1	Häufigkeitsverteilung der TPMT-Aktivität .....	37
3.1.2	Vergleich von Einflussgrößen auf die TPMT-Aktivität .....	40
3.1.2.1	Vergleich der TPMT-Aktivität bei Männern und Frauen.....	40
3.1.2.2	Vergleich der TPMT-Aktivitäten bei verschiedenen Erkrankungen.....	41
<b>3.2</b>	<b>Genotypisierung .....</b>	<b>42</b>
3.2.1	Schmelzkurvenanalyse .....	42
3.2.2	Häufigkeitsverteilung der TPMT-Genotypen.....	46
3.2.3	TPMT- Allelfrequenzen .....	48
3.2.4	Genotyp/Phänotyp-Vergleich bei Männern und Frauen.....	49
3.2.5	Genotyp/Phänotyp-Vergleich bei verschiedenen Erkrankungen .....	50
3.2.6	Konkordanz und Diskrepanz beider Methoden .....	51
3.2.6.1	Diskrepante Ergebnisse bei verschiedenen Erkrankungen .....	52
3.2.6.2	Diskrepante Ergebnisse bei Männern und Frauen .....	53
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>54</b>

4.1	TPMT-Aktivität - Eigene Ergebnisse und publizierte Daten .....	54
4.2	TPMT-Aktivität bei Männern und Frauen.....	54
4.3	TPMT-Aktivität bei verschiedenen Erkrankungen.....	56
4.4	Konkordanz und Diskrepanz der Ergebnisse beider Methoden .	58
4.5	Vor- und Nachteile beider Methoden .....	60
4.6	Schlussfolgerung .....	63
5	ZUSAMMENFASSUNG .....	65
6	LITERATURVERZEICHNIS .....	67
7	ANHANG .....	85
8	DANKSAGUNG .....	91
9	LEBENS LAUF .....	92
10	KONGRESSBEITRAG .....	93

# Abkürzungen

6-MMP	6-Methyl-Mercaptopurin
6-MP	6-Mercaptopurin
6-MTG	6-Methyl-Thioguanin
6-TG	6-Thioguanin
8-OH-6-TG	8-Hydroxy-Thioguanin
AdoHcy	S-Adenosyl-L-Homocystein
AdoMet	S-Adenosyl-L-Methionin
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AO	Aldehydoxidase
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AZA	Azathioprin
c	Konzentration
CCC	Color Compensation Calibration
CD28	Cluster of Differentiation 28
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTGDP	Desoxy-Thioguanosin-Diphosphat
dTGTP	Desoxy-Thioguanosin-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GD	Guanylatdesaminase
GMPS	Guanosin-Monophosphat-Synthetase
Hb	Hämoglobin
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IMPDH	Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase
LC	LightCycler®
LED	Light Emitting Diode (Leuchtdiode)
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight
min	Minute

MMF	Mycophenolat-Mofetil
MMPNs	Methylmercaptapurinnukleotide
MTGNs	Methylthioguaninnukleotide
nm	Nanometer
nt	Nucleotide
PCR	Polymerase Chain Reaction
PRPP	Phosphoribosyl-Pyrophosphat
Rac1	Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate 1
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SNP	Single-Nucleotide-Polymorphism
TGDP	Thioguanosin-Diphosphat
TGMP	Thioguanosin-Monophosphat
TGN	Thioguaninnukleotid
TGTP	Thioguanosin-Triphosphat
TIMP	Thioinosin-Monophosphat
TPMT	Thiopurin-S-Methyltransferase
TXMP	Thioxanthin-Monophosphat
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolet
V	Volumen
var	genetische Variante
wt	Wildtyp
XO	Xanthinoxidase

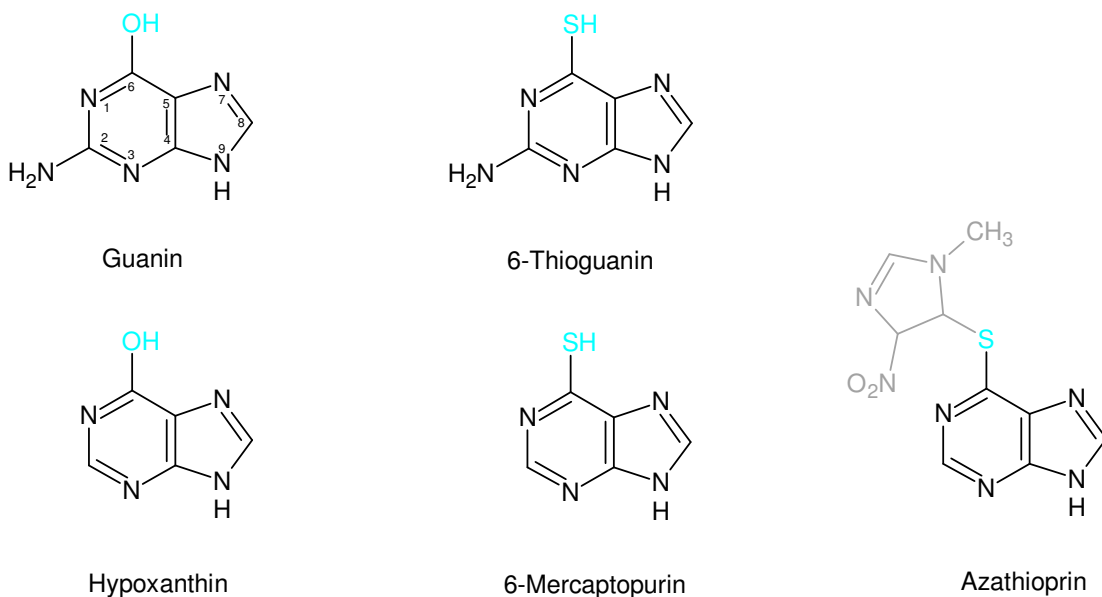


# 1 Einleitung

## 1.1 Thiopurine

Thiopurine, wie 6-Thioguanin, 6-Mercaptopurin und Azathioprin, sind in ihrem Aufbau den physiologisch vorkommenden Purinbasen sehr ähnlich und können dadurch nach entsprechender Metabolisierung als falsche Bausteine in die Nucleinsäuren, DNA und RNA, eingebaut werden. Sie sind in der Lage, die Teilung der schnell proliferierenden Zellen entscheidend zu stören. Dies bewirken sie einerseits dadurch, dass sie nach ihrem Einbau die Struktur der Nucleinsäuren ändern, und andererseits durch ihre Metabolite, die die Synthese der Purinbasen (Purin-de novo-Synthese) hemmen.

Aufgrund ihrer ähnlichen Struktur und des genannten Wirkmechanismus werden Thiopurine auch als Purinanaloga bezeichnet.



**Abbildung 1.** Strukturformel der physiologischen Purine, Guanin und Hypoxanthin (links), und deren Analoga, 6-Thioguanin und 6-Mercaptopurin/Azathioprin (rechts). Sie unterscheiden sich durch die mit blau gekennzeichneten Hydroxy- (-OH) bzw. Thiolgruppen (-SH). Azathioprin unterscheidet sich von 6-Mercaptopurin durch den grau dargestellten zusätzlichen Imidazol-Ring (Methylnitroimidazol).

Elion und Hitchings haben erstmals mit Substitution der Hydroxygruppe (-OH) durch eine schwefelhaltige Thiolgruppe (-SH, früher auch Mercaptogruppe

genannt) am Kohlenstoffatom in Position 6 (Abbildung 1) aus den physiologischen Purinen Hypoxanthin und Guanin deren Analoga 6-Mercaptopurin und 6-Thioguanin synthetisiert und deren Wirkung in Kulturen von *Lactobacillus casei* untersucht (Elion et al. 1951).

Nachdem bei mehreren Experimenten die Gabe von Purin- und Pyrimidinanaloga eine deutliche Wirksamkeit gegen einige Arten von Tumorzellen bei Mäusen zeigte (Barker et al. 1951; Biesele et al. 1952), wurde 6-Mercaptopurin als erstes Thiopurin-Zytostatikum bei Menschen eingesetzt. Burchenal und Kollegen konnten bereits in den Jahren 1952 und 1953 bei 107 Patienten, die überwiegend an akuten Leukämien erkrankt waren, durch Gabe von 6-Mercaptopurin gute klinische wie hämatologische Remissionen erzielen, insbesondere bei Patienten mit Akuter Lymphatischer Leukämie (ALL), auch wenn Resistenzen gegenüber Kortison und Folsäureantagonisten bestanden (Burchenal et al. 1953).

Die Prognose der ALL, die häufigste maligne Erkrankung des Kindesalters, galt damals mit wenigen Monaten als besonders schlecht. Die Erkenntnis, dass hier durch 6-Mercaptopurin Totalremissionen erreicht werden konnten, hatte die Zulassung des Medikamentes im Jahre 1953 durch die zuständige US-amerikanische Behörde (Food and Drug Administration) zur Folge. Heutzutage kann bei kindlicher ALL unter Anwendung effektiver Therapieprotokolle eine Heilungsrate von bis zu 85% erreicht werden (Schmiegelow et al. 2009a).

Gertrude B. Elion und George H. Hitchings erhielten im Jahre 1988 gemeinsam mit James W. Black „für ihre wegweisenden Entwicklungen wichtiger biochemischer Prinzipien der Arzneimitteltherapie“ den Nobelpreis für Medizin.

Azathioprin wurde erst später im Jahr 1963 eingeführt, als Murray und Kollegen damit ein verlängertes Überleben des Spenderorgans bei Nierentransplantationen belegen konnten (Murray et al. 1963). Azathioprin (AZA) trägt im Vergleich zu 6-Mercaptopurin einen zusätzlichen Imidazol-Ring (Methylnitroimidazol) am Schwefelatom (Abbildung 1) und besitzt eine deutlich höhere orale Bioverfügbarkeit (siehe 1.2). Ein Schutz der Thiol-Gruppe vor der Methylierung und damit die in vivo Inaktivierung des Medikamentes, der als Idee der Entwicklung von Azathioprin zu Grunde lag, ließ sich jedoch nicht belegen. Die nicht-enzymatische Abspaltung des zusätzlichen Imidazol-Rings fand nach der oralen Azathioprin-Gabe schnell statt (Anstey et al. 1992).

Heute sind Thiopurine ein fester Bestandteil in den Therapieprotokollen einiger hämatologisch-onkologischer Erkrankungen, wie ALL bei Kindern (Veerman et al. 1996) und Erwachsenen (Jabbour et al. 2005), AML bei Kindern (Lee et al. 2010) und Erwachsenen (Ohno et al. 1986). Des Weiteren werden sie in der Behandlung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen, Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, häufig eingesetzt (Caprilli et al. 2005). Bei der Therapie schwerer Verläufe einer Reihe anderer, vor allem autoimmuner Erkrankungen (siehe Tabelle 1), finden Thiopurine weiterhin Verwendung, entweder als Alternativmedikation bei bestehenden Unverträglichkeiten gegen die Mittel der ersten Wahl, oder häufig in Kombination mit anderen Immunsuppressiva. Bei solch einer Kombinationstherapie kann die Dosis der einzelnen Medikamente reduziert werden, und die Behandlung somit nebenwirkungsärmer gestaltet werden. Dies ist im Falle der möglichen Dosisreduktion der Glukokortikosteroide von besonderer Bedeutung.

**Tabelle 1.** Weitere Indikationen für eine Medikation mit Thiopurinen

<b>Erkrankung</b>	<b>Literatur</b>
Systemischer Lupus erythematodes	(Griffiths et al. 2010)
Autoimmunhepatitis	(Mieli-Vergani et al. 2009)
Atopische Dermatitis	(Bußmann et al. 2009)
Psoriasis vulgaris / Psoriasis Arthritis	(Menter et al. 2009)
Dermatomyositis / Polymyositis	(Hengstman et al. 2009)
Bullöse Autoimmundermatosen	(Schmidt 2009)
Aktive Rheumatoide Arthritis	(Willkens et al. 1992)
Systemische Vaskulitiden	(Chan und Luqmani 2009)
Multiple Sklerose	(Casetta et al. 2007)
Myasthenia gravis	(Sathasivam 2008)
Morbus Behcet	(Okada 2000)
Autoimmunpankreatitis	(Raina et al. 2009)
Idiopathische Lungenfibrose	(Raghu et al. 1991)
Chronisch Idiopathische Thrombozytopenische Purpura	(Arnold et al. 2010)
Autoimmun-hämolytische Anämie vom Wärmetyp	(Valent und Lechner 2008)

Die Anwendung der Thiopurine in der Transplantationsmedizin ist im Vergleich zu neueren Immunsuppressiva eher rückläufig, auch wenn sie diesen nicht in jeder Hinsicht unterlegen sind. Nierentransplantierte, die unter anderem Azathioprin (AZA) bzw. Mycophenolat-Mofetil (MMF) erhielten, zeigten unter MMF zwar eine

niedrigere Rate der akuten Abstoßungsreaktion, waren aber infektionsbedingt länger hospitalisiert und zeigten im Vergleich zu Patienten unter AZA langfristig auch kein verbessertes Transplantatüberleben (Opelz und Dohler 2009). Ebenfalls unter den Lebertransplantierten war MMF-Gabe, bei gleicher Überlebensrate des transplantierten Organs und des Patienten, seltener mit einer akuten Abstoßungsreaktion assoziiert. Die Reaktivierung einer vorhandenen Hepatitis C Infektion war jedoch häufiger bei den mit MMF behandelten Patienten zu beobachten als unter AZA-Gabe (Germani et al. 2009).

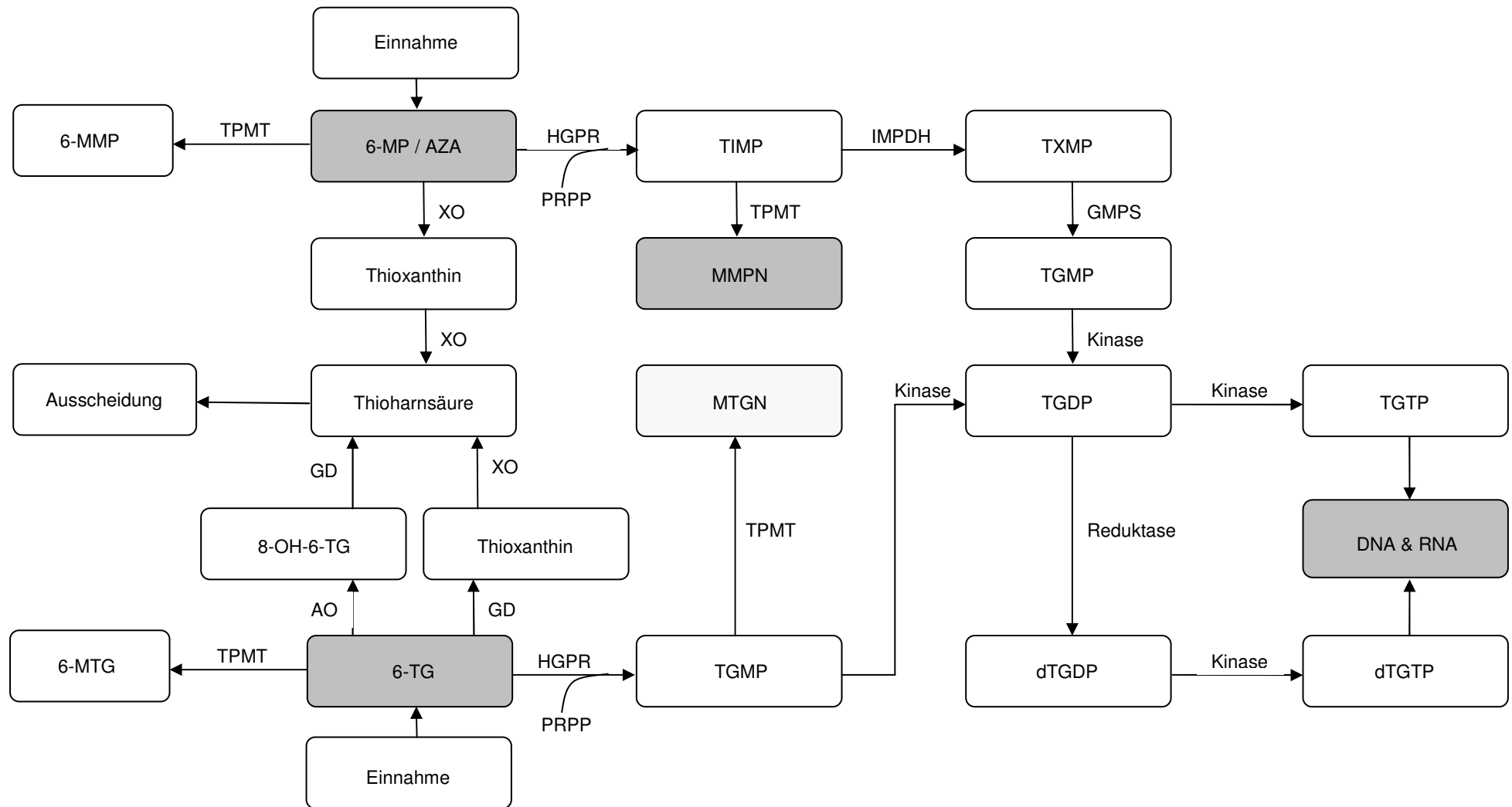
## **1.2 Pharmakokinetik und Pharmakodynamik der Thiopurine**

Trotz ihrer relativ geringen oralen Bioverfügbarkeit werden Thiopurinmedikamente meistens oral verabreicht. Während 6-Thioguanin eine durchschnittlich 30%ige orale Bioverfügbarkeit mit einer Variationsbreite von 14% bis 46% zeigt (Fachinformation Tabloid<sup>®</sup>, 6-TG, 2009), beträgt diese für 6-Mercaptopurin im Durchschnitt etwa 16% (5% bis 37%) (Fachinformation Puri-Nethol<sup>®</sup>, 6-MP, 2009). Azathioprin hat als Imidazolderivat von 6-Mercaptopurin eine höhere orale Bioverfügbarkeit von durchschnittlich 47% (27-83%) (Van Os et al. 1996).

Obwohl Thiopurine mit 1 bis 2 Stunden eine kurze Halbwertszeit im Plasma besitzen, reichern sich deren aktive Metabolite (6-TGN) intrazellulär bei repetitiver Thiopuringabe an. Die Halbwertszeit von 6-TGN in Erythrozyten variiert stark und beträgt 3 bis 13 Tagen (Schwab und Klotz 2001).

Thiopurine sind „Prodrugs“, da sie selbst pharmakologisch nicht wirksam sind. Ihre zytotoxische und immunsuppressive Wirkung entfalten sie erst, nachdem sie von den Zielzellen metabolisiert und dadurch in ihre aktive Metaboliten überführt wurden (Lennard 1992).

Abbildung 2 stellt vereinfacht den intrazellulären Stoffwechselweg der Thiopurine dar. Hier konkurrieren die inaktivierenden Enzyme, im Wesentlichen die Xanthinoxidase (XO) und Thiopurin-S-Methyltransferase (TPMT), mit dem initial-aktivierenden Schlüsselenzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) um das Substrat, das verabreichte Thiopurin-Medikament. Eine reduzierte bis fehlende HGPRT-Aktivität wie beispielsweise bei Patienten mit Lesch-Nyhan-Syndrom äußert sich demnach in einer (natürlichen) Resistenz gegen Thiopurine (Nyhan 1997), da sie nicht in ihren aktiven Metaboliten überführt



**Abbildung 2.** Metabolismus der Thiopurine, 6-MP: 6-Mercaptopurin, AZA: Azathioprin (6-MP-Prodrug), 6-TG: 6-Thioguanin, 6-MMP: 6-Methyl-Mercaptopurin, 6-MTG: 6-Methyl-Thioguanin, HGPR: Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase, TPMT: Thiopurin-S-Methyltransferase, XO: Xanthinoxidase, GD: Guanylatdesaminase, AO: Aldehydoxidase, 8-OH-6-TG: 8-Hydroxy-6-Thioguanin, PRPP: Phosphoribosyl-Pyrophosphat, IMPDH: Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase, GMPS: Guanysin-Monophosphat-Synthetase, TIMP: Thioinosin-5'-Monophosphat, MMPN: Methylmercaptapurinnukleotide, TGMP: Thioguanosin-5'-Monophosphat, MTGN: Methylthioguaninnukleotide, TXMP: Thioxanthin-5'-Monophosphat, TGDP: Thioguanosin-5'-Diphosphat, TGTP: Thioguanosin-5'-Triphosphat, dTGDP: Desoxy-Thioguanosin-5'-Diphosphat, dTGTP: Desoxy-Thioguanosin-5'-Triphosphat, zytotoxische Wirkung der Thiopurine durch den Einbau in DNA & RNA und Inhibition der Purin-de novo-Synthese mit MMPN als starke und MTGN als schwache Inhibitoren, Thioharnsäure: Endabbauprodukt (Ausscheidung über die Nieren). Modifiziert nach (Kitchen et al. 1999; Shipkova und Von Ahsen 2003; Karran 2006)

werden können. Ansari und Kollegen konnten bei mit AZA-behandelten Patienten nach einer Herztransplantation zeigen, dass Abstoßungsreaktionen um so häufiger auftraten, je höher der Anteil an T-Lymphozyten mit einem mutierten HGPRT-Gen bei den Patienten war (Ansari et al. 1995).

Von HGPRT katalysiert wird 6-TG in Anwesenheit von Phosphoribosyl-Pyrophosphat (PRPP) direkt in Thioguanosin-Monophosphat (TGMP) umgewandelt. Im Gegensatz dazu ist der Stoffwechsel von 6-MP etwas komplexer. Nach einem ähnlich verlaufenden Initialschritt entsteht aus 6-MP und PRPP zuerst Thioinosin-Monophosphat (TIMP), was durch das Enzym Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) in Thioxanthin-Monophosphat (TXMP) und anschließend von Guanosin-Monophosphat-Synthetase (GMPS) in Thioguanosin-Monophosphat (TGMP) umgesetzt wird.

Das aus 6-TG und 6-MP entstandene TGMP wird dann durch entsprechende Kinasen in Thioguanosin-Di- und -Triphosphat (TGDP, TGTP) weiter phosphoryliert. Durch die Reduktion des Zuckerrestes, Ribose in Desoxyribose, entsteht neben TGTP ebenfalls Desoxy-Thioguanosin-Triphosphat (dTGTP).

Durch den Einbau dieser Thioguanin-haltigen Nukleotide als falsche Bausteine in RNA und DNA (Inkorporation) entfalten die Thiopurine einen Teil ihrer zytotoxischen und immunsuppressiven Wirkung.

Neben der Produktion von Thioguanin-haltigen Nukleotiden für die Inkorporation in Nucleinsäuren können TIMP und TGMP über einen zusätzlichen alternativen Weg von der Thiopurin-S-Methyltransferase (TPMT) verstoffwechselt werden. Während die TPMT vermittelte Methylierung der SH-Gruppe bei den verabreichten Prodrugs 6-TG und 6-MP deren weitgehende Inaktivierung in 6-MTG und 6-MMP zufolge hat, entstehen durch Methylierung der Metaboliten TIMP und TGMP jeweils Methylmercaptapurinnukleotide (MMPNs) und Methylthioguaninnukleotide (MTGNs). Diese gelten als Inhibitoren der Purin-de novo-Synthese und stellen somit die zweite wichtige Säule der Pharmakodynamik der Thiopurine dar. Bezüglich dieser Eigenschaft sind die genannten Metabolite jedoch nicht gleichwertig. Im Vergleich zu MMPNs, die als besonders potente Inhibitoren der Purin-de novo-Synthese gelten, haben MTGNs in dieser Hinsicht lediglich einen marginalen Effekt (Tay et al. 1969; Coulthard et al. 2002).

Ein weiterer Wirkmechanismus für Thiopurine wird durch Bindung von Thioguanosin-Triphosphat (TGTP) an Rac1 vermittelt. Rac1 spielt als Mitglied der

GTPase-Familie unter anderem bei der Kontrolle des Zellwachstums eine wichtige Rolle. Bei einer gleichzeitigen CD28-Kostimulation führt die Rac1-Inhibition durch TGTP zur Apoptose der betroffenen T-Lymphozyten und damit zu einer Unterdrückung der Immunantwort (Tiede et al. 2003).

In früheren klinischen Studien bei ALL-Patienten konnte kein Vorteil für 6-TG bzw. 6-MP bezüglich des Therapieerfolgs festgestellt werden (Lennard et al. 1993; Erb et al. 1998). Bei neueren Untersuchungen in Zellkulturen konnte jedoch gezeigt werden, dass Zelllinien mit induzierter TPMT-Aktivität weniger sensibel auf 6-TG-Gabe reagieren, was sich auch in einer reduzierten Rate der TGN-Inkorporation der Nucleinsäuren widerspiegelt. Im Gegensatz dazu war eine hohe TPMT-Aktivität bei 6-MP mit einer gesteigerten zytotoxischen Sensibilität der behandelten Zellen und einer deutlich erhöhten Konzentration an MMPNs vergesellschaftet, während die TGN-Inkorporation, ähnlich wie bei 6-TG-Gabe, sank (Dervieux et al. 2001; Coulthard et al. 2002). Diese Ergebnisse bestätigten die historische Grundannahme, dass der Hauptanteil des zytotoxischen Effekts bei 6-TG durch Inkorporation der Thiopurin-Nucleotide in Nucleinsäuren, bei 6-MP jedoch durch Inhibition der Purin-de novo-Synthese zustande kommt.

Während TPMT sowohl für die pharmakologische Wirkung der Thiopurine wie auch für deren Inaktivierung von Bedeutung ist, führt Xanthinoxidase (XO) zum Abbau der Thiopurine zu Thioharnsäure, das Endprodukt des Thiopurin-Stoffwechsels, welches über die Nieren ausgeschieden wird. Hierbei wird 6-MP, katalysiert von XO, über Thioxanthin zur Thioharnsäure abgebaut. Aufgrund einer in der Position 2 befindlichen Aminogruppe (Abbildung 1) stellt 6-TG kein direktes Substrat für XO dar. Es muss zuerst von der Guanylatdesaminase (Guanase) in Thioxanthin umgewandelt werden, um anschließend von XO zur Thioharnsäure abgebaut zu werden. Alternativ kann dieser Stoffwechsel auch von einer Aldehydoxidase und Guanylatdesaminase über das Zwischenprodukt 8-Hydroxy-Thioguanin (8-OH-6-TG) zum Endmetaboliten Thioharnsäure führen.

Die Xanthinoxidase ist ein überwiegend in den Zellen der Darmmukosa und Leber lokalisiertes Enzym, bei dem ein ausgeprägter interindividueller Aktivitätsunterschied bis zum 10-Fachen bekannt ist (Lennard 2001). Inzwischen wurden bei dem für XO kodierenden Gen zwei genetische Varianten entdeckt, deren klinische Bedeutung bezüglich schwerwiegender Thiopurin-

Nebenwirkungen noch nicht eindeutig geklärt ist (Hawwa et al. 2008). Anders ist es bei der medikamentösen Hemmung des Enzyms mittels Allopurinol, was eine Dosisreduktion bei oral verabreichten Azathioprin bzw. 6-Mercaptopurin notwendig macht (Zimm et al. 1983). Dieser Effekt wird auch in Form einer Kombinationstherapie aus AZA und Allopurinol genutzt. Hier konnte durch mögliche Dosisreduktion von AZA die Häufigkeit einiger unerwünschter Wirkungen reduziert werden (Ansari et al. 2009). Da 6-Thioguanin kein direktes Substrat für XO darstellt, ist bei einer Komedikation mit Allopurinol keine Dosisreduktion erforderlich (Kitchen et al. 1999).

Die TPMT-Aktivität in Erythrozyten korreliert in hohem Masse mit der der Leukozyten und deren Vorstufen (Blasten) und der Leberzellen (McLeod et al. 1995). Zudem können Erythrozyten relativ einfach in einer für die Analytik ausreichenden Menge gewonnen werden. Deshalb gilt die erythrozytäre TPMT-Aktivität als geeignete Surrogatmarker für den TPMT-Status der Zielzellen.

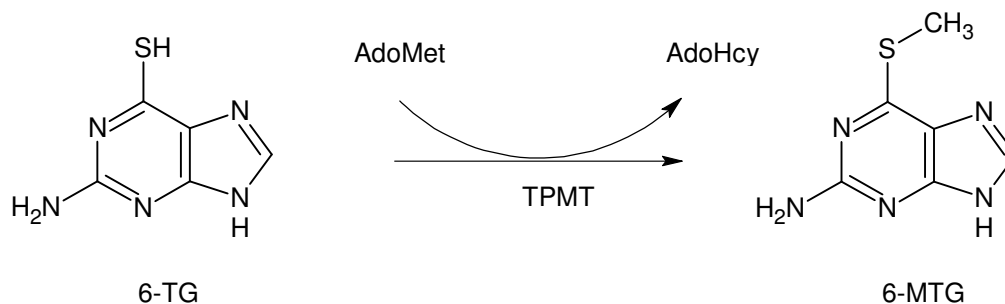
Da die hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks eine extrem niedrige XO-Aktivität aufweisen (Coulthard und Hogarth 2005), stellt die von TPMT katalysierte Methylierung den Hauptabbauweg der zugeführten Thiopurin-Medikamente in diesem Organ dar. Aus diesem Grund kommt es bei einer TPMT-Defizienz zu Akkumulation der aktiven Thiopurin-Metaboliten in verschiedenen Vorstufen der Blutzellen mit Störung der Bildung einzelner (z.B. Leukopenie oder Thrombozytopenie) bzw. aller Zellreihen (Panzytopenie).



### 1.3 Thiopurin-S-Methyltransferase

Die Thiopurin-S-Methyltransferase (EC 2.1.1.67) ist ein zytosolisches Enzym der Phase II-Reaktion beim Abbau lipophiler Substanzen. In unterschiedlicher Konzentration kommt sie in Zellen von Leber, Nieren, Darm, Erythrozyten, Leukozyten und einer Reihe weiterer Geweben vor (Armstrong et al. 2004). Für diese Methyltransferase ist bisher kein natürliches Substrat bekannt (Peng et al. 2008), sodass die Merkmalsträger einer kompletten TPMT-Defizienz ohne eine Thiopurin-Medikation offenbar keinerlei gesundheitliche Nachteile haben und klinisch unauffällig sind.

Bei der von TPMT katalysierten Reaktion wird die Mercaptogruppe (-SH) der Thiopurine methyliert (-S-CH<sub>3</sub>). Hierbei wird das als Methyldonor fungierende S-Adenosyl-L-Methionin (AdoMet) in seine demethylierte Form S-Adenosyl-L-Homocystein (AdoHcy) überführt. Abbildung 3 stellt diese Reaktion am Beispiel von 6-Thioguanin dar.

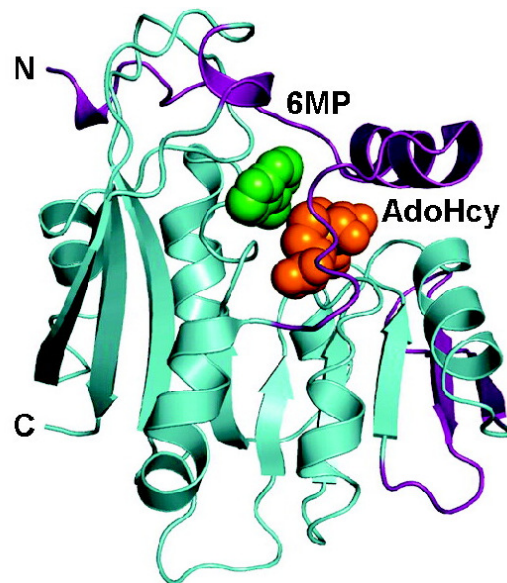


**Abbildung 3.** von TPMT katalysierte Methylierungsreaktion, 6-TG: 6-Thioguanin, AdoMet: S-Adenosyl-L-Methionin, AdoHcy: S-Adenosyl-L-Homocystein, 6-MTG: 6-Methyl-Thioguanin, TPMT: Thiopurin-S-Methyltransferase

Gewonnen wurde das Enzym erstmals im Jahre 1963 aus den Leber- und Nierenextrakten von Ratten und Mäusen (Remy 1963). Abbildung 4 zeigt die Struktur des TPMT-Moleküls der Maus, dessen Aminosäuresequenz zu etwa 80% mit der menschlichen TPMT übereinstimmt (Salavaggione et al. 2005; Peng et al. 2008).

Das menschliche TPMT-Gen ist 34 Kilobasen lang und befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 6, 6p22.3 (Szumlanski et al. 1996). Es kodiert die

aus 246 Aminosäuren bestehende Polypeptidkette der TPMT, welche eine Molekularmasse von 28 kDa aufweist (Zhou 2006).



**Abbildung 4.** Molekülstruktur der TPMT von Maus mit dem N-terminalen- (N) und C-terminalen (C) Ende der Polypeptidkette mit deren Substrat und Kosubstrat, 6-Mercaptopurin (6-MP, grün) und Adenosyl-Homocystein (AdoHcy, orange) im aktiven Zentrum des Enzymmoleküls (aus Peng et al. 2008)

## 1.4 TPMT-Polymorphismus

Unter einem genetischen Polymorphismus ist das Auftreten einer Genvariation in einer Population zu verstehen, bei dem die Allelfrequenz für das variante Allel mehr als 1% in der Bevölkerung beträgt. Am häufigsten wird er durch die so genannten Einzelnukleotidpolymorphismen (Single-Nucleotide-Polymorphism, SNP) verursacht (Schulz 2004). Ende der 70er Jahren entdeckten Weinshilboum und Sladek ein trimodales Verteilungsmuster für die TPMT-Aktivität. Für 88.6% ihrer Probanden, die eine hohe (H: High) TPMT-Aktivität zeigten, nahmen sie einen  $TPMT^H/TPMT^H$ -Genotypen an. Die weiteren 11.1% mit einer reduzierten (L: Low), und 0.3% mit einer fehlenden TPMT-Aktivität wurden demnach einen  $TPMT^H/TPMT^L$ - bzw.  $TPMT^L/TPMT^L$ -Genotypen zugeordnet (Weinshilboum und Sladek 1980). Für diese auf Phänotypisierung basierenden Überlegungen lieferten Krynetski et al. Mitte 90er Jahren mit dem  $TPMT^*2$ -Gen das erste genetische Korrelat (Krynetski et al. 1995).

Neben einigen stummen Mutationen, die keine Strukturänderung des Enzyms zufolge haben, verursachen mehrere Einzelnukleotidpolymorphismen jeweils

einen Aminosäurenaustausch bzw. einen Splicing-Defekt im TPMT-Molekül. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die bis heute bekannten genetischen Varianten des für TPMT kodierenden Gens (TPMT\*2 - TPMT\*28).

**Tabelle 2.** Bekannte TPMT-Genvarianten

Allel	Nukleotidposition Basenaustausch	Aminosäurenaustausch Splicing-Defekt	Literatur
TPMT*1	Wildtyp	-	-
TPMT*2	238 G>C	80 Ala>Pro	(Krynetski et al. 1995)
TPMT*3A	460 G>A, 719 A>G	154 Ala>Thr, 240 Tyr>Cys	(Tai et al. 1996)
TPMT*3B	460 G>A	154 Ala>Thr	(Tai et al. 1996)
TPMT*3C	719 A>G	240 Tyr>Cys	(Loennechen et al. 1998)
TPMT*3D	460 G>A, 719 A>G, 292 G>T	154 Ala>Thr, 240 Tyr>Cys, 98 Glu>Stopp	(Otterness et al. 1997)
TPMT*4	Intron9/Exon10 G>A	Splicing-Defekt	(Otterness et al. 1997; Otterness et al. 1998)
TPMT*5	146 T>C	49 Leu>Ser	(Otterness et al. 1997)
TPMT*6	539 A>T	180 Tyr>Phe	(Otterness et al. 1997)
TPMT*7	681 T>G	227 His>Gln	(Spire-Vayron de la Moureyre et al. 1998b)
TPMT*8	644 G>A	215 Arg>His	(Hon et al. 1999)
TPMT*9	356 A>C	119 Lys>Thr	(Schaeffeler et al. 2004)
TPMT*10	430 G>C	144 Gly>Arg	(Colombel et al. 2000)
TPMT*11	395 G>A	132 Cys>Tyr	(Schaeffeler et al. 2003)
TPMT*12	374 C>T	125 Ser>Leu	(Hamdan-Khalil et al. 2003)
TPMT*13	83 A>T	28 Glu>Val	(Hamdan-Khalil et al. 2003)
TPMT*14	1 A>G	1 Met>Val	(Lindqvist et al. 2004)
TPMT*15	Intron7/Exon8 G>A	Splicing-Defekt	(Lindqvist et al. 2004)
TPMT*16	488 G>A	163 Arg>His	(Schaeffeler et al. 2004)
TPMT*17	124 C>G	42 Gln>Glu	(Schaeffeler et al. 2004)
TPMT*18	211 G>A	71 Gly>Arg	(Schaeffeler et al. 2004)
TPMT*19	365 A>C	122 Lys>Thr	(Hamdan-Khalil et al. 2005)
TPMT*20	712 A>G	238 Lys>Glu	(Schaeffeler et al. 2006)
TPMT*21	205 C>G	69 Leu>Val	(Schaeffeler et al. 2006)
TPMT*22	488 G>C	163 Arg>Pro	(Schaeffeler et al. 2006)
TPMT*23	500 C>G	167 Ala>Gly	(Lindqvist et al. 2007)
TPMT*24	537 G>T	179 Gln>His	(Garat et al. 2008)
TPMT*25	634 T>C	212 Cys>Arg	(Garat et al. 2008)
TPMT*26	622 T>C	208 Phe>Leu	(Kham et al. 2009)
TPMT*27	319 T>G	107Tyr>Asp	(Feng et al. 2009)
TPMT*28	611 T>C	204 Ile>Thr	(Lindqvist Appell et al. 2010)

Aus einer Heterozygotie bezüglich einer der oben beschriebenen Gen-Varianten resultiert, aufgrund des zugrunde liegenden kodominanten Erbgangs, eine reduzierte (intermediäre) Enzymaktivität. Eine Homozygotie bzw. eine verbundene Heterozygotie (zwei unterschiedliche varianten Allele) hat hingegen eine komplette TPMT-Defizienz zufolge.

Das Ausmaß an Aktivitätsverlust des Enzyms ist jedoch bei diesen Gen-Varianten nicht gleich. Während die Allele TPMT\*8, \*9, \*16, \*17, \*18 und \*24 eine mäßig reduzierte Enzymaktivität verursachen, führen die übrigen varianten Allele zu einem deutlichen Aktivitätsverlust. Eine Ausnahme stellt hierbei das Allel TPMT\*19 dar, das für eine mit dem Wildtyp-Allel TPMT\*1 vergleichbar hohe Enzymaktivität kodiert (Salavaggione et al. 2005; Schaeffeler et al. 2006; Lindqvist et al. 2007; Garat et al. 2008; Feng et al. 2009; Kham et al. 2009; Lindqvist Appell et al. 2010). Bei den Kaukasiern ist TPMT\*3A (2.1 - 5.7%) die häufigste Allelvariante gefolgt von TPMT\*3C (0.1-0.8%) und TPMT\*2 (0.2 - 0.7%). Bei den Afrikanern und Asiaten steht jedoch TPMT\*3C mit einer Frequenz von 1.0 - 7.6% an erster Stelle der genetischen Varianten des TPMT-Gens (Derijks und Wong 2010).

Die häufigsten drei varianten Allele TPMT\*3A, \*3C und \*2 sind für bis zu 95% aller Fälle mit intermediärer und defizienter TPMT-Aktivität ursächlich (Evans et al. 2001; McLeod und Siva 2002), während die übrigen Allelvarianten deutlich seltener sind und meist nur bei Einzelpersonen nachgewiesen wurden (Coulthard und Hogarth 2005).

## **1.5 Methoden zur TPMT-Diagnostik**

Für die Untersuchung des TPMT-Status stehen mehrere Techniken zur Verfügung. Bei der Aktivitätsbestimmung kommen radiochemische Methoden (Weinshilboum et al. 1978; Menor et al. 2001) und HPLC-basierte nicht radiochemische Methoden mit UV-, Fluoreszenz- bzw. massenspektrometrischer Detektion (Lennard und Singleton 1994; Kröplin et al. 1998b) zum Einsatz. Darüber hinaus ist inzwischen auch ein kommerzielles ELISA-Kit (Biologix Research Corporation) zur semiquantitativen TPMT-Aktivitätsbestimmung erhältlich.

Bei der Genotypisierung finden mehrere Methoden Verwendung wie beispielsweise: PCR mit sequenzspezifischen Oligonukleotidsonden am LightCycler (Schutz et al. 2000), PCR-Untersuchungen mit anschließender Denaturierung-HPLC (dHPLC) (Udaka et al. 2005), Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) (Oender et al. 2006), oder MALDI-TOF Massenspektrometrie (Schaeffeler et al. 2008), DNA-Mikrochip-Technik (Nasedkina et al. 2006) und Sequenzierung (Haglund et al. 2004).

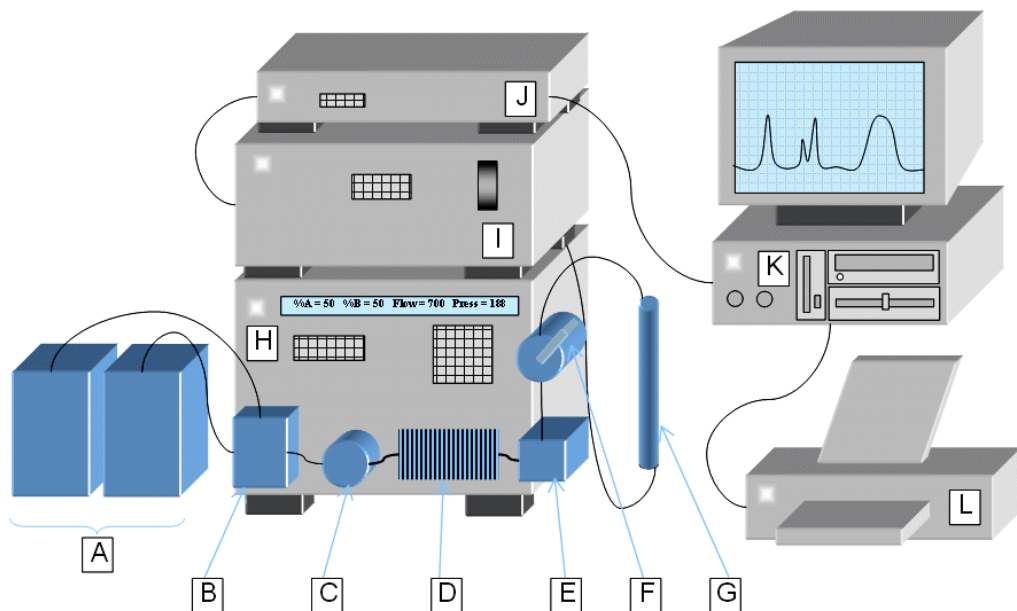
Für die vorliegende Arbeit haben wir uns bei der Phänotypisierung für eine nicht radiochemische HPLC-Methode entschieden, die von der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Iven am Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität zu Lübeck entwickelt (Kröplin et al. 1998a) und etabliert und später in der Routinediagnostik von unserem Institut übernommen wurde. Für die Genotypisierung verwendeten wir eine auf sequenzspezifischen Oligonukleotidsonden basierte PCR-Methode am LightCycler. Diese Untersuchungen konnte ich mit freundlicher Unterstützung unserer Kollegen in den PCR-Laboren der Institute für Pathologie und für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des hiesigen Klinikums durchführen.

Im Folgenden sollen allgemeine Grundlagen zu den ausgewählten Methoden für diese Arbeit, HPLC-Analytik und PCR-Untersuchung mittels LightCycler, dargelegt werden.

### **1.5.1 Funktionsweise der HPLC-Analytik**

Die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (High Pressure Liquid Chromatography) auch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High

Performance Liquid Chromatography) genannt, ist ein sensitives chemisches Analyseverfahren, das Mitte der 70er Jahren entwickelt wurde. Bei der HPLC handelt es sich um ein sehr effizientes Trennverfahren, mit dessen Hilfe komplexe Gemische in ihre Komponenten aufgeteilt und hinsichtlich ihrer Struktur (qualitativ) und Menge (quantitativ) untersucht werden können (Meyer 2010). Die hohe Trennleistung dieses Verfahrens wurde durch hohe Drücke (bis 300 bar) an sehr kleinen druckstabilen Packungsteilchen (<math><10\mu\text{m}</math> Durchmesser) der Trennsäulen erreicht. Abbildung 5 stellt den typischen Aufbau solch einer HPLC-Anlage schematisch dar.



**Abbildung 5.** Aufbau einer HPLC-Anlage mit Vorratsgefäßen für die Lösungsmittel als mobile Phase (A), Hochdruckpumpe mit Gradientenmischer (B), Überdruckventil (C), Pulsationsdämpfer (D), Spülventil / Mischkammer (E), Injektionsventil für die Proben / Autosampler (F), Trennsäule (G), Detektor (I), Interface (J), Computer (K), Drucker (L) (Quelle: Academic dictionaries and encyclopedias-<http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/564987>, Stand: 02.12.2009)

Die zu untersuchenden Stoffe (Solvente) werden dabei von der flüssigen mobilen Phase (Eluent) mitgenommen und an der stationären Phase entlang der Trennsäule bewegt. Während dieser Passage werden die Solvente in Abhängigkeit von ihrer Polarität, den Eigenschaften der Trennsäule und des eingesetzten Eluenten unterschiedlich stark zurückgehalten. Damit erreichen die gelösten Stoffe zeitversetzt und separiert den Detektor und erzeugen abhängig von der eingesetzten Nachweismethode einen Ausschlag (Peak). Diese Zeit, die

einzelne Fraktionen bis zur Detektion benötigen, wird als Retentionszeit bezeichnet.

Unter konstanten chromatographischen Bedingungen ist die Retentionszeit einer Verbindung charakteristisch. Somit ermöglicht sie eine qualitative Beurteilung der Zusammensetzung des zu untersuchenden Solventen, wenn die Retentionszeit mit der einer bekannten Substanz übereinstimmt. Ist zudem die Konzentration dieser Substanzen bekannt, kann die Fläche unter der Signal/Zeit-Kurve einer Standardlösung mit der entsprechenden Fläche einer unbekannt Probe im Verhältnis gesetzt werden, was zusätzlich eine quantitative Auswertung erlaubt. Um in einem weiten Messbereich valide Ergebnisse zu ermitteln, wird in der Regel zuvor mit Hilfe mehrerer Kalibratoren eine Kalibrationsgerade erstellt.

#### **1.5.1.1 Gradienten- und Isokratische HPLC**

Bei der isokratischen HPLC bleibt die Zusammensetzung des Eluenten während des gesamten chromatographischen Laufs gleich. Während die schnell eluierten Komponenten mit kurzen Retentionzeiten gut diskriminierbare schmale Peaks ergeben, werden diese mit zunehmender Verweildauer an der stationären Phase breiter. Solche breiten Peaks können, bei ähnlichen Retentionszeiten, ineinander übergehen. Sehr breite Peaks können sogar im Grundrauschen untergehen und undetektiert bleiben. Um in diesem Fall trotzdem eine gute Trennleistung zu erreichen, wird bei einer Gradienten-HPLC die Zusammensetzung des Eluenten über die Zeit den zu eluierenden Substanzen angepasst.

#### **1.5.1.2 Normal- und Umkehrphasenchromatographie**

Die Normalphasen-HPLC verwendet eine polare stationäre Phase (oft Silika) und eine unpolare mobile Phase (Eluent) wie zum Beispiel Hexan ( $C_6H_{14}$ ) zur Auftrennung der Probe. Die Probenmoleküle müssen im unpolaren Eluenten lösbar sein, gleichzeitig aber auch polare Molekülbereiche besitzen, welche mit der polaren stationären Phase in Wechselwirkung treten. Im Gegensatz dazu basiert die Umkehrphasenchromatographie (Reversed Phase-HPLC) auf der unterschiedlichen Verteilung der Komponenten eines Gemisches zwischen einer unpolaren stationären (oft Silika mit Kohlenwasserstoffketten modifiziert) und einer polaren mobilen Phase, meistens einer Mischung aus Acetonitril ( $CH_3CN$ ) oder Methanol ( $CH_3OH$ ) und Wasser oder wässrige Puffer.

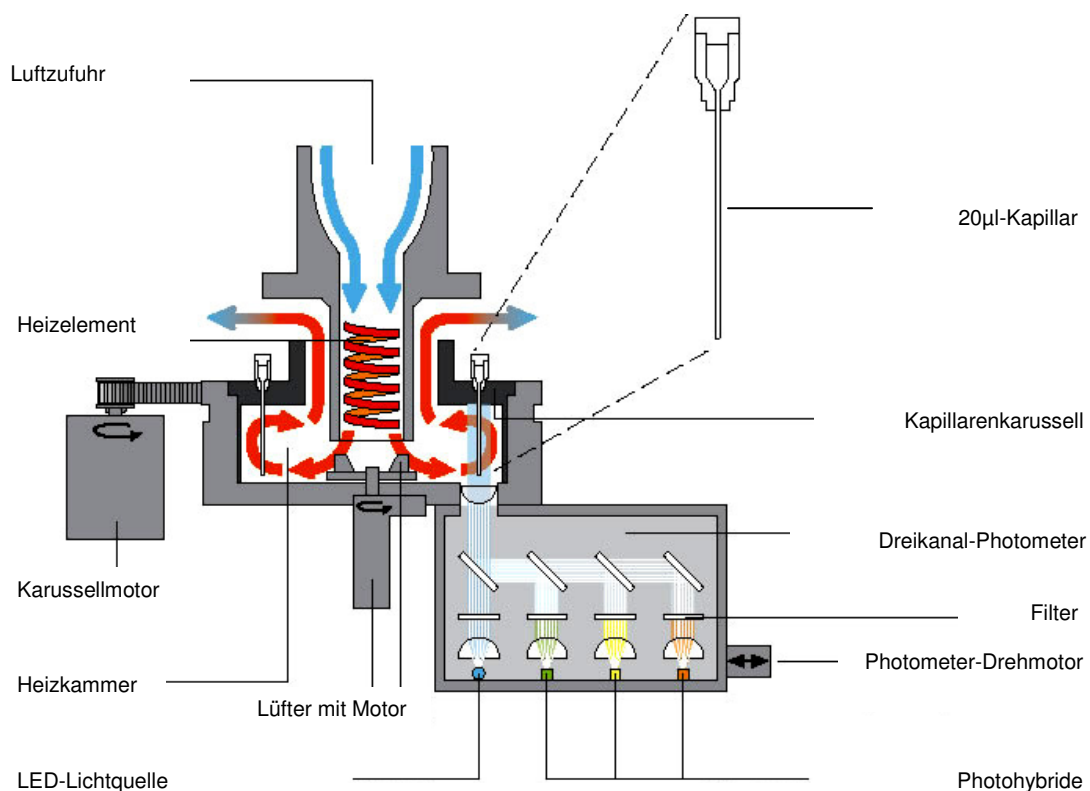
### **1.5.2 Polymerasekettenreaktion**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR für Polymerase chain reaction) ist eine Methode zur Analyse der Nukleinsäuren, die von der Arbeitsgruppe von Kary B. Mullis entwickelt und im Jahre 1985 erstmal publiziert wurde (Saiki et al. 1985). Bestimmte Abschnitte von Nukleinsäuren werden bei einer PCR in mehreren aufeinander folgenden Zyklen vervielfältigt. Zur DNA-Amplifikation wird einem Reaktionsgemisch aus Nukleotiden, DNA-Polymerase und einem ausgewählten Oligonukleotid (dem so genannten Primer), die zuvor isolierte zu untersuchende DNA zugegeben. In jedem PCR-Zyklus wird die Doppelstrang-DNA zuerst durch Hitze (95°C) denaturiert. Eine anschließende Senkung der Temperatur ermöglicht die Anlagerung des im Reaktionsgemisch vorhandenen Primers (Annealing) an seine Zielsequenz und dessen Verlängerung (Elongation). Die aus mehreren PCR-Zyklen resultierenden Amplifikate können, mit interkalierenden Farbstoffen markiert, entweder mittels Agarosegel-Elektrophorese, oder aber mit Hilfe entsprechender Geräte direkt und in Echtzeit (Real time PCR) detektiert werden. Solch eine Möglichkeit bietet z.B. das LightCycler<sup>®</sup>Instrument (Roche Diagnostics), das seit seiner Einführung im Jahre 1997 ein breites Anwendungsgebiet sowohl in qualitativer wie auch in quantitativer Real time PCR gefunden hat (Lyon und Wittwer 2009). Im Folgenden werden der Aufbau und die Arbeitsweise von LightCycler näher erläutert.



### 1.5.2.1 Aufbau des LightCycler® Instruments

Wie in Abbildung 6 schematisch dargestellt, verfügt das Gerät im oberen Teil über ein Probenkarussell, das für 32 Kapillaren Platz bietet. Die Kapillaren werden im Karussell so eingesetzt, dass der untere, den PCR-Mix beinhaltende Bereich in der Heizkammer hängt. Im unteren Teil des Gerätes finden sich die Detektionseinheit, die Energieversorgung und die Motoren für Probenkarussell, Ventilator und Photometer.



**Abbildung 6.** Schematische Darstellung LightCycler® 1.5, modifiziert nach <https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/lightcycler/index.jsp?id=LC01050201>, Stand: 22.12.09

### 1.5.2.2 Arbeitsweise des LightCycler® Instruments

Zum Aufheizen und Abkühlen der PCR-Ansätze wird Luft verwendet. Die Temperierung erfolgt hierbei durch ein Heizelement, welches die Luft erhitzt. Diese Luft wird von einem Ventilator gleichmäßig in der Heizkammer verteilt, so dass zu jeder Zeit für alle Proben gleiche Temperaturbedingungen herrschen. Durch Zufuhr von Raumluft in die Heizkammer werden eventuelle Überhitzungen vermieden. Die Glaskapillaren besitzen bei einer Länge von 45 mm (inkl.

Aufnahmebehälter) einen Außendurchmesser von lediglich 1,55 mm. Diese werden zwecks Vermeidung der Kontamination und Verdunstung mit einem Plastikstopfen verschlossen. Durch Verwendung dieser verschlossenen Kapillaren sind die benötigten Reaktionsvolumina mit 10 bis 20 µl äußerst gering.

Die PCR-Ansätze können in diesem System mit hoher Geschwindigkeit von bis zu 20°C/s auf eine bestimmte Temperatur ( $\pm 0,3$  °C) eingestellt werden. Dies wird einerseits durch die geringe Wärmekapazität der Luft und andererseits durch das optimierte Verhältnis von Oberfläche zu Volumen in den Glaskapillaren und damit einem schnellen Wärmeaustausch zwischen Proben und der Luft in der Heizkammer erreicht. Bedingt durch die rasche Temperierung beträgt die Dauer eines PCR-Zyklus nur 30 bis 60 Sekunden.

An der Heizkammer angeschlossen ist die fluorimetrische Detektionseinheit, die aus einer Lichtquelle und einem Mehrkanal-Photometer besteht. Die Proben werden von einer wartungsfreien langlebigen blauen LED mit einer Wellenlänge von 470 nm angeregt. Das daraufhin von den Proben emittierte Licht wird dann von den entsprechenden Detektoren erfasst. Das für diese Arbeit verwendete LightCycler<sup>®</sup>-Instrument (Version 1.5) verfügt über ein Dreikanal-Photometer mit Detektoren für die Wellenlängen 530, 640 und 705 nm jeweils in den Photometerkanälen F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> und F<sub>3</sub>. Ein Messvorgang dauert lediglich 20 Millisekunden. Dafür werden die Proben und der entsprechende Detektor mit dem Karussell- und Photometer-Drehmotor in die richtige Position gebracht.

Die von den Detektoren erfassten Fluoreszenzen werden nach Umwandlung in ein elektrisches Signal vom Computer aufgezeichnet, wobei die LightCycler Software (V 3.5) zur Auswertung der Daten verwendet wird. So kann der PCR-Lauf für jede Probe am Computer in Echtzeit (Real time PCR) verfolgt werden.

### **1.5.2.3 LightCycler<sup>®</sup>-Detektionsprinzip**

Bei der Detektion der PCR-Produkte mit Fluoreszenzfarbstoffen bietet der LightCycler<sup>®</sup> im Allgemeinen zwei Möglichkeiten. Zum einen sequenzunspezifisch durch interkalierende Farbstoffe wie SYBR Green I<sup>®</sup>, die unabhängig von der Sequenz an amplifizierte doppelsträngige DNA binden. Dies führt zu einer deutlichen Fluoreszenzzunahme. Zum anderen sequenzspezifisch mit Hilfe von Energieübertragung zwischen zwei Farbstoffen, bekannt als Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET). Das zur Genotypisierung verwendete

artus<sup>®</sup>TPMT PCR-Kit nutzt solche FRET-Sonden. Deshalb soll dieses Detektionsprinzip im Folgenden näher erläutert werden.

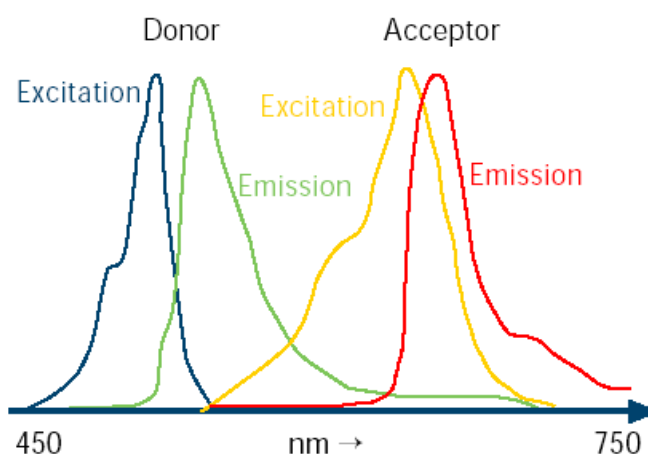
#### 1.5.2.4 Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET)

Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) basiert auf der Übertragung von Energie von einem fluoreszierenden Donor-Molekül (z.B. Fluorescein) auf ein anderes, benachbartes fluoreszierendes Akzeptor-Molekül (z.B. LightCycler-Red 640).

Wenn Fluorescein durch die blaue LED des Gerätes mit einem Lichtstrahl von 470 nm angeregt wird (Excitation), führt dies zu einer Übertragung von Energie und die anschließende Anregung des LightCycler-Red 640-Moleküls, welches durch das blaue LED-Licht selbst nicht anregbar ist. Das vom LightCycler-Red 640-Molekül emittierte Licht (Emission) wird anschließend von dem entsprechenden Detektor bei 640 nm gemessen (Abbildung 8).

Grundvoraussetzung für FRET-Entstehung ist:

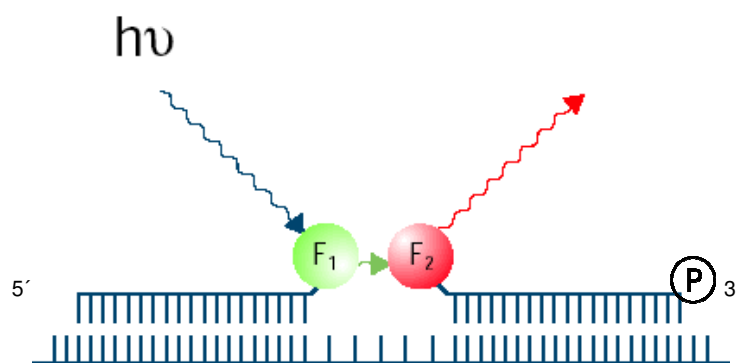
- Donor- und Akzeptor-Moleküle müssen in unmittelbarer Nähe zueinander liegen
- Anregungsspektrum des Akzeptors muss sich mit dem Fluoreszenzemissionsspektrum des Donors überschneiden (Abbildung 7)
- Dipol-Orientierungen von Donor und Akzeptor müssen annähernd parallel zueinander sein



**Abbildung 7.** Fluoreszenzspektrum zweier Farbstoffe bei Entstehung von Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET). Aus Roche Molecular Biochemicals Technical Note No. LC 6/99 ([https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/lightcycler/lightcycler\\_docs/technical\\_notes/lc\\_06.pdf](https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/lightcycler/lightcycler_docs/technical_notes/lc_06.pdf) Stand 07.01.10)

Die sequenzspezifischen FRET-Sonden binden in der „Annealing“- Phase der PCR, in der die DNA einzelsträngig vorliegt, an ihre Zielsequenz. Abbildung 8 zeigt schematisch die FRET-Entstehung. In dieser Reaktion werden zwei sequenzspezifische Oligonukleotidsonden eingesetzt. Die Donorsonde ist an ihrem 3´Ende in der Regel mit Fluorescein, und die Akzeptorsonde an ihrem 5´Ende mit einem weiteren Farbstoffmolekül markiert, welches in Kombination mit dem Donor (Fluorescein) die oben genannten Voraussetzungen für FRET-Entstehung erfüllt. LightCycler-Red 640 und 705 sind geeignete Beispiele hierfür und wurden bei der vorliegenden Arbeit verwendet. Die beiden Donor- und Akzeptorsonden werden bezüglich ihrer Sequenz so gestaltet, dass der Abstand zwischen deren Bindungsstellen eine Länge von 5 Nukleotiden nicht überschreitet, damit die Farbstoffmoleküle nah genug aneinander zu liegen kommen. Um eine Elongation der Sonden zu verhindern wird das 3´Ende der Akzeptorsonde bei der Produktion phosphoryliert. Dies ist bei der Donorsonde nicht notwendig, da die entsprechende Position bereits mit dem Farbstoffmolekül besetzt ist.

Wenn Fluorescein durch das blaue Licht (470 nm) der LightCycler-LED angeregt wird, wird die entstehende Energie entweder als grünes Licht (530 nm) abgestrahlt und vom F<sub>1</sub>-Kanal erfasst oder, im Falle einer passenden Akzeptorsonde, auf das zweite Farbstoffmolekül übertragen. Dieses emittiert wiederum ein Fluoreszenzlicht eigener Wellenlänge (640 bzw. 705 nm) jeweils für die Farbstoffe LightCycler Red-640 und -705, das in den Kanälen F<sub>2</sub> oder F<sub>3</sub> erfasst wird.



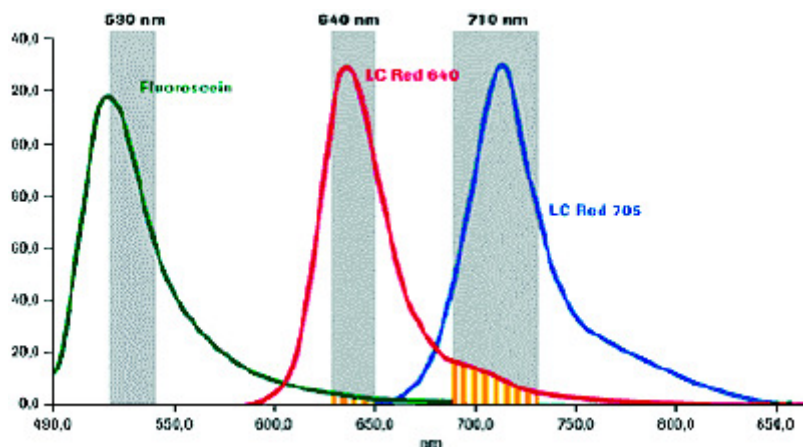
**Abbildung 8.** Zwei Farbstoff-markierten Oligonukleotidsonden. Die Donorsonde ist an ihrem 3´Ende mit Fluorescein (F<sub>1</sub>) und die Akzeptorsonde an ihrem 5´Ende mit LightCycler-Red 640 (F<sub>2</sub>) markiert und an ihrem 3´Ende phosphoryliert (P). Modifiziert nach Roche Molecular Biochemicals Technical Note No. LC 6/99 ([https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/lightcycler/lightcycler\\_docs/technical\\_notes/lc\\_06.pdf](https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/lightcycler/lightcycler_docs/technical_notes/lc_06.pdf) Stand 07.01.10)

Die gemessene Fluoreszenz im F<sub>2</sub>- oder ggf. F<sub>3</sub>-Kanal ist damit der Menge an amplifizierter DNA direkt proportional und steigt mit steigender Anzahl an PCR-Produkten. Dagegen fällt die Fluoreszenz von Fluorescein (530 nm) im F<sub>1</sub>-Kanal. Da es sich hier um einen dynamischen Prozess handelt, ist es günstiger, die ermittelten Fluoreszenzen der F<sub>2</sub>- und F<sub>3</sub>-Kanäle nicht absolut, sondern im Verhältnis zum F<sub>1</sub>-Signal darzustellen (F<sub>2</sub>/F<sub>1</sub> bzw. F<sub>3</sub>/F<sub>1</sub>).

Am Ende solch einer PCR-Untersuchung bleiben die eingesetzten Oligonukleotidsonden intakt und können zur Erkennung gesuchter Punktmutationen mittels Schmelzkurvenanalyse benutzt werden.

### 1.5.2.5 Color-Compensation-Calibration-Datei (CCC-Datei)

Bei der fluorimetrischen Auswertung der aufgezeichneten Daten kann es zu falsch hohen Ergebnissen kommen, wenn ein PCR-Ansatz zwei oder mehr Farbstoffe beinhaltet, deren Emissionsspektren sich überschneiden (gelb schraffierte Bereiche in Abbildung 9). Um diesen Effekt aufzuheben, sollte vor jedem Multicolor-PCR-Lauf eine gerätespezifische Fluoreszenz-Kalibration stattfinden.



**Abbildung 9.** Emissionsspektren der Farbstoffe Fluorescein (grün), LC Red 640 (rot) und LC Red 705 (blau) mit deren Messbereichen für die Kanäle 530 nm/F1, 640 nm/F2 und 710 nm/F3 dargestellt als graue Balken. Die gelb schraffierten Bereiche zeigen das Hineinstrahlen der Farbstoffe in den jeweils anderen „falschen“ Kanal. Aus Roche Technical Note No. LC 19/2004, ([https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/lightcycler/lightcycler\\_docs/technical\\_notes/lc\\_19.pdf](https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/lightcycler/lightcycler_docs/technical_notes/lc_19.pdf) Stand 18.01.10)

Während eines 45minütigen Kalibrationslaufs werden die Fluoreszenzsignale von Fluorescein, LC Red 640, LC Red 705 und von einer nicht fluoreszierenden Flüssigkeit (Blank) in allen drei Kanälen (F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> und F<sub>3</sub>) erfasst. Aus den gewonnenen Daten generiert die LightCycler-Software anschließend eine so

genannte Color-Compensation-Calibration-Datei (CCC-Datei). Diese gerätespezifische Datei muss nach jeder Reparatur oder Wartung des Gerätes, spätestens aber nach einem Jahr erneuert werden. Sie enthält im Wesentlichen die Information zu den prozentualen Anteilen von Fluoreszenz-Kreuzsignalen jedes Farbstoffs in den anderen „falschen“ Detektionskanälen (gelb schraffierte Bereiche in Abbildung 9). Diese Kreuzsignale, im Falle LC Red 640 im F<sub>3</sub>-Kanal besonders relevant, werden dann bei der Auswertung mit aktivierter CCC-Datei anteilig vom Gesamtsignal abgezogen, so dass erst die korrigierten Signale der endgültigen Auswertung zugeführt werden.

## 1.6 Zielsetzung

Mit dieser Arbeit soll eine diagnostisch sichere und in einem Routinelabor realisierbare Strategie entwickelt werden, um das Risiko schwerwiegender lebensbedrohlicher Nebenwirkungen aufgrund einer TPMT-Defizienz vor dem Beginn einer Thiopurin-Therapie abschätzen zu können. Dazu sollte der TPMT-Status von Patienten unterschiedlicher Kollektiven einerseits unter Anwendung der von Kröplin et al. beschriebenen HPLC-Methode (Phänotypisierung), und andererseits mittels einer Polymerasekettenreaktion (PCR) hinsichtlich ihres TPMT-Polymorphismus (Genotypisierung) untersucht werden. Mit daraus gewonnenen Erkenntnissen sollten insbesondere folgende Fragen beantwortet werden:

- Sind die aus der Literatur bekannten Zahlen für die TPMT-Aktivität und TPMT-Allelfrequenzen in unseren Patientenkollektiven reproduzierbar?
- Ist die Höhe der Enzymaktivität in den verschiedenen Kollektiven unterschiedlich?
- Wie gut ist die Konkordanz der Untersuchungsergebnisse beider Methoden, TPMT-Aktivitätsbestimmung (Phänotypisierung) und Genotypisierung? Wie oft sind diskrepante Ergebnisse zu beobachten?
- Besteht bei Fällen mit diskrepanten Ergebnissen ein Zusammenhang mit dem zugrunde liegenden Krankheitsbild bzw. mit dem Geschlecht?
- Ist eine der beiden Methoden der anderen diagnostisch überlegen?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien und Bezugsquellen

#### 2.1.1 Geräte

HPLC-Pumpe L-7100	Merck / VWR-Hitachi, Darmstadt
HPLC-Fluoreszenzdetektor L-7480	Merck / VWR-Hitachi, Darmstadt
Interface D-7000	Merck / VWR-Hitachi, Darmstadt
Säulenofen L-5025	Merck / VWR-Hitachi, Darmstadt
LiChroCART® 125-4 HPLC-Säule	Merck / VWR-Hitachi, Darmstadt
C <sub>18</sub> -Vorsäule	Phenomenex Ltd., Aschaffenburg
Autosampler L-2200	Merck / VWR-Hitachi, Darmstadt
Vortex (Mixer) IKA MS1 / MS3	IKA Werke GmbH, Staufen
Thermomixer 5433	Eppendorf GmbH, Hamburg
Thermostat 2761/3401	Eppendorf GmbH, hamburg
Degasser DG-4400	Phenomenex Ltd., Aschaffenburg
Ultraschallbad SONOREX	BANDELIN electronic GmbH, Berlin
Laborzentrifuge	Hettich GmbH, Tuttlingen
Laborzentrifuge	Eppendorf GmbH, Hamburg
LightCycler® (LC) Instrument	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler® (LC) Cooling Block	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler® (LC) Capping Tool	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Variopipetten 10, 100 und 1000 µl	Eppendorf GmbH, Hamburg
Auswerteeinheit HPLC/LightCycler®	Computer, Monitor und Drucker
UVIKON Spectrophotometer 943	Goebel Elektro GmbH, Ludwigshafen
Laborwaage Mettler P1210	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Laborwaage Mettler-Toledo AG245	Mettler-Toledo GmbH, Gießen

#### 2.1.2 Software

HSM 7.0 (HPLC-Software)	Merck / VWR-Hitachi, Darmstadt
LightCycler-Software 3.5	Roche Diagnostik GmbH, Mannheim
Microsoft Office 2003	Microsoft Deutschland GmbH, München
EndNote 7	Thomson Reuters, New York/USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc., San Diego/USA

ACD/ChemSketch 12.01

Advanced Chemistry Development Inc.,  
Toronto/Canada

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Pipettenspitze 10, 100 und 1000 µl

Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf

Reaktionsgefäße 1.5 und 2 ml

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Mikro-Schraubröhre 1.5 ml

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

LightCycler Kapillaren 20 µl

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

### 2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Kaliumdihydrogenphosphat, p.a.

Merck, Darmstadt

Tetrahydrofuran (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O), HPLC-Grade

Merck, Darmstadt

Acetonitril (CH<sub>3</sub>CN), HPLC-Grade

Geyer GmbH, Renningen

S-Adenosyl-L-Methionine Chloride,  
HPLC-Grade

Sigma-Aldrich, Deisenhofen

2-Amino-6-Methylmercaptapurin  
(Methylthioguanin) 100mg, p.a.

Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Thioguanin Tabletten 40 mg

GlaxoSmithKline, München

Natriumhydroxid (NaOH), p.a.

Merck, Darmstadt

Salzsäure (HCl) 32%, p.a.

Merck, Darmstadt

QIAamp<sup>®</sup> DNA Blood Mini

QIAGEN GmbH, Hilden

artus<sup>®</sup> TPMT LC PCR Kit

QIAGEN GmbH, Hilden

Color Compensation Set

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Haemoglobin Colorometric Method

RANDOX Laboratories Ltd., Crumlin/UK



## **2.2 Methoden**

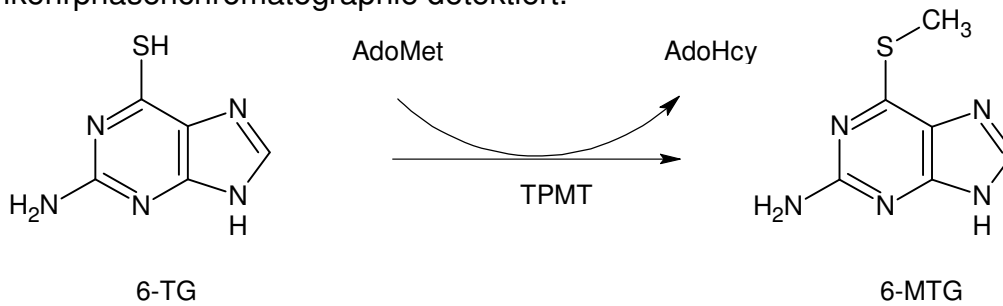
Für unseren Methodenvergleich wurden insgesamt 262 Proben von Patienten zwischen Januar 2008 und November 2009 untersucht, bei denen eine Medikation mit Thiopurinen geplant bzw. bereits begonnen worden war. 167 Proben stammten von Einsendungen aus den gastroenterologischen, 62 aus den hämatologisch-onkologischen, 21 aus den dermatologischen, 10 aus den neurologischen und 2 aus den transplantationsmedizinischen Abteilungen. Sämtliche Proben wurden für diese Arbeit unter Beibehaltung der Angaben zum Alter, Geschlecht und einsendender Abteilung anonymisiert. Für den Methodenvergleich wurden lediglich die Reste der eingesandten Proben zur Routineuntersuchung des Thiopurin-Metabolismus verwendet (EDTA-Blut). Es fanden keinerlei zusätzliche Blutentnahmen statt. Die meisten der gastroenterologischen Patienten zeigten das Bild einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung. Die hämatologisch-onkologischen Patienten waren hauptsächlich an einer akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) erkrankt. Diese Proben wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Iven aus dem Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Universität zu Lübeck untersucht.

Das EDTA-Blut wurde zeitnah nach Eingang im Labor 10 min bei 3000 UpM zentrifugiert. Das Plasma wurde verworfen, die Leukozyten als Buffycoat für die DNA-Isolierung und anschließende TPMT-Genotypisierung bei -20 °C eingefroren. Die Erythrozyten wurden gewaschen und lysiert (siehe 2.2.1.5). Das Erythrozytenlysate wurde für den nächsten Analysenschritt, die Phänotypisierung, bei -60 °C eingefroren.

### **2.2.1 Phänotypisierung (TPMT-Aktivitätsbestimmung)**

Zur Phänotypisierung wurde eine nach Ford et al. modifizierte nicht radiochemische HPLC-Methode von Kröplin et al. verwendet (Kröplin et al. 1998a; Ford et al. 2004). Wie in Abbildung 10 dargestellt wird bei dieser Methode 6-Thioguanin (6-TG) als Substrat in Anwesenheit von S-Adenosyl-L-Methionin (AdoMet) als Methyl-Donor von Patienten-TPMT aus dem Erythrozytenlysate unter Entstehung von S-Adenosyl-L-Homocystein (AdoHcy) zu 6-Methyl-Thioguanin (6-

MTG) umgesetzt. Das Letztere wird dann mittels einer isokratischen Umkehrphasenchromatographie detektiert.



**Abbildung 10.** Reaktionsgleichung für die Messung der TPMT-Aktivität mittels HPLC, 6-TG: 6-Thioguanin, AdoMet: S-Adenosyl-L-Methionin, AdoHcy: S-Adenosyl-L-Homocystein, 6-MTG: 6-Methyl-Thioguanin

### 2.2.1.1 Stammlösungen

Die für die TPMT-Aktivitätsbestimmung mittels HPLC notwendigen Reagenzien wurden alle 14 Tage, wie in der Tabelle 3 aufgelistet, frisch angesetzt.

**Tabelle 3.** Verwendete Stammlösungen

Stoff	Konzentration	Ansatz
NaOH	6 mol/l	24 g NaOH in Aqua dest. aufgelöst und auf 100 ml aufgefüllt
NaOH	0.1 mol/l	0.4 g NaOH in Aqua dest. aufgelöst und auf 100 ml aufgefüllt
HCl	0.1 mol/l	0.98 ml HCl (32%) mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.02 mol/l (pH 7.4)	0.272 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in 90 ml Aqua dest. aufgelöst, mit NaOH-Lösung (6 mol/l) auf pH von 7.4 titriert und mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.05 mol/l (pH 6.2)	6.8 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in 800 ml Aqua dest. aufgelöst, mit NaOH-Lösung (6 mol/l) auf pH von 6.2 titriert und mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt
6-TG	500 µg/ml	siehe 2.2.1.2
6-MTG	100 µg/ml	siehe 2.2.1.3
AdoMet	100 µg/ml	siehe 2.2.1.4

### 2.2.1.2 Thioguanin(6-TG)-Lösung

Es wurde eine 6-TG-Lösung mit einer Konzentration von 500 µg/ml als Substrat für die Methylierungsreaktion aus der käuflich erworbenen 40 mg Thioguanin-Tablette hergestellt. Ein entsprechend dem Wirkstoff-Gewichtsanteil abgewogener Anteil der im Mörser zerkleinerten Tablette wurde mit 0.1 molarer NaOH im Ultraschallbad aufgelöst und 5 min bei 4000 UpM zentrifugiert. Der Überstand

wurde mit dem gleichen Volumen von 0.1 molarer HCl und 0.02 molarer  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  so verdünnt, dass eine Lösung mit der Endkonzentration von 500  $\mu\text{g/ml}$  6-TG resultierte.

### 2.2.1.3 Methylthioguanin-Kalibrator

Zur Herstellung einer Stammlösung wurde das Produkt der Methylierungsreaktion, 6-MTG, in 0.1 molarer NaOH gelöst und mit Aqua dest. auf eine Endkonzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$  eingestellt. Aus dieser Stammlösung wurde dann mit Aqua dest. eine geometrische Verdünnungsreihe 1:10, 1:100 und 1:1000 mit 6-MTG-Konzentrationen von jeweils 10, 1 und 0.1  $\mu\text{g/ml}$  hergestellt. Wie in Tabelle 4 dargestellt, wurden sechs Kalibratoren angesetzt, welche jeweils auch 50  $\mu\text{l}$  Hämolyt einer laborinternen Kontrolle enthielten, damit bei den Kalibratoren und Probenansätzen die gleiche Matrix vorhanden war.

**Tabelle 4.** Zusammensetzung der verwendeten 6-MTG-Kalibratoren

Kalibrator 6-MTG	6-MTG-Stammlösung		Aqua dest.	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.2 mol/l	Hämolyt	End- Volumen
	[ng]	c [ $\mu\text{g/ml}$ ]	V [ $\mu\text{l}$ ]	V [ $\mu\text{l}$ ]	V [ $\mu\text{l}$ ]	V [ $\mu\text{l}$ ]
3.125	0.1	31.2	118.8	50	50	250
6.25	0.1	62.5	87.5	50	50	250
12.5	0.1	125	25	50	50	250
25	1	25	125	50	50	250
50	1	50	100	50	50	250
75	1	75	75	50	50	250

### 2.2.1.4 S-Adenosyl-L-Methionin (AdoMet)

Die ausgewogene Substanz wurde in Aqua dest. aufgelöst, so dass sich eine Konzentration von 1 mg/ml ergab. Eine mit Aqua dest. hergestellte 1:10 Verdünnung dieser Lösung (100  $\mu\text{g/ml}$ ) wurde aliquotiert und bei -60 °C eingefroren.

### 2.2.1.5 Patienten-Hämolyt

EDTA-Blut wurde 10 min bei 3000 UpM zentrifugiert. Plasma wurde verworfen, Buffy-coat für die Genotypisierung aufgehoben. Die gepackten Erythrozyten

wurden anschließend in kalter (4°C) physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert und noch einmal zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die gewaschenen, gepackten Erythrozyten wurden in einem Volumenverhältnis 1:6 mit destilliertem Wasser lysiert. Es wurden jeweils 300 µl gepackte Erythrozyten und 1500 µl destilliertes Wasser gut gemischt und zur vollständigen Hämolyse für 10 min im Eisbad stehen gelassen. Um die störenden Zellreste zu beseitigen, wurden die Proben anschließend 10 min bei 14000 UpM zentrifugiert. Die auf diese Weise hergestellten Hämolysate (der Überstand nach der Zentrifugation) sind im tiefgefrorenen Zustand bezüglich ihrer TPMT-Aktivität mehrere Monate stabil (Kröplin et al. 1998a) und konnten so bis zur nächsten Messung, in der Regel spätestens nach 14 Tagen, gelagert werden.

#### **2.2.1.6 Kontroll-Hämolysat**

Als Kontrolle für jede Messreihe wurde das aus EDTA-Blut eines Mitarbeiters unseres Instituts hergestellte Hämolysat mit normaler TPMT-Aktivität verwendet. Dieses wurde ähnlich wie unter 2.2.1.5 für Hämolysate aus Patientenproben beschrieben präpariert, aliquotiert und bei -60 °C aufbewahrt. Buffy-coat wurde jedoch zusammen mit dem Plasma verworfen, da hier keine Genotypisierung durchgeführt wurde. Das jeweils neu hergestellte Kontroll-Hämolysat wurde mit dem aktuell verwendeten, zuneige gehenden Kontroll-Hämolysat in überlappenden Messreihen untersucht, bevor es in der Routine eingesetzt wurde.

#### **2.2.1.7 Hämoglobin-Bestimmung**

Die Hämolysate wurden vor Bestimmung der TPMT-Aktivität auf ihren Hämoglobingehalt untersucht. Dies ist notwendig, um die ermittelten Enzymaktivitäten mit dem jeweiligen Hb-Gehalt der Proben zu normieren und somit vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Es konnte unter anderem von Kröplin und Kollegen eine direkte lineare Beziehung zwischen der TPMT-Aktivität und dem Hb-Gehalt der verwendeten Erythrozytenlysate bis einer Hb-Konzentration von 14 g/dl gezeigt werden (Kröplin et al. 1998a). Für die Hämoglobin-Bestimmung wurde eine Cyanid-kolorimetrische Methode des Herstellers RANDOX eingesetzt. Es wurden jeweils 20 µl der zu testenden Hämolysate und zwei Kontrollproben mit 5 ml Testreagenz zusammen pipettiert und gut gemischt.

Nach 3 min wurde die Extinktion ( $\Delta A$ ) am UVIKON Spektralphotometer bei 546 nm gegen Aqua dest. gemessen. Die Hb-Konzentration ( $cHb$ ) wurde anschließend mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten für Hämoglobin bei dieser Wellenlänge und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors im Testansatz nach der folgenden Formel berechnet:

$$cHb[g / dl] = \Delta A \times 36.77$$

### 2.2.1.8 Probenansatz

Es wurden bei jeder Messung zehn Patienten-, eine Kontrollprobe und ein Pufferleerwert als Doppelbestimmung, wie aus der Tabelle 5 zu entnehmen ist, angesetzt.

**Tabelle 5.** Pipettierschema für die Probenansätze

	6-TG 500 µg/ml	AdoMet 100µg/ml	Aqua dest.	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.4	Hämolysat	End- Volumen
	V [µl]	V [µl]	V [µl]	V [µl]	V [µl]	V [µl]
Pufferleerwert	50	50	50	100	-	250
Probe/Kontrolle	50	50	50	50	50	250

Die Zugabe des Substrats, 6-TG-Lösung, startete die Methylierungsreaktion (Abbildung 10). Die Proben wurden im Thermomixer bei 37°C für exakt eine Stunde inkubiert.

### 2.2.1.9 Eiweißfällung

Kalibrator- und Probenansätze wurden einer Eiweißfällung mittels Hitzedenaturierung unterzogen, die Kalibratoren direkt, die Proben aber erst nach der einstündigen Inkubation, was einerseits durch die Zerstörung der Struktur des katalysierenden Enzyms (TPMT) die Reaktion beendet und andererseits den Störeffekt des Eiweißes in der anschließenden HPLC-Analytik weitgehend aufhebt. Hierfür wurden die Reaktionsgefäße 7.5 min bei 96°C erhitzt und anschließend für 5 min im Eisbad wieder abgekühlt. Durch die darauf folgende zehnminütige Zentrifugation bei 14000 UpM wurde ein klarer Überstand

gewonnen, welcher dann zwecks quantitativer Bestimmung von 6-Methylthioguanin (6-MTG) der nachgeschalteten HPLC-Analyse zugeführt wurde.

#### **2.2.1.10 HPLC-Analyse der Proben**

Die TPMT-Aktivität der Patienten wurde mittels einer isokratischen Umkehrphasen-HPLC ermittelt. Die verwendete Anlage bestand aus einer Pumpe (L-7100), einem Säulenofen (L-5025), einem Autosampler (L-2200) und einem Fluoreszenzdetektor (L-7480) der Firmen Merck und Hitachi, die über ein Interface (D-7000) an den Steuerungs- und Auswertungscomputer angeschlossen war. Die chromatographische Trennung erfolgte auf einer LiChroCART<sup>®</sup> 125-4 C<sub>18</sub>-Säule mit 5 µm Partikelgröße. Um die Hauptsäule vor Verschmutzung und vorzeitiger Degeneration zu schützen, wurde ihr eine kurze C<sub>18</sub>-Vorsäule (Firma Phenomenex) vorgeschaltet.

Der Eluent bestand aus einem ternären Gemisch aus KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.05 mol/l, pH 6.2), Acetonitril und Tetrahydrofuran in einem Volumenverhältnis von 92:5:3.

Bei einem Eluentenfluss von 0.65 ml/min wurden jeweils 50 µl der Kalibratoren (2.2.1.3) und Kontroll- und Probenansätze (2.2.1.6 und 2.2.1.5) über den Autosampler auf die Säule injiziert und dort in die einzelnen Komponenten aufgetrennt. Das Eluat mit dem zu analysierende Metaboliten, 6-MTG, wurde anschließend in der Durchflusszelle des Fluoreszenzdetektors einem Anregungsstrahl (Excitation: 315 nm) ausgesetzt. Die durch 6-MTG emittierte Fluoreszenz (Emission: 390 nm) wurde vom Detektor erfasst und in elektrische Signale umgewandelt, die über das Interface D-7000 an den angeschlossenen Computer übermittelt wurden. Das in der HPLC-Software aufgerufene Programm erstellte schließlich die entsprechenden Chromatogramme und Kalibrationsgeraden.

### **2.2.2 Genotypisierung**

#### **2.2.2.1 DNA-Extraktion**

Die tiefgefrorenen Buffycoats wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Aus diesem leukozytenreichen Gemisch wurde dann mit Hilfe von QIAamp DNA Blood Mini Kit<sup>®</sup> für die spätere Genotypisierung wie folgt Patienten-DNA gewonnen:

Es wurden 20 µl Proteinase K mit 200 µl Buffycoat in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Nach Zugabe von 200 µl Lysepuffer wurden die Proben für 3 Min mit einem Vortexer gut durchmischt und anschließend für 10 Min bei 56°C inkubiert. Der Inkubationsansatz wurde mit 200 µl Ethanol versetzt, mittels Vortexer erneut gut durchmischt und anschließend in die mitgelieferten Spezialsäulen gegeben. Nach zwei Waschschrinen folgte dann die Elution der isolierten, gereinigten DNA. Diese wurde tiefgefroren für den nächsten Genotypisierungslauf aufbewahrt.

### 2.2.2.2 TPMT PCR-Ansatz

Der zur Genotypisierung verwendete artus® TPMT LC PCR-Kit untersucht die drei häufigsten Einzelnukleotid-Mutationen (Single Nucleotide Polymorphism), nt 238, nt 480 und nt 719, am LightCycler® 1.5. Da bei dieser Geräteversion nur zwei der drei vorhandenen Photometerkanäle zur Fluoreszenzdetektion mittels FRET-Sonden zur Verfügung stehen (F<sub>2</sub>- und F<sub>3</sub>-Kanal), können maximal zwei Punktmutationen in einem PCR-Ansatz untersucht werden. Folglich wurden für eine Patientenprobe zwei PCR-Ansätze benötigt.

Die im PCR-Kit vorhandenen Reaktionsgemische (Mix-A und Mix-B) enthalten neben den für die PCR notwendigen üblichen Reagenzien (Nukleotide, Primer und Taq-Polymerase) noch Fluorescein-markierte Donorsonden. Während Mix-A mit einer LC Red 640-markierten Akzeptorsonde der Detektion der Mutation an der Nukleotid-Position nt 238 (TPMT\*2) dient, verfügt Mix B über zwei LC Red 640- und 705-markierten Akzeptorsonden, mit denen jeweils die Mutationen an den Nukleotid-Positionen nt 460 (TPMT\*3B) und nt 719 (TPMT\*3C) untersucht werden können. Für jede Probe wurden, wie in Tabelle 6 beschrieben, 18 µl Master Mix A und B hergestellt. Diese wurden dann in die im LC Cooling Block vorgekühlten 20 µl Kapillaren pipettiert. Um Kontaminationen mit fremder DNA zu verhindern, wurden generell nur spezielle, für PCR geeignete Pipettenspitzen mit Aerosolschutz verwendet.

**Tabelle 6.** Pipettierschema für PCR-Master Mix je eine Probe

	artus® Mix A [µl]	artus® Mix B [µl]	50 mM MgCl <sub>2</sub> [µl]
Master Mix A	16	-	2
Master Mix B	-	16	2

Darüber hinaus fand die Zugabe der extrahierten Patienten- und Kontroll-DNA (Tabelle 7) erst zum Schluss und in einem separaten Raum statt.

**Tabelle 7.** Pipettierschema für PCR-Ansätze

	Master Mix A [μl]	Master Mix B [μl]	Patienten-/Kontroll-DNA [μl]
PCR-Ansatz A	18	-	2
PCR-Ansatz B	-	18	2

Die Kapillaren wurden anschließend mittels des LC Capping Tools mit den zugehörigen Plastikstopfen fest verschlossen, was eine Kontamination ab diesem Zeitpunkt verhinderte. Die verschlossenen Kapillaren wurden samt den Metalleinsätzen des LC Cooling Blocks für wenige Sekunden bei 1000 UpM zentrifugiert, damit das noch im Aufnahmebehälter befindliche Reaktionsgemisch in die dünnen Bereiche der Kapillaren überführt wird. Die Metalleinsätze des LC Cooling Blocks schützen die Kapillaren einerseits vor mechanischer Belastung bei Zentrifugation und eventuellem Zerschlagen und kühlen andererseits deren Inhalt und verhindern damit das Entstehen unspezifischer PCR-Produkte.

Nach der Zentrifugation wurde das Probenkarussell mit den Kapillaren bestückt und der PCR-Lauf gestartet.

### 2.2.2.3 Qualitätskontrolle

Zur internen Qualitätskontrolle wurden die im artus<sup>®</sup> TPMT LC PCR-Kit vorhandenen Negativ- (ohne genomische Substanz), homozygote TPMT\*2/\*2- und heterozygote TPMT\*3A/\*1-Kontrolle verwendet. Als externe Qualitätskontrollmaßnahme nahmen wir an einem von Referenzinstitut für Bioanalytik ([www.dgkl-rfb.de](http://www.dgkl-rfb.de)) angebotenen Ringversuch (Molekularbiologie FV2/09) für TPMT-Genotypisierung teil.

### 2.2.2.4 TPMT PCR-Protokoll

Wie aus Tabelle 8 zu entnehmen ist, besteht das PCR-Protokoll zur Untersuchung der Proben am LightCycler<sup>®</sup> Instrument (Version 1.5) aus fünf Schritten mit einer Gesamt-Laufdauer von etwa 35 Minuten.



**Tabelle 8.** LightCycler PCR-Protokoll

Program: hot start enzymes				Type: None		Cycles: 1	
Segment Nummer	1. Target-Temp. [°C]	Hold Time [s]	Slope [°C/s]	2. Target-Temp. [°C]	Step Size [°C]	Step Delay [Cycles]	Acquisition Mode
1	95	120	20	-	-	-	None

Program: touch down				Type: None		Cycles: 10	
Segment Nummer	1. Target-Temp. [°C]	Hold Time [s]	Slope [°C/s]	2. Target-Temp. [°C]	Step Size [°C]	Step Delay [Cycles]	Acquisition Mode
1	95	5	20	-	-	-	None
2	65	15	20	55	1	1	None
3	72	20	20	-	-	-	None

Program: amplification				Type: None		Cycles: 35	
Segment Nummer	1. Target-Temp. [°C]	Hold Time [s]	Slope [°C/s]	2. Target-Temp. [°C]	Step Size [°C]	Step Delay [Cycles]	Acquisition Mode
1	95	1	20	-	-	-	None
2	55	10	20	-	-	-	Single
3	72	20	20	-	-	-	None

Program: melting				Type: Melting Curves		Cycles: 1	
Segment Nummer	1. Target-Temp. [°C]	Hold Time [s]	Slope [°C/s]	2. Target-Temp. [°C]	Step Size [°C]	Step Delay [Cycles]	Acquisition Mode
1	95	10	20	-	-	-	None
2	45	60	20	-	-	-	None
3	32	30	0.5	-	-	-	Continuous
4	85	85	0.5	-	-	-	Continuous

Program: cooling				Type: None		Cycles: 1	
Segment Nummer	1. Target-Temp. [°C]	Hold Time [s]	Slope [°C/s]	2. Target-Temp. [°C]	Step Size [°C]	Step Delay [Cycles]	Acquisition Mode
1	40	30	20	-	-	-	None

## 2.3 Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse sowie deren grafische Darstellungen wurden mit Hilfe von GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego/USA) durchgeführt.

Bei dem untersuchten Patientengesamtkollektiv handelte es sich um eine nicht randomisierte Stichprobe. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde auf 5% festgelegt. Der Alpha-Fehler wurde nicht adjustiert. Insofern verstehen sich alle inferenzstatistischen Auswertungen rein deskriptiv. Die miteinander zu vergleichenden Kollektive wurden mittels D´Agostino-Pearson-Test auf das Vorliegen einer Normalverteilung überprüft. Da bei den folgenden Gegenüberstellungen jeweils ein oder beide Kollektive keine Normalverteilung aufwiesen ( $P < 0.05$ ), wurde für die Untersuchung der Signifikanz der Rangsummenunterschiede (annäherungsweise Median-Unterschiede) bei zwei Gruppen ein Mann-Whitney-Test und bei mehr als zwei Gruppen eine Kruskal-Wallis ANOVA als nichtparametrische Verfahren für ungepaarte unabhängige Stichproben angewendet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Phänotypisierung (TPMT-Aktivitätsbestimmung)

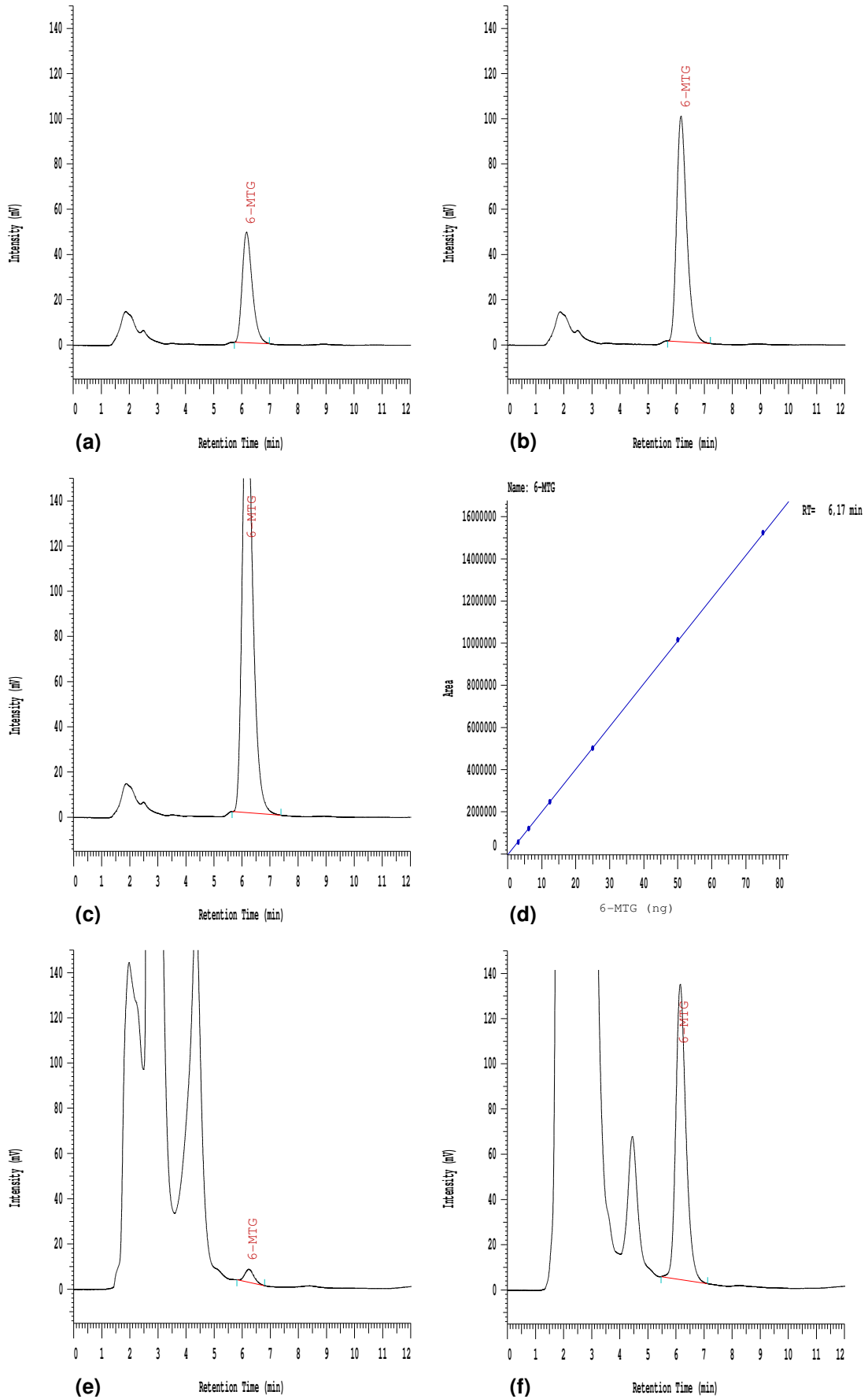
Die TPMT-Aktivität wurde, wie unter 2.2.1 dargestellt, als Funktion der pro Stunde entstandenen Menge an 6-MTG mit Hilfe einer isokratischen Umkehrphasen-HPLC ermittelt. Abbildung 11 zeigt das Beispiel einer Kalibrationsgeraden für 6-MTG und die zugehörigen Chromatogramme der eingesetzten Kalibratoren sowie die Chromatogramme einer Patienten- und einer Leerwertprobe aus einem HPLC-Lauf. Die Zuordnung der registrierten Peaks zum gesuchten Analyten erfolgte durch Abgleich der Retentionszeiten der Kalibratoren (in dem dargestellten Lauf 6.17 Min).

Die bei Leerwert- und Patientenproben (Kurven e und f in Abbildung 11) registrierten Störpeaks zeigten Retentionszeiten bis 4.5 Minuten und waren damit gut von dem gesuchten 6-MTG-Peak diskriminierbar. Ähnliches galt für die konstanten Peaks, die mit einer Retentionszeit von jeweils 2 und 2.5 Minuten in den Chromatogrammen der Kalibratoransätze zu beobachten waren und auf eine Verunreinigung einer der verwendeten Lösungsmittel hindeuten. Auch hier war eine zuverlässige Trennung von dem gesuchten 6-MTG-Peak möglich.

Für die Validität eines HPLC-Laufs wurden folgende Kriterien überprüft:

- Kalibrationsgerade: Linearität und Homogenität der Einzelergebnisse
- Präzision der Messung: Maximale Differenz der Doppelbestimmungen von 15% (bei Verwendung von externen Standards)
- Richtigkeit der Messung durch die mitgeführte Kontrollprobe (maximal zulässige Abweichung vom Zielwert:  $\pm 15\%$ )
- Richtige Zuordnung des Ergebnisses zum TPMT-Status der Kontrollperson

Entsprechend der Kalibrationsgeraden wurde die Fläche unter der Kurve bei jeder Patientenprobe abzüglich der zugehörigen Fläche der Leerwertprobe (Korrektur der nicht-enzymatischen Methylierung) über die Gerätesoftware als Menge an 6-MTG [ng] im untersuchten Ansatz umgerechnet und ausgegeben. Da dieser Messung eine einstündige Inkubation bei 37°C vorausgegangen war, spiegelt der Mittelwert aus den Ergebnissen der Doppelbestimmungen das in einer Stunde entstandene Reaktionsprodukt (6-MTG) wider. Mit Hilfe des Molekulargewichts von 6-MTG ( $181 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) kann die molare Menge pro Stunde [ $\text{nmol 6-MTG}\cdot\text{h}^{-1}$ ]



**Abbildung 11.** Eine 6-MTG-Kalibrationsgerade (d) mit den zugehörigen Chromatogrammen der Kalibratoren: 6.25 ng (a); 12.5 ng (b); 25 ng (c) und Chromatogramme einer Leerwert- (e) und einer Patientenprobe (f). Nicht abgebildet sind Chromatogramme zu den Kalibratoren: 3.125; 50 und 75 ng

berechnet werden. Dieser Wert wurde dann auf die Hämoglobinkonzentration [g.dl<sup>-1</sup>] des eingesetzten Hämolysats normiert und stellt letztlich die TPMT-Enzymaktivität in nmol 6-MTG.g<sup>-1</sup>Hb.h<sup>-1</sup> dar. Bei der Normierung auf die Messgröße Gramm Hämoglobin (g Hb) ergibt sich für das eingesetzte Hämolysatvolumen von 50 µl bezogen auf die ermittelte Hb-Konzentration (*cHb*) in g.dl<sup>-1</sup> ein Umrechnungsfaktor von 2000 (50µl\*2000=1 dl).

Die Enzymaktivität wird somit nach folgender Formel berechnet, wobei  $\Delta U$  das Leerwert-korrigierte Messsignal in mV darstellt:

$$\text{TPMT-Aktivität} = \frac{2000 * \Delta U}{181 * cHb}$$

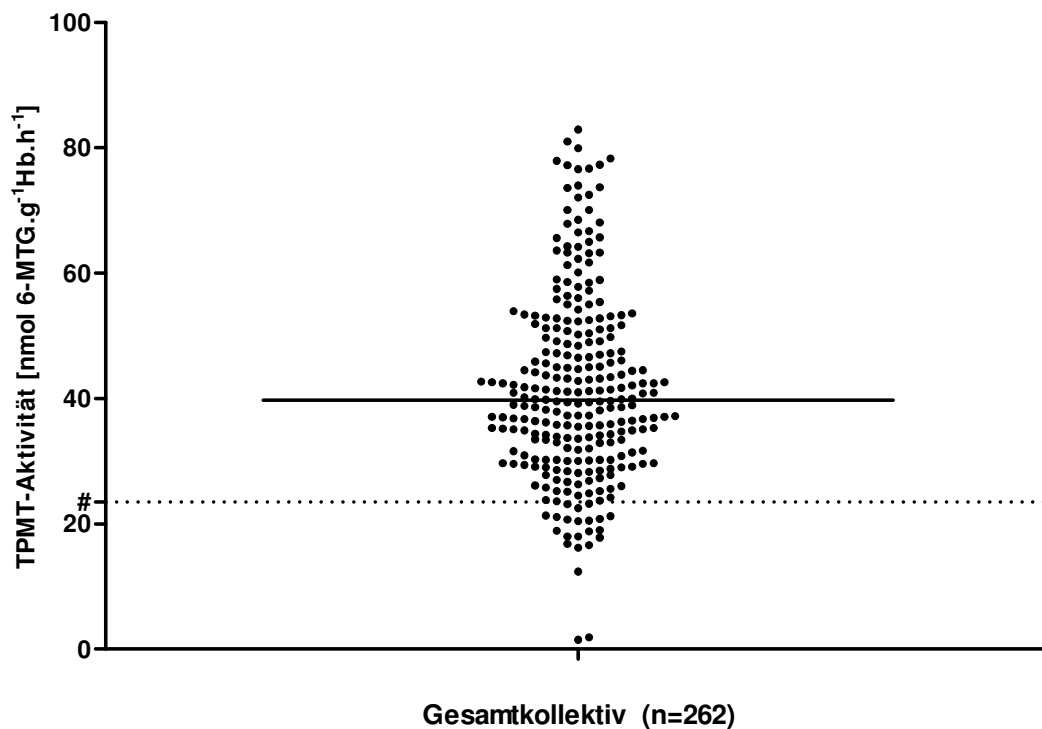
Bei dem in der Abbildung 11 dargestellten Beispiel betragen die ermittelten Signale aus Doppelbestimmungen für die Patienten- und Leerwertprobe jeweils 16.4 und 0.6 mV bei einer Hb-Konzentration von 4.6 g.dl<sup>-1</sup>. Die TPMT-Aktivität des Patienten lässt sich wie folgt berechnen:

$$\frac{2000 * (16.4 - 0.6) \text{nmol}6 - \text{MTG}}{181 * 4.6 \text{gHb.h}} = 37.9 \text{ nmol 6-MTG.g}^{-1}\text{Hb.h}^{-1}$$

Die auf dieser Weise ermittelten Ergebnisse der Enzymaktivität des gesamten Patientenkollektivs sind der Tabelle 19 im Anhang zu entnehmen.

### 3.1.1 Häufigkeitsverteilung der TPMT-Aktivität

Abbildung 12 zeigt die TPMT-Aktivität der Patienten in Einzelwerten. Diese variierten zwischen 1.50 und 82.9 nmol 6-MTG.g<sup>-1</sup>Hb.h<sup>-1</sup> mit einem Median von 39.7 und einem Mittelwert von 41.7 nmol 6-MTG.g<sup>-1</sup>Hb.h<sup>-1</sup>. Weitere Kenngrößen der Aktivitätsverteilung sind der Tabelle 9 zu entnehmen.



**Abbildung 12.** TPMT-Aktivität des Gesamtkollektivs, dargestellt mit der gestrichelten Linie (#) als Entscheidungsgrenze zwischen der normalen und intermediären Enzymaktivität bei der angewendeten Methode 23.5 und mit der durchgezogenen Linie der Median von 39.7 nmol 6-MTG.g<sup>-1</sup>Hb.h<sup>-1</sup>

Die für die Methode (Kröplin et al. 1998a) geltende Unterscheidungsgrenze zwischen normaler und intermediärer Enzymaktivität von 23.5 nmol 6-MTG.g<sup>-1</sup>Hb.h<sup>-1</sup> zugrunde gelegt, können diese Ergebnisse nach dem bekannten trimodalen Modus des Enzyms (Weinshilboum und Sladek 1980) in drei Gruppen mit einer normalen (91.6%), intermediären (7.63%) und sehr niedrigen/fehlenden TPMT-Aktivität (Nichtmethylierer) (0.76%) unterteilt werden. Die Tabellen 9 und 10 bieten eine Übersicht wichtiger statistischer Kenngrößen der Ergebnisse der TPMT-Phänotypisierung dieser drei Gruppen und des Gesamtkollektivs.

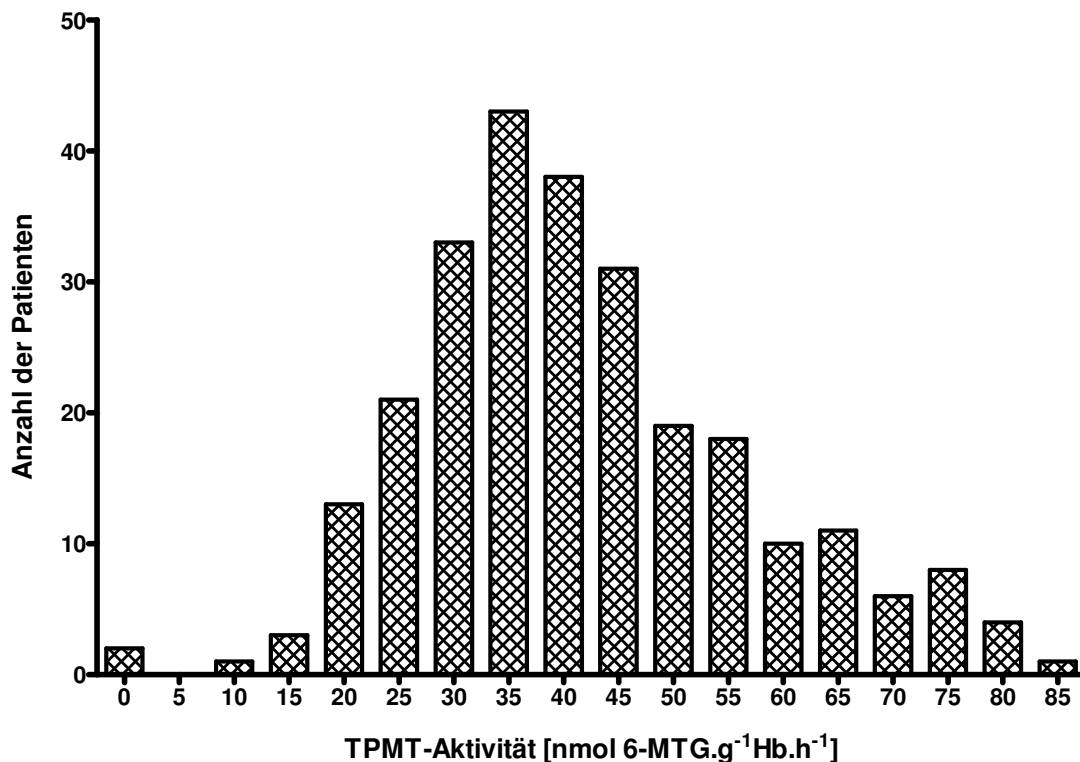
**Tabelle 9.** Statistische Kenngrößen der TPMT-Aktivität in nmol 6-MTG.g<sup>-1</sup>Hb.h<sup>-1</sup> des Gesamtkollektivs, Min: Minimum, Max: Maximum, SEM: Standardfehler des Mittelwerts, SD: Standardabweichung

TPMT-Aktivität	Min	Max	Median	Mittelwert	SEM	SD
Gesamtkollektiv n=262	1.50	82.9	39.7	41.7	0.933	15.1

**Tabelle 10.** Statistische Kenngrößen der TPMT-Aktivität in  $\text{nmol } 6\text{-MTG}\cdot\text{g}^{-1}\text{Hb}\cdot\text{h}^{-1}$  der drei Phänotyp-Gruppen: Normal-, Intermediär- und Nichtmethylierer

Phänotyp	TPMT-Aktivität		Min	Max	Median	Mittelwert	SEM	SD
	n	%						
Normal-	n=240	91.6%	23.6	82.9	41.2	43.9	0.886	13.7
Intermediär-	n=20	7.63%	12.4	23.2	19.7	19.4	0.595	2.66
Nichtmethylierer	n=2	0.76%	1.50	1.90	1.70	1.70	0.200	0.283

Die Patienten mit normaler TPMT-Aktivität hatten im Median mit  $41.2 \text{ nmol } 6\text{-MTG}\cdot\text{g}^{-1}\text{Hb}\cdot\text{h}^{-1}$  eine signifikant höhere ( $P < 0.001$ ) Aktivität als die der intermediären Gruppe ( $19.7 \text{ nmol } 6\text{-MTG}\cdot\text{g}^{-1}\text{Hb}\cdot\text{h}^{-1}$ ). Aufgrund der besonders kleinen Stichprobe der Nichtmethylierer ( $n=2$ ) ist eine statistische Analyse im Vergleich zu den beiden größeren Gruppen (Normal- und Intermediär-Methylierer) nicht sinnvoll und wurde daher nicht durchgeführt. Die Ergebnisse dieser 2 Patienten ( $1.50$  und  $1.90 \text{ nmol } 6\text{-MTG}\cdot\text{g}^{-1}\text{Hb}\cdot\text{h}^{-1}$ ) stimmten mit der zu erwartenden sehr niedrigen bis fehlenden Enzymaktivität sehr gut überein und lagen deutlich unterhalb der ermittelten Enzymaktivitäten der beiden anderen Gruppen. Die TPMT-Aktivität des Gesamtkollektivs lässt in der Histogramm-Darstellung (Abbildung 13) eine linksgipflige (rechtsschiefe) Häufigkeitsverteilung erkennen.



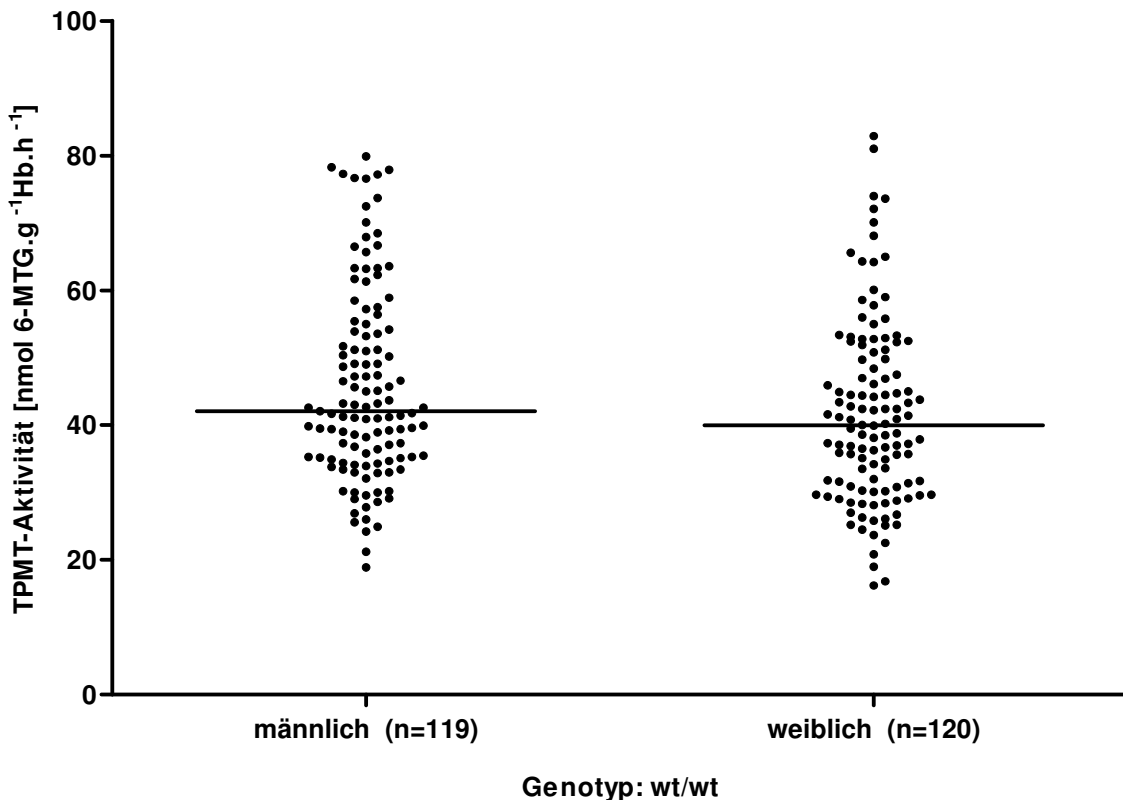
**Abbildung 13.** Häufigkeitsverteilung der TPMT-Aktivität des Gesamtkollektivs ( $n=262$ )

### 3.1.2 Vergleich von Einflussgrößen auf die TPMT-Aktivität

Im Folgenden wurden unterschiedlichen Gruppen der Patienten bezüglich ihrer TPMT-Aktivität untersucht. Um eine Verschiebung der statistischen Kennzahlen zu vermeiden, die aufgrund zufälliger Verteilung der Träger der genetischen Varianten in den jeweiligen Gruppen zustande kommen kann, wurden lediglich Patienten eingeschlossen, die keine der untersuchten Mutationen aufwiesen (wt/wt, siehe 3.2).

#### 3.1.2.1 Vergleich der TPMT-Aktivität bei Männern und Frauen

Die in dieser Untersuchung einbezogenen Patienten ohne nachweisbare Mutationen (n=239) waren jeweils zur Hälfte weiblich (n=120) bzw. männlich (n=119). Wie in Abbildung 14 dargestellt, lag die TPMT-Aktivität bei Männern im Median mit  $42.1 \text{ nmol } 6\text{-MTG}\cdot\text{g}^{-1}\text{Hb}\cdot\text{h}^{-1}$  geringfügig jedoch statistisch signifikant höher (P<0.05) als bei Frauen (Median  $40.0 \text{ nmol } 6\text{-MTG}\cdot\text{g}^{-1}\text{Hb}\cdot\text{h}^{-1}$ ).

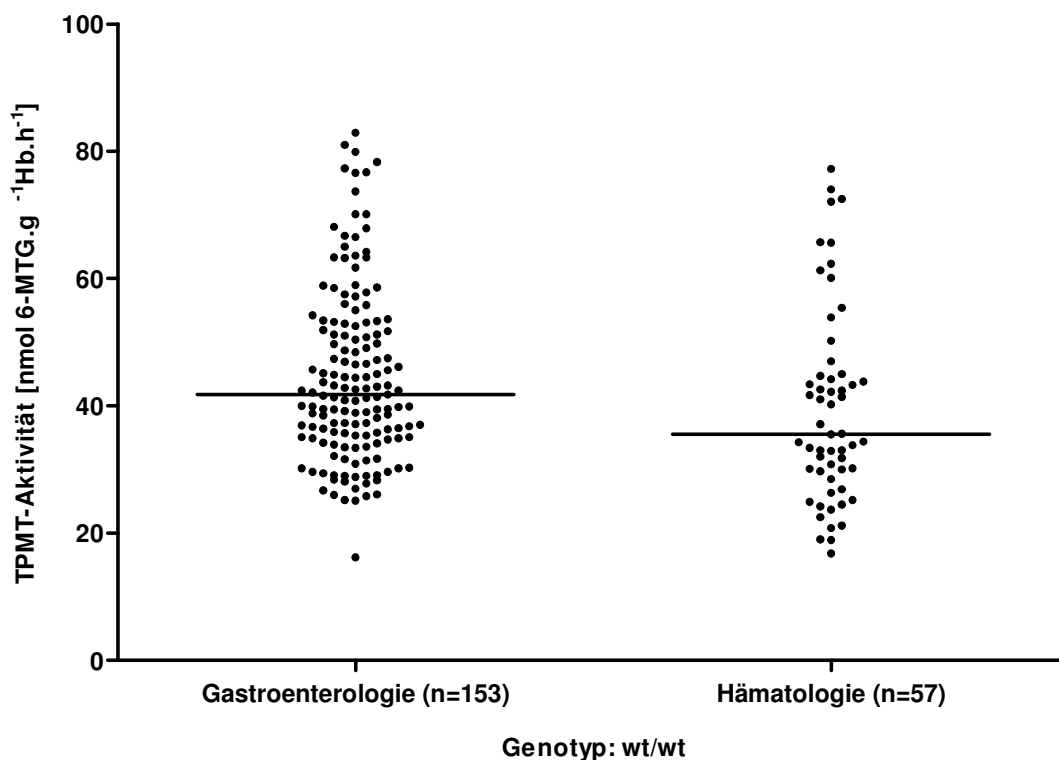


**Abbildung 14.** Vergleich der TPMT-Aktivität zwischen Männern und Frauen ohne nachweisbare Mutationen (wt/wt), die durchgezogenen Linien stellen den Median in der jeweiligen Gruppe dar



### 3.1.2.2 Vergleich der TPMT-Aktivitäten bei verschiedenen Erkrankungen

Eingeschlossen wurden Patienten aus den zwei größeren Kollektiven mit gastroenterologischen und hämatologischen Erkrankungen, die ähnlich wie unter 3.1.2.1 dargestellt keine der untersuchten Mutationen trugen. Hier zeigten die Patienten des gastroenterologischen Kollektivs mit einem Median von 41.8 nmol 6-MTG.g<sup>-1</sup>Hb.h<sup>-1</sup> eine signifikant höhere TPMT-Aktivität (P<0.01) als die des hämatologischen Kollektivs (Median 35.5 nmol 6-MTG.g<sup>-1</sup>Hb.h<sup>-1</sup>). Siehe Abbildung 15.



**Abbildung 15.** Vergleich der TPMT-Aktivität zwischen gastroenterologischen und hämatologischen Patienten ohne nachweisbaren Mutationen (wt/wt), die durchgezogenen Linien stellen den Median in der jeweiligen Gruppe dar

Beide Kollektiven bestanden jeweils zur Hälfte aus Männern und Frauen. Bei den gastroenterologischen Patienten betrug das Verhältnis Männer zu Frauen 77:76, bei den hämatologischen Patienten 28:29.

## 3.2 Genotypisierung

### 3.2.1 Schmelzkurvenanalyse

Die Patientenproben wurden wie unter 2.2.2 dargelegt einer PCR-Untersuchung unterzogen. Am Ende jedes PCR-Laufs wurden die Schmelzkurven der Proben nach Aktivierung einer gültigen Color Compensation Calibration Datei (CCC-Datei) analysiert.

Die Oligonukleotidsonden waren jeweils so gestaltet, dass sie bezüglich der Positionen nt 238 und nt 719 eine zu dem genetischen Varianten exakt komplementäre Sequenz (TPMT\*2 und TPMT\*3C) und damit einen höheren Schmelzpunkt im Vergleich zum Wildtypen (ohne Mutation) aufwiesen. Umgekehrt verhielten sich die Sonden für die Mutation an der Position nt 460, welche zum Wildtypen komplementär waren. Damit zeigten die genetischen Varianten an dieser Position (TPMT\*3B) einen niedrigeren Schmelzpunkt.

Die vom Hersteller angegebenen Schmelzpunkte für die drei zu untersuchenden Punktmutationen sind in Tabelle 11 aufgeführt.

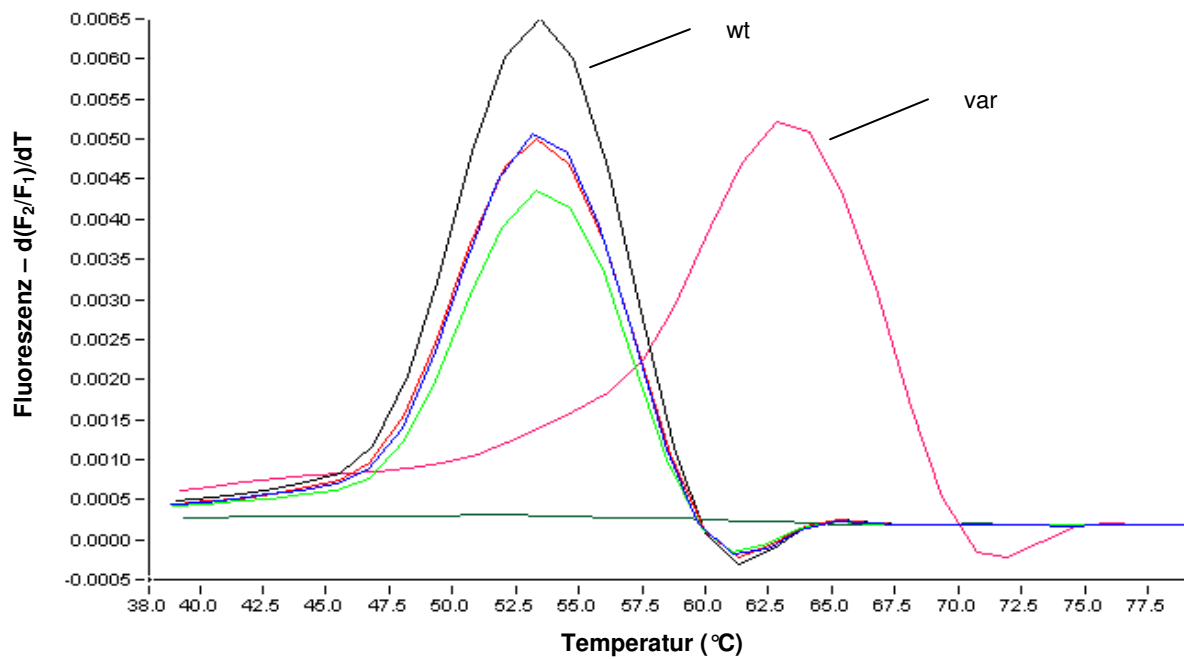
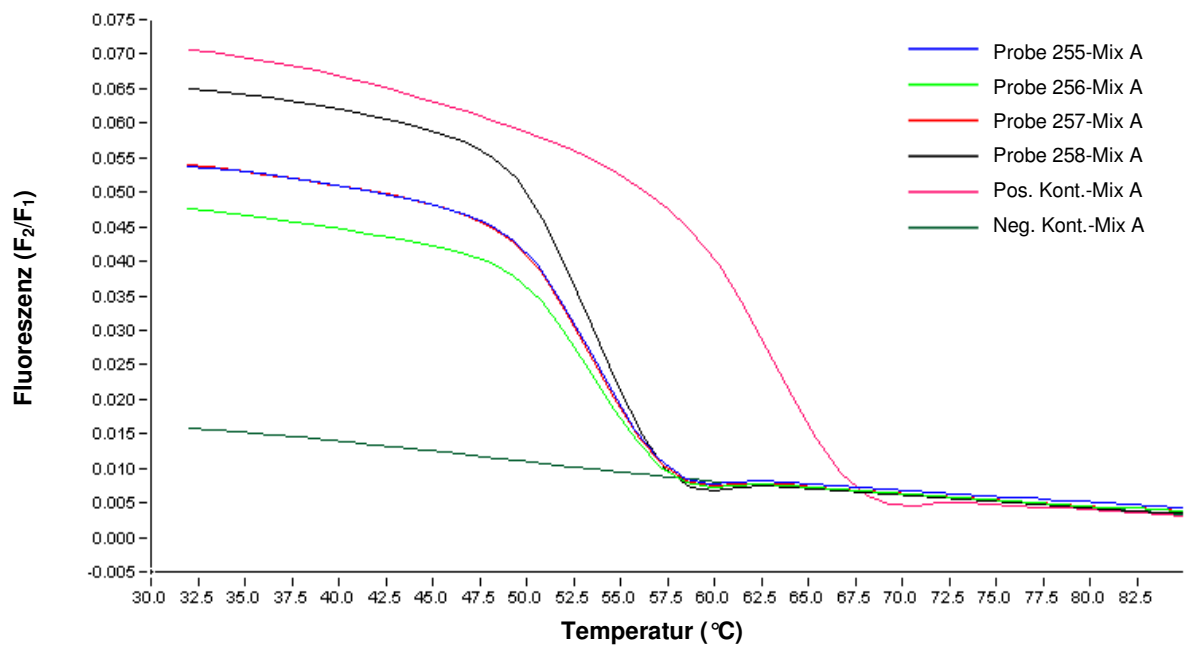
**Tabelle 11.** Schmelzpunkte des Wildtyps (wt) und der genetischen Varianten (var)

	F <sub>2</sub> -Kanal			F <sub>3</sub> -Kanal		
	nt	wt	Var	nt	wt	var
Ansatz - A	238	54 °C	64 °C	-	-	-
Ansatz - B	460	57 °C	47 °C	719	42 °C	54 °C

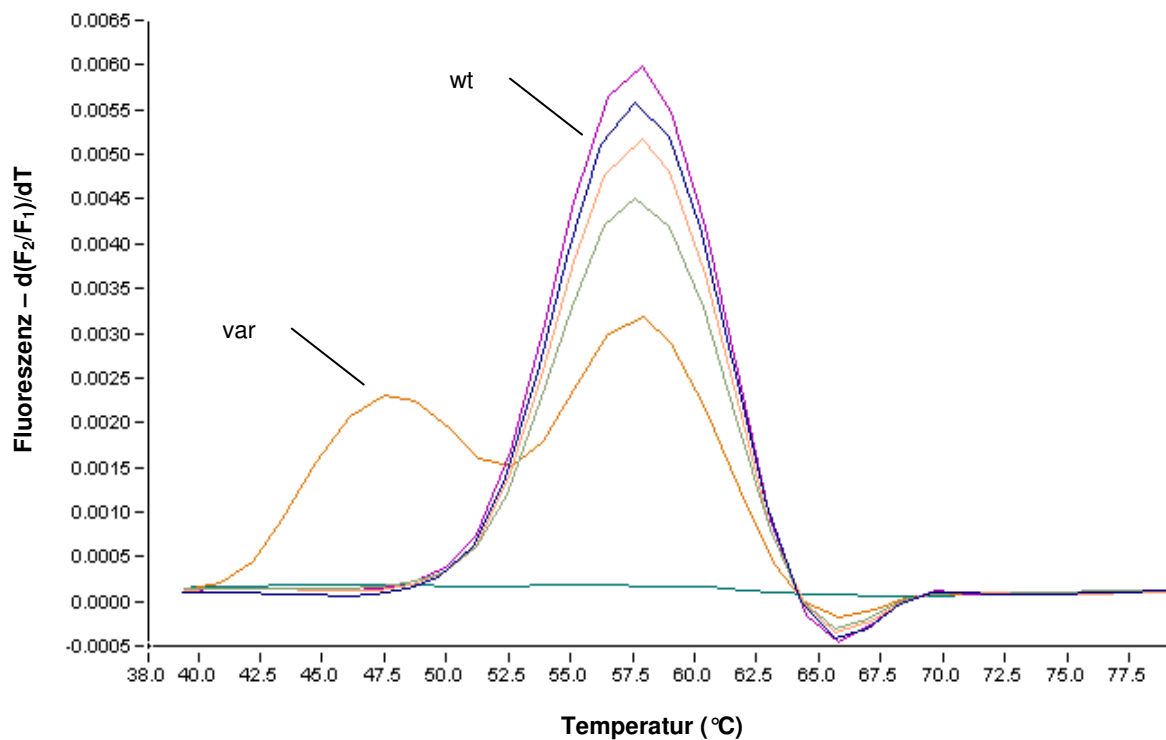
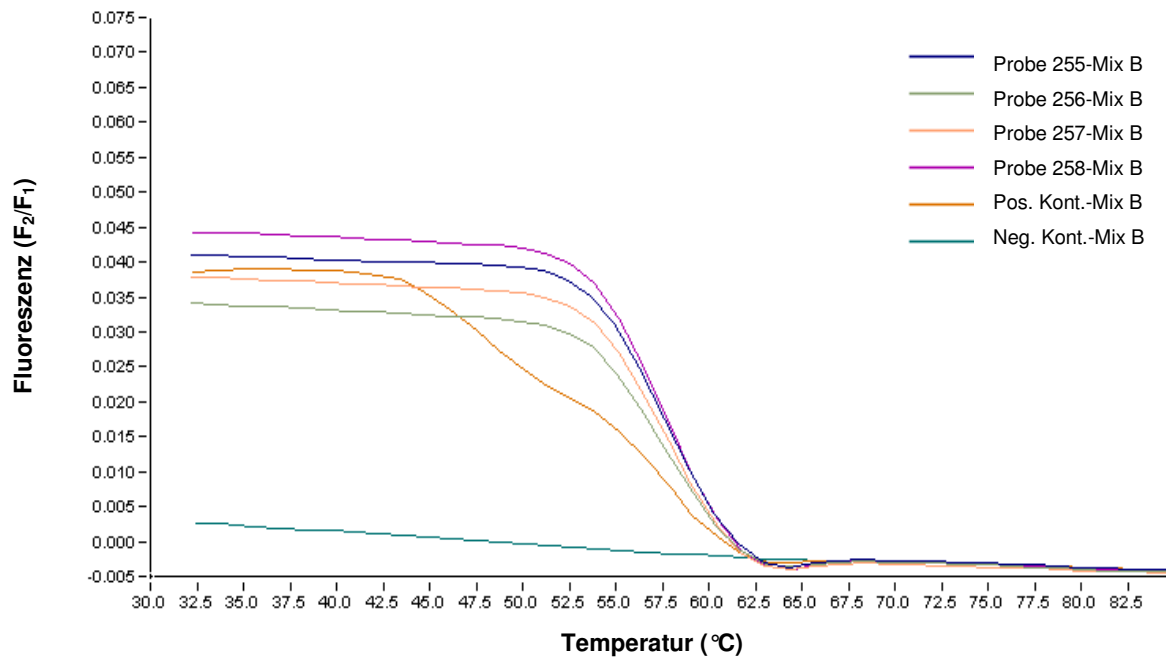
Zur Validierung eines PCR-Laufs wurden folgende Kriterien überprüft:

- Typische zu erwartende Verläufe der Schmelzkurven der Patientenproben
- Schmelzpunkte der Patientenproben wie in Tabelle 11 beschrieben mit einer maximal zulässigen Abweichung von  $\pm 2$  °C
- Richtigkeit der Untersuchung durch die ermittelten Schmelzpunkte der in jedem Lauf mitgeführten Kontrollproben
- Erfolgreiche Teilnahme an einem Externen Ringversuch

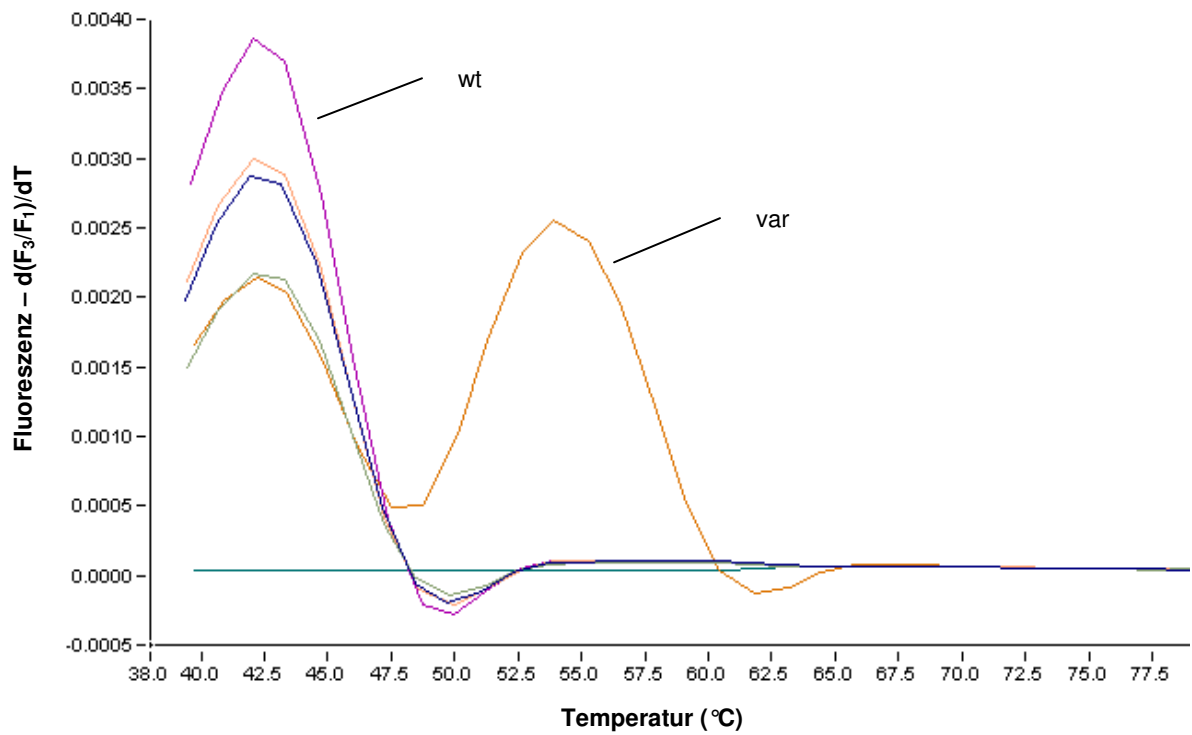
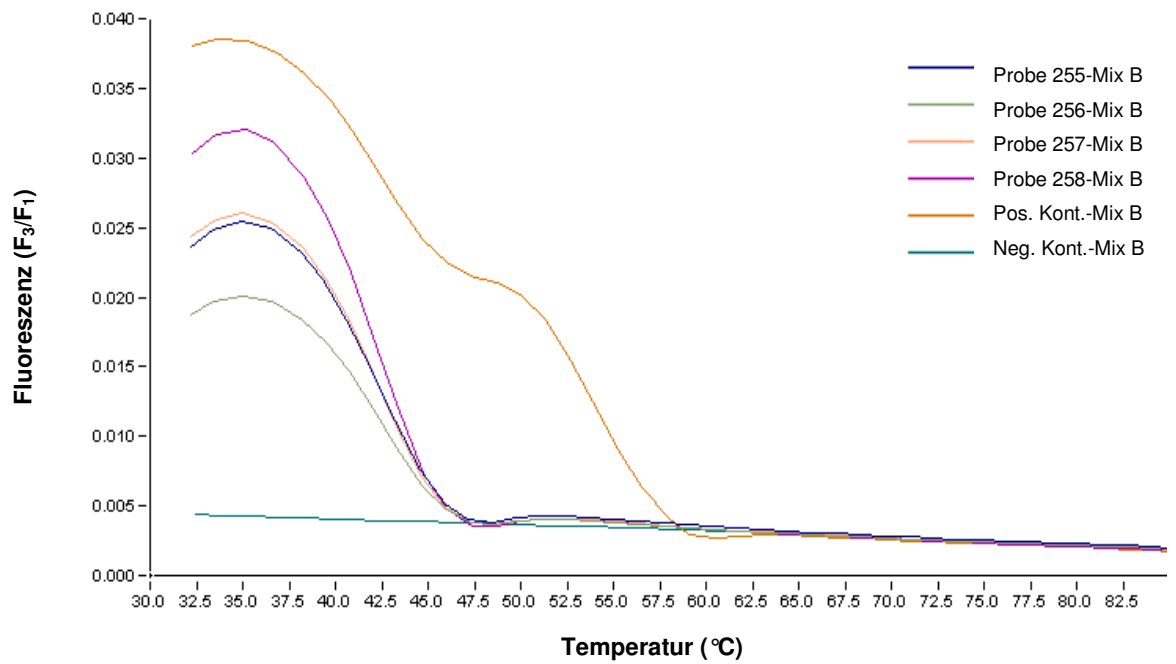
Die Abbildungen 16, 17 und 18 zeigen beispielhaft die drei ermittelten Schmelzkurven für einen PCR-Lauf.



**Abbildung 16.** Schmelzkurve eines PCR-Laufs mit dem Mix A zur Detektion der Mutation an der Position nt 238 (TPMT\*2), oben Darstellung der Fluoreszenz ( $F_2/F_1$ ) gegen Temperatur, unten deren negative erste Ableitung nach der Temperatur, wt: wildtyp, var: variant



**Abbildung 17.** Schmelzkurve des gleichen PCR-Laufs (Abbildung 16) mit dem Mix B zur Detektion der Mutation an der Position nt 460 (TPMT\*3B), oben Darstellung der Fluoreszenz ( $F_2/F_1$ ) gegen Temperatur, unten deren negative erste Ableitung nach der Temperatur, wt: wildtyp, var: variant



**Abbildung 18.** Schmelzkurve des gleichen PCR-Laufs (Abbildungen 16 und 17) mit dem Mix B zur Detektion der Mutation an der Position nt 719 (TPMT\*3C), oben Darstellung der Fluoreszenz ( $F_3/F_1$ ) gegen Temperatur, unten deren negative erste Ableitung nach der Temperatur, wt: wildtyp, var: variant

### 3.2.2 Häufigkeitsverteilung der TPMT-Genotypen

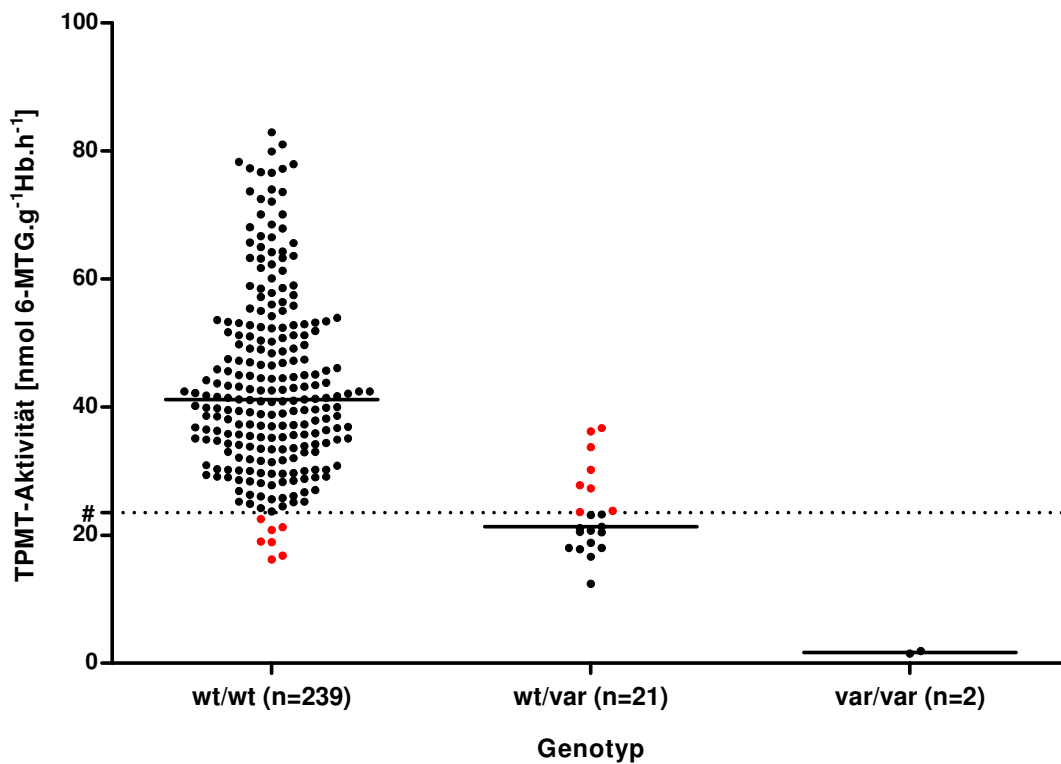
Sämtliche Proben wurden, wie in 2.2.2 beschrieben und oben (3.2.1) an Beispielen detailliert dargestellt genotypisiert. Abbildung 19 zeigt die ermittelten Ergebnisse. Eine Mutation an der Position nt 238 (TPMT\*2) fand sich bei keinem der untersuchten 262 Patienten. 239 Patienten (91.22%) trugen darüber hinaus auch keine Mutationen an den Positionen nt 460 (TPMT\*3B) bzw. nt 719 (TPMT\*3C). Hier liegt aller Wahrscheinlichkeit nach ein wt/wt-Genotyp (TPMT\*1/\*1) vor, wobei allerdings die weiteren besonders seltenen Punktmutationen im TPMT-Gen (TPMT\*3D - \*28) mit der angewendeten Methode nicht detektiert werden können.

Bei 23 Patienten waren Punktmutationen an den Positionen nt 460 und nt 719 nachweisbar. 2 Patienten (0.76%) konnten als Homozygote Varianten (var/var) jeweils einem TPMT\*3A/\*3A- bzw. TPMT\*3A/\*3C-Genotypen sicher zugeordnet werden.

Im Gegensatz dazu konnte die eingesetzte PCR-Methode bei den übrigen 21 Patienten (8.02%), welche bezüglich der Positionen nt 460 und nt 719 als heterozygot variant getestet wurden, zwischen den beiden möglichen Genotypen TPMT\*1/\*3A und TPMT\*3B/\*3C nicht unterscheiden. Hier kann mittels weitergehender Untersuchungen, z.B. Long-Range-PCR und intramolekulare Ligation (McDonald et al. 2002), Haplotypisierung durch Familienuntersuchung oder Sequenzierung überprüft werden, ob die zwei nachgewiesenen Punktmutationen (nt 460 und nt 719) auf einem Allel lokalisiert (TPMT\*1/\*3A), oder auf beiden Allelen verteilt sind (TPMT\*3B/\*3C). Während der heterozygote TPMT\*1/\*3A-Genotyp (wt/var) eine intermediäre TPMT-Aktivität zufolge hat, führt ein TPMT\*3B/\*3C-Genotyp (verbundene Heterozygotie) zu einer sehr niedrigen bis fehlenden Enzymaktivität und entspricht damit einem homozygoten var/var-Genotypen.

Die sichere Befundinterpretation der 21 (8.02%) Patienten, die in der vorliegenden Arbeit mit jeweils einer Heterozygotie bei Positionen nt 460 und nt 719 getestet wurden, bedurfte jedoch keiner weitergehenden genetischen Untersuchung, da sie alle in der Phänotypisierung eine intermediäre oder normale Enzymaktivität zeigten (12.4 - 36.7 nmol 6-MTG.g<sup>-1</sup>Hb.h<sup>-1</sup>). Dies schließt das Vorliegen eines

TPMT\*3B/\*3C-Genotypen sicher aus. Bei diesen Patienten handelt es sich damit zweifelsohne um heterozygote TPMT\*1/\*3A-Genotypen (wt/var).



**Abbildung 19.** TPMT-Aktivität der Patienten aufgeteilt nach ihrem Genotyp, dargestellt mit der gestrichelten Linie (#) als Entscheidungsgrenze zwischen der normalen und intermediären Enzymaktivität bei der angewendeten Methode  $23.5 \text{ nmol } 6\text{-MTG.g}^{-1}\text{Hb.h}^{-1}$ , und mit der durchgezogenen Linien die Mediane für die jeweilige Genotyp-Gruppe, mit rot gekennzeichnet sind die Proben mit diskrepanten Ergebnissen der Geno- und Phänotypisierung

Eine Zusammenfassung der statistischen Kenngrößen der ermittelten drei Genotyp-Gruppen bezüglich ihrer TPMT-Aktivität bietet Tabelle 12.

**Tabelle 12.** TPMT-Aktivität in  $\text{nmol } 6\text{-MTG.g}^{-1}\text{Hb.h}^{-1}$  (Phänotyp) der Patienten im Bezug auf ihren Genotyp, Min: Minimum, Max: Maximum, SEM: Standardfehler des Mittelwerts, SD: Standardabweichung, wt: wildtyp, var: variant

Genotyp	Phänotyp		Min	Max	Median	Mittelwert	SEM	SD
	n	%						
wt/wt	n=239	91.22%	16.2	82.9	41.2	43.7	0.914	14.1
wt/var	n=21	8.02%	12.4	36.7	21.3	23.4	1.42	6.48
var/var	n=2	0.76%	1.50	1.90	1.70	1.70	0.200	0.283

Der Median für TPMT-Aktivität lag bei den homozygoten wt/wt-Genotypen mit 41.2 nmol 6-MTG.g<sup>-1</sup>Hb.h<sup>-1</sup> signifikant höher (P<0.001) als bei den heterozygoten wt/var-Genotypen (Median 21.3 nmol 6-MTG.g<sup>-1</sup>Hb.h<sup>-1</sup>).

Ähnlich wie bei den Ergebnissen der Phänotypisierung (siehe 3.1.1) wurde auch hier von einer statistischen Analyse der homozygot Varianten (var/var) Patienten im Vergleich zu den beiden größeren Gruppen (wt/wt und wt/var) aufgrund der besonders kleinen Stichprobe (n=2) abgesehen. Die Ergebnisse dieser 2 Patienten (1.50 und 1.90 nmol 6-MTG.g<sup>-1</sup>Hb.h<sup>-1</sup>) lagen deutlich unterhalb der ermittelten Enzymaktivitäten bei den wt/wt- und wt/var-Genotypen und stimmten mit der zu erwartenden sehr niedrigen bis fehlenden Enzymaktivität sehr gut überein.

Bei Verwendung der für die Methode geltende Unterscheidungsgrenze von 23.5 nmol 6-MTG.g<sup>-1</sup>Hb.h<sup>-1</sup>(Kröplin et al. 1998a) kam es jedoch gelegentlich zu diskrepanten Ergebnissen der beiden Methoden. Diese Patienten, deren TPMT-Aktivität in Abbildung 19 in rot hervorgehoben wurde, zeigten entweder eine intermediäre Enzymaktivität, ohne dass sie eine der untersuchten Mutationen aufwiesen (TPMT\*1/\*1), oder aber eine normale Enzymaktivität trotz einer nachgewiesenen Heterozygotie (TPMT\*1/\*3A).

### 3.2.3 TPMT- Allelfrequenzen

Von 524 untersuchten TPMT-Allelen (262 Patienten) konnte das TPMT\*3A-Allel, wie unter 3.2.2 erläutert, 21 mal bei heterozygot varianten und 3 mal bei homozygot varianten Patienten (TPMT\*3A/\*3A und TPMT\*3A/\*3C) und somit insgesamt 24 mal nachgewiesen werden. Ein TPMT\*3C-Allel fand sich ein einziges Mal, während TPMT\*2 und \*3B nicht nachweisbar waren. Tabelle 13 zeigt die entsprechenden Allelfrequenzen.

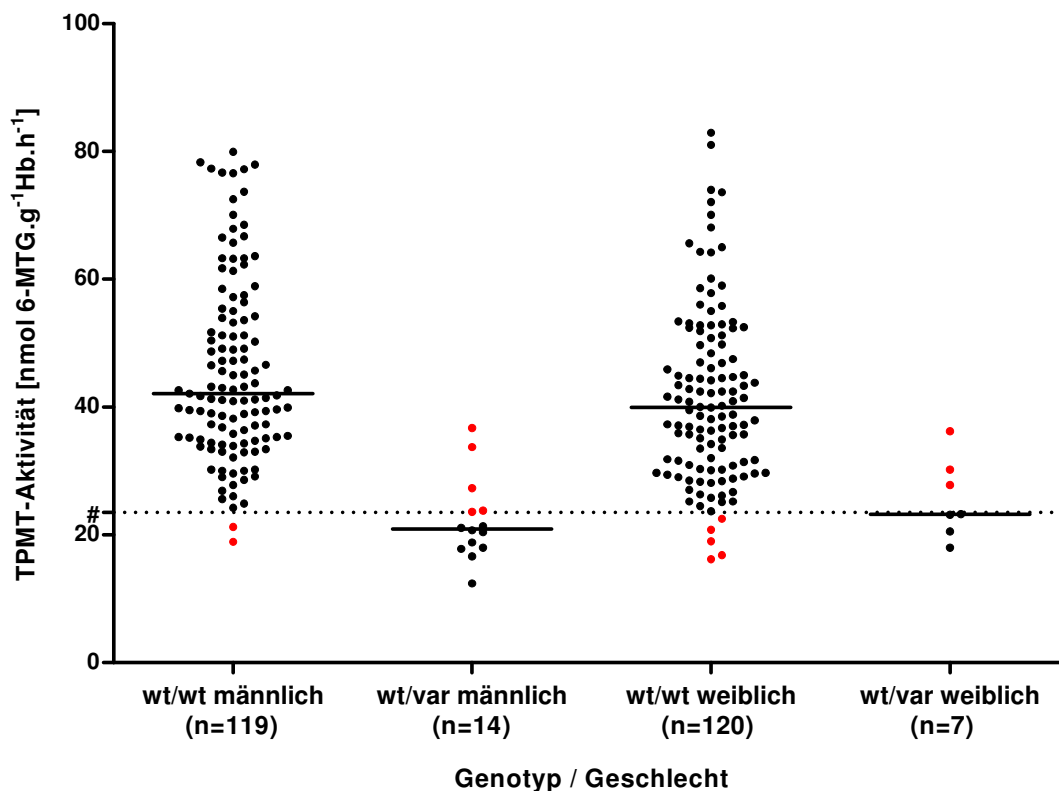
**Tabelle 13.** TPMT-Allelfrequenzen der untersuchten Patienten

	TPMT*1	TPMT*2	TPMT*3A	TPMT*3B	TPMT*3C	Total
<b>Anzahl</b>	499	-	24	-	1	524
<b>Frequenz [%]</b>	95.2	-	4.6	-	0.2	100



### 3.2.4 Genotyp/Phänotyp-Vergleich bei Männern und Frauen

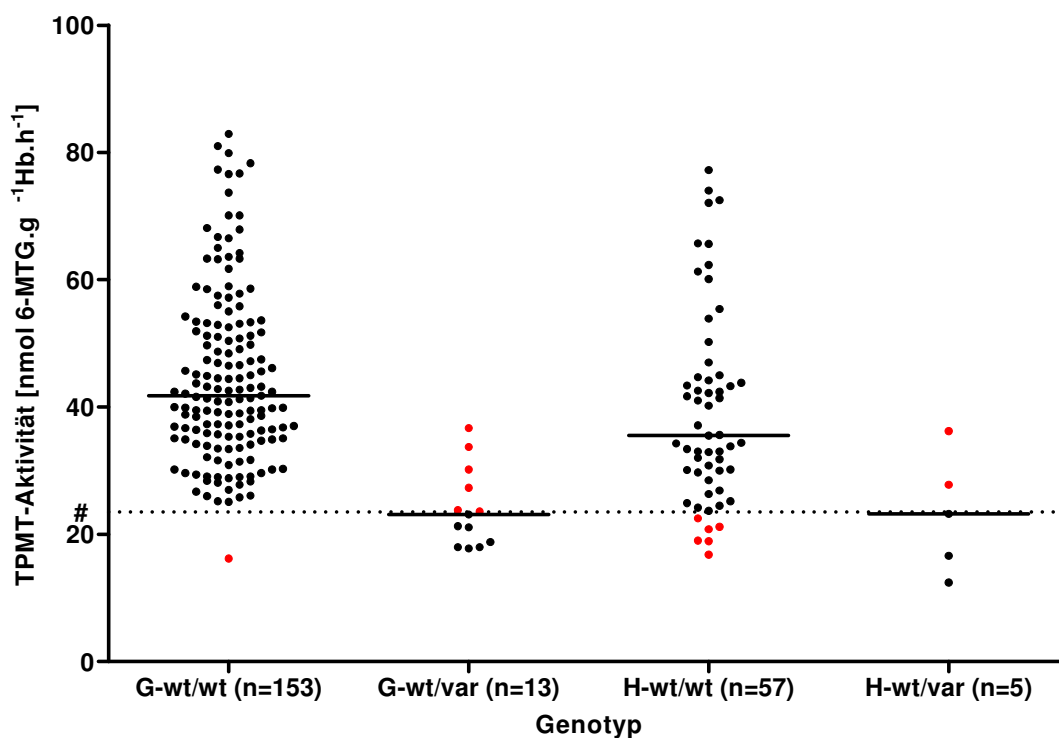
Männer ohne eine nachweisbare Mutation (wt/wt) zeigten, wie bereits unter 3.1.2.1 dargestellt, mit einem Median von 42.1 nmol 6-MTG.g<sup>-1</sup>Hb.h<sup>-1</sup> eine signifikant höhere (P<0.05) TPMT-Aktivität als wt/wt-Frauen (Median 40.0 nmol 6-MTG.g<sup>-1</sup>Hb.h<sup>-1</sup>). Bei den heterozygoten Varianten (wt/var) war ein gegensinniges Verhältnis bezüglich der Enzymaktivität zu beobachten. Hier lag der Median bei Frauen (23.2 nmol 6-MTG.g<sup>-1</sup>Hb.h<sup>-1</sup>) höher als bei Männern (20.9 nmol 6-MTG.g<sup>-1</sup>Hb.h<sup>-1</sup>). Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (P>0.05). Ähnlich wie beim Gesamtkollektiv (siehe 3.2.2) fand sich auch hier eine signifikant höhere Enzymaktivität bei den homozygoten wt/wt-Genotypen im Vergleich zu den heterozygoten wt/var-Genotypen, sowohl unter Männern (P<0.001) wie auch unter Frauen (P<0.01). Abbildung 20 zeigt die Einzelwerte der Patienten, wobei die diskrepanten Ergebnisse beider Methoden in rot dargestellt wurden.



**Abbildung 20.** TPMT-Aktivität der Patienten aufgeteilt nach Genotyp und Geschlecht, dargestellt mit der gestrichelten Linie (#) als Entscheidungsgrenze zwischen der normalen und intermediären Enzymaktivität bei der angewendeten Methode 23.5 nmol 6-MTG.g<sup>-1</sup>Hb.h<sup>-1</sup>, und mit der durchgezogenen Linien die Mediane für die jeweilige Gruppe, mit rot gekennzeichnet sind die Proben mit diskrepanten Ergebnissen der Geno- und Phänotypisierung

### 3.2.5 Genotyp/Phänotyp-Vergleich bei verschiedenen Erkrankungen

Wie bereits unter 3.1.2.2 dargestellt, hatten homozygote wt/wt-Genotypen im gastroenterologischen Kollektiv eine signifikant höhere Enzymaktivität ( $P < 0.01$ ) als die des hämatologischen Kollektivs (Median 41.8 vs. 35.5 nmol 6-MTG.g<sup>-1</sup>Hb.h<sup>-1</sup>). Solch ein Unterschied konnte bei den heterozygoten wt/var-Genotypen zwischen den beiden Kollektiven jedoch nicht festgestellt werden ( $P > 0.05$ ). Hier lag der Median der Enzymaktivität der gastroenterologischen und der hämatologischen Patienten mit 23.1 und 23.2 nmol 6-MTG.g<sup>-1</sup>Hb.h<sup>-1</sup> in gleicher Höhe, knapp unterhalb der Entscheidungsgrenze der Methode (23.5 nmol 6-MTG.g<sup>-1</sup>Hb.h<sup>-1</sup>).



**Abbildung 21.** TPMT-Aktivität und Genotyp der Patienten des gastroenterologische (G) und hämatologischen (H) Kollektivs, mit rot gekennzeichnet sind die Proben mit diskrepanten Ergebnissen der Geno- und Phänotypisierung bei Anwendung der Entscheidungsgrenze von 23.5 nmol 6-MTG.g<sup>-1</sup>Hb.h<sup>-1</sup> (#gestrichelte Linie). Durchgezogene Linien: Mediane der TPMT-Aktivität für die jeweilige Gruppe

Ähnlich wie beim Gesamtkollektiv (siehe 3.2.2) fand sich auch hier eine signifikant höhere Enzymaktivität bei den homozygoten wt/wt-Genotypen im Vergleich zu den heterozygoten wt/var-Genotypen, sowohl im gastroenterologischen ( $P < 0.001$ ), als auch im hämatologischen Kollektiv ( $P < 0.05$ ). Abbildung 21 stellt die Einzelwerte der Patienten dar. Die diskrepanten Ergebnisse beider Methoden sind wiederum

farblich (rot) gekennzeichnet. Die Zusammensetzung dieser Patientenkollektive wird im Folgenden näher erläutert.

### 3.2.6 Konkordanz und Diskrepanz beider Methoden

Unter Anwendung einer Unterscheidungsgrenze zwischen der normalen und intermediären TPMT-Aktivität von  $23.5 \text{ nmol } 6\text{-MTG}\cdot\text{g}^{-1}\text{Hb}\cdot\text{h}^{-1}$  (Kröplin et al. 1998a) fand sich bei 247 von 262 untersuchten Patienten (94.3%) eine Übereinstimmung der Ergebnisse von Geno- und Phänotypisierung. So hatten 232 Patienten ohne nachweisbare Mutationen eine normale, 13 heterozygot varianten Patienten (TPMT\*1/\*3A) eine reduzierte (intermediäre) Enzymaktivität. Die zwei als homozygot variant getesteten Patienten zeigten erwartungsgemäß eine extrem niedrige Enzymaktivität und konnten somit mit den beiden eingesetzten Methoden (Geno- und Phänotypisierung) sicher diagnostiziert werden. Im Gegensatz dazu kam es bei 15 Patienten (5.7%) zu diskrepanten Ergebnissen. Die ermittelte Enzymaktivität verhielt sich hier gegensinnig zu den detektierten Genotypen. Während 7 Patienten ohne nachweisbaren Mutationen eine intermediäre TPMT-Aktivität zeigten, wiesen 8 heterozygot varianten Patienten (TPMT\*1/\*3A) eine normale Enzymaktivität auf.

**Tabelle 14.** Vergleich der mittels Phäno- und Genotypisierung erzielten Ergebnisse für 262 Patienten mit den wt/wt- (TPMT\*1/\*1), wt/var- (TPMT\*1/\*3A) und var/var-Genotypen (TPMT\*3A/\*3A und TPMT\*3A/\*3C), in rot dargestellt sind die diskrepanten Ergebnisse

Genotyp		Phänotyp	normale	intermediäre	fehlende
			TPMT-Aktivität	TPMT-Aktivität	TPMT-Aktivität
wt/wt	(TPMT*1/*1)	n=239	232	7	-
wt/var	(TPMT*1/*3A)	n=21	8	13	-
var/var	(TPMT*3A/*3A) (TPMT*3A/*3C)	n=2	-	-	2

Eine Übersicht dieser Ergebnisse bietet die Tabelle 14. Die Patienten mit diskrepanten Ergebnissen sind dabei ähnlich wie in Abbildungen 19, 20 und 21 in rot dargestellt und werden im Folgenden unter Berücksichtigung ihres Geschlechts sowie ihres Krankheitsbilds näher betrachtet.

### 3.2.6.1 Diskrepanze Ergebnisse bei verschiedenen Erkrankungen

Alle 15 Patienten mit diskrepanzen Ergebnissen gehörten entweder dem gastroenterologischen oder dem hämatologischen Kollektiv an. Die Phänotyp-/Genotyp-Ergebnisse dieser zwei Kollektive werden deshalb in den Tabellen 15 und 16 vergleichend dargestellt. Von insgesamt 7 Patienten mit diskrepanzen Ergebnissen im gastroenterologischen Kollektiv (Tabelle 15) zeigten 6 heterozygot variante Patienten (85.7%) phänotypisch eine normale Enzymaktivität. Ohne eine nachweisbare Mutation hatte hingegen ein Patient (14.3%) eine intermediäre Enzymaktivität.

**Tabelle 15.** Vergleich der mittels Phäno- und Genotypisierung erzielten Ergebnisse für 166 Patienten des gastroenterologischen Kollektivs mit den wt/wt- (TPMT\*1/\*1) und wt/var-Genotypen (TPMT\*1/\*3A), in rot dargestellt sind die diskrepanzen Ergebnisse

Phänotyp		normale TPMT-Aktivität	intermediäre TPMT-Aktivität
wt/wt (TPMT*1/*1)	n=153	152	1
wt/var (TPMT*1/*3A)	n=13	6	7

Eine deutlich andere Verteilung fand sich bei den hämatologischen Patienten (Tabelle 16). Hier hatten 6 von 8 Patienten mit diskrepanzen Ergebnissen (75%) eine intermediäre TPMT-Aktivität, ohne dass eine Mutation nachgewiesen werden konnte. 2 Patienten (25%) hatten bei einer normalen Enzymaktivität einen heterozygoten Genotyp.

**Tabelle 16.** Vergleich der mittels Phäno- und Genotypisierung erzielten Ergebnisse für 62 Patienten des hämatologischen Kollektivs mit den wt/wt- (TPMT\*1/\*1) und wt/var-Genotypen (TPMT\*1/\*3A), in rot dargestellt sind die diskrepanzen Ergebnisse

Phänotyp		normale TPMT-Aktivität	intermediäre TPMT-Aktivität
wt/wt (TPMT*1/*1)	n=57	51	6
wt/var (TPMT*1/*3A)	n=5	2	3

### 3.2.6.2 Diskrepanze Ergebnisse bei Männern und Frauen

Wie in Abbildung 20 (Abschnitt 3.2.4) bereits dargestellt zeigten 7 Männer und 8 Frauen diskrepanze Phänotyp-/Genotyp-Ergebnisse. Von insgesamt 7 Patienten zeigten 5 (71.4%) bei einer Heterozygotie (wt/var) eine normale TPMT-Aktivität, während 2 Patienten (28.6%) eine intermediäre Enzymaktivität hatten, obwohl keine der untersuchten Mutationen nachweisbar waren. Tabelle 17 gibt bei diskrepanzen Fällen zusätzlich einen Hinweis auf die Zugehörigkeit der Patienten zu dem gastroenterologischen (G) oder hämatologischen (H) Kollektiv.

**Tabelle 17.** Vergleich der mittels Phäno- und Genotypisierung erzielten Ergebnisse für 133 (männlichen) Patienten mit den wt/wt- (TPMT\*1/\*1) und wt/var-Genotypen (TPMT\*1/\*3A), in rot dargestellt sind die diskrepanzen Ergebnisse, H: hämatologisches und G: gastroenterologisches Kollektiv

Phänotyp		Genotyp	normale	intermediäre
			TPMT-Aktivität	TPMT-Aktivität
wt/wt	(TPMT*1/*1)	n=119	117	2 (H; H)
wt/var	(TPMT*1/*3A)	n=14	5 (G; G; G; G; G)	9

Analog dazu stellt Tabelle 18 die diskrepanzen Ergebnisse der 8 von 127 untersuchten Patientinnen dar. Hier hatten 3 von 8 Patientinnen (37.5%) eine normale Enzymaktivität trotz einer Heterozygotie (wt/var), und 5 von 8 Patientinnen (62.5%) eine intermediäre TPMT-Aktivität ohne nachweisbare Mutationen (wt/wt).

**Tabelle 18.** Vergleich der mittels Phäno- und Genotypisierung erzielten Ergebnisse für 127 Patientinnen mit den wt/wt- (TPMT\*1/\*1) und wt/var-Genotypen (TPMT\*1/\*3A), in rot dargestellt sind die diskrepanzen Ergebnisse, H: hämatologisches und G: gastroenterologisches Kollektivs

Phänotyp		Genotyp	normale	intermediäre
			TPMT-Aktivität	TPMT-Aktivität
wt/wt	(TPMT*1/*1)	n=120	115	5 (H; H; H; H; G)
wt/var	(TPMT*1/*3A)	n=7	3 (G; H; H)	4

Die Patientinnen und Patienten mit diskrepanzen Ergebnissen ließen zusammengenommen hier eine identische Verteilung bezüglich ihres zugrunde liegenden Krankheitsbilds erkennen, wie dies zuvor unter 3.2.6.1 dargestellt wurde.

## 4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, eine sichere und in einem Routinelabor realisierbare Strategie zu entwickeln, mit der das Risiko einer schwerwiegenden lebensbedrohlichen toxischen Knochenmarksschädigung durch TPMT-Defizienz vor Beginn einer Therapie mit Thiopurin-Medikamenten abgeschätzt und möglichst vermieden werden kann. Zu diesem Zweck wurden 262 Patienten unter Anwendung beider etablierten Untersuchungsansätze, Phänotypisierung und Genotypisierung, hinsichtlich ihres TPMT-Status untersucht.

### 4.1 TPMT-Aktivität - Eigene Ergebnisse und publizierte Daten

Die ermittelte TPMT-Aktivität der Patienten (Phänotypisierung) in dieser Arbeit folgte mit 91.6% für Normal-, 7.6% für Intermediär- und 0.76% für Nicht-methylierer dem bekannten trimodalen Muster und zeigte eine ähnliche prozentuale Verteilung wie in mehreren Veröffentlichungen für vergleichbare Individuen mit normaler bzw. intermediärer Enzymaktivität beschrieben (Weinshilboum und Sladek 1980; McLeod et al. 1994; Indjova et al. 2003; Gisbert et al. 2007). Die für Patienten mit sehr niedriger TPMT-Aktivität zu erwartende Häufigkeit von 0.3% (Weinshilboum und Sladek 1980; Indjova et al. 2003) haben wir jedoch mit 0.76% (2 von 262 getesteten Patienten) am ehesten zufallsbedingt übertroffen. Erwartungsgemäß fand sich ein deutlicher TPMT-Aktivitätsunterschied zwischen den Normal-, den Intermediär- und den Nichtmethylierern in allen untersuchten Kollektiven.

Die errechneten Allelfrequenzen für TPMT\*1, \*3A und \*3C waren mit jeweils 95.2%, 4.6% und 0.2% ähnlich wie zuvor von anderen Autoren für Kaukasier z.B. aus Deutschland (Schaeffeler et al. 2004), Frankreich (Spire-Vayron de la Moureyre et al. 1998a) oder England (Collie-Duguid et al. 1999) publiziert. Ein TPMT\*3B-Allel fand sich ähnlich wie in diesen Untersuchungen auch bei unseren Patientenkollektiven nicht. Zudem war auch das TPMT\*2-Allel in unseren Kollektiven nicht nachweisbar.

### 4.2 TPMT-Aktivität bei Männern und Frauen

Ähnlich wie bei Untersuchungen von Klemetsdal et al., Micheli et al., Indjova et al., Schaeffeler et al. und Tamm et al. fanden wir auch eine signifikant höhere TPMT-

Aktivität bei Männern im Vergleich zu Frauen (Klemetsdal et al. 1993; Micheli et al. 1997; Indjova et al. 2003; Schaeffeler et al. 2004; Tamm et al. 2008). Dies war jedoch nur bei Patienten ohne Mutation (wt/wt) nachweisbar. Unter den heterozygot varianten (wt/var) Patienten zeigten Frauen eine leicht höhere TPMT-Aktivität als Männer, wobei dieser Unterschied statistisch nicht signifikant war. Die Ursache hierfür könnte die interindividuelle Variabilität der Enzymaktivität in Verbindung mit der geringen Fallzahl sein (lediglich 14 Männer und 7 Frauen).

Meinen Daten und denen einer Reihe weiterer oben erwähnter Veröffentlichungen, welche von einer höheren TPMT-Aktivität bei Männern berichten, stehen eben so viele Untersuchungen entgegen, die diesbezüglich entweder keinen signifikanten Unterschied nachweisen konnten (Jacqz-Aigrain et al. 1994; Rossi et al. 2001; Ford et al. 2004; Hindorf et al. 2004; Wusk et al. 2004; Wei et al. 2005), oder aber diesen lediglich bei einzelnen Altersgruppen fanden (Serpe et al. 2009).

Während die TPMT-Aktivitätsunterschiede jeweils zwischen den Normal- (wt/wt), Intermediär- (wt/var) und Nichtmethylierern (var/var) deutlich ausgeprägt sind, fällt der bisweilen zu beobachtende Unterschied der TPMT-Aktivität zwischen Männern und Frauen sehr gering aus. Dies konnte unter anderem in einer spanischen Studie mit mehr als 14000 Patienten eindrucksvoll demonstriert werden. Dort fand sich diesbezüglich zwar ein statistisch signifikanter Unterschied der TPMT-Aktivität (20.4 U/ml für Männer vs. 19.9 U/ml für Frauen), der jedoch äußerst knapp ausfiel und daher von den Autoren als wahrscheinlich klinisch irrelevant angesehen wurde (Gisbert et al. 2007). Die von mir ermittelten Daten weisen hier einen ähnlich kleinen Unterschied auf (42.1 vs. 40.0 nmol 6-MTG.g<sup>-1</sup>Hb.h<sup>-1</sup> für Männer und Frauen). Bei deutlich geringerer Fallzahl wurden hier die Träger des varianten TPMT-Gens, welche bezüglich ihres Geschlechts nicht gleich verteilt waren (w:m=8:15), in meine Berechnungen nicht eingeschlossen.

Eine Anpassung der Entscheidungsgrenze im Sinne eines geschlechtsspezifischen cut-offs würde, wie aus Abbildung 20 ersichtlich ist, weder bei Frauen noch bei Männern zu einer besseren Diskriminierung zwischen Individuen mit normaler und mit intermediärer TPMT-Aktivität führen. Bei einer Herabsetzung der Entscheidungsgrenze würden zwar weniger Trägerinnen des wt/wt-Genotypen eine intermediäre Enzymaktivität aufweisen, dafür jedoch mehr Heterozygote wt/var-Patientinnen mit einer Aktivität über der Entscheidungsgrenze als Patientinnen mit normaler TPMT-Aktivität fehlinterpretiert werden. In ähnlicher

Weise kann auch bei Männern (Abbildung 20) durch eine Änderung des cut-offs die Diskrepanz einzelner Ergebnisse nicht behoben werden. Deshalb sollte auch nach meinen eigenen Untersuchungen der beobachtete geschlechtsspezifische Unterschied der TPMT-Aktivität als klinisch nicht relevant eingestuft werden.

### **4.3 TPMT-Aktivität bei verschiedenen Erkrankungen**

Wir fanden einen signifikanten Unterschied zwischen den Medianen des gastroenterologischen (41.8 nmol 6-MTG.g<sup>-1</sup>Hb.h<sup>-1</sup>) und des hämatologischen Kollektivs (35.5 nmol 6-MTG.g<sup>-1</sup>Hb.h<sup>-1</sup>). Der Grund für diese Differenz kann einerseits die unterschiedliche Größe der jeweiligen Kollektive in Verbindung mit einer unterschiedlichen Verteilung bezüglich des Geschlechts bzw. der aktuellen Haupt- und Komedikation sein. Andererseits können bestimmte eventuell krankheitsspezifische Probeneigenschaften die Ursache für die beobachtete Differenz sein.

Obwohl die beiden Kollektive nicht gleich groß waren, bestanden sie zu je einer Hälfte aus Männern und Frauen. Zudem war die ermittelte Aktivitätsdifferenz zwischen Männern und Frauen sehr gering, sodass hier das Geschlecht als Ursache für die unterschiedliche TPMT-Aktivität der gastroenterologischen und hämatologischen Kollektive ausgeschlossen werden kann.

Beim Thiopurin-Metabolismus werden seit längerem medikamentös bedingte Induktions- und Inhibitionsphänomene der beteiligten Enzyme zum Teil kontrovers diskutiert. Während die Rolle der Xanthinoxidase-Inhibitoren wie Allopurinol bei einer Therapie mit 6-Mercaptopurin und deren Prodrug Azathioprin unumstritten ist und gelegentlich auch zur Feinjustierung der Dosis genutzt wird (Zimm et al. 1983; Ansari et al. 2009), ist die Datenlage bezüglich des Einflusses von Thiopurinen selbst und Aminosalizylaten, die bei der Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen häufig eingesetzt werden, auf die TPMT-Aktivität widersprüchlich. Neben mehreren Veröffentlichungen, die von einer Induktion der TPMT-Aktivität durch Thiopurin-Gabe bzw. einer Inhibition durch Aminosalizylate ausgehen (Lennard et al. 1990; McLeod et al. 1995; Lewis et al. 1997; Evans et al. 2001; Lowry et al. 2001; Dewit et al. 2002), gibt es Untersuchungen, die diesbezüglich entweder gar keinen bzw. keinen relevanten Effekt zeigen konnten (Wusk et al. 2004; Dilger et al. 2007; Gisbert et al. 2007; Daperno et al. 2009).



Zum Zeitpunkt der Probenentnahme zur Untersuchung des TPMT-Status erhielten einige Patienten bereits eine Thiopurin-Therapie. Aufgrund fehlender Angaben konnte jedoch eine Zuordnung der einzelnen Patienten hinsichtlich ihrer Thiopurin- und weiteren Komedikation nicht durchgeführt werden. Nichtsdestotrotz könnte der Anteil an Patienten, die bereits eine Thiopurin-Therapie erhielten, im gastroenterologischen Kollektiv höher gelegen haben als im hämatologischen Kollektiv, was häufiger eine Induktion des Enzyms bewirkt haben könnte. Unter Einschluss der Träger der genetischen TPMT-Varianten fand ich für die Patienten des gastroenterologischen Kollektivs eine TPMT-Aktivität von  $40.0 \text{ nmol } 6\text{-MTG}\cdot\text{g}^{-1}\text{Hb}\cdot\text{h}^{-1}$  im Median, die nur geringfügig höher liegt als die von Kröplin et al. (mit der gleichen Methode) für gesunde Blutspender ermittelte TPMT-Aktivität von  $38.8 \text{ nmol } 6\text{-MTG}\cdot\text{g}^{-1}\text{Hb}\cdot\text{h}^{-1}$  (Kröplin et al. 1998a). Diese Differenz fällt jedoch deutlich niedriger aus als der zu erwartende Aktivitätsanstieg von etwa 35% (Evans et al. 2001) bei der Annahme einer Thiopurin bedingten Enzyminduktion. Eine gleichzeitige Enzyminhibition durch Aminosalizylate könnte hier die Ursache sein. Ein direkter Vergleich der TPMT-Aktivität zwischen hämatologischen und gastroenterologischen Patienten mit größeren Fallzahlen ist mir aus der Literatur nicht bekannt. Von Khalil et al. konnte jedoch gezeigt werden, dass die an ALL erkrankten Kinder bei der Diagnosestellung eine niedrigere TPMT-Aktivität im Vergleich zu gesunden Erwachsenen aufweisen (Khalil et al. 2005).

Für die Patienten des hämatologischen Kollektivs fand ich, unter Einschluss der Träger der genetischen TPMT-Varianten, eine TPMT-Aktivität von  $34.3 \text{ nmol } 6\text{-MTG}\cdot\text{g}^{-1}\text{Hb}\cdot\text{h}^{-1}$  im Median, die niedriger lag als die von Kröplin et al. ermittelte TPMT-Aktivität für gesunde Blutspender von  $38.8 \text{ nmol } 6\text{-MTG}\cdot\text{g}^{-1}\text{Hb}\cdot\text{h}^{-1}$  (Kröplin et al. 1998a). Damit zeigten meine Ergebnisse eine ähnliche Tendenz wie die von Khalil et al. Dieses Phänomen wurde auch von anderen Autoren in Zusammenhang mit der TPMT-Aktivitätsbestimmung bei ALL-Patienten beobachtet. So zeigten pädiatrische ALL-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine niedrigere TPMT-Aktivität als gesunde Kinder mit einem anschließenden Aktivitätsanstieg nach der Induktionstherapie (Brouwer et al. 2005) oder aber sechs Monate nach Therapiebeginn (Fakhoury et al. 2007). Als Grund für diese Beobachtungen wurde die überalterte Erythrozytenpopulation der zum Zeitpunkt der Diagnosestellung anämischen Patienten diskutiert. Infolge der krankheitsbedingten Störung der Neubildung von Erythrozyten ist der Anteil an

alten Erythrozyten in der Zirkulation erhöht. Andererseits ist davon auszugehen, dass die Aktivität des vorhandenen Enzym-Besatzes der Erythrozyten durch natürliche degenerative Prozesse mit zunehmendem Alter der kernlosen Erythrozyten, die die Fähigkeit zur Proteinbiosynthese weitgehend verloren haben, sinkt. Bei einer Fraktionierung der Erythrozyten nach Alter konnte von Lennard et al. gezeigt werden, dass jüngere Erythrozyten im Vergleich zu älteren Erythrozyten sowohl bei Gesunden wie auch bei pädiatrischen ALL-Patienten eine deutlich höhere TPMT-Aktivität aufweisen (Lennard et al. 2001).

Die von mir ermittelte signifikant höhere TPMT-Aktivität der gastroenterologischen im Vergleich zu hämatologischen Patienten konnte ebenfalls in diesem Zusammenhang gesehen werden. Diese Patienten, die hauptsächlich an Morbus Crohn bzw. Colitis ulcerosa erkrankt waren, könnten durch Blutverlust über Darmläsionen eine kompensatorisch gesteigerte Erythropoese haben, welche mit einem erhöhten Anteil an jüngeren Erythrozyten einhergeht. Dies könnte die höhere TPMT-Aktivität dieser Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden und erst recht zu den anämischen ALL-Patienten erklären, die eine überalterte Erythrozytenpopulation besitzen.

#### **4.4 Konkordanz und Diskrepanz der Ergebnisse beider Methoden**

Wir erreichten bei 262 getesteten Patienten eine Gesamtkonkordanzrate von 94.3% zwischen den beiden eingesetzten Methoden Phäno- und Genotypisierung. Die Diskrepanzrate betrug dabei 5.7%.

Bei Untersuchungen mit größeren Fallzahlen unter Kaukasiern wurden unterschiedliche Konkordanzraten von 71.6% (Serpe et al. 2009) bis 98.4% (Schaeffeler et al. 2004) berichtet. In einer weiteren Untersuchung lag die Konkordanzrate insgesamt bei 97%, zwischen intermediärer TPMT-Aktivität und heterozygot variantem Genotypen war sie mit 79% jedoch deutlich niedriger (Ford et al. 2006).

Bei einer Untersuchung von 14832 Patienten variierte die monatliche Konkordanzrate zwischen intermediärer TPMT-Aktivität und heterozygot variantem Genotypen von 67% bis 90%. Hier waren 44 Patienten phänotypisch als Nichtmethylierer getestet, von denen bei 2 Patienten nur ein variantes Allel und bei einem anderen keine der häufigen Mutationen nachweisbar waren (Ford et al.

2009). Auch in dem von mir untersuchten gastroenterologischen Kollektiv zeigte ein Patient unter 166 Patienten eine intermediäre TPMT-Aktivität, ohne Träger einer der getesteten häufigen Mutationen zu sein (Tabelle 15). Dieser Patient könnte Träger einer weiteren nicht getesteten Variante des TPMT-Gens sein, welche mit den gängigen Genotypisierungsmethoden übersehen werden kann. Deutlich anders war das Zahlenverhältnis im hämatologischen Kollektiv, wo sechs von 62 Patienten bei einer intermediären Enzymaktivität keine der getesteten Mutationen aufwiesen (Tabelle 16). Es ist äußerst unwahrscheinlich, dass hier knapp 10% der Patienten eine der sehr seltenen nicht getesteten Mutationen (TPMT\*3D-TPMT\*28), die zum Teil nur bei Einzelpersonen nachgewiesen wurden oder aber eine noch unbekannte Mutation trügen. Aus diesem Grund verzichteten wir auf eine aufwendige und kostenintensive Sequenzierung des gesamten TPMT-Gens. Viel mehr scheint diese Häufung an diskrepanten Ergebnisse im hämatologischen Kollektiv mit dem zuvor beschriebenen Phänomen der niedrigeren TPMT-Aktivität bei überalterter Erythrozytenpopulation zusammenzuhängen.

Im gastroenterologischen Kollektiv (Tabelle 15) zeigte der Hauptteil der Fälle mit diskrepantem Ergebniss der Phäno- und Genotypisierung (6 von insgesamt 7) im Gegensatz zu den hämatologischen Patienten eine oberhalb der Entscheidungsgrenze liegende und damit als normal eingestufte TPMT-Aktivität trotz einer nachgewiesenen Heterozygotie (TPMT\*3A/\*1). Der Grund hierfür könnte eine Enzyminduktion sein. Solch eine Induktion der TPMT-Aktivität wird seit längerem für die Thiopurin-Medikamente selbst, wie schon erwähnt, kontrovers diskutiert. Zum Teil erhielten die von mir untersuchten Patienten bereits zum Zeitpunkt der Blutentnahme eine Thiopurin-Therapie. Eine genaue Zuordnung war uns jedoch aufgrund fehlender Angaben nicht möglich.

Eine weitere, wahrscheinlichere Erklärung kann wiederum das Verteilungsmuster des Erythrozytenalters liefern. Diese hauptsächlich an Morbus Crohn bzw. Colitis ulcerosa erkrankten Patienten haben bedingt durch chronische Blutungen aus dem Darm sehr wahrscheinlich eine gesteigerte Hämatopoese und folglich mehr junge Erythrozyten, welche (in Analogie zu ALL-Patienten) eine höhere Enzymaktivität zeigen, als bei einer Heterozygotie zu erwarten wäre. Eindrucksvoll ist in diesem Zusammenhang auch ein Fallbericht einer Patientin, die unter Thiopurin-Medikation wahrscheinlich infektionsbedingt eine

Knochenmarksuppression und Panzythopenie entwickelte. Während der Erholungsphase des Knochenmarks zeigte sie eine sehr hohe TPMT-Aktivität von  $182 \text{ nmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , welche nach etwa 6 Wochen auf  $43 \text{ nmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$  abgefallen war (de Boer et al. 2008). Da die Patientin keine Erythrozytenkonzentrate bekommen hatte, wurde der Exzess an jungen Erythrozyten als Ursache für die anfänglich hohe Enzymaktivität angesehen. Der im späteren Verlauf bedingt durch natürliche Alterungsprozesse der Erythrozyten inklusive ihres TPMT-Enzymbesatzes auf ein deutlich niedrigeres Niveau abgesunkene Wert ist diejenige Enzym-Aktivität, die den TPMT-Status der Patientin diagnostisch richtig erfassen kann, während es bei einer alleinigen Untersuchung zum ersten Zeitpunkt mit dem Exzess an jungen Erythrozyten zu Fehlinterpretationen in der Befundung des ermittelten Ergebnisses kommen kann. Das Erythrozytenalter stellt somit bei der Phänotypisierung eine wichtige in vivo Einflussgröße dar. Dies bedeutet, dass eine analytisch richtig ermittelte TPMT-Aktivität aufgrund besonderer Patientenspezifischer Gegebenheiten, hier einer von der Norm abweichenden Alterszusammensetzung der Erythrozyten, zu einem klinisch falschen Befund des TPMT-Status führen kann. Solch eine in vivo Einflussgröße sollte, soweit nicht vermeidbar, bei der Interpretation der Ergebnisse stets bekannt sein, um fragliche Befunde der Phänotypisierung ggf. mit der Alternativmethode Genotypisierung zu verifizieren. Ähnliches gilt für Patienten nach Transfusion von Erythrozytenkonzentraten in den letzten 6 bis 12 Wochen vor der Blutentnahme. Hier sollte gleich die Genotypisierung angewendet werden (Deufel et al. 2004), da eine komplette TPMT-Defizienz bzw. eine intermediäre Enzym-Aktivität durch die in der Zirkulation vorhandenen Fremderythrozyten maskiert werden kann.

#### **4.5 Vor- und Nachteile beider Methoden**

Bei meinen Untersuchungen konnte ich zwei besonders gefährdete Patienten mit einer kompletten TPMT-Defizienz sowohl mit der Phänotypisierung (Aktivitätsmessung) wie auch mit der Genotypisierung sicher diagnostizieren. Für die Phänotypisierung ist jedoch entscheidend, dass eine Erythrozytentransfusion vor der Blutentnahme sicher ausgeschlossen werden muss. Dies erfordert auf der Einsenderseite besondere Aufmerksamkeit bei der Erstellung des Laborauftrags. Die Information zu eventuellen Bluttransfusionen sollte anhand des

Verlegungsberichts oder im Rahmen der Anamneseerhebung eingeholt werden. Um eine nachträgliche Fehlinterpretation der Untersuchungsergebnisse zu vermeiden, weisen wir bei jeder TPMT-Befundung auf diese diagnostische Einschränkung der Methode hin. Hat eine Bluttransfusion zuvor stattgefunden, darf eine Phänotypisierung erst zu einem späteren Zeitpunkt, frühestens 6 Wochen nach der Transfusion angewendet werden. Alternativ kann eine sofortige Genotypisierung durchgeführt werden, die durch Fremderythrozyten nicht beeinträchtigt wird. Von diesem speziellen Umstand abgesehen ist die Phänotypisierung bei der Fragestellung nach einer kompletten TPMT-Defizienz diagnostisch sicher.

Die meisten PCR-Methoden für die Routinediagnostik, wie auch der in dieser Arbeit verwendete PCR-Kit, untersuchen die drei häufigsten Punktmutationen an den Nukleotidpositionen nt 238, nt 460 und nt 719 für die Allele TPMT\*2, \*3B und \*3C (Mutationen an beiden Positionen nt 460 und nt 719 TPMT\*3A), die für bis zu 95% aller Fälle mit intermediärer und defizienter TPMT-Aktivität verantwortlich sind (Evans et al. 2001). Liegt eine bzw. zwei der sehr seltenen Varianten (TPMT\*3D - \*28) oder noch nicht bekannte Mutationen vor, würde die Genotypisierung bei der Diagnose einer kompletten TPMT-Defizienz versagen. Die Phänotypisierung kann auch in solchen Fällen mit einer extrem niedrigen bis nichtdetektierbaren Enzymaktivität ein sicheres Ergebnis liefern.

Bei der Unterscheidung zwischen Normal- und Intermediär-Methylierern hingegen kommt es in der Phänotypisierung bei Ergebnissen um die cut-off Grenze der Methode gelegentlich zu diskrepanten Befunden im Vergleich zur Genotypisierung. Da dieser Effekt sehr wahrscheinlich durch die bereits erwähnte in vivo Einflussgröße Erythrozytenalter verursacht wird, ist die Kenntnis der zugrunde liegende Erkrankung, die eine deutliche Verschiebung der Alterszusammensetzung der Erythrozyten verursachen kann, für die Befundinterpretation notwendig, um ggf. mit einer anschließenden Genotypisierung eine Heterozygotie beweisen bzw. ausschließen zu können.

Um die Unterscheidung zwischen Normal- und Intermediär-Methylierern mit der Phänotypisierung zu verbessern, könnte eine Anpassung der cut-off Grenze bzw. ein Korrekturfaktor für die ermittelten Ergebnisse sinnvoll sein, welche der Einflussgröße Erythrozytenalter in diesem Zusammenhang Rechnung trägt. Dazu sind weitere Untersuchungen notwendig, die neben einer Phäno- und

Genotypisierung, wie in dieser Arbeit, auch eine Bestimmung der Retikulozytenzahl als Maß für die Alterszusammensetzung der Erythrozyten beinhalten sollten, die im Gegensatz zu einer Fraktionierung der Erythrozyten nach ihrem Alter in einem Routinelabor durchgeführt werden kann.

Bei der Diagnostik einer TPMT-Heterozygotie sind die unterschiedlichen Genotypisierungsmethoden nicht gleichwertig. Während einige Methoden wie z.B. Long-Range-PCR bei jeweils einer Heterozygotie in den Positionen nt 460 und nt 719 zwischen beiden möglichen Genotypen TPMT\*3A/\*1 und TPMT\*3B/\*3C sicher unterscheiden können, sind die am häufigsten verwendeten PCR-Methoden mit Farbstoff-markierten sequenzspezifischen Oligonukleotidsonden dazu nicht in der Lage. Dies stellt eine diagnostische Lücke für solch eine PCR-Methode dar, die ansonsten bezüglich einzelner Punktmutationen eindeutige Ergebnisse liefert. Diese diagnostische Lücke ist allerdings sehr klein, da das Vorkommen vom TPMT\*3B/\*3C-Genotypen (verbundene Heterozygotie) unter Kaukasiern mit einem Individuum unter mehr als 500000 als extrem selten geschätzt wird (Relling et al. 2011b).

Eine Überprüfung des Genotypisierungsbefundes mit der Phänotypisierung kann alternativ zur Long-Range-PCR oder zu Haplotypisierungsmethoden eingesetzt werden, um einerseits zwischen den TPMT\*3A/\*1- und TPMT\*3B/\*3C-Genotypen sicher unterscheiden zu können, und andererseits Indizien für das Vorliegen seltenerer nicht getesteter Mutationen zu liefern.

Die zur Phänotypisierung verwendeten Methoden sind meist sehr unterschiedlich aufgebaut und wenig standardisiert. Ihre Ergebnisse unterscheiden sich (je nach eingesetztem Substrat, Detektionsverfahren oder Normierung) zum Teil erheblich voneinander. Die TPMT-Aktivitätsmessung lieferte beispielsweise bei 6-Mercaptopurin als Substrat um etwa 34% niedrigere Ergebnisse als bei 6-Thioguanin (Kröplin und Iven 2000). Eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse wird darüber hinaus noch durch verschiedene Detektionsverfahren wie z.B. Radiochemie und Fluoreszenz oder durch unterschiedliche Bezugsgrößen für die Normierung z. B. nach Gramm Hämoglobin im Hämolsat oder nach Milliliter gepackten Erythrozyten erschwert. Die Methoden zur Genotypisierung sind hingegen deutlich besser standardisiert.

## 4.6 Schlussfolgerung

Während die Notwendigkeit einer Alternativ-Medikation an Stelle der Thiopurine oder aber eine deutliche Dosisreduktion (auf 5-10% der Standarddosis) bei den Nichtmethylierern (var/var) allgemein akzeptiert ist (McLeod et al. 2000; Evans et al. 2001; Derijks und Wong 2010; Relling et al. 2011a), wird eine Dosisanpassung bei den Intermediär-Methylierern (wt/var) nicht von allen Autoren geteilt. Hier stehen Empfehlungen für eine Reduktion auf etwa 50 - 70% der Standarddosis (Zhou 2006; Derijks und Wong 2010; Relling et al. 2011a) Veröffentlichungen entgegen, welche keine Dosisreduktion empfehlen und eine TPMT-Heterozygotie (wt/var) der Patienten in Kombination mit einer Thiopurin-Standarddosierung sogar für vorteilhaft halten. So konnten beispielsweise Stanulla et al. bei mehr als 800 an ALL erkrankten Kindern mit einer gleichen therapeutischen Dosierung von 6-Mercaptopurin ein besseres Therapieansprechen bei den heterozygot varianten Patienten (wt/var) erreichen. Sie hatten verglichen mit den homozygoten Wildtyp-Patienten (wt/wt) ein etwa 3-fach geringeres Risiko, nach der Konsolidierungstherapie noch messbare Tumorlast zu tragen. Die Häufigkeit der Myelosuppression war bei beiden Gruppen gleich (Stanulla et al. 2005). Neben männlichem Geschlecht und höherem Alter wurde ebenfalls der homozygote TPMT-Wildtyp (wt/wt) als Risikofaktor für ein Rezidiv der kindlichen ALL beschrieben, obwohl die heterozygot varianten Patienten hier keine verbesserte Überlebensrate zeigten (Schmiegelow et al. 2009b). Dies führten die Autoren auf evtl. vermehrt auftretende Sekundär-Neoplasmen zurück. Dagegen konnten Stanulla et al. in einer weiteren Studie keinen Zusammenhang zwischen dem TPMT-Polymorphismus und einer Häufung von Sekundär-Neoplasmen nach einer ALL-Therapie mit dem Berlin-Frankfurt-Münster-Protokoll nachweisen (Stanulla et al. 2009).

Da aktuell eine therapeutische Konsequenz in Form eines gänzlichen Verzichts auf Thiopurine bzw. einer deutlichen Dosisreduktion nur im Falle einer kompletten TPMT-Defizienz bei Nichtmethylierern als gesichert gilt, sollten die entsprechenden Untersuchungsmethoden der Hauptanforderung genügen, solch eine komplette TPMT-Defizienz sicher diagnostizieren zu können. Mit gewissen Einschränkungen (Bluttransfusionen bei der Phänotypisierung und sehr seltene oder noch nicht bekannte Mutationen bei der Genotypisierung) erfüllten beide

Methoden bei meinen Untersuchungen diese Anforderung und scheinen somit diesbezüglich gleichwertig zu sein. Sollte jedoch künftig einer Unterscheidung zwischen Normal- und Intermediär-Methylierern eine größere Bedeutung beigemessen werden, ist eher der Genotypisierung der Vorrang zu geben, welche eine bessere Unterscheidung ermöglicht. Die Ergebnisse einer Phänotypisierung sollten in solchen Fällen unter Berücksichtigung der Faktoren, die die Alterszusammensetzung der Erythrozyten beeinflussen können, kritisch beurteilt werden. Des Weiteren kann der Versuch unternommen werden, die Unterscheidung zwischen Normal- und Intermediär-Methylierern auch mittels Phänotypisierung zu verbessern. Dazu sind weitere Untersuchungen notwendig, bei denen die Berücksichtigung der in vivo Einflussgröße der Altersverteilung der Erythrozyten bei der Wahl der Entscheidungsgrenze einen wichtigen Ansatzpunkt darstellt.

Die Phäno- und Genotypisierung können in einem Routinelabor je nach vorhandener Geräteausstattung und Knowhow zur Untersuchung des TPMT-Status gleichwertig eingesetzt werden. Bei schwer zu interpretierenden Befunden einer Methode sollten die Ergebnisse jeweils mit der Alternativmethode verifiziert werden.



## 5 Zusammenfassung

Seit Anfang der 1950er Jahren werden Thiopurine (6-Thioguanin, 6-Mercaptopurin und Azathioprin) als Zytostatika bei Leukämien, aber auch als Immunsuppressiva in der Behandlung schwerer Verläufe von Autoimmunerkrankungen und in der Transplantationsmedizin erfolgreich eingesetzt.

Neben der Xanthinoxidase ist die Thiopurin-S-Methyltransferase (TPMT) ein Schlüsselenzym für den Abbau der Thiopurine, für das seit mehr als 30 Jahren ein genetischer Polymorphismus bekannt ist. Demnach zeigen 0.3% der Kaukasier praktisch keine TPMT-Aktivität. Diese Personen sind bei einer Thiopurin-Therapie gefährdet, durch Akkumulation aktiver Metabolite eine lebensbedrohliche toxische Knochenmarksschädigung zu erleiden. Deshalb sollte der TPMT-Status der Patienten vor einer Thiopurin-Medikation untersucht werden. Dafür stehen zwei analytische Ansätze zur Verfügung, zum einen die Messung der Enzymaktivität (Phänotypisierung) und zum anderen die Untersuchung der zugrunde liegenden genetischen Änderung (Genotypisierung).

Im Rahmen eines Methodenvergleichs untersuchte ich 262 Patienten und konnte dabei das aus der Literatur bekannte trimodale Muster für die TPMT-Aktivität mit Normal- (91.6%), Intermediär- (7.63%) und Nichtmethylierer (0.76%) und die zu erwartende Allelfrequenzen reproduzieren. Des Weiteren konnte ich zeigen, dass eine komplette TPMT-Defizienz in der Phänotypisierung sicher diagnostiziert werden kann. Auch die Ergebnisse der Genotypisierung waren hinsichtlich des Nichtmethylierer-Status eindeutig. Darüber hinaus konnte ich eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse beider Methoden demonstrieren und erreichte dabei eine Konkordanzrate von 94.3%. Die beobachteten Fälle mit diskrepanten Ergebnissen traten lediglich bei der Unterscheidung zwischen Normal- und Intermediär-Methylierern auf und zeigten einen deutlichen Zusammenhang mit dem zugrunde liegenden Krankheitsbild. Die Ursache für dieses Phänomen ist sehr wahrscheinlich die Alterszusammensetzung der Patienten-Erythrozyten. Ist diese Verteilung zugunsten älterer Erythrozyten verschoben, wie z. B. bei Leukämie-Patienten, sinkt die gemessene TPMT-Aktivität aufgrund natürlicher degenerativer Prozesse in älteren Erythrozyten. Ein Überschuss an jüngeren Erythrozyten, was wahrscheinlich bei den gastroenterologischen Patienten durch

Blutungen aus dem Darm und konsekutiv gesteigerte Hämatopoese der Fall ist, führt hingegen zu einer höheren TPMT-Aktivität.

Zur Unterscheidung zwischen Normal- und Intermediär-Methylierern ist die Genotypisierung nach meinen Ergebnissen besser geeignet. Bei der Diagnostik einer kompletten TPMT-Defizienz, die unumstritten eine deutliche Dosisreduktion oder gar einen Verzicht auf Thiopurine erfordert, erfüllen beide Methoden mit gewissen Einschränkungen (Bluttransfusionen bei der Phänotypisierung und sehr seltene oder noch nicht bekannte Mutationen bei der Genotypisierung) die für die Routinediagnostik notwendigen Qualitätserfordernisse und können gleichwertig angewendet werden. Bei unklaren Fällen soll das Ergebnis einer Methode mit der jeweils alternativen Methode kontrolliert und verifiziert werden.

## 6 Literaturverzeichnis

**Ansari A, Patel N, Sanderson J, O'Donohue J, Duley JA, Florin TH.** Low-dose azathioprine or mercaptopurine in combination with allopurinol can bypass many adverse drug reactions in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 31: 640-647, 2009.

**Ansari AA, Mayne A, Sundstrom JB, Gravanis MB, Kanter K, Sell KW, Villinger F, Siu CO, Herskowitz A.** Frequency of hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HPRT-) T cells in the peripheral blood of cardiac transplant recipients. A noninvasive technique for the diagnosis of allograft rejection. *Circulation* 92: 862-874, 1995.

**Anstey A, Lennard L, Mayou SC, Kirby JD.** Pancytopenia related to azathioprine--an enzyme deficiency caused by a common genetic polymorphism: a review. *J R Soc Med* 85: 752-756, 1992.

**Armstrong VW, Shipkova M, von Ahsen N, Oellerich M.** Analytic aspects of monitoring therapy with thiopurine medications. *Ther Drug Monit* 26: 220-226, 2004.

**Arnold DM, Nazi I, Santos A, Chan H, Heddle NM, Warkentin TE, Kelton JG.** Combination immunosuppressant therapy for patients with chronic refractory immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 115: 29-31, 2010.

**Barker GR, Dhar MM, Parsons LD.** The action of some pyrimidine derivatives and related compounds on sarcoma development in grafted mice. *Br J Cancer* 5: 124-129, 1951.

**Biesele JJ, Berger RE, Clarke M.** Tissue culture screening of purines and purine nucleosides for selective damage to mouse sarcoma cells. *Cancer Res* 12: 399-406, 1952.

**Brouwer C, De Abreu RA, Keizer-Garritsen JJ, Lambooy LH, Ament K, ter Riet PG, van Wering ER, Trijbels FJ, Veerman AJ, Hoogerbrugge PM, Bokkerink JP.** Thiopurine methyltransferase in acute lymphoblastic leukaemia: biochemical and molecular biological aspects. *Eur J Cancer* 41: 613-623, 2005.

**Burchenal JH, Murphy ML, Ellison RR, Sykes MP, Tan TC, Leone LA, Karnofsky DA, Craver LF, Dargeon HW, Rhoads CP.** Clinical evaluation of a new antimetabolite, 6-mercaptopurine, in the treatment of leukemia and allied diseases. *Blood* 8: 965-999, 1953.

**Bußmann C, Bieber T, Novak N.** Systemic therapeutic options for severe atopic dermatitis. *J Dtsch Dermatol Ges* 7: 205-219, 2009.

**Caprilli R, Angelucci E, Cocco A, Viscido A, Annese V, Ardizzone S, Biancone L, Castiglione F, Cottone M, Meucci G, Paoluzi P, Papi C, Sturniolo GC, Vecchi M.** Appropriateness of immunosuppressive drugs in inflammatory bowel diseases assessed by RAND method: Italian Group for IBD (IG-IBD) position statement. *Dig Liver Dis* 37: 407-417, 2005.

**Casetta I, Iuliano G, Filippini G.** Azathioprine for multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev*: CD003982, 2007.

**Chan M, Luqmani R.** Pharmacotherapy of vasculitis. *Expert Opin Pharmacother* 10: 1273-1289, 2009.

**Collie-Duguid ES, Pritchard SC, Powrie RH, Sludden J, Collier DA, Li T, McLeod HL.** The frequency and distribution of thiopurine methyltransferase alleles in Caucasian and Asian populations. *Pharmacogenetics* 9: 37-42, 1999.

**Colombel JF, Ferrari N, Debuysere H, Marteau P, Gendre JP, Bonaz B, Soule JC, Modigliani R, Touze Y, Catala P, Libersa C, Broly F.** Genotypic analysis of thiopurine S-methyltransferase in patients with Crohn's disease and severe myelosuppression during azathioprine therapy. *Gastroenterology* 118: 1025-1030, 2000.

**Coulthard S, Hogarth L.** The thiopurines: an update. *Invest New Drugs* 23: 523-532, 2005.

**Coulthard SA, Hogarth LA, Little M, Matheson EC, Redfern CP, Minto L, Hall AG.** The effect of thiopurine methyltransferase expression on sensitivity to thiopurine drugs. *Mol Pharmacol* 62: 102-109, 2002.

**Daperno M, Sostegni R, Canaparo R, Serpe L, Lavagna A, Crocella L, Castagno F, Vernetto A, Rigazio C, Ercole E, D'Antico S, Pera A, Zara G, Rocca R.** Prospective study of the effects of concomitant medications on thiopurine metabolism in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 30: 843-853, 2009.

**de Boer NK, van Bodegraven AA, de Graaf P, van der Hulst RW, Zoetekouw L, van Kuilenburg AB.** Paradoxical elevated thiopurine S-methyltransferase activity after pancytopenia during azathioprine therapy: potential influence of red blood cell age. *Ther Drug Monit* 30: 390-393, 2008.

**Derijks LJ, Wong DR.** Pharmacogenetics of thiopurines in inflammatory bowel disease. *Curr Pharm Des* 16: 145-154, 2010.

**Dervieux T, Blanco JG, Krynetski EY, Vanin EF, Roussel MF, Relling MV.** Differing contribution of thiopurine methyltransferase to mercaptopurine versus thioguanine effects in human leukemic cells. *Cancer Res* 61: 5810-5816, 2001.

**Deufel T, Geßner R, Lackner KJ, Schwab M, Steimer W, Steiner M, von Ahsen N, Kiehntopf M.** Richtlinie: Labormedizinische Diagnostik bei der Therapie mit TPMT (Thiopurin-S-Methyltransferase)-abhängigen Pharmaka. Guidelines for the laboratory management of thiopurine drug therapy. *LaboratoriumsMedizin* 28: 477-482, 2004.

**Dewit O, Vanheuverzwyn R, Desager JP, Horsmans Y.** Interaction between azathioprine and aminosalicylates: an in vivo study in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 16: 79-85, 2002.

**Dilger K, Schaeffeler E, Lukas M, Strauch U, Herfarth H, Muller R, Schwab M.** Monitoring of thiopurine methyltransferase activity in postsurgical patients with Crohn's disease during 1 year of treatment with azathioprine or mesalazine. *Ther Drug Monit* 29: 1-5, 2007.

**Elion GB, Hitchings GH, Vanderwerff H.** Antagonists of nucleic acid derivatives. VI. Purines. *J Biol Chem* 192: 505-518, 1951.

**Erb N, Harms DO, Janka-Schaub G.** Pharmacokinetics and metabolism of thiopurines in children with acute lymphoblastic leukemia receiving 6-thioguanine versus 6-mercaptopurine. *Cancer Chemother Pharmacol* 42: 266-272, 1998.

**Evans WE, Hon YY, Bomgaars L, Coutre S, Holdsworth M, Janco R, Kalwinsky D, Keller F, Khatib Z, Margolin J, Murray J, Quinn J, Ravindranath Y, Ritchey K, Roberts W, Rogers ZR, Schiff D, Steuber C, Tucci F, Kornegay N, Krynetski EY, Relling MV.** Preponderance of thiopurine S-methyltransferase deficiency and heterozygosity among patients intolerant to mercaptopurine or azathioprine. *J Clin Oncol* 19: 2293-2301, 2001.

**Fakhoury M, Andreu-Gallien J, Mahr A, Medard Y, Azougagh S, Vilmer E, Jacqz-Aigrain E.** Should TPMT genotype and activity be used to monitor 6-mercaptopurine treatment in children with acute lymphoblastic leukaemia? *J Clin Pharm Ther* 32: 633-639, 2007.

**Feng Q, Vannaprasaht S, Peng Y, Angsuthum S, Avihingsanon Y, Yee VC, Tassaneeyakul W, Weinshilboum RM.** Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: functional characterization of a novel rapidly degraded variant allozyme. *Biochem Pharmacol* 79: 1053-1061, 2009.

**Ford L, Graham V, Berg J.** Whole-blood thiopurine S-methyltransferase activity with genotype concordance: a new, simplified phenotyping assay. *Ann Clin Biochem* 43: 354-360, 2006.

**Ford L, Kampanis P, Berg J.** Thiopurine S-methyltransferase genotype-phenotype concordance: used as a quality assurance tool to help control the phenotype assay. *Ann Clin Biochem* 46: 152-154, 2009.

**Ford LT, Cooper SC, Lewis MJ, Berg JD.** Reference intervals for thiopurine S-methyltransferase activity in red blood cells using 6-thioguanine as substrate and rapid non-extraction liquid chromatography. *Ann Clin Biochem* 41: 303-308, 2004.

**Garat A, Cauffiez C, Renault N, Lo-Guidice JM, Allorge D, Chevalier D, Houdret N, Chavatte P, Lorient MA, Gala JL, Broly F.** Characterisation of novel defective thiopurine S-methyltransferase allelic variants. *Biochem Pharmacol* 76: 404-415, 2008.

**Germani G, Pleguezuelo M, Villamil F, Vaghjiani S, Tsochatzis E, Andreana L, Burroughs AK.** Azathioprine in liver transplantation: a reevaluation of its use and a comparison with mycophenolate mofetil. *Am J Transplant* 9: 1725-1731, 2009.

**Gisbert JP, Gomollon F, Cara C, Luna M, Gonzalez-Lama Y, Pajares JM, Mate J, Guijarro LG.** Thiopurine methyltransferase activity in Spain: a study of 14,545 patients. *Dig Dis Sci* 52: 1262-1269, 2007.

**Griffiths B, Emery P, Ryan V, Isenberg D, Akil M, Thompson R, Maddison P, Griffiths ID, Lorenzi A, Miles S, Situnayake D, Teh LS, Plant M, Hallengren C, Nived O, Sturfelt G, Chakravarty K, Tait T, Gordon C.** The BILAG multi-centre open randomized controlled trial comparing ciclosporin vs azathioprine in patients with severe SLE. *Rheumatology (Oxford)*, 2010.

**Haglund S, Lindqvist M, Almer S, Peterson C, Taipalensuu J.** Pyrosequencing of TPMT alleles in a general Swedish population and in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Chem* 50: 288-295, 2004.

**Hamdan-Khalil R, Allorge D, Lo-Guidice JM, Cauffiez C, Chevalier D, Spire C, Houdret N, Libersa C, Lhermitte M, Colombel JF, Gala JL, Broly F.** In vitro

characterization of four novel non-functional variants of the thiopurine S-methyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun* 309: 1005-1010, 2003.

**Hamdan-Khalil R, Gala JL, Allorge D, Lo-Guidice JM, Horsmans Y, Houdret N, Broly F.** Identification and functional analysis of two rare allelic variants of the thiopurine S-methyltransferase gene, TPMT\*16 and TPMT\*19. *Biochem Pharmacol* 69: 525-529, 2005.

**Hawwa AF, Millership JS, Collier PS, Vandenbroeck K, McCarthy A, Dempsey S, Cairns C, Collins J, Rodgers C, McElnay JC.** Pharmacogenomic studies of the anticancer and immunosuppressive thiopurines mercaptopurine and azathioprine. *Br J Clin Pharmacol* 66: 517-528, 2008.

**Hengstman GJ, van den Hoogen FH, van Engelen BG.** Treatment of the inflammatory myopathies: update and practical recommendations. *Expert Opin Pharmacother* 10: 1183-1190, 2009.

**Hindorf U, Peterson C, Almer S.** Assessment of thiopurine methyltransferase and metabolite formation during thiopurine therapy: results from a large Swedish patient population. *Ther Drug Monit* 26: 673-678, 2004.

**Hon YY, Fessing MY, Pui CH, Relling MV, Krynetski EY, Evans WE.** Polymorphism of the thiopurine S-methyltransferase gene in African-Americans. *Hum Mol Genet* 8: 371-376, 1999.

**Indjova D, Atanasova S, Shipkova M, Armstrong VW, Oellerich M, Svinarov D.** Phenotypic and genotypic analysis of thiopurine s-methyltransferase polymorphism in the bulgarian population. *Ther Drug Monit* 25: 631-636, 2003.

**Jabbour EJ, Faderl S, Kantarjian HM.** Adult acute lymphoblastic leukemia. *Mayo Clin Proc* 80: 1517-1527, 2005.

**Jacqz-Aigrain E, Bessa E, Medard Y, Mircheva Y, Vilmer E.** Thiopurine methyltransferase activity in a French population: h.p.l.c. assay conditions and effects of drugs and inhibitors. *Br J Clin Pharmacol* 38: 1-8, 1994.



**Karran P.** Thiopurines, DNA damage, DNA repair and therapy-related cancer. *Br Med Bull* 79-80: 153-170, 2006.

**Khalil MN, Erb N, Khalil PN, Escherich G, Janka-Schaub GE.** Interference free and simplified liquid chromatography-based determination of thiopurine S-methyltransferase activity in erythrocytes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 821: 105-111, 2005.

**Kham SK, Soh CK, Aw DC, Yeoh AE.** TPMT\*26 (208F-->L), a novel mutation detected in a Chinese. *Br J Clin Pharmacol* 68: 120-123, 2009.

**Kitchen BJ, Moser A, Lowe E, Balis FM, Widemann B, Anderson L, Strong J, Blaney SM, Berg SL, O'Brien M, Adamson PC.** Thioguanine administered as a continuous intravenous infusion to pediatric patients is metabolized to the novel metabolite 8-hydroxy-thioguanine. *J Pharmacol Exp Ther* 291: 870-874, 1999.

**Klemetsdal B, Wist E, Aarbakke J.** Gender difference in red blood cell thiopurine methyltransferase activity. *Scand J Clin Lab Invest* 53: 747-749, 1993.

**Kröplin T, Iven H.** Methylation of 6-mercaptopurine and 6-thioguanine by thiopurine S-methyltransferase. A comparison of activity in red blood cell samples of 199 blood donors. *Eur J Clin Pharmacol* 56: 343-345, 2000.

**Kröplin T, Weyer N, Gutsche S, Iven H.** Thiopurine S-methyltransferase activity in human erythrocytes: a new HPLC method using 6-thioguanine as substrate. *Eur J Clin Pharmacol* 54: 265-271, 1998a.

**Kröplin T, Weyer N, Iven H.** Determination of thiopurine methyltransferase activity in erythrocytes using 6-thioguanine as the substrate. *Adv Exp Med Biol* 431: 741-745, 1998b.

**Krynetski EY, Schuetz JD, Galpin AJ, Pui CH, Relling MV, Evans WE.** A single point mutation leading to loss of catalytic activity in human thiopurine S-methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 949-953, 1995.

**Lee DH, Chung NG, Cho B, Kim HK, Kang HJ, Shin HY, Ahn HS, Yoo KH, Sung KW, Koo HH, Kook H, Hwang TJ, Im HJ, Seo JJ, Park HJ.** Idarubicin plus behenoyl cytarabine and 6-thioguanine compares favorably with idarubicin plus cytarabine-based regimen for children with previously untreated acute myeloid leukemia: 10-year retrospective, multicenter study in Korea. *J Korean Med Sci* 25: 9-15, 2010.

**Lennard L.** The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *Eur J Clin Pharmacol* 43: 329-339, 1992.

**Lennard L.** Therapeutic drug monitoring of cytotoxic drugs. *Br J Clin Pharmacol* 52 Suppl 1: 75S-87S, 2001.

**Lennard L, Chew TS, Lilleyman JS.** Human thiopurine methyltransferase activity varies with red blood cell age. *Br J Clin Pharmacol* 52: 539-546, 2001.

**Lennard L, Davies HA, Lilleyman JS.** Is 6-thioguanine more appropriate than 6-mercaptopurine for children with acute lymphoblastic leukaemia? *Br J Cancer* 68: 186-190, 1993.

**Lennard L, Lilleyman JS, Van Loon J, Weinshilboum RM.** Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 336: 225-229, 1990.

**Lennard L, Singleton HJ.** High-performance liquid chromatographic assay of human red blood cell thiopurine methyltransferase activity. *J Chromatogr B Biomed Appl* 661: 25-33, 1994.

**Lewis LD, Benin A, Szumlanski CL, Otterness DM, Lennard L, Weinshilboum RM, Nierenberg DW.** Olsalazine and 6-mercaptopurine-related bone marrow suppression: a possible drug-drug interaction. *Clin Pharmacol Ther* 62: 464-475, 1997.

**Lindqvist Appell M, Wennerstrand P, Peterson C, Hertervig E, Martensson LG.** Characterization of a novel sequence variant, TPMT\*28, in the human thiopurine methyltransferase gene. *Pharmacogenet Genomics*, 2010.

**Lindqvist M, Haglund S, Almer S, Peterson C, Taipalensu J, Hertervig E, Lyrenas E, Soderkvist P.** Identification of two novel sequence variants affecting thiopurine methyltransferase enzyme activity. *Pharmacogenetics* 14: 261-265, 2004.

**Lindqvist M, Skoglund K, Karlgren A, Soderkvist P, Peterson C, Kidhall I, Almer S.** Explaining TPMT genotype/phenotype discrepancy by haplotyping of TPMT\*3A and identification of a novel sequence variant, TPMT\*23. *Pharmacogenet Genomics* 17: 891-895, 2007.

**Loennechen T, Yates CR, Fessing MY, Relling MV, Krynetski EY, Evans WE.** Isolation of a human thiopurine S-methyltransferase (TPMT) complementary DNA with a single nucleotide transition A719G (TPMT\*3C) and its association with loss of TPMT protein and catalytic activity in humans. *Clin Pharmacol Ther* 64: 46-51, 1998.

**Lowry PW, Franklin CL, Weaver AL, Szumlanski CL, Mays DC, Loftus EV, Tremaine WJ, Lipsky JJ, Weinshilboum RM, Sandborn WJ.** Leucopenia resulting from a drug interaction between azathioprine or 6-mercaptopurine and mesalamine, sulphasalazine, or balsalazide. *Gut* 49: 656-664, 2001.

**Lyon E, Wittwer CT.** LightCycler technology in molecular diagnostics. *J Mol Diagn* 11: 93-101, 2009.

**McDonald OG, Krynetski EY, Evans WE.** Molecular haplotyping of genomic DNA for multiple single-nucleotide polymorphisms located kilobases apart using long-range polymerase chain reaction and intramolecular ligation. *Pharmacogenetics* 12: 93-99, 2002.

**McLeod HL, Krynetski EY, Relling MV, Evans WE.** Genetic polymorphism of thiopurine methyltransferase and its clinical relevance for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 14: 567-572, 2000.

**McLeod HL, Lin JS, Scott EP, Pui CH, Evans WE.** Thiopurine methyltransferase activity in American white subjects and black subjects. *Clin Pharmacol Ther* 55: 15-20, 1994.

**McLeod HL, Relling MV, Liu Q, Pui CH, Evans WE.** Polymorphic thiopurine methyltransferase in erythrocytes is indicative of activity in leukemic blasts from children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 85: 1897-1902, 1995.

**McLeod HL, Siva C.** The thiopurine S-methyltransferase gene locus -- implications for clinical pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* 3: 89-98, 2002.

**Menor C, Fueyo JA, Escribano O, Cara C, Fernandez-Moreno MD, Roman ID, Guijarro LG.** Determination of thiopurine methyltransferase activity in human erythrocytes by high-performance liquid chromatography: comparison with the radiochemical method. *Ther Drug Monit* 23: 536-541, 2001.

**Menter A, Korman NJ, Elmets CA, Feldman SR, Gelfand JM, Gordon KB, Gottlieb AB, Koo JY, Lebwohl M, Lim HW, Van Voorhees AS, Beutner KR, Bhushan R.** Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: section 4. Guidelines of care for the management and treatment of psoriasis with traditional systemic agents. *J Am Acad Dermatol* 61: 451-485, 2009.

**Meyer V.** *Practical High-Performance Liquid Chromatography, Fifth Edition*: 5-23, John Wiley and Sons, West Sussex, 2010.

**Micheli V, Jacomelli G, Fioravanti A, Morozzi G, Marcolongo R, Pompucci G.** Thiopurine methyltransferase activity in the erythrocytes of adults and children: and HPLC-linked assay. *Clin Chim Acta* 259: 161-168, 1997.

**Mieli-Vergani G, Heller S, Jara P, Vergani D, Chang MH, Fujisawa T, Gonzalez-Peralta RP, Kelly D, Mohan N, Shah U, Murray KF.** Autoimmune hepatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 49: 158-164, 2009.

**Murray JE, Merrill JP, Harrison JH, Wilson RE, Dammin GJ.** Prolonged survival of human-kidney homografts by immunosuppressive drug therapy. *N Engl J Med* 268: 1315-1323, 1963.

**Nasedkina TV, Fedorova OE, Glotov AS, Chupova NV, Samochatova EV, Maiorova OA, Zemlyakova VV, Roudneva AE, Chudinov AV, Yurasov RA, Kozhekbaeva JM, Barsky VE, Krynetskiy EY, Krynetskaia NF, Cheng C, Ribeiro RC, Evans WE, Roumyantsev AG, Zasedatelev AS.** Rapid genotyping of common deficient thiopurine S-methyltransferase alleles using the DNA-microchip technique. *Eur J Hum Genet* 14: 991-998, 2006.

**Nyhan WL.** The recognition of Lesch-Nyhan syndrome as an inborn error of purine metabolism. *J Inherit Metab Dis* 20: 171-178, 1997.

**Oender K, Lanschuetzer CM, Laimer M, Klausegger A, Paulweber B, Kofler B, Hintner H, Bauer JW.** Introducing a fast and simple PCR-RFLP analysis for the detection of mutant thiopurine S-methyltransferase alleles TPMT\*3A and TPMT\*3C. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 20: 396-400, 2006.

**Ohno R, Kato Y, Nagura E, Murase T, Okumura M, Yamada H, Ogura M, Minami S, Suzuki H, Morishima Y, et al.** Behenoyl cytosine arabinoside, daunorubicin, 6-mercaptopurine, and prednisolone combination therapy for acute myelogenous leukemia in adults and prognostic factors related to remission duration and survival length. *J Clin Oncol* 4: 1740-1747, 1986.

**Okada AA.** Drug therapy in Behcet's disease. *Ocul Immunol Inflamm* 8: 85-91, 2000.

**Opelz G, Dohler B.** Influence of immunosuppressive regimens on graft survival and secondary outcomes after kidney transplantation. *Transplantation* 87: 795-802, 2009.

**Otterness D, Szumlanski C, Lennard L, Klemetsdal B, Aarbakke J, Park-Hah JO, Iven H, Schmiegelow K, Branum E, O'Brien J, Weinshilboum R.** Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: gene sequence polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther* 62: 60-73, 1997.

**Otterness DM, Szumlanski CL, Wood TC, Weinshilboum RM.** Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics. Kindred with a terminal exon splice junction mutation that results in loss of activity. *J Clin Invest* 101: 1036-1044, 1998.

**Peng Y, Feng Q, Wilk D, Adjei AA, Salavaggione OE, Weinshilboum RM, Yee VC.** Structural basis of substrate recognition in thiopurine s-methyltransferase. *Biochemistry* 47: 6216-6225, 2008.

**Raghu G, Depaso WJ, Cain K, Hammar SP, Wetzel CE, Dreis DF, Hutchinson J, Pardee NE, Winterbauer RH.** Azathioprine combined with prednisone in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: a prospective double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Am Rev Respir Dis* 144: 291-296, 1991.

**Raina A, Yadav D, Krasinskas AM, McGrath KM, Khalid A, Sanders M, Whitcomb DC, Slivka A.** Evaluation and management of autoimmune pancreatitis: experience at a large US center. *Am J Gastroenterol* 104: 2295-2306, 2009.

**Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ, Schmiegelow K, Pui CH, Yee SW, Stein CM, Carrillo M, Evans WE, Klein TE.** Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for Thiopurine Methyltransferase Genotype and Thiopurine Dosing. *Clin Pharmacol Ther*, 2011a.

**Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ, Schmiegelow K, Pui CH, Yee SW, Stein CM, Carrillo M, Evans WE, Klein TE.** Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for Thiopurine Methyltransferase Genotype and Thiopurine Dosing Supplemental Material from <http://www.pharmgkb.org> (Download: 09.02.2011). *Clin Pharmacol Ther*, 2011b.

**Remy CN.** Metabolism of thiopyrimidines and thiopurines. S-Methylation with S-adenosylmethionine transmethylase and catabolism in mammalian tissues. *J Biol Chem* 238: 1078-1084, 1963.

**Rossi AM, Bianchi M, Guarnieri C, Barale R, Pacifici GM.** Genotype-phenotype correlation for thiopurine S-methyltransferase in healthy Italian subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 57: 51-54, 2001.

**Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N.** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354, 1985.

**Salavaggione OE, Wang L, Wiepert M, Yee VC, Weinshilboum RM.** Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: variant allele functional and comparative genomics. *Pharmacogenet Genomics* 15: 801-815, 2005.

**Sathasivam S.** Steroids and immunosuppressant drugs in myasthenia gravis. *Nat Clin Pract Neurol* 4: 317-327, 2008.

**Schaeffeler E, Eichelbaum M, Reinisch W, Zanger UM, Schwab M.** Three novel thiopurine S-methyltransferase allelic variants (TPMT\*20, \*21, \*22) - association with decreased enzyme function. *Hum Mutat* 27: 976, 2006.

**Schaeffeler E, Fischer C, Brockmeier D, Wernet D, Moerike K, Eichelbaum M, Zanger UM, Schwab M.** Comprehensive analysis of thiopurine S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in a large population of German-Caucasians and identification of novel TPMT variants. *Pharmacogenetics* 14: 407-417, 2004.

**Schaeffeler E, Stanulla M, Greil J, Schrappe M, Eichelbaum M, Zanger UM, Schwab M.** A novel TPMT missense mutation associated with TPMT deficiency in a 5-year-old boy with ALL. *Leukemia* 17: 1422-1424, 2003.

**Schaeffeler E, Zanger UM, Eichelbaum M, Asante-Poku S, Shin JG, Schwab M.** Highly multiplexed genotyping of thiopurine s-methyltransferase variants using MALD-TOF mass spectrometry: reliable genotyping in different ethnic groups. *Clin Chem* 54: 1637-1647, 2008.

**Schmidt E.** [Optimizing therapy in patients with severe autoimmune blistering skin diseases]. *Hautarzt* 60: 633-640, 2009.

**Schmiegelow K, Al-Modhwahi I, Andersen MK, Behrendtz M, Forestier E, Hasle H, Heyman M, Kristinsson J, Nersting J, Nygaard R, Svendsen AL, Vettenranta K, Weinshilboum R.** Methotrexate/6-mercaptopurine maintenance therapy influences the risk of a second malignant neoplasm after childhood acute lymphoblastic leukemia: results from the NOPHO ALL-92 study. *Blood* 113: 6077-6084, 2009a.

**Schmiegelow K, Forestier E, Kristinsson J, Soderhall S, Vettenranta K, Weinshilboum R, Wesenberg F.** Thiopurine methyltransferase activity is related to the risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia: results from the NOPHO ALL-92 study. *Leukemia* 23: 557-564, 2009b.

**Schulz T.** Genetische Polymorphismen (Sequenzvariationen) von Fremdstoff-metabolisierenden Enzymen und ihre Bedeutung in der Umweltmedizin. In: *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*: Springer Berlin / Heidelberg, 2004, p. 1115-1123.

**Schutz E, von Ahsen N, Oellerich M.** Genotyping of eight thiopurine methyltransferase mutations: three-color multiplexing, "two-color/shared" anchor, and fluorescence-quenching hybridization probe assays based on thermodynamic nearest-neighbor probe design. *Clin Chem* 46: 1728-1737, 2000.



**Schwab M, Klotz U.** Pharmacokinetic considerations in the treatment of inflammatory bowel disease. *Clin Pharmacokinet* 40: 723-751, 2001.

**Serpe L, Calvo PL, Muntoni E, D'Antico S, Giaccone M, Avagnina A, Baldi M, Barbera C, Curti F, Pera A, Eandi M, Zara GP, Canaparo R.** Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics in a large-scale healthy Italian-Caucasian population: differences in enzyme activity. *Pharmacogenomics* 10: 1753-1765, 2009.

**Shipkova M, Von Ahsen N.** Therapy with Thiopurine Drugs - TDM and Pharmacogenomics of TPMT. *Laboratoriums Medizin* 27: 211-221, 2003.

**Spire-Vayron de la Moureyre C, Debuysere H, Mastain B, Vinner E, Marez D, Lo Guidice JM, Chevalier D, Brique S, Motte K, Colombel JF, Turck D, Noel C, Flipo RM, Pol A, Lhermitte M, Lafitte JJ, Libersa C, Broly F.** Genotypic and phenotypic analysis of the polymorphic thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT) in a European population. *Br J Pharmacol* 125: 879-887, 1998a.

**Spire-Vayron de la Moureyre C, Debuysere H, Sabbagh N, Marez D, Vinner E, Chevalier ED, Lo Guidice JM, Broly F.** Detection of known and new mutations in the thiopurine S-methyltransferase gene by single-strand conformation polymorphism analysis. *Hum Mutat* 12: 177-185, 1998b.

**Stanulla M, Schaeffeler E, Flohr T, Cario G, Schrauder A, Zimmermann M, Welte K, Ludwig WD, Bartram CR, Zanger UM, Eichelbaum M, Schrappe M, Schwab M.** Thiopurine methyltransferase (TPMT) genotype and early treatment response to mercaptopurine in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Jama* 293: 1485-1489, 2005.

**Stanulla M, Schaeffeler E, Moricke A, Coulthard SA, Cario G, Schrauder A, Kaatsch P, Dordelmann M, Welte K, Zimmermann M, Reiter A, Eichelbaum M, Riehm H, Schrappe M, Schwab M.** Thiopurine methyltransferase genetics is not a major risk factor for secondary malignant neoplasms after treatment of childhood

acute lymphoblastic leukemia on Berlin-Frankfurt-Munster protocols. *Blood* 114: 1314-1318, 2009.

**Szumanski C, Otterness D, Her C, Lee D, Brandriff B, Kellsell D, Spurr N, Lennard L, Wieben E, Weinshilboum R.** Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: human gene cloning and characterization of a common polymorphism. *DNA Cell Biol* 15: 17-30, 1996.

**Tai HL, Krynetski EY, Yates CR, Loennechen T, Fessing MY, Krynetskaia NF, Evans WE.** Thiopurine S-methyltransferase deficiency: two nucleotide transitions define the most prevalent mutant allele associated with loss of catalytic activity in Caucasians. *Am J Hum Genet* 58: 694-702, 1996.

**Tamm R, Oselin K, Kallassalu K, Magi R, Anier K, Remm M, Metspalu A.** Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) pharmacogenetics: three new mutations and haplotype analysis in the Estonian population. *Clin Chem Lab Med* 46: 974-979, 2008.

**Tay BS, Lilley RM, Murray AW, Atkinson MR.** Inhibition of phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase from Ehrlich ascites-tumour cells by thiopurine nucleotides. *Biochem Pharmacol* 18: 936-938, 1969.

**Tiede I, Fritz G, Strand S, Poppe D, Dvorsky R, Strand D, Lehr HA, Wirtz S, Becker C, Atreya R, Mudter J, Hildner K, Bartsch B, Holtmann M, Blumberg R, Walczak H, Iven H, Galle PR, Ahmadian MR, Neurath MF.** CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *J Clin Invest* 111: 1133-1145, 2003.

**Udaka T, Torii C, Takahashi D, Mori T, Aramaki M, Kosaki R, Tanigawara Y, Takahashi T, Kosaki K.** Comprehensive screening of the thiopurine methyltransferase polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. *Genet Test* 9: 85-92, 2005.

**Valent P, Lechner K.** Diagnosis and treatment of autoimmune haemolytic anaemias in adults: a clinical review. *Wien Klin Wochenschr* 120: 136-151, 2008.

**Van Os EC, Zins BJ, Sandborn WJ, Mays DC, Tremaine WJ, Mahoney DW, Zinsmeister AR, Lipsky JJ.** Azathioprine pharmacokinetics after intravenous, oral, delayed release oral and rectal foam administration. *Gut* 39: 63-68, 1996.

**Veerman AJ, Hahlen K, Kamps WA, Van Leeuwen EF, De Vaan GA, Solbu G, Suci S, Van Wering ER, Van der Does-Van der Berg A.** High cure rate with a moderately intensive treatment regimen in non-high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. Results of protocol ALL VI from the Dutch Childhood Leukemia Study Group. *J Clin Oncol* 14: 911-918, 1996.

**Wei H, Zhou S, Li C, Zhang J, Wu J, Huang M.** Phenotyping and genotyping studies of thiopurine S-methyltransferase in Kazaks. *Pharm Res* 22: 1762-1766, 2005.

**Weinshilboum RM, Raymond FA, Pazmino PA.** Human erythrocyte thiopurine methyltransferase: radiochemical microassay and biochemical properties. *Clin Chim Acta* 85: 323-333, 1978.

**Weinshilboum RM, Sladek SL.** Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet* 32: 651-662, 1980.

**Willkens RF, Urowitz MB, Stablein DM, McKendry RJ, Jr., Berger RG, Box JH, Fiechtner JJ, Fudman EJ, Hudson NP, Marks CR, et al.** Comparison of azathioprine, methotrexate, and the combination of both in the treatment of rheumatoid arthritis. A controlled clinical trial. *Arthritis Rheum* 35: 849-856, 1992.

**Wusk B, Kullak-Ublick GA, Rammert C, von Eckardstein A, Fried M, Rentsch KM.** Thiopurine S-methyltransferase polymorphisms: efficient screening method for patients considering taking thiopurine drugs. *Eur J Clin Pharmacol* 60: 5-10, 2004.

**Zhou S.** Clinical pharmacogenomics of thiopurine S-methyltransferase. *Curr Clin Pharmacol* 1: 119-128, 2006.

**Zimm S, Collins JM, O'Neill D, Chabner BA, Poplack DG.** Inhibition of first-pass metabolism in cancer chemotherapy: interaction of 6-mercaptopurine and allopurinol. *Clin Pharmacol Ther* 34: 810-817, 1983.

## 7 Anhang

**Tabelle 19.** Übersicht aller Ergebnisse (n=262) der Phäno- und Genotypisierung (nach aufsteigender Enzymaktivität sortiert). ID: Proben-Nummer; w: weiblich; m: männlich; D: Dermatologie; G: Gastroenterologie; H: Hämatologie/Onkologie; N: Neurologie; T: Transplantationsmedizin; U: nmol 6-MTG.h<sup>-1</sup>

Nr.	ID	Alter	Gesch.	Einsender	TPMT-Aktivität [U.g <sup>-1</sup> Hb]	Genotypisierung
1	78	10	w	G	1.50	TPMT*3A/*3C
2	251	26	m	N	1.90	TPMT*3A/*3A
3	221	6	m	H	12.4	TPMT*3A/*1
4	240	9	w	G	16.2	TPMT*1/*1
5	54	15	m	H	16.6	TPMT*3A/*1
6	55	5	w	H	16.8	TPMT*1/*1
7	2	41	m	G	17.8	TPMT*3A/*1
8	8	61	m	G	18.0	TPMT*3A/*1
9	172	11	w	G	18.0	TPMT*3A/*1
10	232	16	m	G	18.8	TPMT*3A/*1
11	11	1	m	H	18.9	TPMT*1/*1
12	13	5	w	H	19.0	TPMT*1/*1
13	253	68	m	N	20.4	TPMT*3A/*1
14	125	50	w	D	20.5	TPMT*3A/*1
15	259	34	m	N	20.7	TPMT*3A/*1
16	16	4	w	H	20.8	TPMT*1/*1
17	238	16	m	G	21.1	TPMT*3A/*1
18	23	6	m	H	21.2	TPMT*1/*1
19	250	13	m	G	21.3	TPMT*3A/*1
20	53	4	w	H	22.5	TPMT*1/*1
21	133	17	w	G	23.1	TPMT*3A/*1
22	212	13	w	H	23.2	TPMT*3A/*1
23	252	15	m	G	23.6	TPMT*3A/*1
24	12	13	w	H	23.7	TPMT*1/*1
25	63	9	m	G	23.8	TPMT*3A/*1
26	30	2	m	H	24.2	TPMT*1/*1
27	14	7	w	H	24.5	TPMT*1/*1
28	47	5	m	H	24.9	TPMT*1/*1
29	4	11	w	G	25.1	TPMT*1/*1
30	7	24	w	G	25.2	TPMT*1/*1
31	15	2	w	H	25.2	TPMT*1/*1
32	255	49	m	T	25.6	TPMT*1/*1
33	19	14	w	G	25.8	TPMT*1/*1
34	93	33	m	G	26.0	TPMT*1/*1
35	18	74	w	G	26.1	TPMT*1/*1
36	107	3	w	H	26.3	TPMT*1/*1
37	76	17	w	G	26.7	TPMT*1/*1
38	34	3	m	H	26.9	TPMT*1/*1
39	70	16	w	G	27.0	TPMT*1/*1
40	254	10	m	G	27.3	TPMT*3A/*1
41	88	15	m	G	27.8	TPMT*1/*1
42	148	2	w	H	27.8	TPMT*3A/*1
43	84	17	w	G	28.1	TPMT*1/*1

Nr.	ID	Alter	Gesch.	Einsender	TPMT-Aktivität [U.g <sup>-1</sup> Hb]	Genotypisierung
44	106	9	w	G	28.3	TPMT*1/*1
45	67	13	w	G	28.4	TPMT*1/*1
46	29	8	w	H	28.5	TPMT*1/*1
47	187	50	m	D	28.6	TPMT*1/*1
48	1	54	w	G	28.8	TPMT*1/*1
49	177	7	w	G	29.0	TPMT*1/*1
50	257	16	m	G	29.0	TPMT*1/*1
51	3	27	w	G	29.1	TPMT*1/*1
52	105	11	m	G	29.1	TPMT*1/*1
53	80	18	w	G	29.4	TPMT*1/*1
54	97	12	w	G	29.6	TPMT*1/*1
55	256	10	m	G	29.6	TPMT*1/*1
56	44	3	w	H	29.7	TPMT*1/*1
57	246	50	w	D	29.7	TPMT*1/*1
58	41	3	m	H	30.0	TPMT*1/*1
59	85	66	m	N	30.0	TPMT*1/*1
60	58	11	w	H	30.1	TPMT*1/*1
61	33	2	m	H	30.2	TPMT*1/*1
62	96	21	w	G	30.2	TPMT*1/*1
63	122	11	m	G	30.2	TPMT*1/*1
64	165	12	w	G	30.2	TPMT*3A/*1
65	73	72	w	G	30.3	TPMT*1/*1
66	36	3	w	H	30.8	TPMT*1/*1
67	6	56	w	G	30.9	TPMT*1/*1
68	230	18	w	G	31.4	TPMT*1/*1
69	59	5	w	G	31.6	TPMT*1/*1
70	166	31	w	G	31.7	TPMT*1/*1
71	37	6	w	H	31.8	TPMT*1/*1
72	26	6	w	H	32.0	TPMT*1/*1
73	87	19	m	G	32.1	TPMT*1/*1
74	32	5	m	H	32.9	TPMT*1/*1
75	35	12	m	H	33.0	TPMT*1/*1
76	38	4	m	H	33.0	TPMT*1/*1
77	151	20	m	G	33.4	TPMT*1/*1
78	215	16	m	H	33.4	TPMT*1/*1
79	260	16	w	G	33.5	TPMT*1/*1
80	9	58	w	G	33.6	TPMT*1/*1
81	262	14	m	G	33.7	TPMT*3A/*1
82	45	4	m	H	33.8	TPMT*1/*1
83	20	15	m	G	33.9	TPMT*1/*1
84	110	12	m	G	34.1	TPMT*1/*1
85	161	16	w	G	34.2	TPMT*1/*1
86	42	14	m	H	34.3	TPMT*1/*1
87	21	14	m	H	34.4	TPMT*1/*1
88	126	14	m	G	34.7	TPMT*1/*1
89	90	22	w	G	34.9	TPMT*1/*1
90	144	3	m	G	34.9	TPMT*1/*1
91	64	17	m	G	35.1	TPMT*1/*1
92	121	16	w	G	35.1	TPMT*1/*1
93	241	77	m	D	35.2	TPMT*1/*1
94	89	13	m	G	35.3	TPMT*1/*1

Nr.	ID	Alter	Gesch.	Einsender	TPMT-Aktivität [U.g <sup>-1</sup> Hb]	Genotypisierung
95	118	12	m	G	35.3	TPMT*1/*1
96	52	5	m	H	35.5	TPMT*1/*1
97	27	10	w	H	35.6	TPMT*1/*1
98	82	56	w	N	35.7	TPMT*1/*1
99	91	23	w	G	35.7	TPMT*1/*1
100	79	13	m	G	35.8	TPMT*1/*1
101	206	15	w	G	35.9	TPMT*1/*1
102	24	2	w	H	36.2	TPMT*3A/*1
103	140	11	w	G	36.3	TPMT*1/*1
104	75	13	m	G	36.4	TPMT*1/*1
105	199	14	w	G	36.5	TPMT*1/*1
106	61	51	w	G	36.7	TPMT*1/*1
107	196	11	m	G	36.7	TPMT*3A/*1
108	145	13	m	G	36.8	TPMT*1/*1
109	101	23	w	G	36.9	TPMT*1/*1
110	191	16	w	G	37.0	TPMT*1/*1
111	25	4	m	H	37.1	TPMT*1/*1
112	94	31	w	G	37.1	TPMT*1/*1
113	117	73	w	N	37.2	TPMT*1/*1
114	69	30	w	G	37.3	TPMT*1/*1
115	135	7	m	G	37.3	TPMT*1/*1
116	158	15	m	G	37.3	TPMT*1/*1
117	119	42	w	D	37.9	TPMT*1/*1
118	157	24	w	G	38.1	TPMT*1/*1
119	130	43	m	D	38.2	TPMT*1/*1
120	142	58	w	G	38.5	TPMT*1/*1
121	123	46	m	G	38.6	TPMT*1/*1
122	261	63	w	D	38.6	TPMT*1/*1
123	139	22	w	G	38.8	TPMT*1/*1
124	95	40	m	G	38.9	TPMT*1/*1
125	226	6	m	G	39.0	TPMT*1/*1
126	168	16	m	G	39.2	TPMT*1/*1
127	86	12	m	G	39.4	TPMT*1/*1
128	102	56	m	G	39.4	TPMT*1/*1
129	66	56	w	G	39.5	TPMT*1/*1
130	233	39	m	G	39.5	TPMT*1/*1
131	71	53	m	N	39.6	TPMT*1/*1
132	137	16	m	G	39.8	TPMT*1/*1
133	109	83	w	G	39.9	TPMT*1/*1
134	124	56	m	G	39.9	TPMT*1/*1
135	167	14	w	G	40.0	TPMT*1/*1
136	108	3	w	H	40.2	TPMT*1/*1
137	127	5	w	G	40.8	TPMT*1/*1
138	74	14	m	G	40.9	TPMT*1/*1
139	195	59	w	D	40.9	TPMT*1/*1
140	113	13	m	H	41.0	TPMT*1/*1
141	186	49	m	N	41.1	TPMT*1/*1
142	114	48	w	D	41.2	TPMT*1/*1
143	131	9	m	G	41.2	TPMT*1/*1
144	112	42	m	G	41.3	TPMT*1/*1
145	39	2	w	H	41.4	TPMT*1/*1

Nr.	ID	Alter	Gesch.	Einsender	TPMT-Aktivität [U.g <sup>-1</sup> Hb]	Genotypisierung
146	72	22	m	G	41.4	TPMT*1/*1
147	132	12	w	G	41.6	TPMT*1/*1
148	28	6	m	H	41.7	TPMT*1/*1
149	197	19	m	G	41.8	TPMT*1/*1
150	184	6	m	G	42.1	TPMT*1/*1
151	216	8	w	H	42.2	TPMT*1/*1
152	51	7	w	H	42.4	TPMT*1/*1
153	143	17	w	G	42.4	TPMT*1/*1
154	159	19	w	G	42.4	TPMT*1/*1
155	46	5	m	H	42.6	TPMT*1/*1
156	171	10	m	G	42.6	TPMT*1/*1
157	203	13	m	G	42.7	TPMT*1/*1
158	208	11	w	G	42.8	TPMT*1/*1
159	205	17	m	G	43.0	TPMT*1/*1
160	92	38	m	G	43.2	TPMT*1/*1
161	115	20	m	G	43.2	TPMT*1/*1
162	214	19	w	H	43.3	TPMT*1/*1
163	217	14	w	H	43.4	TPMT*1/*1
164	156	15	m	G	43.7	TPMT*1/*1
165	48	1	w	H	43.8	TPMT*1/*1
166	218	4	w	H	44.2	TPMT*1/*1
167	5	39	w	G	44.4	TPMT*1/*1
168	65	14	w	G	44.5	TPMT*1/*1
169	237	13	w	G	44.5	TPMT*1/*1
170	31	10	w	H	44.7	TPMT*1/*1
171	185	52	w	G	44.9	TPMT*1/*1
172	68	36	w	G	45.0	TPMT*1/*1
173	192	1	m	H	45.0	TPMT*1/*1
174	104	11	m	G	45.1	TPMT*1/*1
175	111	16	m	G	45.6	TPMT*1/*1
176	17	15	m	G	45.7	TPMT*1/*1
177	141	54	w	D	45.9	TPMT*1/*1
178	150	13	w	G	46.1	TPMT*1/*1
179	207	15	m	G	46.5	TPMT*1/*1
180	163	15	m	G	46.6	TPMT*1/*1
181	120	70	w	G	46.9	TPMT*1/*1
182	40	5	w	H	47.0	TPMT*1/*1
183	181	53	m	G	47.2	TPMT*1/*1
184	234	67	m	N	47.2	TPMT*1/*1
185	81	16	m	G	47.4	TPMT*1/*1
186	175	5	w	G	47.5	TPMT*1/*1
187	174	11	w	G	48.4	TPMT*1/*1
188	235	3	m	G	48.7	TPMT*1/*1
189	227	76	m	D	49.0	TPMT*1/*1
190	10	41	m	G	49.1	TPMT*1/*1
191	179	71	m	D	49.1	TPMT*1/*1
192	231	9	w	G	49.7	TPMT*1/*1
193	129	40	w	G	49.8	TPMT*1/*1
194	57	4	m	H	50.2	TPMT*1/*1
195	116	16	m	G	50.4	TPMT*1/*1
196	100	23	w	G	50.8	TPMT*1/*1



Nr.	ID	Alter	Gesch.	Einsender	TPMT-Aktivität [U.g <sup>-1</sup> Hb]	Genotypisierung
197	103	36	m	G	51.0	TPMT*1/*1
198	183	16	w	G	51.2	TPMT*1/*1
199	201	77	m	D	51.2	TPMT*1/*1
200	239	15	m	G	51.2	TPMT*1/*1
201	182	13	m	G	51.7	TPMT*1/*1
202	152	17	w	G	51.9	TPMT*1/*1
203	245	75	w	D	52.3	TPMT*1/*1
204	189	58	w	D	52.4	TPMT*1/*1
205	200	37	w	G	52.5	TPMT*1/*1
206	194	62	w	D	52.8	TPMT*1/*1
207	248	68	w	D	52.8	TPMT*1/*1
208	225	19	w	G	52.9	TPMT*1/*1
209	202	51	w	G	53.1	TPMT*1/*1
210	178	14	m	G	53.2	TPMT*1/*1
211	147	16	w	G	53.3	TPMT*1/*1
212	149	16	w	G	53.4	TPMT*1/*1
213	60	14	m	G	53.6	TPMT*1/*1
214	50	3	m	H	53.9	TPMT*1/*1
215	210	13	m	G	54.2	TPMT*1/*1
216	134	16	m	G	55.0	TPMT*1/*1
217	223	88	w	D	55.0	TPMT*1/*1
218	213	7	m	H	55.4	TPMT*1/*1
219	138	13	w	G	55.8	TPMT*1/*1
220	162	14	w	G	56.0	TPMT*1/*1
221	229	59	m	D	56.4	TPMT*1/*1
222	62	46	m	G	57.2	TPMT*1/*1
223	136	16	m	G	57.5	TPMT*1/*1
224	198	10	w	G	57.8	TPMT*1/*1
225	228	17	m	G	58.5	TPMT*1/*1
226	188	9	w	G	58.6	TPMT*1/*1
227	154	3	m	G	58.9	TPMT*1/*1
228	243	11	w	G	59.0	TPMT*1/*1
229	219	1	w	H	60.1	TPMT*1/*1
230	22	12	m	H	61.3	TPMT*1/*1
231	190	14	m	G	61.7	TPMT*1/*1
232	220	4	m	H	62.3	TPMT*1/*1
233	83	45	m	G	63.2	TPMT*1/*1
234	99	72	m	G	63.3	TPMT*1/*1
235	155	18	m	G	63.3	TPMT*1/*1
236	247	15	m	G	63.6	TPMT*1/*1
237	128	66	w	G	64.2	TPMT*1/*1
238	258	61	w	D	64.3	TPMT*1/*1
239	249	10	w	G	65.0	TPMT*1/*1
240	56	1	w	H	65.6	TPMT*1/*1
241	43	2	m	H	65.7	TPMT*1/*1
242	193	8	m	G	66.5	TPMT*1/*1
243	160	37	m	G	66.7	TPMT*1/*1
244	209	13	m	G	67.9	TPMT*1/*1
245	98	12	w	G	68.1	TPMT*1/*1
246	146	40	m	N	68.5	TPMT*1/*1
247	176	15	m	G	70.1	TPMT*1/*1

<b>Nr.</b>	<b>ID</b>	<b>Alter</b>	<b>Gesch.</b>	<b>Einsender</b>	<b>TPMT-Aktivität [U.g<sup>-1</sup>Hb]</b>	<b>Genotypisierung</b>
248	236	6	w	G	70.1	TPMT*1/*1
249	169	6	w	H	72.1	TPMT*1/*1
250	49	15	m	H	72.5	TPMT*1/*1
251	242	76	w	D	73.6	TPMT*1/*1
252	180	14	m	G	73.7	TPMT*1/*1
253	170	4	w	H	74.0	TPMT*1/*1
254	204	17	m	G	76.6	TPMT*1/*1
255	173	1	m	G	76.7	TPMT*1/*1
256	222	1	m	H	77.2	TPMT*1/*1
257	244	15	m	G	77.3	TPMT*1/*1
258	153	23	m	T	77.9	TPMT*1/*1
259	164	19	m	G	78.3	TPMT*1/*1
260	77	3	m	G	79.9	TPMT*1/*1
261	224	13	w	G	81.0	TPMT*1/*1
262	211	2	w	G	82.9	TPMT*1/*1

## 8 Danksagung

Herrn PD Dr. med. D. Hartwig danke ich sehr für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas, die Einführung in die Prinzipien wissenschaftlichen Arbeitens und seine ausgezeichnete Betreuung und konstruktiven Ratschläge während der gesamten Zeit der Entstehung dieser Arbeit.

Besonderem Dank bin ich Herrn Prof. Dr. med. M. Seyfarth, dem ehemaligen Direktor des Instituts für Klinische Chemie, verpflichtet. Ohne seine persönliche Förderung und Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. H. Iven für die fachlich wertvolle Beratung in Fragen zur Phänotypisierungsmethode aus seiner Arbeitsgruppe sowie die Zusammenarbeit im Rahmen der Untersuchung hämatologischer Patienten.

Mein Dank gilt Frau K. Stark, der medizinisch-technischen Assistentin aus dem Institut für Klinische Chemie, für die Einführung in die Bedienung der HPLC-Anlagen und ihre tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Meinem Kollegen Herrn Dr. rer. nat. L. Dibbelt danke ich für wertvolle Hinweise bei Durchsicht meiner Dissertation, insbesondere im Bereich der HPLC-Analytik.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. H. Merz aus dem Institut für Pathologie sowie Herrn Prof. Dr. med. J. Rupp und Herrn Prof. Dr. med. J. Knobloch aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene für ihre freundliche Erlaubnis, meine Untersuchungen in ihren PCR-Laboren durchzuführen.

Für die schnelle Einarbeitung in die Bedienung des LightCycler-Instruments bedanke ich mich bei Frau B. Steinfeldt, der medizinisch-technischen Assistentin aus dem Institut für Pathologie.

Herrn Prof. Dr. med. R. Junker, Direktor des Instituts für Klinische Chemie, danke ich für die Freistellung für den Abschluß dieser Arbeit. Des weiteren bedanke ich mich bei meinen Kolleginnen Frau Dr. med. D. Pauli, Frau Dr. med. D. Manner und Frau K. Krieg und meinem Kollegen Herrn Dr. rer. nat. M. Marx für ihre moralische Unterstützung insbesondere in der finalen Phase der Fertigung dieser Arbeit.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mich immer motivierten und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

## 9 Lebenslauf

## **10 Kongressbeitrag**

**Sharifzadeh S, Iven H, Stark K, Dibbelt L, Seyfarth M, Hartwig D.**  
Labordiagnostik der TPMT (Thiopurin-S-Methyltransferase)-Defizienz  
Phenotypisierung vs. Genotypisierung. Posterpräsentation auf der 5.  
Jahrestagung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und  
Laboratoriumsmedizin e.V. 21.-24.09.2008 Mannheim. Abstract im Abstractband  
*CCLM Vol. 46 No. 9: A187, 2008.*