Therapie mit Thiopurin-Medikamenten – TDM und Pharmakogenomik der TPMT

Therapy with Thiopurine Drugs – TDM and Pharmacogenomics of TPMT

Maria Shipkova¹, N. von Ahsen²

Zusammenfassung: Bei den Thiopurinen gibt es eine über Jahrzehnte gewachsene klinische Erfahrung in der Therapie von Leukämien und der Immunsuppression. Bereits seit über 20 Jahren ist ein genetischer Polymorphismus der TPMT (Thiopurin-S-Methyltransferase) bekannt, des Schlüsselenzyms der Thiopurin-entgiftung. Eine komplette TPMT-Defizienz führt zu einer hohen Konzentration aktiver Metabolite unter einer Standardtherapie mit Thiopurinen, wodurch eine lebensbedrohliche Myelosuppression ausgelöst wird. Eine Phänotypisierung durch Messung der TPMT-Aktivität in Erythrozyten vor Beginn einer Thiopurintherapie wird dringend empfohlen, da hierdurch die meisten Risikopatienten identifiziert werden können. Die Phänotypisierung kann mittels eines radiochemischen oder HPLC-basierten Assays durchgeführt werden. Bei einer Bluttransfusion innerhalb der letzten 2–3 Monate ist eine Genotypisierung die Methode der Wahl. Allerdings besteht bei der Genotypisierung ein geringes Restrisiko bzgl. der Prädiktion einer TPMT-Defizienz, da routinemäßig nur auf Vorliegen der häufigsten Defektmutationen untersucht werden kann. Auf Grund der sehr großen interindividuellen Variation der Thiopurinpharmakokinetik wird zur weiteren Optimierung einer Therapie die Bestimmung der 6-Thioguaninnukleotid-Konzentration in Erythrozyten empfohlen. Durch Messung dieser aktiven Thiopurinmetabolite ermöglicht auch eine Überprüfung der Patientencompliance. Das Drug-Monitoring kann nicht die Kontrolle allgemeiner Toxizitätsparameter (Leukozytenzahl, Transaminasen usw.) ersetzen, es liefert vielmehr ergänzende Information. Diese Vorgehensweise ermöglicht eine relativ sichere, effektive und nebenwirkungsarme Therapie mit Thiopurinmedikamenten.

Schlüsselwörter: Thiopurine; Thiopurin S-Methyltransferase; Drug-Monitoring; Genotyp; Phänotyp.

Summary: Clinicians look back on decades of experience with the use of thiopurine drugs in the treatment of leukaemia and immunosuppression. TPMT (thiopurine-S-methyltransferase) is the key enzyme of thiopurine drug catabolism. The enzyme activity underlies a genetic polymorphism that has been known for over 20 years. TPMT deficiency leads to accumulation of active metabolites and life-threatening myelosuppression under therapy with standard dosage. Phenotyping by measuring the erythrocyte TPMT activity before initiation of any thiopurine drug therapy is highly recommended to detect TPMT-deficient patients. Phenotyping methods include a radiochemical assay and HPLC-based methods. A blood transfusion within the last 2–3 months may cause false test results due to contamination with donor erythrocytes. In such cases, genotyping is superior. A low risk of not detecting all deficient cases exists, since routine screening can normally only check for the presence of the most common deficiency-causing alleles. Individual thiopurine pharmacokinetics are variable and therapeutic drug monitoring is recommended for therapy optimization and compliance check. Therapeutic drug monitoring is no substitute for the monitoring of general toxicity indicators such as leukocyte counts and liver enzyme tests, but rather gives additional information. This approach leads to a relatively safe, efficient and well-tolerated thiopurine therapy.

Keywords: thiopurines; thiopurine S-methyltransferase; therapeutic drug monitoring; genotype; phenotype.

1. Metabolismus der Thiopurine

Thiopurinmedikamente (Azathioprin, 6-Mercaptopurin und 6-Thioguanin) werden sowohl in der Chemotherapie von hämopoetischen Neoplasien als auch zur Immunsuppression bei Autoimmunerkrankungen und in der Transplantationsmedizin eingesetzt. Die Thiopurine sind inaktive Prodrugs, die erst in 6-Thioguaninnukleotide (6-TGN) umgewandelt werden müssen, um antiproliferativ und immunsuppressiv zu wirken. Es wird allgemein angenommen, dass die 6-TGN durch Einbau in DNA und RNA mit deren Synthese interferieren [1, 2]. Sie sind auch für die toxischen Nebenwirkungen

¹Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und Klinische Chemie, Klinikum Stuttgart, Katharinenhospital.

²Abteilung Klinische Chemie, Georg-August-Universität, Göttingen.

Korrespondenz: Dr. Nicolas von Ahsen, Georg-August Universität, Abt. Klinische Chemie, Robert-Koch-Str. 40, 37075 Göttingen, Deutschland.

Fax: +49 551 39-12 504

E-mail: nahsen@gwdg.de

Abbildung 1 Stoffwechsel der Thiopurinmedikamente (vereinfacht). AZA, Azathioprin; HGPRT, Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase; MMP, 6-Methylmercaptapurin; MMPN, Methylmercaptapurinnukleotide; 6-MP, 6-Mercaptopurin; MTG, 6-Methylthioguanin; MTGN, Methylthioguaninnukleotide; 6-TG, 6-Thioguanin; TGMP, Thioguanosin-5-monophosphat; 6-TGN, 6-Thioguaninnukleotide; TIMP, Thioinosin-5-monophosphat; TPMT, Thiopurin-S-Methyltransferase; TU, Thioharnsäure; TXMP, Thioxanthosin-5-monophosphat; XO, Xanthinoxidase.

der Thiopurintherapie verantwortlich. 6-TGN entstehen durch einen mehrstufigen Metabolismus [3, 4], der mit dem Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) beginnt (Abb. 1). 6-Mercaptopurin (6-MP) kann zusätzlich durch die Thiopurin-S-Methyltransferase (TPMT, EC 2.1.1.67) in 6-Methylmercaptapurin (6-MMP) oder durch die Xanthinoxidase (XO) in Thioharnsäure umgewandelt werden. Beide Metabolite sind inaktiv. Im Fall von 6-Thioguanin kann die XO das Medikament nur nach einer durch Guanase katalysierten Vorreaktion metabolisieren. Die Bildung von 6-MMP und Thioharnsäure konkurriert mit der Entstehung aktiver 6-TGN. Ein weiterer konkurrierender Weg ist die TPMT-vermittelte Metabolisierung von Thioinosin-5-Monophosphat (TIMP) und Thioguanosin-5-Monophosphat (TGMP) zu den entsprechenden Methylnukleotiden. Die Methylmercaptapurinnukleotide (MMPN) sind ein potenter Inhibitor der *de novo* Purinsynthese [4–6], der ebenfalls zur Zytotoxizität unter der Therapie mit 6-Mercaptopurin und Azathioprin beitragen könnte. Die klinische Bedeutung dieses Wegs ist noch unklar. Möglicherweise kann die Tatsache, dass Patienten mit reduzierter bis fehlender TPMT-Aktivität im Vergleich zu Patienten mit normaler TPMT-Aktivität höhere 6-TGN-Konzentrationen tolerieren, durch entsprechend niedrigere MMPN-Konzentrationen bei der ersten Patientengruppe erklärt werden [4, 7].

2. Die Variabilität der Pharmakokinetik von Thiopurinmedikamenten

Die Pharmakokinetik von Thiopurinmedikamenten und damit die Konzentration deren zytotoxischer Metabolite unterliegt einer großen intra- und interindividuellen Variabilität [8]. Hierfür werden sowohl genetische als auch epigenetische Faktoren verantwortlich gemacht [9, 10]. Trotz der kurzen Halbwertszeit von 6-Mercaptopurin im Plasma (ca. 1–2 h), reichern sich die aktiven 6-TGN intrazellulär unter kumulativer Thiopurindosierung an. Die Halbwertszeit der 6-TGN in Erythrozyten ist lang und stark streuend (3–13 Tage) [11].

Die Bioverfügbarkeit einer oral verabreichten Standarddosis von 6-Mercaptopurin ist gering und variiert als Folge eines extensiven „First-pass“-Metabolismus durch die XO in Darm und Leber ebenfalls deutlich (5–37 %). Obwohl kein genetischer Polymorphismus für dieses Enzym bekannt ist, haben Populationsstudien einen 4–10fachen Unterschied der XO-Aktivität bei verschiedenen Individuen gezeigt [10]. Die Komedikation mit Allorurinol – einem Inhibitor der XO – ist mit einem starken Anstieg der 6-Mercaptopurin- und 6-TGN-Konzentrationen verbunden [12–14] und kann zu schwerer Toxizität führen [10, 11, 13].

Eine verminderte bis fehlende Aktivität der HGPRT (z. B. Patienten mit Lesch-Nyhan-Syndrom) führt zu einer Resistenz gegen eine Thiopurintherapie [13, 15]. Dieses Enzym katalysiert den ersten Schritt zur Bildung der zytotoxischen 6-TGN.

Die Aktivität der TPMT, dem dritten wichtigen Enzym des Thiopurinmetabolismus, zeigt ebenfalls eine große interindividuelle Variation [3, 16]. Dieses ist durch einen genetischen Polymorphismus begründet, der wahrscheinlich den bedeutendsten Faktor für die variable Pharmakodynamik und Pharmakokinetik von Thiopurinmedikamenten darstellt. Unter Standarddosierung bauen Patienten mit intermediärer TPMT-Aktivität 2–3 mal höhere 6-TGN-Konzentrationen auf, als Patienten mit normaler TPMT-Aktivität. Patienten mit vollständiger TPMT-Defizienz entwickeln 10–20-fach höhere 6-TGN-Konzentrationen, was immer zu einer schweren Myelodepression führt.

Auch epigenetische Faktoren können einen Einfluss auf die TPMT-Aktivität besitzen. Dazu zählt die Thiopurintherapie selbst, die zu einer 25–35%igen Enzyminduktion führen kann [8, 9, 11, 17]. Die Ursache für diese Induktion ist bisher ungeklärt, allerdings wurde eine Stabilisierung des Enzyms gegenüber einem unbekannten Inhibitor oder eine Substratprotektion gegen eine *in vivo* Proteolyse als mögliche Ursachen diskutiert [11]. Weiterhin weisen *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen daraufhin [18–20], dass Aminosalazylsäure und ihre Derivate (z. B. Sulphasalazin, Olsalazin, Mesalamin), die als Co-Therapie bei entzündlichen Darmerkrankungen eingesetzt werden, zu einer Hemmung der TPMT in Erythrozyten und entsprechend erhöhten 6-TGN-Konzentrationen führen können. Lewis

et al. berichteten über eine schwere Myelosuppression unter Mercaptopurin/Olsalazin-Kombinationsmedikation bei einem Patienten mit M. Crohn und einer basalen TPMT-Aktivität im niedrigen Normalbereich [18]. Weitere Untersuchungen sollten die klinische Relevanz dieser Beobachtungen überprüfen. Studien haben gezeigt, dass die Therapie mit Diuretika *in vivo* zu einer Induktion der TPMT-Aktivität führen kann [21]. Furosemid hatte allerdings *in vitro* einen hemmenden Effekt auf die TPMT-Aktivität in Erythrozyten [22]. Eine erhöhte TPMT-Aktivität wurde in Erythrozyten bei Patienten mit Urämie beobachtet [23, 24], während urämisches Plasma *in vitro* die TPMT-Aktivität hemmte [24]. Als Grund für die beobachteten *in vivo* Effekte wurde ebenfalls eine Hemmung der TPMT-Degradation vermutet [9].

Die Wirkung zahlreicher Faktoren, die die Pharmakokinetik von Thiopurinmedikamenten beeinflussen, kann als Konsequenz sowohl eine lebensbedrohliche Hämatotoxizität als auch ein Therapieversagen haben. Vor diesem Hintergrund erscheint zur Optimierung des therapeutischen Effekts ein Drug-Monitoring sinnvoll.

3. Parameter zum Monitoring der Therapie mit Thiopurinmedikamenten

3.1 6-TGN-Konzentration

Wie bereits erwähnt, ist die Bildung von 6-TGN und deren Einbau in die DNA sowohl für den Effekt der Thiopurintherapie als auch für deren Hämatotoxizität verantwortlich. Die 6-TGN-Konzentration in Erythrozyten korreliert mit dem Ausmaß der 6-TGN-Inkorporation in die DNA von Leukozyten [25]. Deshalb wird die erythrozytäre 6-TGN-Konzentration allgemein als Surrogatmarker für das Monitoring der Therapie verwendet. In mehreren Studien mit unterschiedlichen Patientenkollektiven wurde ein Zusammenhang zwischen der 6-TGN-Konzentration in Erythrozyten und dem Therapieerfolg sowie einer Myelosuppression als schwerwiegende Nebenwirkung beobachtet. Für pädiatrische Patienten mit ALL fanden Lennard et al. unter einer Therapie mit 6-Mercaptopurin das krankheitsfreie Überleben signifikant mit der 6-TGN-Konzentration in Erythrozyten assoziiert [26]. ALL-Patienten mit einer 6-TGN-Konzentration von mehr als $275 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ Erythrozyten hatten eine deutlich bessere Prognose [27]. Für die Chemotherapie von Leukämien mit 6-Mercaptopurin werden effektive therapeutische 6-TGN-Konzentrationen von $500\text{--}1000 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ Erythrozyten diskutiert.

Bei Patienten mit Colitis ulcerosa und Morbus Crohn sind die Beobachtungen nicht einheitlich. Allerdings wurde in drei Studien eine Assoziation zwischen überdurchschnittlichen 6-TGN-Konzentrationen und verminderter Krankheitsaktivität gezeigt [28–30]. In der Untersuchung von Cuffari et al. ging bei erwachsenen Patienten mit entzündlicher Darmerkrankung der Erfolg einer Azathioprintherapie mit einer 6-TGN-Konzentra-

tion über $250 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ Erythrozyten einher [30]. Ein ähnlicher Cut-off ($> 235 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ Erythrozyten) für einen Therapieerfolg wurde in der Studie von Dubinsky et al. [29] bei pädiatrischen Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen berichtet. Für die Therapie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen mit Azathioprin wird ein vorläufiger therapeutischer Bereich von $250\text{--}450 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ Erythrozyten vorgeschlagen [31, 32].

Auch in der Transplantationsmedizin konnte ein Zusammenhang zwischen 6-TGN-Konzentrationen in Erythrozyten und dem Abstoßungsrisiko gefunden werden [13, 33, 34]. Beispielsweise wurde bei Nierentransplantatempfängern unter entweder niedriger oder hoher Azathioprinosis gezeigt, dass die kumulative Inzidenz einer frühen Abstoßung um 21 % reduziert war, wenn die 6-TGN-Konzentrationen zwischen 100 und $200 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ Erythrozyten betrugen [33]. Auf dieser Basis wird heute empfohlen, bei Empfängern solider Organe unter Dreifachtherapie mit Ciclosporin und Prednison die 6-TGN-Konzentration auf $100\text{--}450 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ Erythrozyten einzustellen [31, 32].

Die 6-TGN-Konzentrationen wurden nicht nur mit dem Therapieerfolg in Zusammenhang gebracht, sondern auch mit unerwünschten hämatologischen Nebenwirkungen. Verschiedene Gruppen konnten bei Patienten mit ALL [35, 36] oder nach Organtransplantation [13, 14, 37] eine Assoziation zwischen den 6-TGN-Konzentrationen in Erythrozyten und dem Risiko einer Leukopenie beobachten. Allerdings war das nicht immer bei Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen oder Glomerulonephritis der Fall [14, 28].

Bei der Beurteilung der 6-TGN-Konzentration ist zu berücksichtigen, welches Thiopurinmedikament verabreicht wird. Während unter der Therapie mit 6-Mercaptopurin und 6-Thioguanin vergleichbare 6-TGN-Konzentrationen in Leukozyten beobachtet wurden, lagen die 6-TGN-Konzentrationen in Erythrozyten unter der Therapie mit 6-Thioguanin etwa fünfmal höher als unter der Therapie mit 6-Mercaptopurin [38]. Eine Erklärung hierfür kann im unterschiedlichen Metabolismus der beiden Thiopurine in Leukozyten und Erythrozyten liegen, der zu einer gesteigerten Akkumulation von 6-TGN in letzteren unter 6-Thioguanin-Therapie führt. Als Konsequenz ist zu erwarten, dass unter einer Therapie mit 6-Thioguanin höhere therapeutische 6-TGN-Bereiche in Erythrozyten anzusetzen sind, welche aber bisher nicht systematisch ermittelt wurden.

3.2 6-MMPN-Konzentration

Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass möglicherweise auch die Bestimmung der MMPN-Konzentration eine Rolle für die Optimierung der Therapie mit 6-Mercaptopurin und Azathioprin spielen kann.

In Untersuchungen von Cuffari et al. [28] und Dubinsky et al. [29] bei Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen konnte kein Zusammenhang zwischen MMPN-Konzentrationen und dem klinischen Erfolg der Therapie beobachtet werden, aber mit dem

Auftreten von Hepatotoxizität. In der Studie von *Dubinsky et al.* [29] wurde bei MMPN-Konzentrationen über $5700 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ Erythrozyten ein dreifach erhöhtes Risiko für hepatotoxische Nebenwirkungen im Vergleich zu niedrigeren Konzentrationen gefunden. Dieselbe Arbeitsgruppe beobachtete bei einigen Patienten mit M. Crohn und Colitis ulcerosa, dass eine Steigerung der 6-Mercaptopurin- oder Azathioprin-Dosis nicht zu einem adäquaten Anstieg der 6-TGN-Konzentration in den Erythrozyten der betroffenen Patienten führte, sondern zu einer Überproduktion von 6-MMPN, welche mit einem Therapieversagen und gesteigerter Hepatotoxizität einher ging [39]. Die Ursache für diesen atypischen Thiopurinmetabolismus ist bisher unbekannt. Die Autoren schlagen als Alternative bei solchen Patienten den Wechsel zu einer Therapie mit 6-Thioguanin vor [40], das im Vergleich zu 6-Mercaptopurin einer deutlich geringeren Metabolisierung durch TPMT unterliegt, wodurch es zu einer direkteren Bildung der wirksamen 6-TGN kommt.

Bei jeweils sehr geringen Fallzahlen wurden bei Kindern mit ALL unter Chemotherapie normale 6-TGN-Spiegel [41], bzw. eine Wildtyp-TPMT-Aktivität [17] mit einer Hepatotoxizität assoziiert. Ob es bei den Betroffenen tatsächlich zu einer hepatischen Akkumulation von 6-MP und/oder seinen methylierten Metaboliten kommt [41], wurde nicht geklärt. Allerdings scheinen diese Ergebnisse die Beobachtungen bei Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen zu unterstützen.

Bei Kindern mit ALL unter der Therapie mit 6-Mercaptopurin wurde beobachtet, dass Patienten mit einer erhöhten TPMT-Aktivität erwartungsgemäß größere Dosen benötigten, um therapeutische 6-TGN-Konzentrationen zu erreichen. Dieses ging auch mit höheren 6-MMPN-Konzentrationen in den Erythrozyten einher und war mit einer gesteigerten Inzidenz von infektiösen Komplikationen assoziiert. Ein solcher Zusammenhang konnte für die 6-TGN-Konzentrationen nicht gesehen werden [35].

Weitere Studien sind notwendig, um die Relevanz der Bestimmung der 6-MMPN-Konzentrationen für die Optimierung der Thiopurintherapie zu überprüfen.

3.3 TPMT-Aktivität (Phänotyp)

Die Thiopurin-S-Methyltransferase ist ein zytosolisches Enzym, dessen Vorkommen in mehreren Geweben (Leber, Niere, Blutzellen, Skelettmuskel usw.) nachgewiesen wurde [16, 42]. Die Aktivität des Enzyms in Erythrozyten korreliert eng mit der Aktivität in anderen Geweben, einschließlich Lymphoblasten [16]. Deshalb kann die TPMT-Aktivität in Erythrozyten als Surrogatmarker verwendet werden, in Analogie zu den 6-TGN-Konzentrationen. Das Enzym katalysiert die S-Methylierung von Sulfhydrylverbindungen. Ein endogenes Substrat ist bisher spekulativ und selbst die homozygote Enzymdefizienz bleibt folgenlos bis zur Einnahme von Thiopurinmedikamenten. Bereits Ende der siebziger Jahre des letzten Jahrhunderts haben *Weinshilboun* und

Sladek gezeigt, dass 89 % der Kaukasier homozygot für ein Gen sind, das für eine hohe TPMT-Aktivität verantwortlich ist [16]. Heterozygot waren ~ 11 %, und diese Individuen zeigten eine intermediäre TPMT-Aktivität. Eine von 300 Personen war homozygot TPMT-defizient und hatte keine messbare TPMT-Aktivität. Mittlerweile wurde der TPMT-Polymorphismus in zahlreichen Populationsuntersuchungen weltweit erforscht. Einige Studien [43, 44] haben ethnische Unterschiede in der TPMT-Aktivität gefunden (z. B. etwa 17 % niedrigere TPMT-Aktivität bei schwarzen Amerikanern im Vergleich zu weißen Amerikanern). Andere Autoren haben über geschlechtsabhängige Variationen mit höherer TPMT-Aktivität bei Männern als bei Frauen berichtet (45). Es gibt Hinweise darauf, dass Kleinkinder und besonders Neugeborene über eine höhere TPMT-Aktivität als Erwachsenen verfügen [46, 47]. Allerdings konnte eine Altersabhängigkeit nicht in allen Studien gefunden werden [48, 49].

Die Metabolisierung von Thiopurinen über die TPMT konkurriert mit der Entstehung aktiver 6-TGN (Abb. 1). Klinische Studien konnten eine inverse Korrelation zwischen TPMT-Aktivität und intrazellulärer 6-TGN-Konzentration zeigen [26, 50]. Mittlerweile ist durch mehrere Fallberichte untermauert, dass TPMT-defiziente Patienten 10–20-fach höhere 6-TGN Konzentrationen unter Standard-Thiopurindosierung aufbauen und ausnahmslos unter einem sehr hohen Risiko für die Entwicklung einer schweren bis lebensbedrohlichen Knochenmarkdepression stehen [7, 26, 50–53]. Die Bestimmung der TPMT-Aktivität eignet sich daher als Screeningverfahren zur Erkennung dieser Patienten vor Einleitung einer Therapie mit Thiopurinen. In solchen Fällen ist zu prüfen, ob ein anderes Immunsuppressivum alternativ eingesetzt werden kann. Müssten trotzdem Thiopurinmedikamente zur Anwendung kommen, ist die sorgfältige Überwachung der 6-TGN-Konzentration unerlässlich [32]. Es wurde gezeigt, dass eine Dosisreduktion auf 5–10 % der Standarddosierung bei Leukämiekranken mit TPMT-Defizienz eine erfolgreiche Fortsetzung der Therapie ermöglicht [17].

Im Unterschied zu homozygoten Patienten bauen heterozygote intermediäre 6-TGN-Konzentrationen auf, die ebenfalls mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Myelodepression einhergehen. Allerdings sind Häufigkeit und Schweregrad der Myelodepression in dieser Patientengruppe geringer als bei völlig TPMT-Defizienten [7, 17]. Dieses wurde in einer Untersuchung der Arbeitsgruppe von *Evans* in Memphis gezeigt [17], in der bei ALL-Patienten mit unterschiedlicher TPMT-Aktivität der Metabolismus, die Verträglichkeit und die benötigte Dosis von 6-Mercaptopurin untersucht wurden. Es wurde über 2,5 Jahre verfolgt, wie häufig die Dosis reduziert werden musste, um eine Toxizität zu vermeiden. Dies war bei allen Homozygoten innerhalb der ersten 6 Monate der Fall, bei den Heterozygoten in 12 % nach einem Jahr und in 35 % nach 2,5 Jahren. Die Patienten mit hoher TPMT-Aktivität haben die Therapie im ersten Jahr sehr gut vertragen

Abbildung 2 Darstellung der bekannten TPMT-Defektallele (schematisch). Introne sind als Linien, Exone als Boxen dargestellt. Kodierende Exone sind schwarz, nicht kodierende weiß, in grauen Exonen finden sich kodierende Mutationen. Das Vorhandensein von Exon 2 wurde in Frage gestellt [60].

und nur in 7 % der Fälle war nach 2,5 Jahren eine Reduzierung der Dosis notwendig. In einer anderen Studie der Arbeitsgruppe [17] wurden Patienten mit Thiopurinintoleranz untersucht. Die Dosisreduktion der Thiopurintherapie bei Heterozygoten war interindividuell variabel und umfasste eine Spanne von 0 bis 93 %. Die Diagnose einer vollständigen oder partiellen TPMT-Defizienz ermöglichte eine adäquate Thiopurindosierung und adaptierte Behandlung. Dadurch wurde die Chance für eine kurative Therapie der ALL deutlich verbessert.

Auch bei entzündlichen Darmerkrankungen hat die heterozygote TPMT-Defizienz einen Einfluss auf den Erfolg einer Therapie mit 6-Mercaptopurin oder Azathioprin [29]. In dieser Studie haben die Heterozygoten offensichtlich von ihrem Defekt profitiert. Ein Therapieerfolg wurde bei allen Heterozygoten beobachtet, aber nur bei 46 % der Patienten mit Wildtyp. Der Therapieerfolg war mit höheren 6-TGN-Konzentrationen bei nicht signifikant unterschiedlicher Mediandosis assoziiert.

Interessanterweise fand sich bei 13 Patienten mit einer Leukopenie nur ein Heterozygoter. Auch in weiteren Studien mit Crohn- oder Colitis ulcerosa-Patienten und systemischem Lupus erythematodes [30, 54, 55] wurde die Beobachtung gemacht, dass der TPMT-Polymorphismus alleine kein ausreichender Prädiktor für die Myelosuppression bei solchen Patienten war. Eine Leukozytenzählung im Rahmen der Überwachungsmaßnahmen ist deshalb unerlässlich. Andererseits berichteten Schütz et al. [13] von einem Herztransplantierten, bei dem wegen eines Leukozytenabfalls die Azathioprintherapie abgesetzt wurde und der in der Folge an einer akuten Abstoßung verstarb. Retrospektiv konnte festgestellt werden, dass bei diesem Patienten keine TPMT-Defizienz, sondern eine sehr niedrige 6-TGN-Konzentration vorlag. Die Neutropenie war nicht durch Azathioprintoxizität verursacht. Dies zeigt deutlich, dass auch die Leukozytenzählung alleine das Monitoring der Therapie mit Thiopurinmedikamenten nicht ersetzen kann. Die Bestimmung der 6-TGN-Konzentra-

tionen kann in solchen Fällen zu einer Differenzierung zwischen thiopurinbedingten oder durch andere Faktoren (z. B. Virusinfektionen, Begleitmedikation) ausgelöste Leukopenien beitragen und damit eine individualisierte Therapie ermöglichen.

Nicht nur eine eingeschränkte TPMT-Aktivität ist für die Therapie mit Thiopurinmedikamenten relevant. Es gibt auch Hinweise in der Literatur, dass eine überdurchschnittlich hohe TPMT-Aktivität einen negativen Einfluss auf den Erfolg einer Thiopurintherapie hat. Bei Kindern mit einer ALL [26] und bei Nierentransplantierten [34] waren höhere TPMT-Aktivitäten mit einer niedrigeren 6-TGN-Konzentration verbunden. In diesen Kollektiven wurde eine erhöhte Rezidivrate bzw. ein erhöhtes Abstoßungsrisiko beobachtet.

3.4 Molekulare Genetik der TPMT

Die *TPMT* cDNA konnte 1993 von der Arbeitsgruppe um Weinshilboum kloniert werden [56]. Damit wurde die Grundlage für die molekulardiagnostische Mutationsanalytik gelegt und eine Phänotyp-Genotyp-Korrelation ermöglicht. Die PCR-Analytik wird durch das Vorliegen eines prozessierten *TPMT*-Pseudogens erschwert [57]. Dabei handelt es sich um eine der *TPMT* mRNA homologe Sequenz, die durch reverse Transkription und anschließende genomische Integration entstanden ist (GenBank #U11424). Die „kodierende“ Sequenz des Pseudogens ist zu 96 % homolog zur *TPMT*. Von praktischer Relevanz ist hier, dass PCR-Primer zur Analytik von genomischer DNA immer Exon übergreifend gelegt sein müssen, um die Amplifikation des Pseudogens zu vermeiden. Genauso würde bei der reversen Transkriptions-PCR eine minimale Kontamination der RNA mit DNA zu falschen Ergebnissen führen. Das Design von Exon übergreifenden Primern ist problemlos möglich, da die Struktur des *TPMT*-Gens aufgeklärt wurde. Zunächst wurde von einem 34 kB großen Gen mit 10 Exonen berichtet, dessen Startcodon auf Exon 3 liegt [58]. Später fanden Krynetski et al. lediglich ein 25 kB großes Gen mit 9 Exonen [59]. Das Exon 2 wurde damit bisher nur bei einer von 16 humanen Leber cDNAs nachgewiesen [58] und ist wahrscheinlich als eine seltene Variante zu betrachten. Dieses findet auch eine andere Untersuchung, die wahrscheinlich als abschließend gelten kann. Es fanden sich 9 Exone und ein 27 kB großes Gen (GenBank #AB045146) [60].

Die erste beschriebene funktionelle *TPMT*-Mutation war das (eher seltene) *2-Allel [61] und nur wenig später das bei Kaukasiern häufigste Defektallel *3A [58] (s. Abb. 2). Bei Afrikanern und Afro-Amerikanern ist *3C das häufigste Defektallel [62] ebenso wie bei Asiaten (Übersicht in [3]). Die Prävalenz der Defektallele ist insgesamt unter Asiaten am niedrigsten [63]. Es ist davon auszugehen, dass das *TPMT**3C-Allel das älteste Defektallel ist, da es bei Afrikanern, Asiaten und Kaukasiern zu finden ist. Wahrscheinlich ist die *3C-Mutation weltweit der häufigste Auslöser für eine Thiopurinunverträglichkeit. Durch das Vorliegen einer weiteren Mutation auf dem *3C-Allel (nach der Trennung

von afrikanischen und nicht-afrikanischen Populationen) entstand dann die bei Kaukasiern häufigste Mutation *3A [42, 62]. Insgesamt wurden bisher neben dem für volle Aktivität kodierenden Wildtyp (*1) Allel zehn *TPMT*-Defektallele beschrieben (Übersicht in [64], Abb. 2). Die Ursachen zu verminderter Enzymaktivität führender Mutationen sind auch bei der *TPMT* der Aminosäureaustausch (*TPMT**2, *3A, *3B, *3C, *3D, *5, *6, *7, *8), das vorzeitige Stop-Codon (*TPMT**3D) oder der Verlust eines Splice-Signals (*TPMT**4). Für einige Defektproteine konnte ein beschleunigter intrazellulärer Abbau gezeigt werden (Übersicht in [42]).

Auch beim Vorliegen eines homozygoten *TPMT*-Wildtyps besteht eine interindividuell bis zu 4-fache Variation der *TPMT*-Aktivität. Es müssen also weitere Faktoren vorliegen, die die Enzymaktivität beeinflussen. Ein möglicher genetischer Kandidat ist ein Minisatellit (VNTR) in der *TPMT* 3' nicht kodierenden Region, der aus 17 oder 18 bp Einheiten besteht, die in 3–9 Wiederholungen vorliegen [65, 66]. Eine hohe Anzahl von VNTR-Wiederholungen korrelierte schwach mit einer niedrigen *TPMT*-Aktivität [66, 67], ebenso wurde das Vorliegen bestimmter Sequenzmotive in dem Minisatelliten mit der variablen *TPMT*-Aktivität korreliert [68]. Eine mögliche klinische Bedeutung des VNTR ist noch nicht endgültig abzusehen, jedoch ist sie wahrscheinlich gering. Eine kürzlich publizierte Studie konnte weder eine Assoziation von VNTR-Länge oder Motiven mit der Enzymaktivität herstellen [69].

4. Analytische Verfahren

4.1 Bestimmung der 6-TGN- und 6-MMPN-Konzentration in Erythrozyten

Für die Bestimmung von 6-TGN und 6-MMPN in Erythrozyten werden ausschließlich HPLC-Methoden eingesetzt. Seit der Synthese des ersten Thiopurinmedikamentes – 6-Mercaptopurin – von Elion im Jahr 1951 [70] wurden zahlreiche chromatographische Verfahren entwickelt. Als Ausgangsmaterial für die Erythrozyten-Isolierung werden Heparin- oder EDTA-Vollblut verwendet. Einige Verfahren erlauben die direkte Messung individueller 6-TGN als Mono-, Di-, und Triphosphate [71, 72]. Die Mehrzahl der Verfahren bestimmt allerdings die Konzentration freier 6-TG (manche in Kombination mit 6-MMP), die durch saure Hydrolyse bei hohen Temperaturen (100 °C) aus den Nukleotiden entstehen. Die Methoden zur Quantifizierung freier 6-TG/6-MMP in Erythrozyten unterscheiden sich deutlich hinsichtlich des Hydrolyseschritts (Art und Konzentration der verwendeter Säure, Dauer der Hydrolyse, DTT-Konzentration), der weiteren Probenvorbereitung (verschiedene Extraktionsverfahren oder einfache Enteiweißung), der chromatographischen Bedingungen (verschiedene Säulen in Kombination mit isokratischer oder Gradientelution) und der Detektion (UV oder Fluoreszenz nach einem Derivatisierungsschritt) [73]. Darüber hinaus findet man in der Literatur unterschiedliche Ein-

heiten in denen die Ergebnisse angegeben werden, wie z. B. pmol/0.8*10⁹ Erythrozyten [74–76], nmol/mmol Hämoglobin [77], pmol/100 µL Erythrozyten [78] oder pmol/25 mg Hämoglobin [79]. Diese methodische Vielfalt behindert die Bewertung der Ergebnisse und den Vergleich verschiedener Studien. Die oben erwähnten therapeutischen Bereiche wurden mit der Methode von *Lennard* ermittelt [74, 75], die am weitesten verbreitet ist, aber relativ aufwendig und gesundheitsschädlich durch Verwendung des Neurotoxins Phenylmercuriacetat. Bei der unkritischen Einführung anderer Methoden ist aus o. g. Gründen allerdings Vorsicht geboten. Wir haben kürzlich zeigen können, dass in Patientenproben mit einem anderen häufig verwendeten HPLC-Verfahren nach *Dervieux* und *Bouliou* [76] etwa 2,6-fach höhere 6-TGN Konzentrationen als mit der Methode nach *Lennard* [75] gemessen werden, obwohl eine exzellente Korrelation ($r = 0.98$) zwischen den Ergebnissen beider Verfahren bestand [73]. Auch *Lowry* et al. [80] fanden einen 1,6-fachen Unterschied zwischen 6-TGN-Werten, die mit einer modifizierten *Lennard*-Variante [74] und einer Modifikation des *Erdmann*-Verfahrens [81] bestimmt wurden. In beiden Fällen wurden Unterschiede im Hydrolyseschritt verantwortlich gemacht. Dagegen scheinen die 6-MMP-Konzentrationen nach unserer Erfahrung weniger abhängig von methodischen Unterschieden zu sein (unveröffentlichte Beobachtung). Hierfür könnte eine höhere Stabilität des MMP-Moleküls gegenüber einer Oxidation im Vergleich zum 6-TG-Molekül verantwortlich sein.

Da die 6-TGN und 6-MMPN-Konzentrationen innerhalb eines Dosierungsintervalls relativ stabil sind, kann die Blutentnahme für das Monitoring der Thiopurintherapie im Intervall durchgeführt werden [32, 82].

Auf Grund der analytischen Differenzen können alle therapeutischen Bereiche nur als vorläufig und methodenabhängig betrachtet werden. Eine Standardisierung der analytischen Verfahren ist dringend erforderlich.

4.2 Methoden zur TPMT-Phänotypisierung

Ähnlich wie bei 6-TGN/6-MMPN werden auch zur Bestimmung des TPMT-Phänotyps aus Heparin- oder EDTA-Vollblut isolierte Erythrozyten verwendet. Das älteste und auch heute noch viel verwendete Verfahren zur Bestimmung des TPMT-Aktivität ist die radiochemische Methode nach *Weinshilboum* et al. [83]. Diese basiert auf der Übertragung der radioaktiv markierten Methylgruppe von S-Adenosyl-Methionin auf 6-MP. In letzter Zeit werden zunehmend auch nicht-radioaktive HPLC-Methoden etabliert. Dabei kann man zwischen solchen unterscheiden, die 6-MP [84–88] oder 6-TG [89] als Substrat verwenden. Wie bereits für die Bestimmung der 6-TGN/6-MMPN-Konzentrationen diskutiert, verfügen diese Verfahren über eine unterschiedliche Probenvorbereitung nach dem Inkubationsschritt und unterschiedliche chromatographische Bedingungen. Während 6-MMP als Produkt der enzymatischen Reaktion durch UV-Detektion quantifiziert wird, bietet sich für 6-Methylthioguanin die Fluoreszenzdetektion

an. Da Extraktionsschritte in der Probenvorbereitung zu erhöhter Impräzision führen, wird in letzter Zeit nach Möglichkeiten gesucht, diese zu vermeiden [84, 87, 88]. Grundsätzlich korrelieren die radiochemische Methode und HPLC-Methoden gut und liefern vergleichbare Ergebnisse, wenn 6-MP als Substrat benutzt wird [84–88]. Es ist daher möglich, mit beiden Methoden die etablierten Entscheidungsgrenzen zu verwenden [32]. Bei einer TPMT-Aktivität < 2.8 nmol/(mL Erythrozyten*h) ist eine homozygote TPMT-Defizienz anzunehmen, Aktivitäten < 10 nmol/(mL Erythrozyten*h) sprechen für eine heterozygote Defizienz. Unter Thiopurintherapie werden ca. 30 % höhere Grenzen angesetzt. Wenn 6-TG statt 6-MP als Substrat eingesetzt wird, resultiert eine um 34 % höhere TPMT-Aktivität [90]. Außerdem wurde beobachtet [91], dass einige 6-TG-Präparationen mit unbekannten Inhibitor/en verunreinigt sind, wodurch die Messung gestört wird. Es muss erwähnt werden, dass auch die TPMT-Aktivität in verschiedenen Einheiten angegeben wird, wie z. B. nmol/(mL Erythrozyten*h) [84–88] oder nmol/(g Hämoglobin*h) [89], was den Vergleich der Ergebnisse schwierig macht. Deshalb ist eine Standardisierung der analytischen Verfahren auch für diesen Parameter notwendig.

Die Phänotypisierung kann auf eine üblicherweise im Labor vorhandene Ausstattung zurückgreifen und eignet sich daher als Screeningverfahren zur Aufdeckung von Patienten mit TPMT-Defizienz. Der Aufwand variiert, er ist bei der radiochemischen Methode größer als bei HPLC-Methoden. Inwieweit die Genotypisierung in ihrem Zeit- und Kostenaufwand konkurrenzfähig ist, richtet sich auch nach den lokalen Gegebenheiten. Sie kann allerdings alleine nicht die große interindividuelle Variabilität der TPMT-Aktivität widerspiegeln (2,8–10 nmol/(mL Erythrozyten*h) bei heterozygot defizienter und 9 bis ca. 30 nmol/(mL Erythrozyten*h) bei Wildtyp für hohe Enzymaktivität), die durch genetische und epigenetische Faktoren (z. B. Induktion durch Thiopurine) bedingt ist. Epigenetische Einflüsse können bei Individuen mit TPMT-Aktivitäten um die Entscheidungsgrenzen zu Genotyp/Phänotyp Diskrepanzen führen. Auf der anderen Seite besteht bei der Bestimmung des Phänotyps das Problem, dass die *in vitro* bestimmte TPMT-Aktivität nicht unbedingt die Verhältnisse *in vivo* widerspiegelt, da während der Erythrozytenisolation Modulatoren der Aktivität ausgewaschen werden können [92]. Entscheidend ist wahrscheinlich, ob es sich hierbei um Effekte auf die Proteinsynthese/Proteolyse oder um eine rein funktionelle Modulation handelt. Das bedeutsamste präanalytische Problem bei der Phänotypisierung ist eine Bluttransfusion innerhalb der letzten 3 Monate vor der Probennahme. Die Präsenz der Spendererythrozyten kann die Ergebnisse verfälschen und zu Fehlinterpretationen und entsprechenden Fehldosierungen führen. Deshalb ist bei einer Bluttransfusion innerhalb der letzten 2–3 Monate die Genotypisierung die Methode der Wahl.

Abbildung 3 Diagnostische Strategie zur Thiopurintherapie und prätherapeutischen Erfassung der TPMT-Defizienz.

4.3 Methoden zur TPMT-Genotypisierung

Nach der Entdeckung der häufigsten TPMT-Mutationen stellt die molekulare Diagnostik eine weitere Möglichkeit dar, eine TPMT-Defizienz prätherapeutisch abzuklären. In Studien wurde bisher die Genotypisierung überwiegend zusätzlich zur Aktivitätsmessung durchgeführt. Deshalb gibt es nur wenig Daten über die Sicherheit, mit der eine ausschließliche Genotypisierung die TPMT-Defizienz erfasst. Es ist davon auszugehen, dass 80–95 % hetero- und homozygoter Fälle identifiziert werden [3]. Die therapeutischen Folgen bei hetero- und homozygoter Defizienz sind bereits im Kapitel 3.3 dargelegt. Es ist mindestens der Nachweis von *TPMT**2, *3A und *3C zu fordern, um die häufigsten Mutationen in den unterschiedlichen ethnischen Gruppen zu erfassen. Im Umkehrschluss ergibt sich, dass min. 5 % der Defizienzen nicht durch eine Genotypisierung nachgewiesen werden. Es findet sich keine Mutation in der kodierenden Sequenz (*TPMT**X). Es ist noch unklar, ob solche Fälle ausschließlich durch epigenetische Faktoren zu erklären sind, oder ob hier ein putativer TPMT-Kofaktor ebenfalls einem genetischen Polymorphismus unterliegt. Eine lebensbedrohliche homozygote Defizienz ist nach Ausschluss der häufigsten Mutationen (*TPMT**2, *3A und *3C) nicht zu erwarten, denn das setzt die unwahrscheinliche Homozygotie für zwei äußerst seltene Allele voraus. Evans et al. berichten z. B. über eine 100%ige TPMT-Genotyp-Phänotyp-Konkordanz bei Vorliegen des Wildtyps oder der homozygoten Defizienz, allerdings fanden sich bei 5 von 9 Patienten mit intermediärer Aktivität nicht die *TPMT**2-, *3A- und *3C-Mutationen [17]. Es ist hier anzumerken, dass es sich hierbei um ein auf schwere Nebenwirkungen selektiertes Patientenkollektiv handelte. Die Suche nach den seltenen Mutationen *TPMT**4-*8 ist nicht zu empfehlen. Es handelt sich dabei um private Mutationen, die bisher lediglich in Einzelfällen beschrieben wurden. Allerdings könnte bei Afro-Amerikanern (und Afri-

kanern) der Anteil noch unbekannter Mutationen (*TPMT**X) größer sein, als bei Kaukasiern [62].

Aufgrund der bereits beschriebenen Problematik sind validierten Methoden der Vorzug zu geben. Eine große Verbreitung hat die RFLP-PCR-Methodik nach Yates gefunden [93]. Weitere Möglichkeiten stellen je nach vorhandenem Instrumentarium die dHPLC-Analytik [94] oder Real-time-PCR dar [95]. Besonders kritisch ist hier die RFLP-PCR zu bewerten. Es sind einige Fehltypisierungen aufgrund von inkomplettem Restriktionsenzymverdaul beschrieben [96], so dass diesbezüglich eine strikte Qualitätskontrolle nötig ist.

Das *3A-Allel wird routinemäßig durch den getrennten Nachweis von Mutationen auf verschiedenen ca. 9 kB entfernten Exonen detektiert. Dieses geschieht unter Annahme einer 100%igen Kopplung der SNPs 460A und 719 G, die jedoch als *TPMT**3B und *TPMT**3C auch in *trans* vorliegen können. Allerdings ist das *TPMT**3B-Allel bisher weltweit erst in weniger als 10 Fällen beschrieben worden [63]. Somit besteht die äußerst seltene, jedoch methodisch immanente Möglichkeit, einen kombiniert *TPMT**3B/*TPMT**3C-Heterozygoten falsch als *TPMT**3A zu diagnostizieren [95]. Die Konsequenzen für den Phänotyp sind im ersten Fall eine totale, im zweiten Fall eine lediglich intermediäre Defizienz. Dieser Fall kann durch eine Haplotypisierung entdeckt werden, d. h. eine gleichzeitige Untersuchung der Eltern, oder mittels spezieller PCR-Techniken [97], die inzwischen auch kombiniert mit der Real-time-PCR möglich ist [98]. Alternativ ist die technisch ebenfalls aufwendige RNA-basierte Genotypisierung möglich. Diese erfordert zusätzlich einen reversen Transkriptionsschritt vor dem Mutationsnachweis mittels allelespezifischer PCR oder Klonierung gefolgt von RFLP oder Sequenzierung. Bei allen von RNA ausgehenden Methoden besteht jedoch die erwähnte Gefahr der Amplifikation des *TPMT*-Pseudogens. In der klinischen Praxis werden Fälle von unerklärter Thiopurin-Toxizität eher auf die Begleitmedikation als auf das Vorliegen eines *TPMT**3B/*TPMT**3C-Genotyps zurückzuführen sein.

Neben den erwähnten kodierenden Mutationen (Abb. 2) sind weitere stumme und intronische Mutationen bekannt [60, 94]. Die Lage dieser SNPs und ggf. das Vorliegen weiterer noch nicht bekannter SNPs sind zu berücksichtigen, v. a. wenn der Mutationsnachweis mit dHPLC- oder SSCP-Technik erfolgt. Diese Techniken liefern dann falsch positive Ergebnisse. Auch bei der Suche nach möglichen intronischen PCR-Primern sollten diese Regionen gemieden werden, da sonst Fehlgenotypisierungen aufgrund der präferentiellen Amplifikation eines Stranges möglich sind.

5. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Bei den Thiopurinen gibt es eine über Jahrzehnte gewachsene klinische Erfahrung in der Therapie von Leu-

kämien und der Immunsuppression. Bereits seit über 20 Jahren ist ein genetischer Polymorphismus der TPMT bekannt, des Schlüsselenzyms der Thiopurinentgiftung. Eine komplette TPMT-Defizienz führt zu einer hohen Konzentration aktiver Metabolite unter einer Standardtherapie mit Thiopurinen, wodurch eine lebensbedrohliche Myelosuppression ausgelöst wird. Eine Phänotypisierung durch Messung der TPMT-Aktivität in Erythrozyten vor Beginn einer Thiopurintherapie wird dringend empfohlen (Abb. 3), da hierdurch die meisten Risikopatienten identifiziert werden können. Bei einer Bluttransfusion innerhalb der letzten 2–3 Monate ist eine Genotypisierung die Methode der Wahl. Allerdings besteht bei der Genotypisierung ein geringes Restrisiko bzgl. der Prädiktion einer TPMT-Defizienz, da routinemäßig nur auf Vorliegen der häufigsten Defektmutationen untersucht werden kann. Auf Grund der sehr großen interindividuellen Variation der Thiopurinpharmakokinetik wird zur weiteren Optimierung einer Therapie die Bestimmung der 6-TGN-Konzentration in Erythrozyten empfohlen. Durch Messung der Thiopurinmetabolite wird auch eine Überprüfung der Patientencompliance ermöglicht. Das therapeutische Monitoring kann nicht die Kontrolle allgemeiner Toxizitätsparameter (Leukozytenzahl, Transaminasen usw.) ersetzen, es liefert vielmehr ergänzende Information. Diese Vorgehensweise ermöglicht eine relativ sichere, effektive und nebenwirkungsarme Therapie mit Thiopurinmedikamenten.

Literatur

- Elion GB. The purine path to chemotherapy. *Science* 1989;244:41–47.
- Lennard L. The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *Eur J Clin Pharmacol* 1992;43:329–339.
- McLeod HL, Siva C. The thiopurine S-methyltransferase gene locus – implications for clinical pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* 2002;3:89–98.
- Coulthard SA, Hogarth LA, Little M, Matheson EC, Redfern CP, Minto L, et al. The effect of thiopurine methyltransferase expression on sensitivity to thiopurine drugs. *Mol Pharmacol* 2002;62:102–109.
- 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* 2001;61:5810–5816.
- Tay BS, Lilley RM, Murray AW, Atkinson MR. Inhibition of phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase from Ehrlich ascites-tumour cells by thiopurine nucleotides. *Biochem Pharmacol* 1969;18:936–938.
- Relling MV, Hancock ML, Rivera GK, Sandlund JT, Ribeiro RC, Krynetski EY, et al. Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:2001–2008.
- Bergan S. Optimisation of azathioprine immunosuppression after organ transplantation by pharmacological measurements. *BioDrugs* 1997;8:446–456.
- Lennard L. Clinical implications of thiopurine methyltransferase – optimization of drug dosage and potential drug interactions. *Ther Drug Monit* 1998;20:527–531.
- Lennard L. Therapeutic drug monitoring of antimetabolic cytotoxic drugs. *Br J Clin Pharmacol* 1999;47:131–143.
- Schwab M, Klotz U. Pharmacokinetic considerations in the treatment of inflammatory bowel disease. *Clin Pharmacokinet* 2001;40:723–751.
- 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* 1983;34:810–817.
- Schutz E, Gummert J, Mohr FW, Armstrong VW, Oellerich M. Should 6-thioguanine nucleotides be monitored in heart transplant recipients given azathioprine? *Ther Drug Monit* 1996;18:228–233.
- Chrzanowska M, Krzymanski M. Determination of 6-thioguanine and 6-methylmercaptopurine metabolites in renal transplantation recipients and patients with glomerulonephritis treated with azathioprine. *Ther Drug Monit* 1999;21:231–237.
- Zimm S, Johnson GE, Chabner BA, Poplack DG. Cellular pharmacokinetics of mercaptopurine in human neoplastic cells and cell lines. *Cancer Res* 1985;45:4156–4161.
- Weinshilboum R. Thiopurine pharmacogenetics: clinical and molecular studies of thiopurine methyltransferase. *Drug Metab Dispos* 2001;29:601–605.
- Evans WE, Hon YY, Bomgaars L, Coutre S, Holdsworth M, Janco R, et al. Preponderance of thiopurine S-methyltransferase deficiency and heterozygosity among patients intolerant to mercaptopurine or azathioprine. *J Clin Oncol* 2001;19:2293–2301.
- Lewis LD, Benin A, Szumlanski CL, Otterness DM, Lennard L, Weinshilboum RM, et al. Olsalazine and 6-mercaptopurine-related bone marrow suppression: a possible drug-drug interaction. *Clin Pharmacol Ther* 1997;62:464–475.
- Lowry PW, Franklin CL, Weaver AL, Szumlanski CL, Mays DC, Loftus EV, et al. Leucopenia resulting from a drug interaction between azathioprine or 6-mercaptopurine and mesalamine, sulphasalazine, or balsalazide. *Gut* 2001;49:656–664.
- Dewit O, Vanheuverzwyn R, Desager JP, Horsmans Y. Interaction between azathioprine and aminosaliclates: an *in vivo* study in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:79–85.
- Klemetsdal B, Straume B, Wist E, Aarbakke J. Identification of factors regulating thiopurine methyltransferase activity in a Norwegian population. *Eur J Clin Pharmacol* 1993;44:147–152.
- Lysaa RA, Giverhaug T, Wold HL, Aarbakke J. Inhibition of human thiopurine methyltransferase by furosemide, bendroflumethiazide and trichlormethiazide. *Eur J Clin Pharmacol* 1996;49:393–396.
- Weyer N, Kroplin T, Fricke L, Iven H. Human thiopurine S-methyltransferase activity in uremia and after renal transplantation. *Eur J Clin Pharmacol* 2001;57:129–136.
- Pazmino PA, Sladek SL, Weinshilboum RM. Thiol S-methylation in uremia: erythrocyte enzyme activities and plasma inhibitors. *Clin Pharmacol Ther* 1980;28:356–367.
- Cuffari C, Seidman EG, Latour S, Theoret Y. Quantitation of 6-thioguanine in peripheral blood leukocyte DNA in Crohn's disease patients on maintenance 6-mercaptopurine therapy. *Can J Physiol Pharmacol* 1996;74:580–585.
- Lennard L, Lilleyman JS, Van Loon J, Weinshilboum RM. Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1990;336:225–229.
- Lilleyman JS, Lennard L. Mercaptopurine metabolism and risk of relapse in childhood lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1994;343:1188–1190.
- Cuffari C, Theoret Y, Latour S, Seidman G. 6-Mercaptopurine metabolism in Crohn's disease: correlation with efficacy and toxicity. *Gut* 1996;39:401–406.
- Dubinsky MC, Lamothe S, Yang HY, Targan SR, Sinnett D, Theoret Y, et al. Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000;118:705–713.

30. Cuffari C, Hunt S, Bayless T. Utilisation of erythrocyte 6-thioguanine metabolite levels to optimise azathioprine therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2001;48:642–646.
31. Armstrong VW, Oellerich M. New developments in the immunosuppressive drug monitoring of cyclosporine, tacrolimus, and azathioprine. *Clin Biochem* 2001;34:9–16.
32. Oellerich M. Pharmaka (Drug Monitoring). In: Thomas L (ed.) *Labor und Diagnose*, 5. erweiterte Aufl. Frankfurt/Main, TH-Books Verlagsgesellschaft, 2000, pp 1170–1183.
33. Bergan S, Rugstad HE, Bentdal O, Sodal G, Hartmann A, Leivestad T, et al. Monitored high-dose azathioprine treatment reduces acute rejection episodes after renal transplantation. *Transplantation* 1998;66:334–339.
34. Dervieux T, Medard Y, Baudouin V, Maisin A, Zhang D, Broly F, et al. Thiopurine methyltransferase activity and its relationship to the occurrence of rejection episodes in paediatric renal transplant recipients treated with azathioprine. *Br J Clin Pharmacol* 1999;48:793–800.
35. Dervieux T, Medard Y, Verpillat P, Guignon V, Duval M, Lescoeur B, et al. Possible implication of thiopurine S-methyltransferase in occurrence of infectious episodes during maintenance therapy for childhood lymphoblastic leukemia with mercaptopurine. *Leukemia* 2001;15:1706–1712.
36. Chrzanowska M, Kolecki P, Duczmal-Cichocka B, Fiet J. Metabolites of mercaptopurine in red blood cells: a relationship between 6-thioguanine nucleotides and 6-methylmercaptopurine metabolite concentrations in children with lymphoblastic leukemia. *Eur J Pharm Sci* 1999;8:329–334.
37. Bergan S, Rugstad HE, Bentdal O, Stokke O. Monitoring of azathioprine treatment by determination of 6-thioguanine nucleotide concentrations in erythrocytes. *Transplantation* 1994;58:803–808.
38. Lancaster DL, Patel N, Lennard L, Lilleyman JS. Leucocyte versus erythrocyte thioguanine nucleotide concentrations in children taking thiopurines for acute lymphoblastic leukaemia. *Cancer Chemother Pharmacol* 2002;50:33–36.
39. Dubinsky MC, Yang H, Hassard PV, Seidman EG, Kam LY, Abreu MT, et al. 6-MP metabolite profiles provide a biochemical explanation for 6-MP resistance in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:904–915.
40. Dubinsky MC, Hassard PV, Seidman EG, Kam LY, Abreu MT, Targan SR, et al. An open-label pilot study using thioguanine as a therapeutic alternative in Crohn's disease patients resistant to 6-mercaptopurine therapy. *Inflamm Bowel Dis* 2001;7:181–189.
41. Berkovitch M, Matsui D, Zipursky A, Blanchette VS, Verjee Z, Giesbrecht E, et al. Hepatotoxicity of 6-mercaptopurine in childhood acute lymphocytic leukemia: pharmacokinetic characteristics. *Med Pediatr Oncol* 1996;26:85–89.
42. Krynetski EY, Evans WE. Genetic polymorphism of thiopurine S-methyltransferase: molecular mechanisms and clinical importance. *Pharmacology* 2000;61:136–146.
43. Klemetsdal B, Tollefsen E, Loennechen T, Johnsen K, Utsi E, Gisholt K, et al. Interethnic difference in thiopurine methyltransferase activity. *Clin Pharmacol Ther* 1992;51:24–31.
44. McLeod HL, Lin JS, Scott EP, Pui CH, Evans WE. Thiopurine methyltransferase activity in American white subjects and black subjects. *Clin Pharmacol Ther* 1994;55:15–20.
45. Klemetsdal B, Wist E, Aarbakke J. Gender difference in red blood cell thiopurine methyltransferase activity. *Scand J Clin Lab Invest* 1993;53:747–749.
46. McLeod HL, Krynetski EY, Wilimas JA, Evans WE. Higher activity of polymorphic thiopurine S-methyltransferase in erythrocytes from neonates compared to adults. *Pharmacogenetics* 1995;5:281–286.
47. Klemetsdal B, Flaegstad T, Aarbakke J. Is there a gender difference in red blood cell thiopurine methyltransferase activity in healthy children? *Med Pediatr Oncol* 1995;25:445–449.
48. Tinel M, Berson A, Pessayre D, Letteron P, Cattoni MP, Horsmans Y, et al. Pharmacogenetics of human erythrocyte thiopurine methyltransferase activity in a French population. *Br J Clin Pharmacol* 1991;32:729–734.
49. Park-Hah JO, Klemetsdal B, Lysaa R, Choi KH, Aarbakke J. Thiopurine methyltransferase activity in a Korean population sample of children. *Clin Pharmacol Ther* 1996;60:68–74.
50. Leipold G, Schutz E, Haas JP, Oellerich M. Azathioprine-induced severe pancytopenia due to a homozygous two-point mutation of the thiopurine methyltransferase gene in a patient with juvenile HLA-B27-associated spondylarthritis. *Arthritis Rheum* 1997;40:1896–1898.
51. Schütz E, Gummert J, Mohr F, Oellerich M. Azathioprine-induced myelosuppression in thiopurine methyltransferase deficient heart transplant recipient. *Lancet* 1993;341:436.
52. McLeod HL, Miller DR, Evans WE. Azathioprine-induced myelosuppression in thiopurine methyltransferase deficient heart transplant recipient. *Lancet* 1993;341:1151.
53. Evans WE, Horner M, Chu YQ, Kalwinsky D, Roberts WM. Altered mercaptopurine metabolism, toxic effects, and dosage requirement in a thiopurine methyltransferase-deficient child with acute lymphocytic leukemia. *J Pediatr* 1991;119:985–989.
54. Naughton MA, Battaglia E, O'Brien S, Walport MJ, Botto M. Identification of thiopurine methyltransferase (TPMT) polymorphisms cannot predict myelosuppression in systemic lupus erythematosus patients taking azathioprine. *Rheumatology (Oxford)* 1999;38:640–644.
55. Colombel JF, Ferrari N, Debuysere H, Marteau P, Gendre JP, Bonaz B, et al. Genotypic analysis of thiopurine S-methyltransferase in patients with Crohn's disease and severe myelosuppression during azathioprine therapy. *Gastroenterology* 2000;118:1025–1030.
56. Honchel R, Aksoy IA, Szumlanski C, Wood TC, Otterness DM, Wieben ED, et al. Human thiopurine methyltransferase: molecular cloning and expression of T84 colon carcinoma cell cDNA. *Mol Pharmacol* 1993;43:878–887.
57. Lee D, Szumlanski C, Houtman J, Honchel R, Rojas K, Overhauser J, et al. Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics. Cloning of human liver cDNA and a processed pseudogene on human chromosome 18q21.1. *Drug Metab Dispos* 1995;23:398–405.
58. Szumlanski C, Otterness D, Her C, Lee D, Brandriff B, Kelsell D, et al. Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: human gene cloning and characterization of a common polymorphism. *DNA Cell Biol* 1996;15:17–30.
59. Krynetski EY, Fessing MY, Yates CR, Sun D, Schuetz JD, Evans WE. Promoter and intronic sequences of the human thiopurine S-methyltransferase (TPMT) gene isolated from a human PAC1 genomic library. *Pharm Res* 1997;14:1672–1678.
60. Seki T, Tanaka T, Nakamura Y. Genomic structure and multiple single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of the thiopurine S-methyltransferase (TPMT) gene. *J Hum Genet* 2000;45:299–302.
61. 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* 1995;92:949–953.
62. 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* 1999;8:371–376.
63. Evans WE. Comprehensive assessment of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) alleles in three ethnic populations. *J Pediatr Hematol Oncol* 2002;24:335–336.
64. Coulthard SA, Hall AG. Recent advances in the pharmacogenomics of thiopurine methyltransferase. *Pharmacogenomics J* 2001;1:254–261.
65. Spire-Vayron de la Moureyre, Debuysere H, Mastain B, Vinner E, Marez D, Lo Guidice JM, et al. Genotypic and phenotypic analysis of the polymorphic thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT) in a European population. *Br J Pharmacol* 1998;125:879–887.

66. Spire-Vayron de la Moureyre, Debuysere H, Fazio F, Sergeant E, Bernard C, Sabbagh N, et al. Characterization of a variable number tandem repeat region in the thiopurine S-methyltransferase gene promoter. *Pharmacogenetics* 1999;9:189–198.
67. Yan L, Zhang S, Eiff B, Szumlanski CL, Powers M, O'Brien JF, et al. Thiopurine methyltransferase polymorphic tandem repeat: genotype-phenotype correlation analysis. *Clin Pharmacol Ther* 2000;68:210–219.
68. Alves S, Amorim A, Ferreira F, Prata MJ. Influence of the variable number of tandem repeats located in the promoter region of the thiopurine methyltransferase gene on enzymatic activity. *Clin Pharmacol Ther* 2001;70:165–174.
69. Marinaki AM, Arenas M, Khan ZH, Lewis CM, Shobowale-Bakre EM, Escuredo E, et al. Genetic determinants of the thiopurine methyltransferase intermediate activity phenotype in British Asians and Caucasians. *Pharmacogenetics* 2003;13:97–105.
70. Elion GB. Historical background of 6-mercaptopurine. *Toxicol Ind Health* 1986;2:1–9.
71. Keuzenkamp-Jansen CW, De Abreu RA, Bokkerink JP, Trijbels JM. Determination of extracellular and intracellular thiopurines and methylthiopurines by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1995;672:53–61.
72. Lavi LE, Holcberg JS. A rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic assay for 6-mercaptopurine metabolites in red blood cells. *Anal Biochem* 1985;144:514–521.
73. Shipkova M, Armstrong VW, Wieland E, Oellerich M. Differences in nucleotide hydrolysis contribute to the differences between erythrocyte 6-thioguanine nucleotide concentrations determined by two widely used methods. *Clin Chem* 2003;49:260–268.
74. Lennard L, Singleton HJ. High-performance liquid chromatographic assay of the methyl and nucleotide metabolites of 6-mercaptopurine: quantitation of red blood cell 6-thioguanine nucleotide, 6-thioinosinic acid and 6-methylmercaptopurine metabolites in a single sample. *J Chromatogr* 1992;583:83–90.
75. Lennard L. Assay of 6-thioinosinic acid and 6-thioguanine nucleotides, active metabolites of 6-mercaptopurine, in human red blood cells. *J Chromatogr* 1987;423:169–178.
76. Dervieux T, Bouliou R. Simultaneous determination of 6-thioguanine and methyl 6-mercaptopurine nucleotides of azathioprine in red blood cells by HPLC. *Clin Chem* 1998;44:551–555.
77. Bruunshuus I, Schmiegelow K. Analysis of 6-mercaptopurine, 6-thioguanine nucleotides, and 6-thiouric acid in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *Scand J Clin Lab Invest* 1989;49:779–784.
78. Weller S, Thurmann P, Rietbrock N, Gossmann J, Scheuermann EH. HPLC analysis of azathioprine metabolites in red blood cells, plasma and urine in renal transplant recipients. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1995;33:639–645.
79. Mawatari H, Kato Y, Nishimura S, Sakura N, Ueda K. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic assay method for quantitating 6-mercaptopurine and its methylated and non-methylated metabolites in a single sample. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998;716:392–396.
80. Lowry PW, Franklin CL, Weaver AL, Pike MG, Mays DC, Tremaine WJ, et al. Measurement of thiopurine methyltransferase activity and azathioprine metabolites in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2001;49:665–670.
81. Erdmann GR, France LA, Bostrom BC, Canafax DM. A reversed phase high performance liquid chromatography approach in determining total red blood cell concentrations of 6-thioguanine, 6-mercaptopurine, methylthioguanine, and methylmercaptopurine in a patient receiving thiopurine therapy. *Biomed Chromatogr* 1990;4:47–51.
82. Welch J, Lennard L, Morton GC, Lilleyman JS. Pharmacokinetics of mercaptopurine: plasma drug and red cell metabolite concentrations after an oral dose. *Ther Drug Monit* 1997;19:382–385.
83. Weinshilboum RM, Raymond FA, Pazmino PA. Human erythrocyte thiopurine methyltransferase: radiochemical microassay and biochemical properties. *Clin Chim Acta* 1978;85:323–333.
84. Anglicheau D, Sanquer S, Lorient MA, Beaune P, Thervet E. Thiopurine methyltransferase activity: new conditions for reversed-phase high-performance liquid chromatographic assay without extraction and genotypic-phenotypic correlation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002;773:119–127.
85. Menor C, Fueyo JA, Escibano O, Cara C, Fernandez-Moreno MD, Roman ID, et al. Determination of thiopurine methyltransferase activity in human erythrocytes by high-performance liquid chromatography: comparison with the radiochemical method. *Ther Drug Monit* 2001;23:536–541.
86. Lennard L, Singleton HJ. High-performance liquid chromatographic assay of human red blood cell thiopurine methyltransferase activity. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1994;661:25–33.
87. Bouliou R, Sauviat M, Dervieux T, Bertocchi M, Mornex JF. Phenotype determination of thiopurine methyltransferase in erythrocytes by HPLC. *Clin Chem* 2001;47:956–958.
88. Indjova D, Shipkova M, Niedmann PD, Svinarov DA, Oellerich M. A simple high-performance liquid chromatographic method for determination of thiopurine methyltransferase activity in erythrocytes. *J Lab Med* 2002;9/10:521–522 (Abstract).
89. Kroplin 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* 1998;54:265–271.
90. Kroplin 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* 2000;56:343–345.
91. Kroplin T, Fischer C, Iven H. Inhibition of thiopurine S-methyltransferase activity by impurities in commercially available substrates: a factor for differing results of TPMT measurements. *Eur J Clin Pharmacol* 1999;55:285–291.
92. Lennard L. TPMT in the treatment of Crohn's disease with azathioprine. *Gut* 2002;51:143–146.
93. Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T, Fessing MY, Tai HL, Pui CH, et al. Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Ann Intern Med* 1997;126:608–614.
94. Schaeffeler E, Lang T, Zanger UM, Eichelbaum M, Schwab M. High-throughput genotyping of thiopurine S-methyltransferase by denaturing HPLC. *Clin Chem* 2001;47:548–555.
95. Schütz 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* 2000;46:1728–1737.
96. Brouwer C, Marinaki AM, Lambooy LH, Duley JA, Shobowale-Bakre M, De Abreu RA. Pitfalls in the determination of mutant alleles of the thiopurine methyltransferase gene. *Leukemia* 2001;15:1792–1793.
97. 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* 2002;12:93–99.
98. von Ahsen N, Schütz E, Hartung S, Andag R, Oellerich M. Thiopurine methyl transferase (TPMT) *3A, *3B and *3C haplotyping by combined long range PCR, intramolecular ligation and real time ASA-PCR. *J Lab Med* 2002;26:522 (Abstract).