

Aus der Abteilung Klinische Chemie
(Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Oellerich)
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Humane Thiopurin-S-Methyltransferase (TPMT):
Neue Methode zum Mutationsscreening und Untersuchung zum
Genotyp-Phänotyp-Zusammenhang**

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

Tim Barthoff

aus

Bochum

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. N. von Ahsen

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Abkürzungen.....	5
1 Einleitung	7
1.1 Einführung.....	7
1.2 Das TPMT-Gen	7
1.3 Genotyp – Phänotyp-Korrelation.....	11
1.4 Immunsuppressiva	14
1.5 Methoden zur Genotypisierung	15
1.5.1 Einzelschritte der PCR.....	16
1.5.2 Realtime-PCR	16
1.5.3 High Resolution Melting.....	17
1.5.4 Genotypisierung mit Anchor- Probe.....	18
1.6 Der Light Cycler LC 480	19
1.7 Gene-scanning mit dem LC480	20
1.8 Zielsetzung dieser Arbeit	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Verwendete Materialien und Reagenzien	23
2.1.1 Instrumente	24
2.1.2 PCR-Reagenzien	25
2.1.3 Verwendete Primer	26
2.1.4 Verwendete Gensonden	27
2.1.5 Aufreinigung der PCR-Produkte	27
2.1.6 Ligation.....	28
2.1.7 Elektroporation.....	28
2.1.8 Miniprep	28
2.1.9 Sequenzierung.....	29
2.2 Patienten	29
2.2.1 Probengewinnung	29
2.3 Isolation der DNA	30
2.4 Genotypisierung	31
2.4.1 Mastermix Pipettierschema:.....	32
2.4.2 Überprüfen der verwendeten Primer	32
2.5 Reaktionsansatz.....	33
2.6 Reaktionen im Light Cycler	33
2.7 Ansetzen der Sequenzieransätze	34
2.7.1 PCR-Produktreinigung	34
2.7.2 DNA-Quantifizierung:	34
2.7.3 Ansetzen der Sequenzieransätze	34
2.8 Klonierung der PCR-Produkte.....	35
2.8.1 Ligation.....	35
2.8.2 Aufreinigung	35
2.8.3 Transformation	35
2.8.4 Kolonie-PCR	36
2.8.5 Mini Prep.....	36
2.8.6 Sequenzierung.....	36
3 Ergebnisse	37

3.1 Überprüfen der Primer.....	37
3.1.1 Gelelektrophorese Exon 2.1 bis 3.2.....	37
3.1.2 Gelelektrophorese Exon 4.1 bis 6.....	38
3.1.3 Gelelektrophorese Exon 7.1 bis 9.....	40
3.2 Ergebnisse der PCR.....	41
3.2.1 Exon 2.1.....	43
3.2.2 Exon 2.2.....	43
3.2.3 Exon 3.1.....	44
3.2.4 Exon 3.2.....	44
3.2.5 Exon 4.1.....	45
3.2.6 Exon 4.2.....	45
3.2.7 Exon 5.1.....	46
3.2.8 Exon 5.2.....	46
3.2.9 Exon 6.....	46
3.2.10 Exon 7.1.....	47
3.2.11 Exon 7.2.....	47
3.2.12 Exon 8.....	48
3.2.13 Exon 9.....	48
3.3 Untersuchung zur *1S-Mutation.....	52
4 Diskussion.....	55
4.1 Interpretation der Ergebnisse.....	56
4.1.1 Gene-scanning.....	56
4.1.2 TPMT*18-Mutation.....	58
4.1.3 TPMT *1S-Mutation.....	59
4.2 Therapeutisches Drug Monitoring.....	59
5 Ausblick.....	61
6 Zusammenfassung.....	61
7 Tabellenverzeichnis.....	64
8 Abbildungsverzeichnis.....	64
9 Literaturverzeichnis.....	66

Abkürzungen

A	Adenosin
Abb	Abbildung
ALL	Akute lymphatische Leukämie
bp	Basepaare
BSA	N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamid
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
CCD	Charge-coupled Device
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Ery	Erythrozyt
fmol	femtomol
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
g	Gramm
G	Guanin
GMPS	Guanosin-monophosphat-synthase
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPRT	Hypoxanthin-Posphorybosyl-Transferase
HRM	High Resolution Melting
IMPD	Inosinmonophosphat-Dehydrogenase
kB	Kilobase
K _m	Michaeliskonstante
L	Liter
µF	Mikrofarat
µl	Mikroliter
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mmol	Millimol
MTHFR	Methylentetrahydrofolatreduktase
mut	Mutation
n	Anzahl
neg.	negativ
nm	Nanometer
nmol	nanomol

NTP	Nukleotid-tri-phosphat
o.g.	oben genannt
ORF	open reading frame
Ω	Ohm
p	P-Wert
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pmol	pikomol
RBC	Erythrozyten
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
SAM	S-Adenosylmethionin
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
T	Thymin
6-TGN	6-Thioguaninnukleotid
6-TGMP	6-Thioguanosin-monophosphat
6-TXMP	6-Thioxanthosin -5-monophosphat
Tab	Tabelle
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
T_m	Schmelzpunkt
TPMT	Thiopurin-S-Methyltransferase
U	Units
u/L	Units pro Liter
V	Volt
V_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
VNTR	variable number tandem repeats
WT	Wild-type

1 Einleitung

1.1 Einführung

Seit über 40 Jahren sind die Thiopurine zur Behandlung von hämatologischen Neoplasien, Unterdrückung von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation, Autoimmunerkrankungen, wie Morbus Crohn und Collitis ulcerosa, und Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis bewährte Medikamente. Das zurzeit am häufigsten eingesetzte Thiopurin ist Azathioprin (Imurek[®]). Weitere Vertreter dieser Stoffgruppe sind 6-Mercaptopurin und 6-Thioguanin. Bei der Verstoffwechslung dieser Medikamente ist die Thiopurin-S-Methyl-Transferase (TPMT) als ein wichtiges Enzym für die Entgiftung entdeckt worden. Die physiologische Funktion dieses Enzyms ist bis heute ungeklärt. Eine totale Defizienz bleibt ohne Folgen, bis zur Gabe von Thiopurinen. Seit über 25 Jahren ist ein genetischer Polymorphismus der TPMT bekannt. Eine totale Defizienz führt zu einer hohen Konzentration an aktiven Metaboliten unter Standardtherapie mit Thiopurinen. Damit konnte die bei einigen Patienten aufgetretene Myelodepression erklärt werden. Seit der Entdeckung der Pharmakogenetik für die Thiopurine wird eine TPMT-Aktivitätsmessung vor Beginn der Therapie angestrebt, um etwaige Komplikationen zu vermeiden. Die TPMT-Aktivität wird dabei in den Erythrozyten gemessen, weshalb bei Patienten, die in den letzten 2-3 Monaten eine Bluttransfusion erhalten haben, eine Genotypisierung die Methode der Wahl ist.

1.2 Das *TPMT*-Gen

Die *TPMT*-cDNA wurde 1993 erstmalig von der Arbeitsgruppe um Weinshilboum kloniert (Honchel et al. 1993). Damit wurde der Grundstein für die Molekular Diagnostik und Mutationsanalyse gelegt. Zeitgleich konnte damit auch eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation hergestellt werden. Das *TPMT*-Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 an Stelle

6p22.3 lokalisiert. Szumlanski et al. beschrieben ein 34kB großes Gen, das sich in 10 Exone und 9 Introne aufteilt, dessen Startcodon auf dem Exon 3 liegt (Szumlanski et al. 1996). Später fanden Krynetski et al. lediglich ein 25kB großes Gen mit 9 Exonen (Krynetski et al. 1997). Das Exon 2 wurde damit bisher nur bei einer von 16 humanen Leber cDNAs nachgewiesen (Szumlanski et al. 1996). Aktuell ist das *TPMT*-Gen als ein 27kB großes Gen mit 9 Exonen in der Gendatenbank zu finden (GenBank#AB045 146).

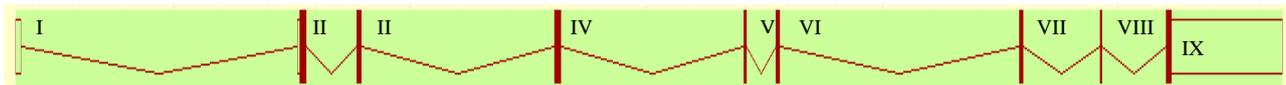


Abbildung 1: Struktur des *TPMT*-Gens; Die römischen Zahlen nummerieren die Exone, Nur farblich ausgefüllte Exone kodieren für das Enzym (Ensemble Genome Browser: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?g=ENSG00000137364;r=6:18128542-18155305;t=ENST00000309983#r=6:18115160-18168687;2008)

Die PCR-Analytik des *TPMT*-Gens wird durch das Vorliegen eines *TPMT*-Pseudogens erschwert (Lee et al. 1995). Dabei handelt es sich um eine *TPMT*-mRNA-homologe Sequenz, die durch reverse Transkription und anschließende genomische Integration entstanden ist (GenBank #U11 424). Das *TPMT*-Pseudogen ist zu 96% homolog zum *TPMT*-Gen. Um die Amplifikation des Pseudogens zu verhindern, müssen PCR-Primer intronisch gelegen sein, was allerdings kein Problem ist, da wie oben beschrieben die Struktur des *TPMT*-Gens restlos bekannt ist.

Die erste beschriebene funktionelle *TPMT*-Mutation war das *2-Allel, das eine G238C-Mutation im *open reading frame* (ORF) hatte und zu einem Ala80Pro-Austausch im *TPMT*-Enzym führt (Krynetski et al. 1995). Zwei weitere wichtige Mutationen auf dem *TPMT*-Gen sind die *3A- und die *3C-Mutation. Die *3A-Mutation führt zum G460A-Austausch auf dem Exon 6, was im *TPMT*-Enzym zum Austausch der Aminosäure Alanin zu Threonin an Stelle 156 führt (Ala156Thr) und zum A719G SNP auf dem Exon 9, der einen Aminosäureaustausch von Tyrosin zu Cytosin an Stelle 240 (Tyr240Cys) bewirkt (Seki et al. 2000). Des Weiteren sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt 26 Mutationen auf dem *TPMT*-Gen bekannt (Garat et al. 2008; Ujiie et al. 2008; Kham et al. 2009), die in Abbildung 2 zusammengefasst sind. Von den bekannten 26 Mutationen sind die oben beschriebenen drei Mutationen die häufigsten mit einer Verteilung in der kaukasischen Bevölkerung: *3A: 3,2–5,7%, *3C: 0,2– 0,8%, *2: 0,2-0,5% (Egan et al. 2006).

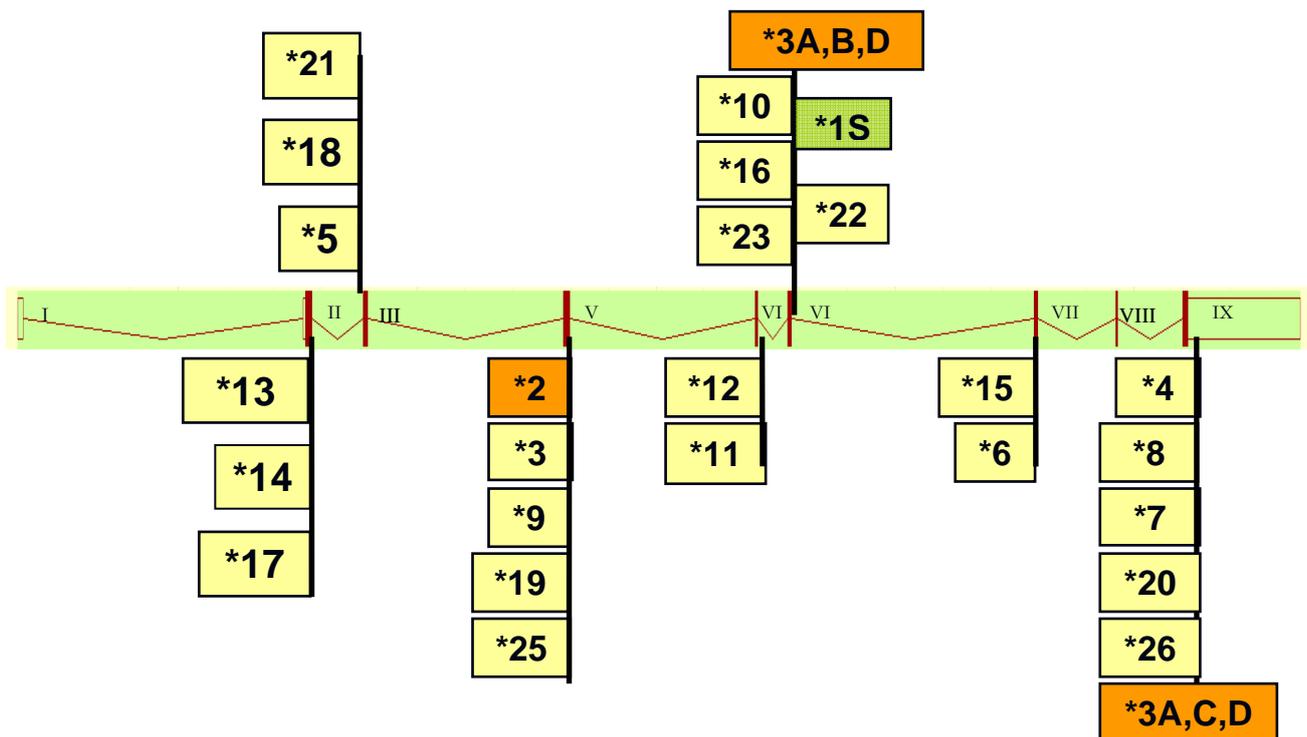


Abbildung 2: Verteilung der 26 bekannten Mutationen auf dem *TPMT*-Gen

Des Weiteren sind diese drei Mutationen zu 95% die Ursache für eine *TPMT*-Defizienz. Untersuchungen in kaukasischen, ost- & westafrikanischen, afroamerikanischen, chinesischen, japanischen, thailändischen und südasiatischen (Indien, Pakistan) Populationen haben einen deutlichen Unterschied bezüglich der Häufigkeitsverteilung der mutierten *TPMT*-Allele ergeben. So haben zum Beispiel Südwestasiaten generell ein geringeres Auftreten von mutierten *TPMT*-Allelen und alle bis heute identifizierten Allele tragen die *TPMT*-*3A-Variante (Collie-Duguid et al. 1999). Das stellt einen Kontrast zur west- und ostafrikanischen Bevölkerung dar, in der das Auftreten von Mutationen ähnlich gehäuft vorkommt wie in den kaukasischen Bevölkerungen, allerdings ist das häufigste mutiert vorkommende Allel in Afrika die *TPMT**3C-Variante (Ameyaw et al. 1999). In der afroamerikanischen Bevölkerung ist die *TPMT**3C die häufigste, es wurden jedoch auch die *2- und *3A-Mutationen gefunden, was die Vermischung von afroamerikanischen und kaukasischen Genen in der US-amerikanischen Bevölkerung widerspiegelt (Hon et al. 1999). Die Frequenz der mutierten *TPMT*-Allele wird in Tabelle 1 nach Howard L. McLeod zusammengefasst (McLeod & Siva 2002).

Ethnische Gruppe	n	wt/wt in %	wt/mut in %	Mut/mut in %	TPMT *2 in %	TPMT*3A in %	TPMT *3C in %
Britische Kaukasier	199	89,9	9,6	0,5	0,5	4,5	0,3
Französische Kaukasier	191	85,9	13,6	0,5	0,5	5,7	0,8
Amerikanische Kaukasier	*	92,5	7,4	0,14	0,2	3,2	0,2
Afroamerikaner	*	90,7	9,2	0,2	0,4	0,8	2,4
Kenianer	101	89,1	10,9	0	0	0	5,4
Ghanaer	217	85,3	14,4	0,5	0	0	7,6
Chinesen	192	95,3	4,7	0	0	0	2,3
Japaner	553	97,3	2,4	0,4	0	0	1,5
Thai	75	89	11	0	0	0	5,3
Süd-West Asiaten	99	98	2	0	0	1	0

Tabelle 1: Ethnische Varianten des *TPMT*-Gens; *: errechnet; mut: mutiert; wt: Wild-type (nach McLeod & Siva 2002)

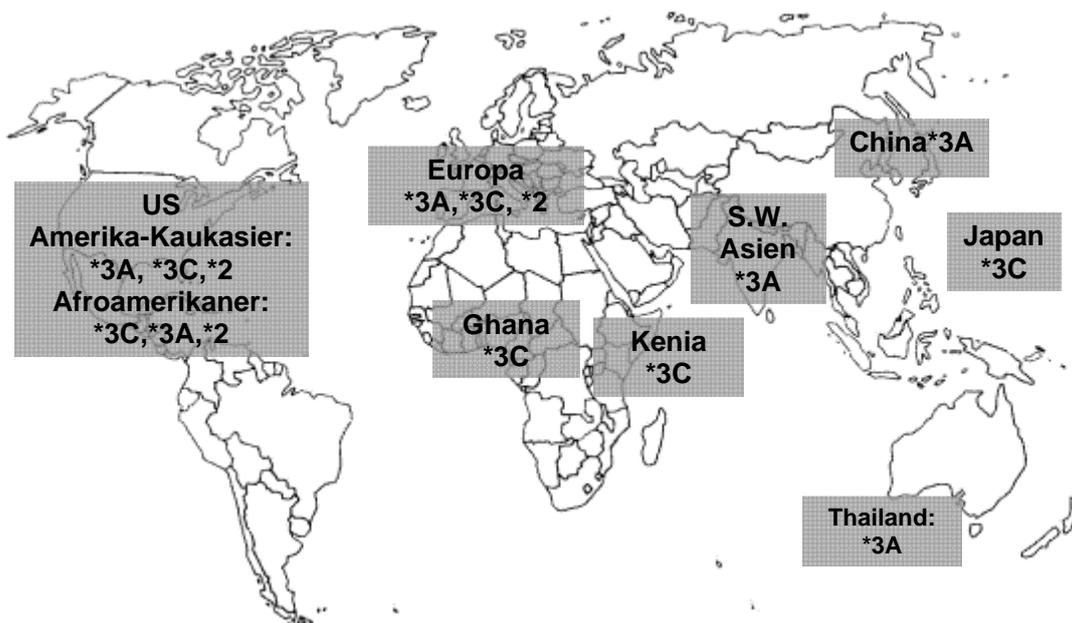


Abbildung 3: Verteilung der 3 häufigsten *TPMT*-Allele weltweit (nach McLeod & Siva 2002)

Neben den bekannten Mutationen wurden auch beim Vorliegen eines homozygoten *TPMT*-Wild-Types interindividuelle Variationen in der *TPMT*-Aktivität gemessen. Als eine mögliche genetische Ursache dafür wurde ein Minisatellit (VNTR) in der *TPMT* 3' nicht kodierenden Region gesehen, der aus 17-18bp Einheiten besteht, die in 3-9 Wiederholungen vorliegen (Spire-Vayron de la Moureyre et al. 1999). Shazia et al. konnten eine inverse Beziehung zwischen der Summe der wiederkehrenden Einheiten (d.h. die Anzahl der Wiederholungen auf den beiden Allelen zusammen) und der Höhe der *TPMT*-Aktivität in Erythrozyten (RBC-red-blood cells) für die indische Bevölkerung zeigen (Shazia & Seshadri 2009). Zu ähnlichen Ergebnissen kam Alves et al. für die europäische Bevölkerung (Alves et al. 2001). Eine klinische Bedeutung haben die VNTR bis heute allerdings noch nicht erlangt.

1.3 Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Die Thiopurin-S-Methyltransferase ist ein zytosolisches Enzym, dessen Vorkommen in mehreren Geweben (Leber, Niere, Blutzellen, Skelettmuskel, usw.) nachgewiesen wurde (Krynetski & Evans 2000). Die *TPMT*-Aktivität ist von verschiedenen genetischen Polymorphismen abhängig, die bereits in 1.2 beschrieben wurden (Weinshilboum 2001).

Das Enzym katalysiert die S-Methylierung von Sulfhydryl-Verbindungen. Ein endogenes Substrat ist bisher spekulativ und selbst die homozygote *TPMT*-Defizienz bleibt folgenlos bis zur Einnahme von Thiopurinmedikamenten. Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass *TPMT*-Defiziente Patienten unter Standard-Dosis-Therapie mit Thiopurinen ein hohes Risiko haben, eine myelotoxische Akkumulation des zytotoxischen Metaboliten zu bekommen (Escousse et al. 1995). Für die

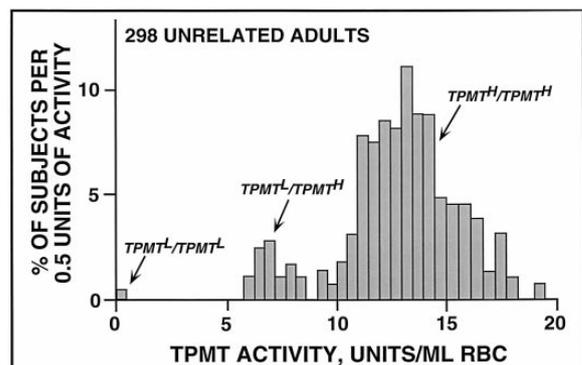


Abbildung 4: *TPMT*-Aktivität in Erythrozyten von 298 randomisiert ausgesuchten kaukasischen Patienten; RBC: Erythrozyten (Weinshilboum 2001 S.602)

kaukasische Bevölkerung konnte schon Ende des letzten Jahrhunderts gezeigt werden, dass 88% homozygot sind für ein Gen, das mit einer hohen *TPMT*-Aktivität einher geht (Weinshilboum & Sladek 1980). 11% waren heterozygot und zeigten eine intermediäre

TPMT-Aktivität. Einer von 300 Kaukasiern wurde als homozygot TPMT-defizient identifiziert und hatte keine messbare TPMT-Aktivität (siehe Abb.4) (Weinshilboum 2001).

Die Metabolisierung von Thiopurinen über die TPMT konkurriert mit der Entstehung aktiver 6-TGN. Mittlerweile ist durch klinische Fallberichte und Untersuchungen eindeutig, dass TPMT-defiziente Patienten eine 10-20 fach höhere 6-TGN- Konzentration unter Standard-Thiopurindosierung aufbauen und so unter einem sehr hohen Risiko stehen, eine lebensbedrohliche Knochenmarkdepression zu entwickeln (Lennard et al. 1990; Krynetski & Evans 2003). *Garat et al* konnten verschiedene Ursachen dafür finden. Zum einen konnte eine erniedrigte Enzymexpression, aber auch eine herabgesetzte Enzymaktivität im Vergleich zum *Wild-type* nachgewiesen werden. So konnte in Zellkulturen mit der *TPMT**3A-, *14-, *22-Mutation kein Enzym im Zytosol nachgewiesen werden. Für die *TPMT**8-Mutation wurde eine Überexpression gefunden. (Garat et al. 2008). Abbildung 5 zeigt die unterschiedlichen TPMT-Expressions-Levels von mutierten Allelen.

Ursache für die unterschiedliche Proteinquantität ist z. B. für die *TPMT**3A-, *14-,*22-Mutation die schnelle Eliminierung durch Ubiquitin-abhängige Proteosomen (Tai et al. 1999). Ebenfalls konnte Garat et al. zeigen, dass eine Enzymüberexpression nicht proportional zur Enzymaktivität ist. Die verminderte oder ganz fehlende Enzymaktivität bei *TPMT**18-, *21- und *22-Mutationen ist durch den Aminosäureaustausch, der seinerseits im aktiven Zentrum des Enzyms stattfindet, und den damit einhergehenden Verlust der Substrataffinität erklärt (Wu et al. 2007).

Die Abbildung 6 fasst die ermittelten Enzymaktivitäten der verschiedenen Mutationen im Vergleich zum *Wild-type* zusammen.

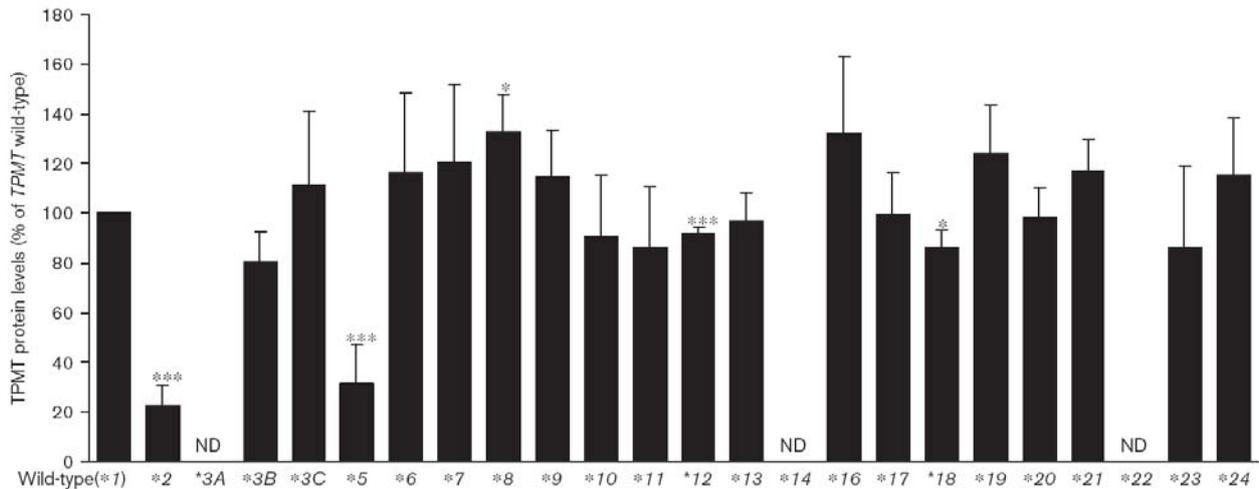


Abbildung 5: Enzymexpression in Zellkulturen mit Mutationen im Vergleich zum *TPMT*-Wild-type; ND: not detectable (Ujii et al. 2008 S.890)

Zusammenfassend stehen damit drei unterschiedliche Mechanismen als Ursache für eine

<i>TPMT</i> variant	K_m ($\mu\text{mol/l}$)	V_{max} (nmol/mg protein/min)	V_{max}/K_m ($\mu\text{l/mg protein/min}$)
Wild-type (<i>TPMT</i> *1)	80 ± 8	111 ± 6	1385 ± 125
<i>TPMT</i> *2	151 ± 13***	16 ± 3***	107 ± 18*** (8%) ^a
<i>TPMT</i> *3A	ND	ND	ND
<i>TPMT</i> *3B	ND	ND	ND
<i>TPMT</i> *3C	156 ± 12***	112 ± 9	722 ± 111*** (52%)
<i>TPMT</i> *5	ND	ND	ND
<i>TPMT</i> *6	485 ± 39***	116 ± 15	238 ± 19*** (17%)
<i>TPMT</i> *7	1027 ± 154***	95 ± 24	96 ± 36*** (7%)
<i>TPMT</i> *8	56 ± 7***	87 ± 6***	1560 ± 190 (113%)
<i>TPMT</i> *9	76 ± 9	75 ± 17***	1010 ± 278* (73%)
<i>TPMT</i> *10	125 ± 5***	85 ± 11***	682 ± 117*** (49%)
<i>TPMT</i> *11	1450 ± 212	65 ± 2	46 ± 8 (3%)
<i>TPMT</i> *12	127 ± 89	76 ± 17***	739 ± 331*** (53%)
<i>TPMT</i> *13	550 ± 140	118 ± 8	224 ± 70 (16%)
<i>TPMT</i> *14	ND	ND	ND
<i>TPMT</i> *16	600 ± 73	147 ± 33	224 ± 25 (16%)
<i>TPMT</i> *17	1267 ± 208***	170 ± 8***	136 ± 17*** (10%)
<i>TPMT</i> *18	ND	ND	ND
<i>TPMT</i> *19	186 ± 124	121 ± 17	812 ± 391* (59%)
<i>TPMT</i> *20	353 ± 39***	124 ± 15	357 ± 78*** (26%)
<i>TPMT</i> *21	ND	ND	ND
<i>TPMT</i> *22	ND	ND	ND
<i>TPMT</i> *23	98 ± 8*	83 ± 11***	859 ± 170*** (62%)
<i>TPMT</i> *24	1094 ± 110***	132 ± 20*	123 ± 27*** (9%)

herabgesetzte oder ganz fehlende Enzymaktivität:

- vermehrter Abbau durch Proteasomen.
- Genmutationen, die zu einer herabgesetzten Enzymexpression führen.
- Genmutationen, die zu einem Enzym führen mit herabgesetzter oder fehlender Substrataffinität.

Abbildung 6: kinetische Darstellung der 6 Thioguanin-S-methylierung von rekombinanten *TPMT*-Mutationen, exponiert in Zellkulturen.

ND: Not detectable; + - Zeigt die Standardabweichung in zwei unabhängigen Experimenten (Ujii et al. 2008 S.892).

Alle Ursachen führen letztendlich zu einem toxischen 6TGN-Spiegel.

1.4 Immunsuppressiva

Die von der Thiopurin-S-Methyltransferase verstoffwechselten Immunsuppressiva sind die so genannten Thioguanine, welche zu den Purinbasenanaloga zählen. Darunter fallen Medikamente wie Azathioprin, 6-Mercaptopurin und 6 Thioguanin. Thioguanine werden seit den 1950er Jahren als Chemotherapeutikum sowohl zur Behandlung von hämopoetischen Neoplasien als auch zur Immunsuppression von Autoimmunerkrankungen, wie z. B. Morbus Crohn, eingesetzt.

Die Thiopurine sind inaktive Prodrugs, die erst in 6-Thioguaninnukleotide (6-TGN) umgewandelt werden müssen, um antiproliferativ und immunsuppressiv zu wirken. Es wird angenommen, dass die 6-TGN durch den Einbau in die DNA und RNA mit deren Synthese interferieren (Elion 1989; Lennard 1992).

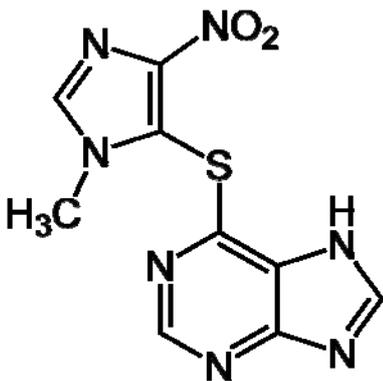


Abbildung 7: Strukturformel von Azathioprin

Die Absorption und Bioverfügbarkeit von oral verabreichten Thioguaninen ist stark variabel und liegt zwischen 14% – 46%. Sie unterliegt einem hohen „First-pass“-Effekt durch die Xanthinoxidase (Lennard 1999). Azathioprin ist ein Prodrug, das zu 88% in 6-Mercaptopurin umgewandelt wird durch eine nicht enzymatische Reaktion in der Leber. Nachdem 6-

Mercaptopurin in die Zelle aufgenommen wurde, wird es durch drei Enzyme metabolisiert, von denen zwei katabol (Xanthinoxidase, XO; TPMT) und eins anabol arbeiten (Hypoxanthin-Phosphorybosyl-Transferase; HPRT) (Lennard 1992). Die XO verstoffwechselt 6-Mercaptopurin zu 6-



Abbildung 8: Strukturformel von 6-Mercaptopurin

Thiouracilsäure (6-TUA), wohingegen die TPMT 6-MP zu 6-Methylmercaptapurin (6-MMP) metabolisiert. Das Enzym

Hypoxanthin-Phosphorybosyl-Transferase (HPRT) katalysiert den ersten anabolen Schritt zu 6 Thioguanin-5-Monophosphat, das durch die Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPD) weiter zu 6-Thioxanthosin -5-monophosphat (6TXMP) reagiert. Dieser Schritt ist die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion in der Reaktionskette. Das 6TXMP wird gleich weiter katalysiert durch die Guanotin-monophosphat-synthase (GMPS) zu 6

(McLeod & Siva 2002). Die Genotypisierung kann sowohl mit der RFLP-PCR nach Yates, der dHPLC-Methode oder mit der Realtime-PCR durchgeführt werden (Yates et al. 1997; Schutz et al. 2000; Schaeffeler et al. 2001). In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit Realtime-PCR gearbeitet, weswegen auf die anderen Methoden nicht eingegangen wird.

1.5.1 Einzelschritte der PCR

Die Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) ist heute eine weitverbreitete und oft eingesetzte Standardmethode. Folgende Angaben stammen aus Löffler und Petrides (2007).

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, Doppelstrang-DNA in vitro zu amplifizieren. Zunächst wird die DNA auf 95°C erhitzt, um sie zu denaturieren. Danach wird der Reaktionsansatz auf 50°C abgekühlt und es werden zwei aus 15-25 Basen bestehende Oligonucleotide zugesetzt, die der Sequenz am 5'-Ende der beiden Einzelstränge komplementär sind. Durch Zusatz von Oligonucleotiden und Taq-Polymerase werden die beiden Einzelstränge nun zum jeweiligen Doppelstrang komplementiert. Anschließend wird der Reaktionszyklus mehrfach wiederholt, wobei sich eine exponentielle Zunahme der amplifizierten DNA Moleküle ergibt.

1.5.2 Realtime-PCR

Die Realtime-PCR basiert auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR-Methode; zusätzlich ermöglicht diese Methode die Quantifizierung der gewonnenen DNA. Die Quantifizierung der DNA erfolgt über Fluoreszenzmessung, die während des Laufs durchgeführt wird.

1.5.3 High Resolution Melting

Beim High Resolution Melting (HRM) handelt es sich um ein Verfahren, das mit hoher Sensitivität Sequenzvariationen in PCR-Produkten im Vergleich zur *Wild-type* (WT)-Sequenz detektieren kann. Der Nachweis beruht auf einem DNA-Heteroduplex, der sich immer dann bildet, wenn neben dem *Wild-type*-Allel eine Sequenzvariation auf dem zweiten Allel vorliegt (Montgomery et al. 2007a). Im Rahmen der PCR entsteht mit hoher Zuverlässigkeit ein Heteroduplex aus einem Strang des Wildtyp-Allels und einem Strang des veränderten Allels. Bei der PCR wird zeitgleich ein zugefügter Farbstoff ausschließlich in die doppelsträngige DNA eingebaut, welcher über eine CCD Kamera und entsprechende Filter detektiert wird. Die Hybride weisen bei Erhöhung der Temperatur ein unterschiedliches Schmelzverhalten auf, was zu einem zeitlich unterschiedlichen Verlust des eingebauten Farbstoffes führt. Somit kann man mit einer Wahrscheinlichkeit von über 99,3% die WT-Fragmente von den Heteroduplexen unterscheiden (Lyon & Wittwer 2009). Das HRM ist ein sehr kostengünstiges und zeiteffektives Screening-Verfahren. Bei einem auffälligen Ergebnis, ist eine gezielte Sequenzierung obligat.

1.5.4 Genotypisierung mit Anchor- Probe

Mittels PCR wird aus der DNA der Abschnitt amplifiziert, der die nachzuweisende Mutation trägt. Voraussetzung für diese Methode ist, dass die nachzuweisende Mutation bekannt ist. Der Mutationsnachweis erfolgt mittels der FRET-Schmelzkurvenanalyse. Dabei werden

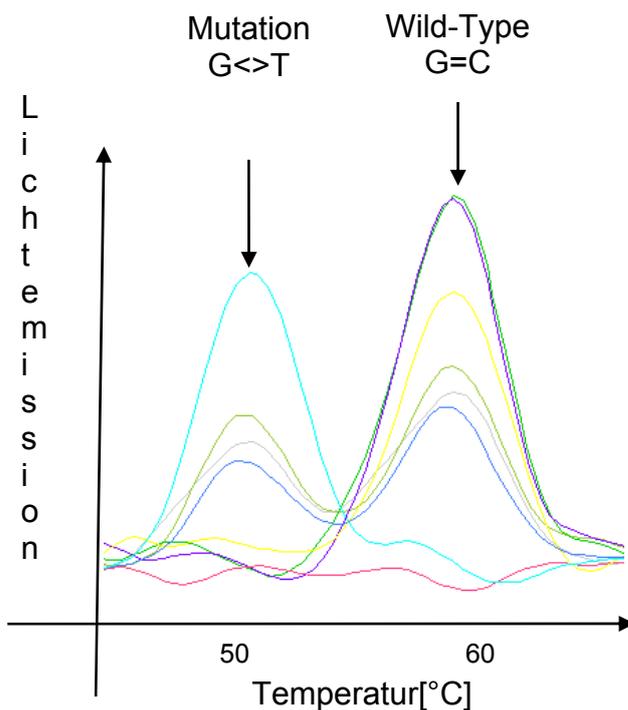


Abbildung 10: Schmelzkurve einer Genotypisierung (aus der Abteilung Klinische Chemie der Uni. Göttingen 2010)

mit Farbstoff markierte Oligonukleotide verwendet, die komplementär zu einem Stück des DNA-Amplifikates sind. Liegen die beiden Sonden nebeneinander, so kommt es bei geeigneten Farbstoffen zum Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) und ein Lichtsignal entsteht. Sobald eine Sonde durch Temperaturerhöhung vom DNA-Strang abfällt, erlischt dieses Signal. So lässt sich darauf schließen, ob die DNA-Sequenz unter der Sonde voll komplementär

zu dieser ist. Der Moment, an dem die Gen-Sonde vom DNA-Strang

abfällt, wird als Schmelzpunkt (T_m) bezeichnet. T_m ist die Temperatur, an welche die eine Hälfte der Gensonden an der DNA gebunden ist, während die andere Hälfte sich bereits von der DNA gelöst hat. Ist die Sonde voll komplementär zum DNA-Strang, so ist die Verbindung stabil und hat einen hohen Schmelzpunkt. Liegt eine Mutation vor, so wird die Verbindung instabil und die Sonde löst sich schon bei niedrigeren Temperaturen vom DNA-Strang ab. Dann erlischt das Leuchten (FRET) früher und die Mutation wird erkannt (Schutz et al. 2000).

1.6 Der Light Cycler LC 480

Das Light Cycler LC 480[®] Real-Time-PCR-System der Firma Roche ist eine moderne Hochdurchsatz-Cyclerplattform mit 96 oder 384 Wellplatten. Für diese Arbeit wurde die 96 Well-Version verwendet. In der Arbeit wurden anhand von Schmelzkurven die amplifizierten DNA-Stücke miteinander verglichen, so dass z.B. der *Wild-type* von einer Mutation unterschieden werden konnte. Für diese Art der Analyse ist eine hohe Genauigkeit in der Detektion von Fluoreszenzen und der Temperatureinstellung von essentieller Bedeutung. Hier zeichnet sich der Light Cycler LC 480[®] der Firma Roche besonders aus. Der LC 480 verfügt über einen präzisen Thermoblock, welcher über einen flüssigkeitsgefüllten Hohlraum zwischen der Aufnahme für die 96-Well-Platte und dem Kühlelement verfügt, wodurch eine gleichmäßige und einheitliche Temperaturverteilung über die gesamte Platte garantiert wird. Zudem wird so ein schneller Temperaturwechsel ermöglicht, was den LC 480 zu einem sehr schnellen Thermocycler macht, der für 40 PCR-Cyclen weniger als 40 min benötigt.

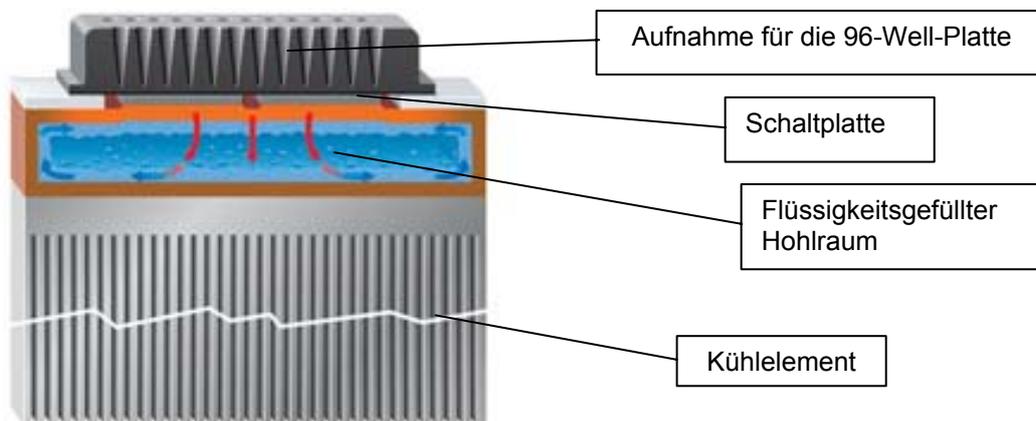


Abbildung 11: Thermoblock des Light Cycler LC 480[®] (Roche)

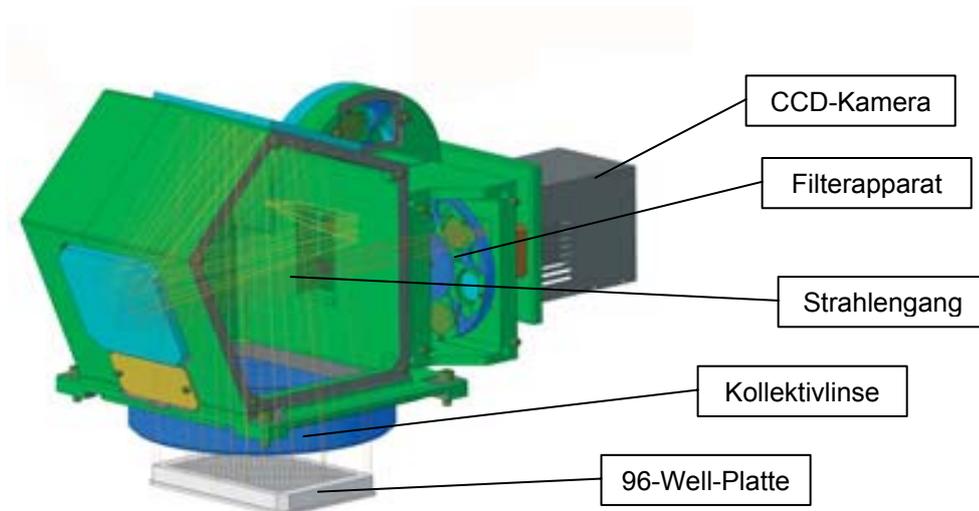


Abbildung 12 :Schematische Darstellung der Detektionseinheit des LC480 (Roche)

Diese Art der Temperaturregelung ermöglicht eine Vergleichbarkeit, unabhängig von Assay-Format oder PCR-Anwendung, auch in Fast-PCR-Protokollen. Zudem verfügt der Light Cycler LC 480[®] über eine Xenonlampe, die Licht über ein breites Spektrum (430 bis 630nm) emittiert. Durch die Bestückung mit verschiedenen Filtern ist der LC480 in der Lage, ein breites Spektrum an fluoreszierenden Farbstoffen für die gegenwärtigen PCR-Anwendungen zu erkennen. Über die Anordnung der optischen Komponenten und die Brennweite wird eine einheitliche Datenerfassung ermöglicht, unabhängig von der Position der Probe.

1.7 Gene-scanning mit dem LC480

Das Gene-scanning ist eine Methode, bei der die einzelnen Exone mittels der in Kapitel 2.1.3 beschriebenen Primer amplifiziert werden. Zu dem Reaktionsansatz wird der Farbstoff syto9 (Invitrogen 2008) zugefügt, der ein grün-fluoreszierender Farbstoff ist, welcher an Doppelstrang-DNA bindet. Beim Schmelzen der DNA wird der Reaktionsansatz mit Licht der Wellenlänge 450 nm angeregt. Syto9 absorbiert und emittiert daraus Licht der Wellenlänge 498 nm, sofern der Farbstoff an die DNA gebunden ist. Die Quantenausbeute im ungebundenen Zustand beträgt <0,01, wohingegen die Quantenausbeute im an die DNA gebundenen Zustand >0.4 beträgt (Invitrogen 2008). Für die Schmelzkurve wird die Fluoreszenz beim langsamen Erhitzen der DNA gegen die

Temperatur aufgetragen. So kann durch die Analyse der Schmelzkurven eine Aussage über eine vorhandene Mutation im entsprechenden PCR-Produkt gemacht werden. Heterozygote Proben werden durch die Schmelzkurvenveränderung im Bezug zur normalen (im Allgemeinen der *Wild-type*) Schmelzkurve identifiziert.

Die Amplifikation einer Mutation ergibt sowohl früh schmelzende heterozygote Produkte als auch normal schmelzende homozygote Produkte. Das Resultat ist eine Veränderung der Schmelzkurve (Wittwer et al. 2003; Laurie et al. 2007).

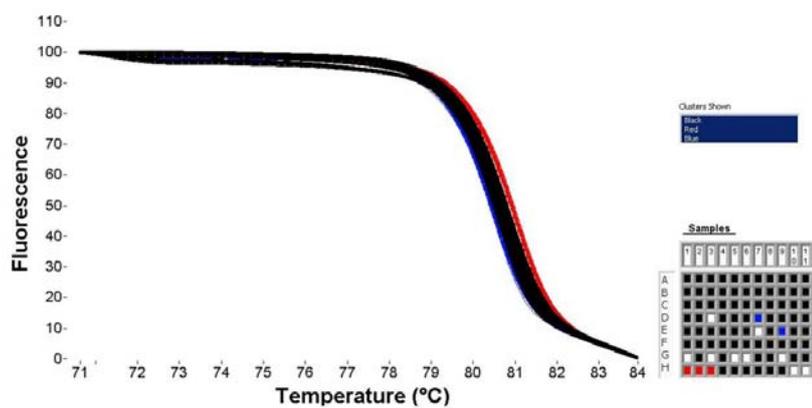


Abbildung 13: Light Cycler LC 480[®] -Schmelzkurve

Die HRM-Schmelzkurvenanalyse hat den Vorteil, dass keine weiteren post-PCR - Verfahren zur Mutationserkennung nötig sind (Polakova et al. 2008).

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Dissertation war die Untersuchung des *TPMT*-Gens mit Hilfe des Gene-scanning, ebenso wie die Suche nach potentiellen neuen Mutationen.

Die Arbeit unterteilt sich in folgende Bereiche:

1. Bestimmung des Genotyps
2. Auswerten der Daten in Bezug auf den Genotyp
3. Etablieren der Methode
4. Abscannen der einzelnen Exone des *TPMT*-Gens
5. Monoklonale Vervielfältigung und Sequenzierung auffälliger Proben
6. Genotypisierung auf *1S-Mutation.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien und Reagenzien

Bezeichnung	Typ	Firma, Firmensitz	Bestellnummer
Pipetten verstellbar	1-10 μ l, 10-100 μ l, 100-1000 μ l	Eppendorf, Hamburg	
Filtertips, steril	10 μ l	Sarstedt, Nümbrecht	70.1115.410
Filtertips, steril	100 μ l	Sarstedt, Nümbrecht	780102
Filtertips, steril	1000 μ l	Biozym, Hessisch Oldendorf	781002
Reaktionsröhrchen	0,5ml	Sarstedt, Nümbrecht	72.699
Reaktionsröhrchen	1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht	72.690.001
Mikroschraubröhrchen	1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht	27.692.005
Mikroschraubröhrchen	2ml	Sarstedt, Nümbrecht	72.693.05
Ständer für Reaktionsröhrchen		Wechselnde Anbieter	

2.1.1 Instrumente

Bezeichnung	Typ	Firma, Firmensitz	Bestellnummer
Heizblock	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg	
Zentrifuge	Mikro 200	Hettrich, Tuttlingen	
Vibriermischer	Vortex- Genie2 G-560E	Scientific Industries, Denver	
Light Cycler LC 480® + Computer + Software		Roche, Grenzach- Wyhlen	
Photometer	GenQuant II	Pharmacia Biotec, Uppsala	

Bezeichnung	Typ	Firma, Firmensitz	Bestellnummer
<u>Zur Isolation genomischer DNA:</u> NucleoSpin®Blood QuickPure	Blood Quick Pure	Macherey- Nagel, Düren	740.569.250

2.1.2 PCR-Reagenzien

Bezeichnung	Typ	Firma, Firmensitz	Bestellnummer
Taq-Polymerase 5U/ μ l	500U	Invitrogen, Paisley	
10x PCR-Puffer	1000U	Invitrogen, Paisley	18067-017
BSA 10mg/ml purified	1,5ml	New England BioLabs, Frankfurt am Main	B9001S
Mg Cl ₂ 50mM		Invitrogen, Paisley	18067-017
DMSO	5ml	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim	D2650
Ampuwa Wasser, steril & pyogenfrei	1l	Fresenius, Bad Hommburg	1636065

Syto9 1:1000 in H ₂ O		Invitrogen, Paisley	S34854
Primer		Operon Biotechnologies, Köln	

2.1.3 Verwendete Primer

Exon	Primer
TPMT_ Ex 2(3)_ for1	ccaatgaccttaaatgacaaca
TPMT_ Ex 2(3)_ rev1	AAAGCAGTCTTGCCGTTAC
TPMT_ Ex 2(3)_ for2	ACGGCAAGACTGCTTTTCAT
TPMT_ Ex 2(3)_ rev2	acatcatgccacagatgac
TPMT_ Ex 3(4)_ for1	actgggtgtgtctgagca
TPMT_ Ex 3(4)_ rev1	CCTCAGTCCACTCTTGCCCTT
TPMT_ Ex 3(4)_ for2	tcctctcagGCTATTAAAGAAGC
TPMT_ Ex 3(4)_ rev2	catcctgttaaatcacccaaa
TPMT_ Ex 5(6)_ for1	aaggTGccaataaagtgcag
TPMT_ Ex 5(6)_ rev1	CAATGAAATGTTCCCCGAAG
TPMT_ Ex 5(6)_ for2	CTTCGGGGAACATTTTCATTG
TPMT_ Ex 5(6)_ rev2	gctttgtggatgttacacagga
TPMT_ Ex 7(8)_ for1	ctttgtccctccagccttt
TPMT_ Ex 7(8)_ rev1	ccaacaactttacCTGGATGT
TPMT_ Ex 7(8)_ for2	TCCCTCCTGGGAAAGAAGTT
TPMT_ Ex 7(8)_ rev2	ttccattagtcaaaaactgga
TPMT_ Ex 8(9)_ for1	aacatgccacatcatcacct
TPMT_ Ex 8(9)_ rev1	gccaggcccaaaagagtta
TPMT_ Ex 9(10)_ for1	caccagccaatTTgagta
TPMT_ Ex 9(10)_ rev1	CAATCCCCAACTTTTATGTGCG
TPMT_ Ex 9(10)_ for2	GGTTGATGCTTTTGAAGAACG
TPMT_ Ex 9(10)_ rev2	CATCCATTACATTTTCAGGCTTT

Ex 9(10)_for 2 clamp	gcggcccgcgccccgcgGGTTGATGCTTTGAAGAACG
----------------------	---------------------------------------

2.1.4 Verwendete Gensonden

TPMT*1S probe	CACCTGGATTAATGGCA
TPMT*1S anchor	CTAATGCTCCTCTATCCCAAATCAT
*3C_anchor	<u>AAA AAG ACA GTC AAT TCC CCA AC</u>
*3C_mut-probe	<u>CTG TAA GTA GAC ATA ACT TTT</u>
*3B_anchor	<u>ATC ATG TCA AAT TTG CCA ATA TTT</u> <u>GTC CTA CCA G</u>
*3B_wt-probe	<u>GGC AAC TAA TGC TCC TCT ATC C</u>
*2_anchor2	AGT GTA GTT GGT GTG GAA ATC AGT
*2_mut-probe2	TTC CAG ACC GGG GAC A

2.1.5 Aufreinigung der PCR-Produkte

Bezeichnung	Typ	Firma, Firmensitz	Bestellnummer
QIAquick	PCR-Purifikationskit	QIAGEN, Hilden	28104

2.1.6 Ligation

Bezeichnung	Typ	Firma, Firmensitz	Bestellnummer
pGEM	T-Vector System I	Promega, Mannheim	A3600

2.1.7 Elektroporation

Bezeichnung	Typ	Firma, Firmensitz	Bestellnummer
Elektroporator	Gene Pulser Xcell	BioRAD, München	
Glasperlen	5mm		9012405
Elektroporations- Küvette	1mm	Biozym, Hessisch Oldendorf	748010
Nährmedium	S.O.C. Medium	Invitrogen, Paisley	15544-034
Nährboden	Agar-Pulver	AppliChem, Darmstadt	A0927,9010

2.1.8 Miniprep

Bezeichnung	Typ	Firma, Firmensitz	Bestellnummer
Nährlösung	LB-Pulvermedium	AppliChem, Darmstadt	A0954,9010
Miniprep	Fast Plasmid Mini Kit	Eppendorf, Hamburg	2300000

2.1.9 Sequenzierung

Bezeichnung	Typ	Firma	Bestellnummer
Sequenzier Kit	Fmol DNA Cycle	Promega, Mannheim	Q4100
Sequenzierer	Li-Cor	MWB Biotech	

2.2 Patienten

In der vorliegenden Arbeit wurden 731 Proben untersucht. Bei den Proben handelt es sich um anonymisiertes Restmaterial, bei dem in der Zeit von 2005 bis 2007 eine erniedrigte TPMT-Aktivität ($< 13 \text{ nmol}/(\text{ml Ery} \times \text{h})$) und im Jahre 2008 eine erniedrigte oder eine erhöhte (< 13 und $> 18 \text{ nmol}/(\text{ml Ery} \times \text{h})$) TPMT-Aktivität im Routine-Labor gemessen wurde. Es wurden Proben ausgewählt, bei denen keine *2-, *3B-, *3C- und *3A- Mutation nachzuweisen war.

2.2.1 Probengewinnung

Das durch Venenpunktion gewonnene Blut wurde in EDTA-Monovetten im Rahmen einer TPMT-Aktivitätsbestimmung aufbewahrt. Wurde im o.g. Zeitraum von einem Patienten mehrmals die TPMT-Aktivität bestimmt, so wurde immer die zeitlich erste Probe verwandt. Das nicht benötigte Blut wurde bis zur DNA-Isolation bei -20°C eingefroren.

2.3 Isolation der DNA

Die genomische DNA wurde aus EDTA-antikoaguliertem Vollblut mit dem DNA-Isolations-Spin-Kit der Firma AppliChem isoliert. Die Methode des Kits basiert auf der chaotropischen Zelllyse in Anwesenheit von Proteinase K.

Die DNA wurde gemäß der Anleitung des Kits aus den Leukozyten extrahiert.

2.4 Genotypisierung

Alle DNAs wurden nach dem *TPMT*-Genotypisierungs-Assay der Universitäts-Medizin Göttingen, Abteilung Klinische Chemie, auf die drei häufigsten Mutationen *3A, *3B und *2 hin untersucht. Der Reaktionsansatz wurde nach folgendem Schema pipettiert:

Reagenzien			Menge 1x in μ l
H ₂ O			13,6
PCR-Puffer 10x			2,1
MgCl ₂ 50mM			1,0
100xBSA			1,0
DMSO			1,0
NTP (je10mM)		Roche	0,4
ReTaq2007			0,1
Oligos			
*3C:			
Ex10-for 100			0,2
Ex10-rev 100-25			0,2
anchor 100-20			0,2
A>Gmut-probe 123-20			0,2
*3B:			
Ex7-for 100			0,2
Ex7-rev 100			0,2
anchor 100-20			0,2
Gwt>A-probe 100-20			0,2
*2:			
Ex5-for2 100-50			0,2
Ex5-rev2 100-50			0,2
anchor 100-20			0,2
G>Cmut-probe 106-20			0,2
			20
DNA			+ 1

Alle DNAs, die homozygot oder heterozygot hinsichtlich der drei häufigsten Mutationen waren, wurden aussortiert und nicht weiter untersucht, da die niedrige TPMT-Aktivität dadurch bereits erklärt wurde.

2.4.1 Mastermix-Pipettierschema:

Reagenz		Menge 1x in μ l
H ₂ O		18,725
10x Puffer		3
dNTP-Mix		0,6
BSA		1,5
MgCl ₂		1,5
DMSO		1,5
Primer forward		0,15
Primer reverse		0,15
Taq- Polymerase		0,375
Syto 9		1,5
		30
DNA		1

2.4.2 Überprüfen der verwendeten Primer

Zur Kontrolle der Primer und der damit entstandenen PCR-Produkte wurde eine 1% Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Ethidiumbromidfärbung (Verdünnung 1:20000) durchgeführt. Die Negativkontrolle durfte kein Produkt zeigen. Aufgrund der Länge der einzelnen Exone des *TPMT*-Gens wurden die Exone in zwei PCRs mit maximal 300Bp unterteilt (Exon X.1 und X.2). Erst durch diese Unterteilung war es möglich, das Gen mit Hilfe der Real Time PCR und dem HRM zu untersuchen. Für die Primer waren folgende PCR-Produktlängen zu erwarten:

PCR	Länge des PCR-Produktes
Exon 2.1	206 bp
Exon 2.2	197 bp
Exon 3.1	223 bp
Exon 3.2	174 bp
Exon 4.1	191bp
Exon 4.2	186 bp
Exon 5.1	182 bp
Exon 5.2	164 bp
Exon 6	288bp
Exon 7.1	166 bp
Exon 7.2	223 bp
Exon 8	211 bp
Exon 9.1	157 bp

2.5 Reaktionsansatz

Der Mastermix wurde nach dem oben beschriebenen Schema in ein Eppendorf-Cup pipettiert. Für den Light Cycler LC 480[®] gibt es von der Firma Roche spezielle 96-Well-Platten. In jedes Well wurden 30µl Mastermix und 1µl DNA pipettiert. Anschließend wurde die ganze Platte mit einer Klarsichtfolie verschlossen und zentrifugiert.

2.6 Reaktionen im Light Cycler

Zuerst wurde der Reaktionsansatz für zwei Minuten auf 95°C erhitzt, um die gesamte DNA zu denaturieren. Anschließend wurde die DNA mit 37 PCR-Zyklen vervielfältigt. Die Temperaturen waren: 55°C für 15 Sekunden, um die Primer an die DNA zu binden, und 72°C für 20 Sekunden, für die Verlängerung der Primer durch die Taq-Polymerase. Anschließend folgte die Aufnahme der Schmelzkurven. Dabei wurde die Temperatur auf 95°C erhöht, bevor nach der Abkühlung auf 68°C für 30 Sekunden die Temperatur langsam und kontinuierlich auf 90°C erhöht wurde, um die Schmelzkurve zu detektieren.

2.7 Ansetzen der Sequenzieransätze

2.7.1 PCR-Produktreinigung

Für die Sequenzierung musste das PCR-Produkt aufgereinigt werden. Dies wurde gemäß der Anleitung des QIAquick PCR Purifikations-Kits durchgeführt.

2.7.2 DNA-Quantifizierung:

Die Quantifizierung der DNA-Produkte wurde mit dem GeneQuant II durchgeführt.

2.7.3 Ansetzen der Sequenzieransätze

Für die Sequenzierung wurden 50ng DNA in 10mmol TRIS, pH8,5 mit 20pmol Primer in einem Gesamtvolumen von 7µl zu der Firma Sequence Laboratories Göttingen GmbH geschickt.

2.8 Klonierung der PCR-Produkte

2.8.1 Ligation

Die Ligation der PCR-Produkte wurde nach Anleitung des pGEM-T Vector System I durchgeführt und anschließend eine Stunde bei 20°C inkubiert.

2.8.2 Aufreinigung

Für die Aufreinigung der Plasmide wurde das PCR-Purifikations-Kit der Firma QIA Quick verwendet und nach Anleitung durchgeführt.

2.8.3 Transformation

Für die Transformation wurden 50µl E.coli aufgetaut und 1µl gereinigtes Plasmid-Purifikat hinzu pipettiert. Anschließend wurde das Gemisch in eine gekühlte Elektroporations-Küvette umgefüllt und elektroporiert. Die Elektroporation wurde mit folgenden Einstellungen durchgeführt:

Programm:	Bacterium
Voltage	1800V
Capacitance	25µF
Resistance	200Ω
Küvette	1mm

Nach der Elektroporation wurden die E.coli-Stämme in ein 1,5ml-Eppendorf-Gefäß zusammen mit 1ml S.O.C.-Medium überführt und eine Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurden 50µl der Kultur auf eine LB-Agarplatte mit 20µl X-Gal (50mg/ml) gegeben, mit Glaskugeln verteilt und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

2.8.4 Kolonie-PCR

Um einen E.coli-Klon zu finden, wurden weiße Kolonien von der Agarplatte in je 50µl LB-Medium gepickt und 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde eine PCR nach dem oben genannten Schema durchgeführt, in der die Klone an Stelle der DNA eingesetzt wurden. Die Klone wurden in 1,5ml LB-Medium über Nacht bei 37°C im Wasserbad angezchtet.

2.8.5 Mini Prep

Die Mini Prep wurde nach der Anleitung des FastPlasmid Mini Kit der Firma Eppendorf durchgeführt.

2.8.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-Inserts wurde nach der Anleitung des Kits *fmol* DNA Cycle Sequencing System der Firma Promega auf dem Sequenzierer Li-Cor der Firma MWG Biotech durchgeführt.

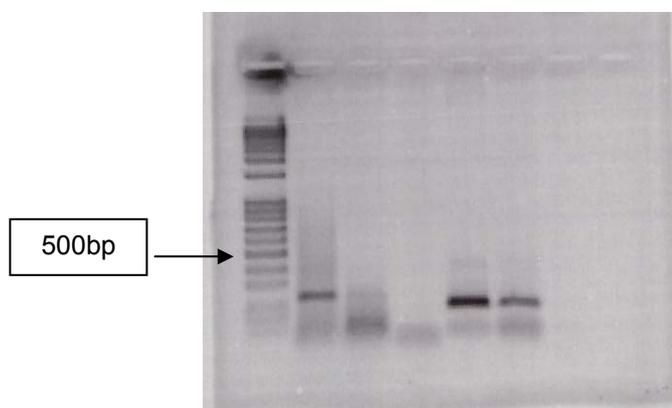
3 Ergebnisse

3.1 Überprüfen der Primer

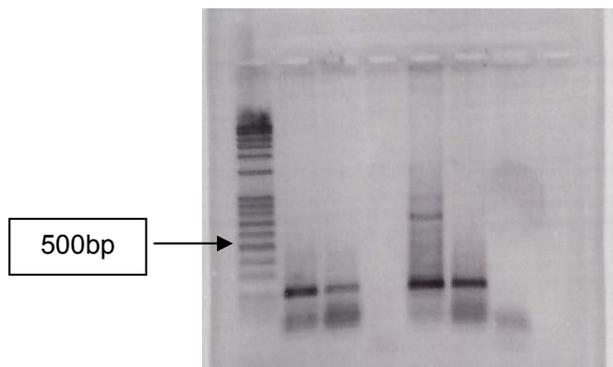
Die Überprüfung der PCR-Amplifikate mittels Gelelektrophorese hat ergeben, dass alle Primer das entsprechende PCR-Produkt liefern, außer den Primern für das Exon 6.2. Jedoch amplifizierten die Primer für das Exon 6.1 das gesamte Exon 6 des *TPMT*-Gens, so dass im weiteren Verlauf des Genscannings immer das gesamte Exon 6 betrachtet wurde.

3.1.1 Gelelektrophorese Exon 2.1 bis 3.2

1	2	3	4	5	6	7
	Exon 2.1	Exon 2.1	Exon 2.1	Exon 2.2	Exon 2.2	Exon 2.2
Produktlänge	206bp	206bp	0bp	197bp	197bp	0bp
DNA-Marker	Positiv-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Negativ-Kontrolle

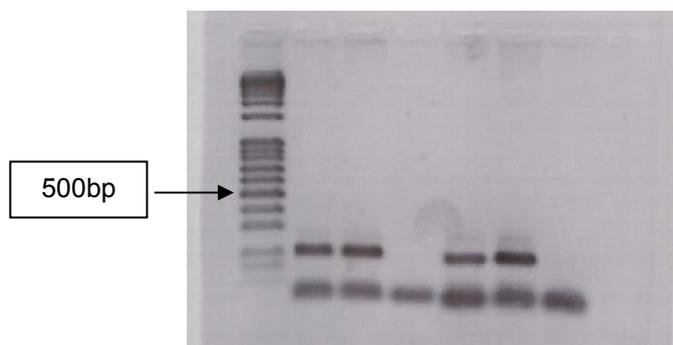


1	2	3	4	5	6	7
	Exon 3.1	Exon 3.1	Exon 3.1	Exon 3.2	Exon 3.2	Exon 3.2
Produktlänge	223bp	223bp	0bp	174bp	174bp	0bp
DNA-Marker	Positiv-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Negativ-Kontrolle

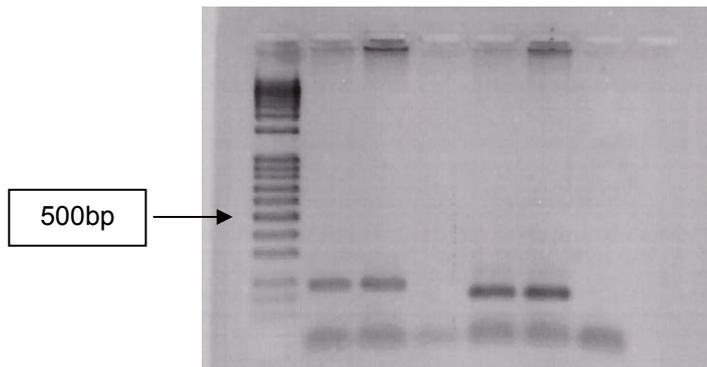


3.1.2 Gelelektrophorese Exon 4.1 bis 6

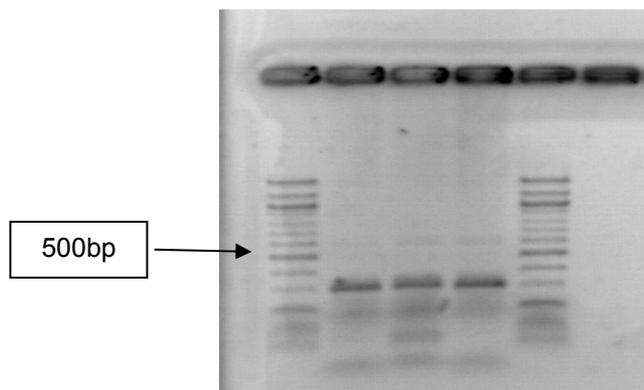
1	2	3	4	5	6	7
	Exon 4.1	Exon 4.1	Exon 4.1	Exon 4.2	Exon 4.2	Exon 4.2
Produktlänge	191bp	191bp	0bp	186 bp	186 bp	0bp
DNA-Marker	Positiv-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Negativ-Kontrolle



1	2	3	4	5	6	7
	Exon 5.1	Exon 5.1	Exon 5.1	Exon 5.2	Exon 5.2	Exon 5.2
Produktlänge	182bp	182bp	0bp	164bp	164bp	0bp
DNA-Marker	Positiv-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Negativ-Kontrolle

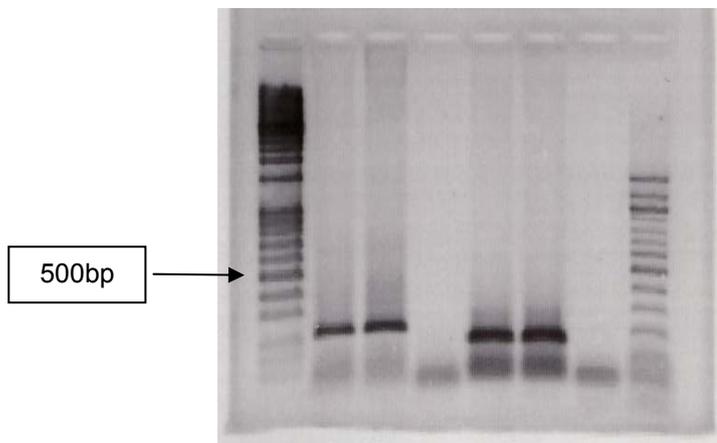


1	2	3	4	5
	Exon 6	Exon 6	Exon 6	
Produktlänge	288bp	288bp	288bp	
DNA-Marker	Positiv-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	DNA-Marker

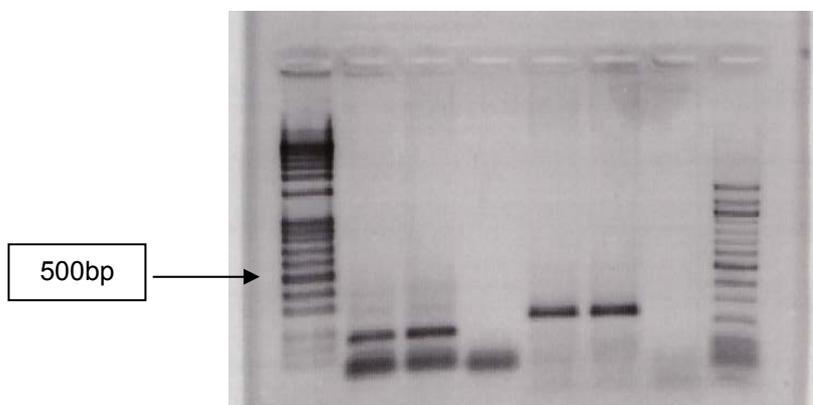


3.1.3 Gelelektrophorese Exon 7.1 bis 9

1	2	3	4	5	6	7	8
	Exon 7.1	Exon 7.1	Exon 7.1	Exon 7.2	Exon 7.2	Exon 7.2	
Produktlänge	166bp	166bp	0bp	223bp	223bp	0bp	
DNA-Marker	Positiv-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Negativ-Kontrolle	DNA-Marker



1	2	3	4	5	6	7	8
	Exon 8	Exon 8	Exon 8	Exon 9	Exon 9	Exon 9	
Produktlänge	211bp	211bp	0bp	157bp	157bp	0bp	
DNA-Marker	Positiv-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Negativ-Kontrolle	DNA-Marker



3.2 Ergebnisse der PCR

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für das Gene-scanning insgesamt 346 Proben mit einer TPMT-Aktivitätsspanne von 3,2 nmol/(ml ery*h) bis 13 nmol/(ml ery*h) hinsichtlich der drei häufigsten Mutationen (*3A,*3C,*2) untersucht mit dem Ergebnis: *3A/*3A (n=1) 0,30%, *3A/*3C (n=1) 0,30%, *1/*3A (n=124) 36 % *1/*3C (n=14) 4,03%, *1/*2 (n=5) 1,45%.

In unserem Kollektiv hatten die Proben mit einer TPMT-Aktivität ≤ 12 nmol/(ml ery*h) eine Mutationsrate von 57,4% (95% Konfidenzintervall: 51,1%- 63,5%). Insgesamt waren von 139 Proben 242 Proben positiv hinsichtlich der *TPMT**3A-, *3C- oder *2-Mutation.

Bei Proben mit einer TPMT-Aktivität von bis zu 9 nmol/(ml ery*h) konnte eine wesentlich höhere Mutationsrate von 89,0% (95% Konfidenzintervall: 80,9%- 93,9%) nachgewiesen werden. Hier waren 81 von 91 Proben mutiert.

Proben mit einer Aktivität von ≤ 6 nmol/(ml ery*h) zeigten eine Mutationsrate von 85,7% (95% Konfidenzintervall: 48,6%- 97,4%). In dieser Gruppe waren 6 von 7 Proben mutiert.

2 Proben haben eine TPMT-Aktivität von ≤ 3 nmol/(ml ery*h). Bei beiden Proben konnte eine *TPMT**3A-, *3C- oder *2-Mutation nachgewiesen werden, was einer Mutationsrate von 100,0% entspricht (95% Konfidenzintervall: 34,2%-100,0%).

Anzumerken ist, dass es sich um selektierte Proben handelte, die im Vorfeld durch eine niedrige Enzymaktivitätsmessung aufgefallen waren und anschließend genotypisiert wurden.

Daraus lässt sich schließen, dass eine herabgesetzte TPMT-Aktivität am ehesten auf eine der drei häufigsten Mutationen zurückzuführen ist.

In Rahmen dieser Arbeit wurden maximal 89,0% der *TPMT* mutierte Proben durch die Genotypisierung gefunden, die übrigen 11,0% (95% Konfidenzintervall: 6,1%-19,0%) wiesen weiterhin eine ungeklärt niedrige Enzymaktivität auf.

Im Vorfeld des Gene-scannings wurden insgesamt 249 Proben mit einer TPMT-Aktivität unter 12 nmol/(ml ery*h) hinsichtlich der drei häufigsten Mutationen (*3A,*3C,*2) untersucht, mit dem Ergebnis: *3A/*3A (n=2) 0,80%, *3A/*3C (n=2) 0,80%, *1/*3A (n=133) 53,41% *1/*3C (n=20) 8,03%, *1/*2 (n=6) 2,41%. Die Proben, die eine der drei häufigsten (o.g) Mutationen aufwiesen, wurden aussortiert und nicht weiter im Gene-scanning untersucht.

Es verblieben 85 Proben mit ungeklärt niedriger TPMT-Aktivität. Diese Proben wurden um vier vietnamesische Proben (V19; V64; V93; V94) ergänzt, die ebenfalls eine unerklärt

niedrige TPMT-Aktivität (5,27-8,28 nmol/ery*h) aufwiesen. Zusammen ergab sich für alle PCRs des Gene-scannings folgende unveränderte Plattenbelegung:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	V19	V64	V93	V94	27	28	32	33	35	36	37	38
B	42	55	58	60	61	64	67	68	69	70	72	73
C	76	77	78	80	81	82	83	84	85	86	87	123
D	127	128	141	151	152	153	155	184	186	187	188	189
E	190	191	192	193	322	331	334	338	344	345	348	349
F	350	351	352	387	389	395	396	399	401	402	404	405
G	407	408	409	410	411	413	414	415	416	417	465	466
H	469	470	471	472	473	*2/*3A-Kontrolle	1/*2-Kontrolle	1/*3A-Kontrolle	1/*3C-Kontrolle	Negativ-Kontrolle	Negativ-Kontrolle	Negativ-Kontrolle

Die Schmelzkurven wurden mit dem Programm Melting Wizard normalisiert und geshiftet. Durch diesen Vorgang wird beim Normalisieren die Fluoreszenz der Proben für jede gemessene Temperatur als Prozentsatz zwischen einer zuvor definierten Nulllinie und der maximal gemessenen Fluoreszenz umgerechnet. Dieser Vorgang ist notwendig, um die Basis-Fluoreszenz (sog. Rauschen) der Proben herauszufiltern.

Beim *shifting (temperature-shifting)* werden die Temperaturdifferenzen zu den Werten einer quadratisch angepassten Referenzkurve berechnet und gemittelt. Jeder Kurve wird dann um den berechneten *temperature shift* verschoben, so dass die Kurven sich überlagern können. (Wittwer et al. 2003; Montgomery et al. 2007b). Durch diesen Vorgang lassen sich evtl. Abweichungen in den Schmelztemperaturen der Proben besser erkennen.

3.2.1 Exon 2.1

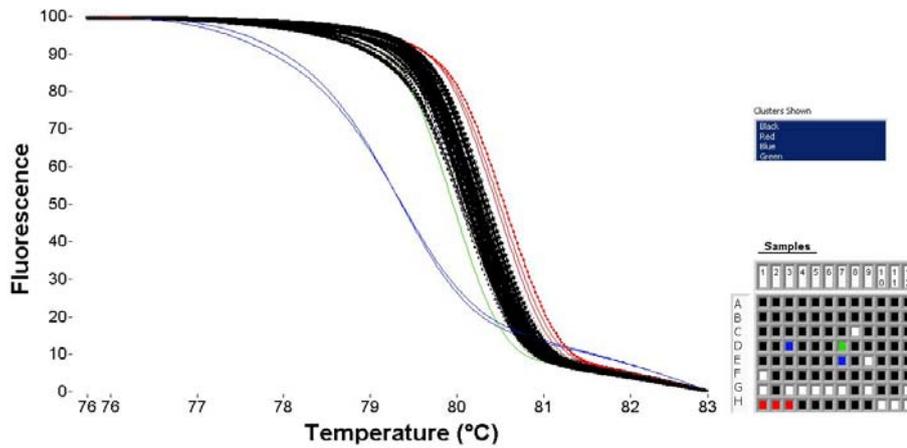


Abbildung 14: Schmelzkurve Exon 2.1: schwarz: normale unauffällige Schmelzkurve; rot und blau: Fehl-Cluster

3.2.2 Exon 2.2

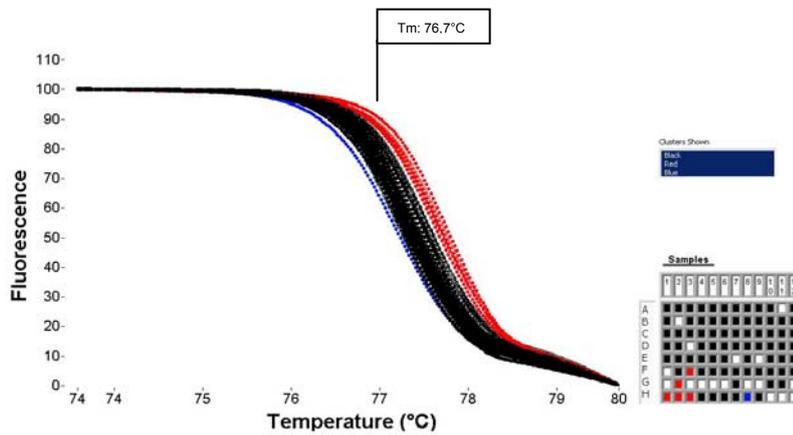


Abbildung 15: Schmelzkurve Exon 2.2: schwarz: normale unauffällige Schmelzkurve; rot und blau: Fehl-Cluster

3.2.3 Exon 3.1

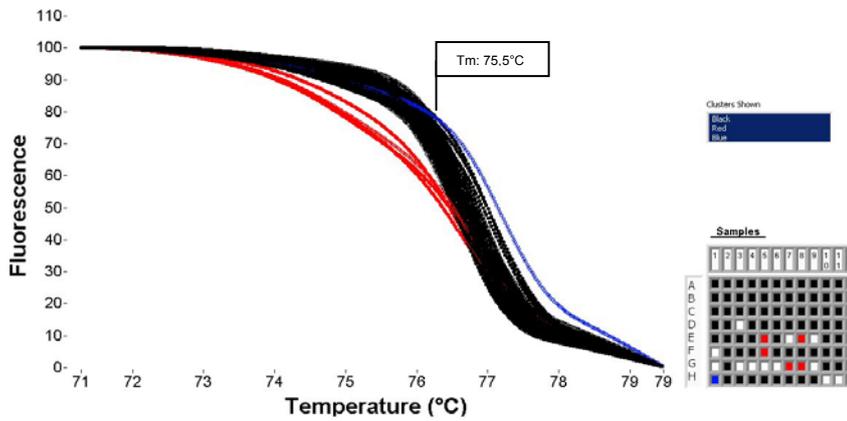


Abbildung 16: Schmelzkurve Exon 3.1: schwarz: normale Schmelzkurve; rot: Versager; blau: Fehl-Cluster

3.2.4 Exon 3.2

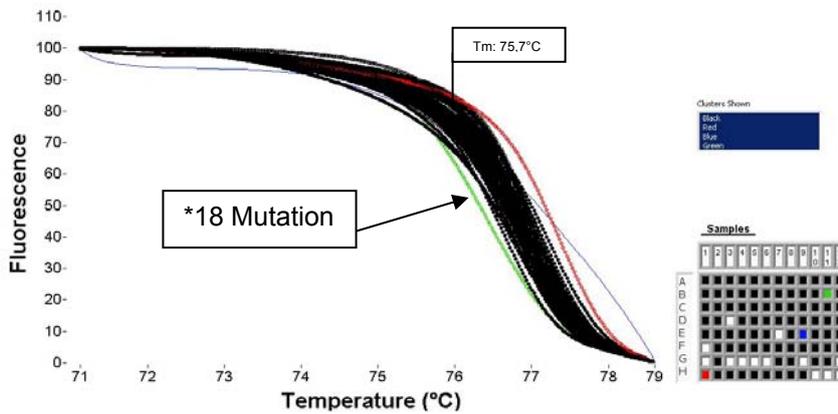


Abbildung 17: Schmelzkurve Exon 3.2: grün: *18-Mutation; rot: Fehl-Cluster; blau: Versager

Bestätigt wurde die *18-Mutation durch erneute Analyse und anschließendes Sequenzieren.

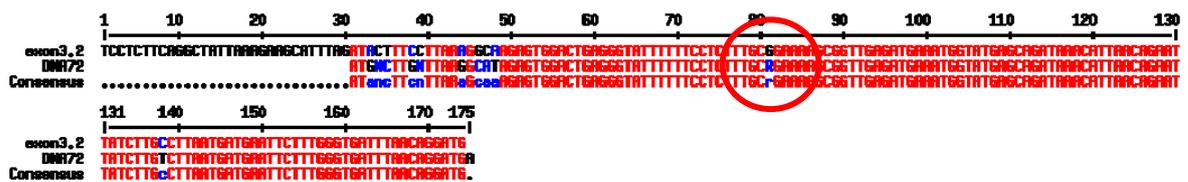


Abbildung 18: Sequenzanalyse der DNA 72 im Exon 3.2

Bei der *18-Mutation kommt es im Exon 3 des *TPMT*- Gens zu einem C124A -Austausch.

Die Enzymexpression ist nahezu unverändert und erreicht im Vergleich zum *Wild-type* 90% der TPMT-Konzentration im Zellplasma. Allerdings ist durch den SNP die Funktion des Enzyms so stark eingeschränkt, dass K_m und V_{max} nicht mehr messbar sind (Ujii et al. 2008). Die DNA-Probe 72, bei der wir die *18-Mutation nachgewiesen haben, hatte allerdings eine gemessene TPMT-Aktivität von 10 nmol/(ml Ery*h). Die Sequenzanalyse zeigt zu der *18-Mutation eine zweite intronische Mutation, die allerdings keine Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz oder das Expressionsverhalten hat.

3.2.5 Exon 4.1

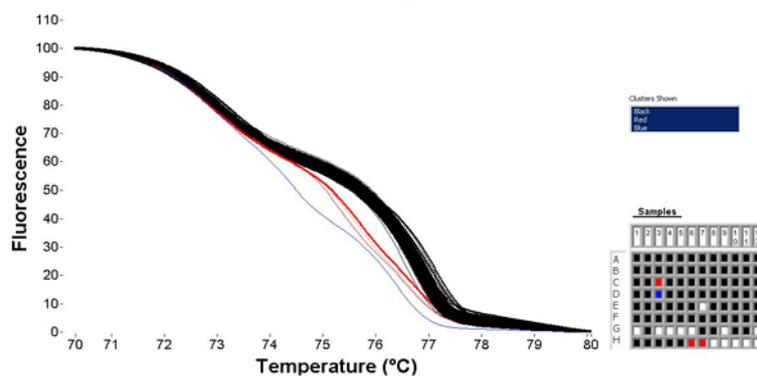


Abbildung 19: Schmelzkurve Exon 4.1: schwarz: normale Schmelzkurve; rot: *2-Mutation; blau: Versager

3.2.6 Exon 4.2

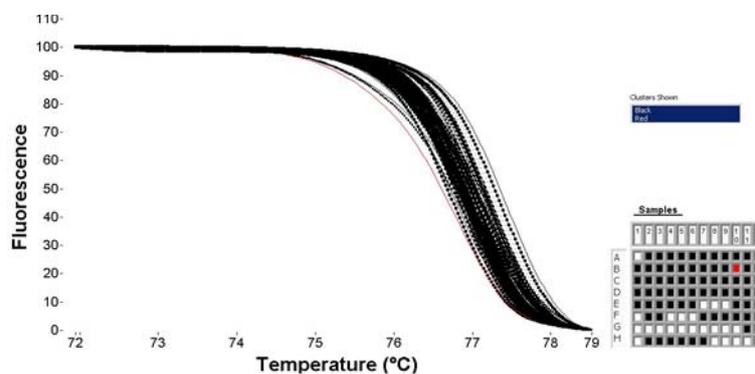


Abbildung 20: Schmelzkurve Exon 4.1: schwarz: normale Schmelzkurve

3.2.7 Exon 5.1

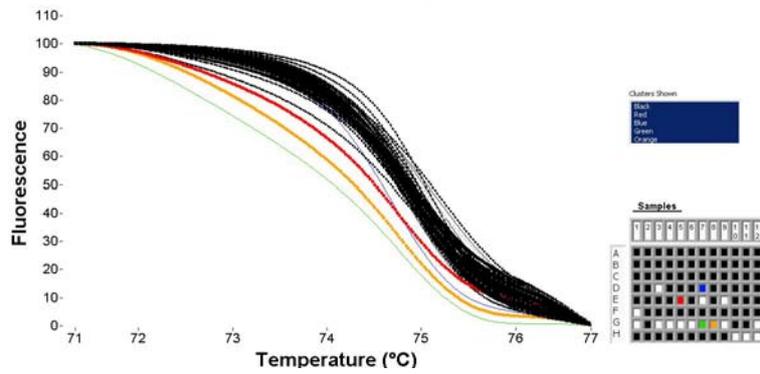


Abbildung 21: Schmelzkurve Exon 5.1: schwarz: normale Schmelzkurve; rot, blau, grün; gelb: Versager

3.2.8 Exon 5.2

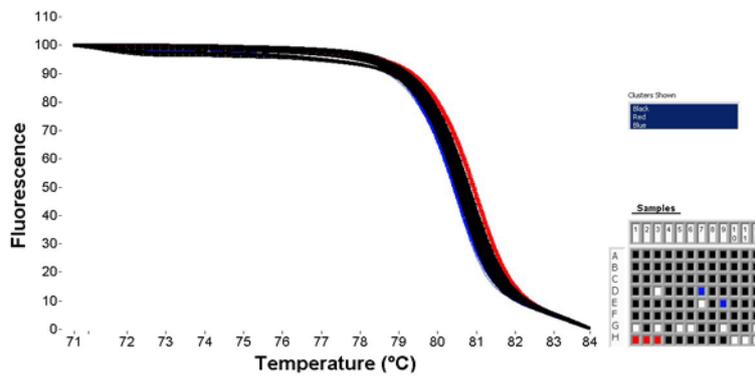


Abbildung 22: Schmelzkurve Exon 5.2: schwarz: normale Schmelzkurve; rot, blau: Fehl-Cluster

3.2.9 Exon 6

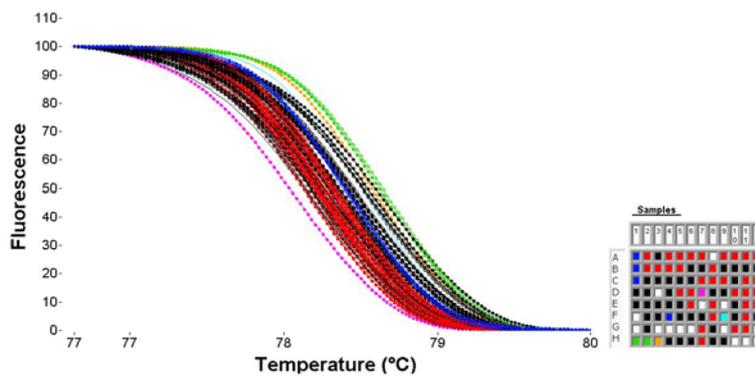


Abbildung 23: Schmelzkurve Exon 6: schwarz: normale Schmelzkurve; rot, blau: *1S- Mutation

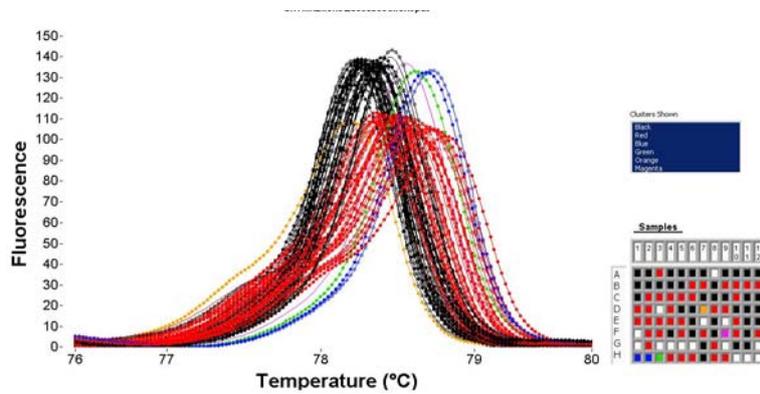


Abbildung 24: Schmelzkurve Exon 6: schwarz: normale Schmelzkurve; rot: *1S; blau, grün: Versager

3.2.10 Exon 7.1

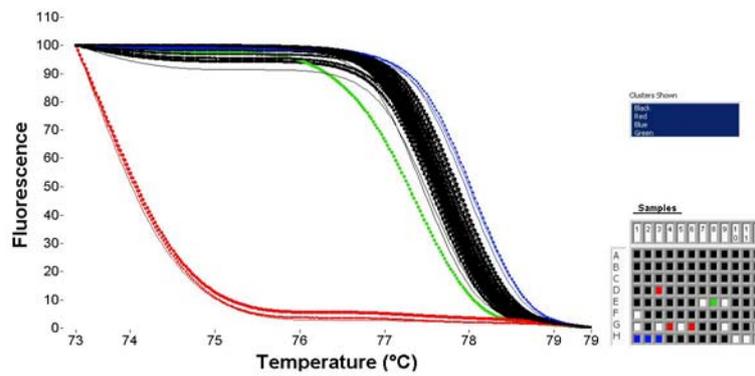


Abbildung 25: Schmelzkurve Exon 7.1: schwarz: normale Schmelzkurve; grün, blau, rot: Versager

3.2.11 Exon 7.2

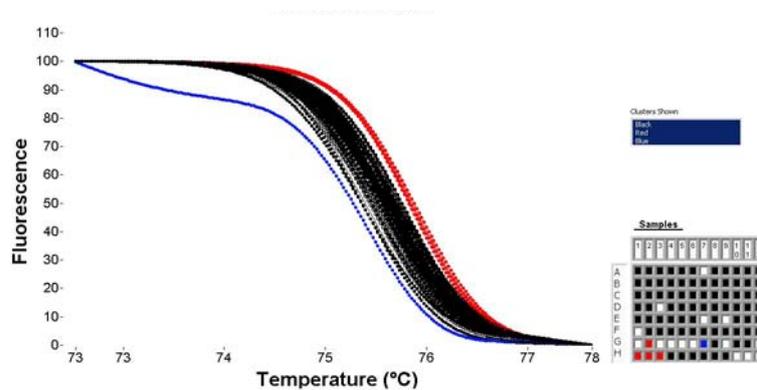


Abbildung 26: Schmelzkurve Exon 7.2: schwarz: normale Schmelzkurve; grün, blau: Fehl-Cluster

3.2.12 Exon 8

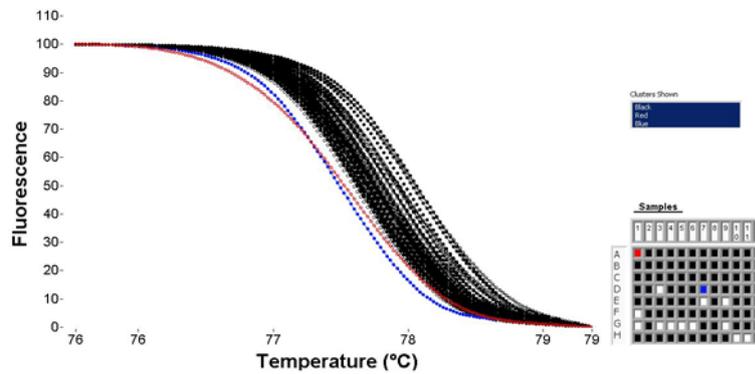


Abbildung 27: Schmelzkurve Exon 8: schwarz: normale Schmelzkurve; blau: fehl Fehl-Cluster; rot: Auffällige Schmelzkurve

3.2.13 Exon 9

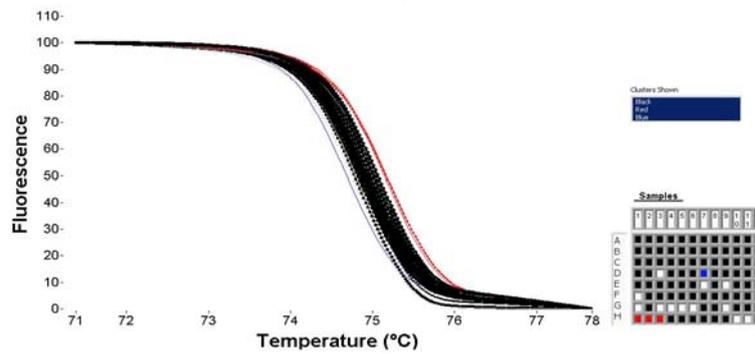


Abbildung 28: Schmelzkurve Exon 9: schwarz: normale Schmelzkurve; blau, rot: Fehl-Cluster

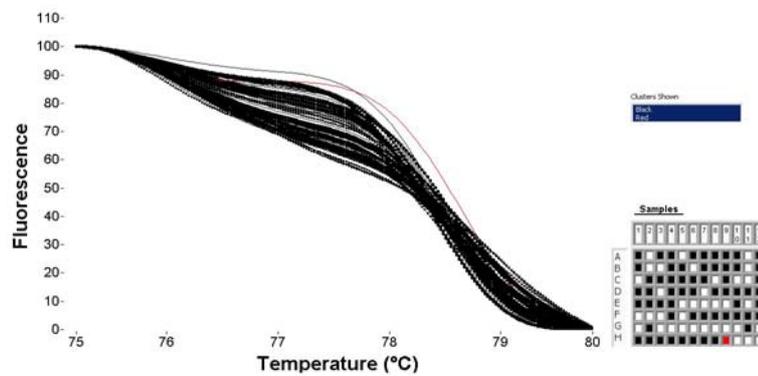


Abbildung 29: Schmelzkurve des gesamten Exon 9 mit cg-Clamp

Die DNA Schmelzkurven, die sich in der Melting Wizard- Software durch eine aberrante Schmelzkurve als auffällig zeigten, wurden in separaten PCR's erneut analysiert. Die DNAs 311, 338 und 389 in Exon 3.1, die DNA 415 in Exon 5.1, die DNAs 155 und V19 in Exon 8 und die DNA 155 in Exon 9.1 zeigten sich auch in der zweiten Analyse als auffällig durch aberrante Schmelzkurven. Zur genauen Analyse wurden die PCR-Produkte aufbereitet und durch die Firma Seq-Lab Göttingen sequenziert mit dem Ergebnis:

Für die DNA 311, 338 und 389 konnte in Exon 3.1 durch die Sequenzierung keine Mutation nachgewiesen werden.

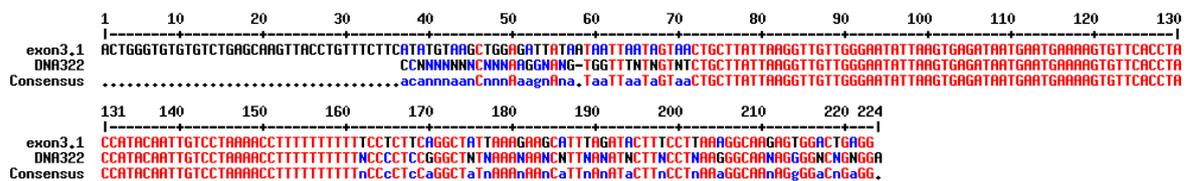


Abbildung 30: Sequenzanalyse der DNA 311 im Exon 3.1

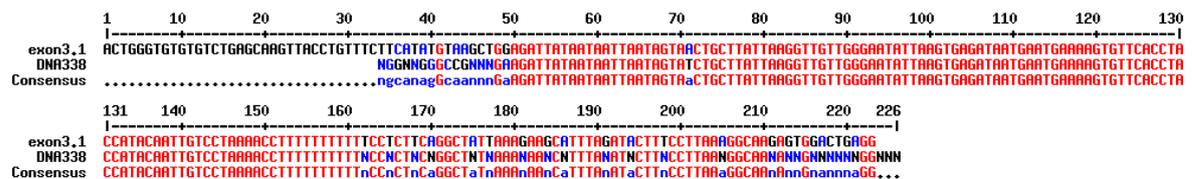


Abbildung 31: Sequenzanalyse der DNA 338 im Exon 3.1

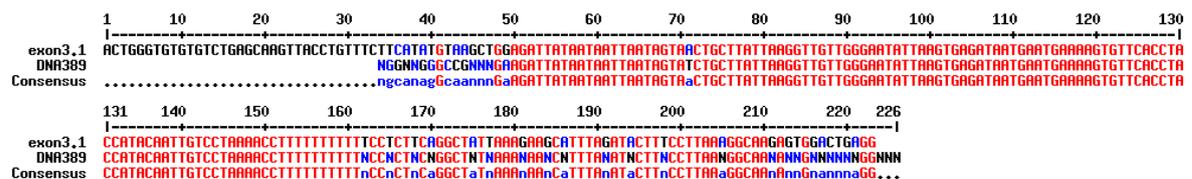


Abbildung 32: Sequenzanalyse der DNA 389 im Exon 3.1

Für die DNA 415 konnte durch die Sequenzierung keine Mutation im Exon 5.1 nachgewiesen werden.

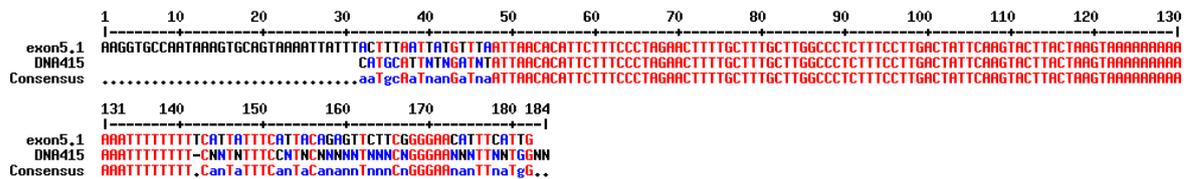


Abbildung 33: Sequenzanalyse der DNA 415 im Exon 5.1

Für die DNA 155 konnte in Exon 8 keine Mutation durch die Sequenzierung nachgewiesen werden

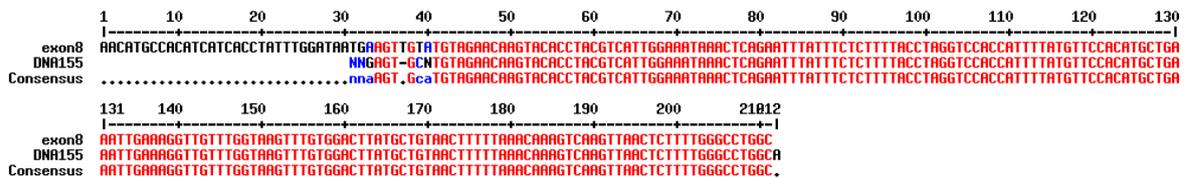


Abbildung 34: Sequenzanalyse der DNA 155 im Exon 8

Durch die Sequenzierung des PCR-Produktes konnte eine Mutation der DNA V19 in Exon 8 weder eindeutig nachgewiesen noch ausgeschlossen werden.



Abbildung 35: Sequenzanalyse der DNA V19 im Exon 8

Für die DNA 155 konnte durch die Sequenzierung keine Mutation im Exon 9.1 nachgewiesen werden.

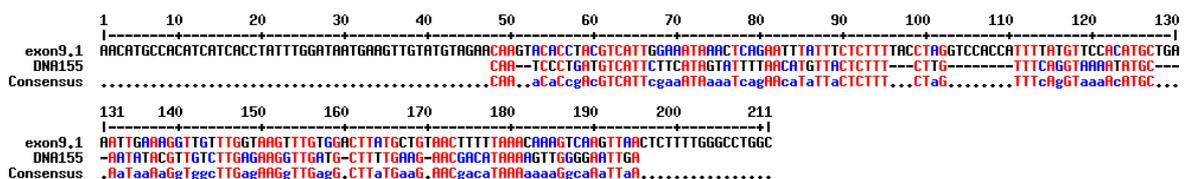


Abbildung 36: Sequenzanalyse der DNA 155 im Exon 9.1

3.3 Untersuchung zur *1S-Mutation

Durch das Gene-scanning auf dem Exon 6 fielen diverse Schmelzkurven durch ein aberrantes Schmelzverhalten auf. In Abbildung 21 und 22 ist eine deutliche Veränderung des Schmelzpunktes zu erkennen.

Zur Untersuchung der aberranten Schmelzkurven in Exon 6 wurden zwei PCR-Produkte, DNA 188 mit auffälliger Schmelzkurve und DNA V19 ohne auffällige Schmelzkurve, sequenziert und miteinander verglichen.

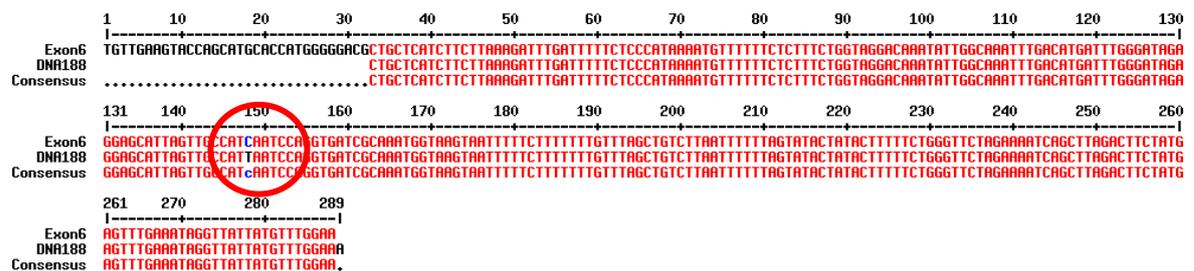


Abbildung 39: Sequenzanalyse DNA188 Exon 6

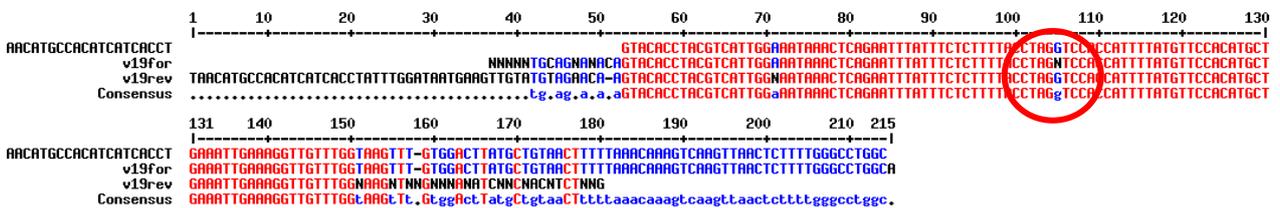


Abbildung 40: Sequenzanalyse DNA V 19 Exon 6

Die Sequenzanalyse zeigt, dass bei DNAs mit aberranter Schmelzkurve in Exon 6 eine *1S-Mutation (T474C) vorhanden ist. Die *1S-Mutation ist eine stille Mutation, die keinerlei Auswirkungen auf die Enzymaktivität hat. Allerdings zeigten sich in den untersuchten Proben, die eine ungeklärt niedrige Enzymaktivität aufwiesen, eine scheinbare Häufung der *1S-Mutation. Es zeigten sich 31 von 81 (38%) analysierten DNAs *1S positiv. Die beschriebene Häufigkeitsverteilung der *1S-Mutation liegt bei 34%. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden weitere 363 Proben aus dem Jahr 2008 untersucht, bei denen keine der drei häufigsten Mutationen nachzuweisen waren. Die Genotypisierung wurde nach dem Standard-Essay der Universitätsmedizin Göttingen Abteilung Klinische Chemie durchgeführt.

Insgesamt wurden im Rahmen der *TPMT**1S-Mutation 480 Patientenproben, auf die drei häufigsten Mutationen hin genotypisiert. Alle Proben, positiv getestet hinsichtlich einer

*TPMT**3A-, *3C- oder *2- Mutation, wurden nicht weiter untersucht. 49 Proben trugen eine *TPMT**3A-, *3C- oder *2-Mutation, und bei 20 Proben war eine Genotypisierung nicht möglich. Die übrigen 342 Proben wurden hinsichtlich der *TPMT**1S-Mutation genotypisiert, um einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten oder einer erniedrigten TPMT-Aktivität und der *TPMT**1S-Mutation festzustellen.

Für das erste Halbjahr 2008 wurden 78 Proben mit einer TPMT- Aktivität bis 14,8 nmol/(ml ery*h) untersucht. Davon waren 51 Proben homozygot *Wild-type*, 25 Proben heterozygot *TPMT**1S und 2 Proben homozygot *TPMT**1S.

Das obere Quantil aus dem ersten Halbjahr 2008 umfasste 77 Proben mit einer TPMT-Aktivitätsspanne von 17,4- 34,1 nmol/(ml ery*h). Hier waren 54 Proben homozygot *Wild-type*, 18 Proben heterozygot *TPMT**1S und 5 Proben homozygot *TPMT**1S.

Für das zweite Halbjahr 2008 sehen die Ergebnisse ähnlich aus.

Von den 92 Proben mit einer Aktivität von bis zu 14.8 nmol/(ml ery*h) waren 63 Proben *Wild-type*, 25 Proben heterozygot *TPMT**1S und 4 Proben *TPMT**1S homozygot. 94 Proben aus dem oberen Quantil des zweiten Halbjahres 2008 hatten eine Aktivitätsspanne von 17 nmol/(ml ery*h) bis 28,6 nmol/(ml ery*h). Davon waren 61 *Wild-type*, 27 Proben heterozygot *TPMT**1S und 6 Proben homozygot *TPMT**1S.

Zusammenfassend waren von 170 Proben mit einer Aktivität bis max. 14,8 nmol/(ml ery*h) 114 Proben *Wild-type*, 50 Proben heterozygot *TPMT**1S und 6 Proben homozygot *TPMT**1S. Von 171 Proben mit einer Aktivität von 17 nmol/(ml ery*h) bis 34,1 nmol/(ml ery*h) waren 115 Proben *Wild-type*, 45 heterozygot *TPMT**1S und 11 homozygot *TPMT**1S. Zusammengefasst stellt sich die Situation in Tabelle 2 dar.

Die Genotypisierung auf die *1S-Mutation wurde mit den oben beschriebenen Gensonden nach der FRET- Methode durchgeführt.

TPMT 2008		1/1	1/*1S	*1S/*1S	Summe
	1.Hj Aktivität bis 14,8	51	25	2	78
	1.Hj Aktivität von 17,4- 34,1	54	18	5	77
	2. Hj Aktivität bis 14,8	63	25	4	92
	2.Hj Aktivität von 17- 28,6	61	27	6	94
	Summe	229	95	17	341
	Aktivität bis 14.8	114	50	6	170
	Aktivität über ~17	115	45	11	171
					p-Wert = 0.709

Tabelle 2: Ergebnis der Genotypisierung auf die *1S-Mutation

Anhand des errechneten p-Werts (Cochran-Armitage Trend Test) ist kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der *TPMT**1S-Mutation und einer erniedrigten oder erhöhten TPMT-Aktivität festzustellen. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass diese Mutation keinen Effekt auf das Spliceverhalten oder die Modifikation des TPMT-Enzyms hat.

4 Diskussion

Bei den Thiopurinen gibt es eine über Jahrzehnte gewachsene klinische Erfahrung in der Therapie von Leukämien und Immunsuppression. Bereits seit über 25 Jahren ist ein genetischer Polymorphismus des *TPMT*-Gens bekannt. Eine totale *TPMT*-Defizienz führt zu einer hohen Konzentration an aktiven Metaboliten unter Standardtherapie mit Thiopurinen. Die Thiopurin-S-Methyltransferase ist weiterhin Gegenstand intensiver Forschung, da eine *TPMT*-Defizienz bei der Gabe von Thiopurinen, wie zum Beispiel Imurek[®], zu erheblichen Komplikationen führen kann.

Zurzeit sind 26 Mutationen auf dem *TPMT*-Gen bekannt (Ujii et al. 2008; Kham et al. 2009). Die drei häufigsten Mutationen sind in Europa, wie schon beschrieben, die *3A-, *3C- und die *2-Mutation (Krynetski & Evans 2000; Schaeffeler et al. 2001 Lennard 2002; Evans 2004;).

Die weltweite Verteilung der häufigsten Mutationen ist allerdings heterogen und von Population zu Population unterschiedlich. Auf dem afrikanischen Kontinent ist die *TPMT*-*3C-Mutation die häufigste, während in Asien die *TPMT**3A und die *TPMT**3C (Japan) die Mutation ist, welche den größten Anteil der *TPMT*-Defizienzen verursacht. Auf dem nordamerikanischen-Kontinent ist das Migrationsverhalten der Populationen anhand der Mutationen im *TPMT*-Gen nachzuvollziehen. So finden sich in der amerikanisch-kaukasischen Bevölkerung die drei gleichen *TPMT*-Mutationen mit ähnlicher Häufigkeit wie in Europa wieder. Die *TPMT**3A-Mutation tritt mit einer Frequenz von 3,3%, die *TPMT**3C- und *TPMT**2-Mutationen jeweils mit 0,2% auf.

Dasselbe gilt für die afroamerikanische Bevölkerung. Dort ist die am meisten vorkommende Mutation die *TPMT**3C mit 2,4%. Weiter kommen auch hier die *TPMT**3A- mit 0,8% und die *TPMT**2-Mutation mit 0,4% vor, was sich durch die Mischung der einzelnen ethnischen Gruppen untereinander erklären lässt (McLeod & Siva 2002).

Als Hauptursache für eine verminderte *TPMT*-Aktivität und eine totale Defizienz können die 26 bekannten Mutationen auf dem *TPMT*-Gen angesehen werden; das zeigt die Arbeit von Garat et. al. 2008 (Abb.5 u.6).

Eine weitere indirekte Ursache für eine herabgesetzte *TPMT*-Aktivität könnte außerdem darin liegen, dass ein Polymorphismus im Gen der Methylentetrahydrofolatreduktase (*MTHFR*) existiert. Für die Methylierungsreaktion der *TPMT* dient S-Adenosylmethionin (*SAM*) als Methyl-Gruppen-Donator. Dabei reagiert *SAM* unter Abgabe der Methyl-Gruppe

zu Homocystein, welches durch 5-Methyltetrahydrofolsäure wieder zu SAM regeneriert werden kann. Die für diese Reaktion nötige 5-Methyltetrahydrofolsäure wird aus 5,10-Methyltetrahydrofolat durch die MTHFR gewonnen (Breen et al. 2005). Für die MTHFR sind zwei häufige Polymorphismen bekannt (Ogino & Wilson 2003). Ist die Aktivität der MTHFR herabgesetzt, so kann es dazu kommen, dass für die Methylierungsreaktion der TPMT nicht genug SAM zur Verfügung steht und dadurch die Aktivität der TPMT funktional reduziert ist (Zukic et al. 2010).

Als weitere Ursache könnte in der *TPMT* 3' nichtkodierenden Region ein Minisatellit gesehen werden (Alves et al. 2001; Shazia & Seshadri 2009).

Einige Untersuchungen zeigen, dass sich offensichtlich die Kopienzahl des VNTRs negativ auf die Transkriptionsrate auswirkt und damit negativ auf die TPMT-Aktivität (Zukic et al. 2010). Alves et al. konnten diesen Zusammenhang nicht nachweisen (Alves et al. 2001). Roberts et al. fanden hingegen einen Zusammenhang zwischen den VNTR und einer ultra hohen TPMT-Aktivität (Roberts et al. 2008). Alles in allem ist die Datenlage zu den VNTRs in der Promotorregion des *TPMT*-Gens ambivalent und bedarf noch weiterer Klärung. In dieser Arbeit wurde alleine davon ausgegangen, dass eine erniedrigte TPMT-Aktivität durch Polymorphismen im *TPMT*-Gen verursacht wird. In Anbetracht der Datenlage kann der Zusammenhang zwischen der Anzahl der VNTRs und der TPMT-Aktivität nicht ausgeschlossen werden und ist eine mögliche Erklärung für Proben mit einer ungeklärt niedrigen TPMT-Aktivität, bei denen durch das Gene-scanning keine Mutation im *TPMT*-Gen gefunden wurde.

4.1 Interpretation der Ergebnisse

4.1.1 Gene-scanning

Das Gene-scanning ist noch eine relativ neue Methode zur Mutationserkennung und entsprechend Gegenstand der Forschung. In dieser Arbeit wurde es auf dem Light Cycler LC 480[®] von Roche durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass diese ohne jedes post-PCR-Verfahren zur Mutationserkennung auskommt (Wittwer et al. 2003; Polakova et al. 2008).

Im Anschluss an die PCR erfolgt automatisch das HRM. Die über HRM ermittelten Schmelzkurven zeigen im Vergleich miteinander, ob eine Mutation vorliegt. Ergänzend ist

zu erwähnen, dass Mutationen ausschließlich innerhalb der Primer identifiziert werden können bzw. dass Primer als exogen eingebrachte Sequenzen nicht dem Scanning unterliegen. Speziell auf das *TPMT*-Gen bezogen, müssen die Primer Intron-Exon übergreifend oder intronisch sein, da ansonsten die Gefahr besteht, das *TPMT*-Pseudogen zu amplifizieren.

Des Weiteren ist beim Primer-Design darauf zu achten, dass es nur eine Schmelzdomäne innerhalb der Primer gibt (Krypuy et al. 2007). Dieser Umstand könnte ein möglicher Grund dafür sein, dass mit Hilfe des GC-Clamp-Primers keine Schmelzkurvenanalyse möglich war. Durch den GC-Clamp bekam das PCR-Produkt eine zweite Schmelzdomäne (Abb. 28, Abb. 29).

Beim HRM sind SNPs innerhalb der amplifizierten DNA an ihrem veränderten Schmelzverhalten im Vergleich zur *Wild-type*-DNA zu erkennen, was durch die Bildung von heteroduplexen-DNA-Strängen bedingt ist (Wittwer et al. 2003; Liew et al. 2004). Durch den SNP ist ein Heteroduplex in geringem Maße instabiler als homologe-Doppelstrang-DNA, wodurch beim HRM ein vorzeitiger Schmelzpunkt erzielt wird (Wittwer et al. 2003; Laurie et al. 2007).

Da diese Methode ausschließlich auf der Bildung von heteroduplexen-DNA-Strängen basiert, ist es nicht möglich homozygote Mutationen zu detektieren, wenn diese vorher nicht mit *Wild-type*-DNA zu einer heterozygoten-DNA gemischt und hybridisiert worden sind (Lyon & Wittwer 2009). Zudem kann mittels HRM keine Aussage darüber getroffen werden, um welche Form des SNP es sich handelt (Insertion, Deletion, etc.). Für die genaue Analyse der Mutation ist in jedem Fall eine Sequenzierung obligat.

Der gesamte Prozess findet in einem verschlossenen Gefäß statt. Ein Öffnen des Gefäßes zur PCR-Produktanalyse ist nicht nötig, wodurch die Gefahr der Verunreinigung (DNAsen, fremde DNA, etc.) stark reduziert wird (Reed & Wittwer 2004). Lediglich während des Pipettierens ist eine Kontamination des PCR-Ansatzes möglich. Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass eine Verunreinigung des Labors mit PCR-Produkten vermieden wird. Im Vergleich zu anderen Methoden zum Mutationsnachweis benötigt das Gene-scanning im Wesentlichen weniger Zeit. Zudem ist der technisch apparative Aufwand stark reduziert gegenüber Methoden wie z.B. TGGE (Tindall et al. 2009). Darüber hinaus besitzt der Light Cycler LC 480[®] die Möglichkeit, 96 oder 384 Proben zeitgleich zu analysieren, was ihn damit zu einer sehr effizienten Hochdurchsatz-Plattform macht.

Diese Aspekte machen das Gene-scanning zu einem sensitiven Screening-Verfahren zur Detektion von heterozygoten-Mutationen, allerdings mit wenig Spezifität hinsichtlich einer bestimmten Mutation.

Mit Hilfe des Gene-scanning wurde das gesamte *TPMT*-Gen auf neue Mutationen hin untersucht.

Die Ergebnisse belegen die Sensitivität der Methode, da in Exon 3 die *TPMT**18-Mutation und in Exon 6 die *TPMT**1S-Mutation erkannt wurde.

4.1.2 *TPMT**18-Mutation

Bei der *TPMT**18-Mutation handelt es sich um einen „single nucleotide polymorphism“ (SNP) an der Base C124G im Exon 3 des *TPMT*-Gens. Dieser SNP hat zur Folge, dass im *TPMT*-Enzym die 24. Aminosäure ausgetauscht wird; statt eines Glutamin wird ein Glutamat eingebaut (Ujii et al. 2008)

Ujii et al. konnten zeigen, dass die Enzymexpression nahezu unverändert ist und im Vergleich zum *Wild-type* 90% der *TPMT*-Konzentration im Zellplasma erreicht wird.

Allerdings ist durch den SNP die Funktion des Enzyms so stark eingeschränkt, dass die K_m und V_{max} nicht mehr messbar sind (Ujii et al. 2008). In der Abbildung 16 ist deutlich eine erniedrigte Schmelztemperatur der *18-Mutation zu sehen. Bestätigt wurde die *18-Mutation durch erneute Analyse im Light Cycler LC 480[®] und anschließendes Sequenzieren (siehe Abb.38.).

Die herabgesetzte Schmelztemperatur ist durch die oben beschriebene Heteroduplexe zu erklären; diese entstehen durch das rasche Abkühlen nach der PCR (Tindall et al. 2009).

Die DNA-Probe 72, bei der die *18-Mutation nachgewiesen wurde, hat eine gemessene *TPMT*-Aktivität von 10 nmol/(ml Ery*h), was sich nur dadurch erklären lässt, dass diese Probe heterozygot ist, und das *Wild-type*-Allel das defiziente Allel weitestgehend kompensiert.

4.1.3 *TPMT**1S-Mutation

Die *TPMT**1S-Mutation ist ein SNP im Exon 6, der zu einem Aminosäuren-Austausch an Position 474 von Threonin zu Cystein (Thr 474Cys) führt (Schaeffeler et al. 2001). Dieser Austausch hat keine Beeinträchtigung der Enzymaktivität zur Folge (Szumlanski et al. 1996; Okada et al. 2005;).

Durch das Gene-scanning auf dem Exon 6 sind diverse Schmelzkurven durch ein aberrantes Schmelzverhalten aufgefallen.

In Abbildung 21 und 22 ist eine deutliche Veränderung des Schmelzpunktes zu erkennen. Die Sequenzierung dieser Proben konnte für die veränderten Schmelzkurven jeweils eine *TPMT**1S-Mutation zeigen. Daraus ergab sich für 31 von 81 der analysierten DNAs *TPMT**1S positiv. Das sind 38%. In der Literatur wird die *TPMT**1S-Mutation mit einer Häufigkeit von 34% beschrieben (Schaeffeler et al. 2001). Diese scheinbare Häufung lässt die Vermutung zu, dass die *TPMT**1S-Mutation sich nicht direkt auf das Enzym auswirkt, eventuell jedoch die Expression des Enzyms verändert. Dieser Zusammenhang wurde bis dahin noch nicht untersucht. Zusammengefasst stellt sich die Situation in Tabelle 2 dar. Anhand des errechneten p-Werts (Cochran-Armitage Trend Test) ist kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der *TPMT**1S-Mutation und einer erniedrigten oder erhöhten TPMT-Aktivität festzustellen. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass diese Mutation keinen Effekt auf, dass Spliceverhalten, Expression oder die Modifikation des TPMT-Enzyms hat.

4.2 Therapeutisches Drug Monitoring

Die Untersuchungen zu dieser Arbeit haben abermals gezeigt, dass es eine große individuelle Thiopurinpharmakokinetik gibt, was die Therapie mit Thiopurinen bei einem nachlässigen Umgang mit diesen Medikamenten sehr gefährlich macht. Auf das Therapeutische Drug Monitoring sollte daher nicht verzichtet werden.

Die 6-TGN-Konzentration in Erythrozyten korreliert mit der 6-TGN- Inkorporation in die DNA von Leukozyten (Cuffari et al. 1996a). Deshalb wird die erythrozytäre 6-TGN-Konzentration als Messwert für das therapeutische Drug Monitoring genommen.

Verschiedene Gruppen fanden eine Assoziation zwischen der 6-TGN-Konzentration und

dem krankheitsfreien Überleben bei pädiatrischen Patienten mit ALL (Lennard et al. 1990; Lilleyman & Lennard 1994).

Die 6-TGN-Konzentrationen wurden nicht nur mit dem Therapieerfolg in Zusammenhang gebracht sondern auch mit unerwünschten hämatologischen Nebenwirkungen. Mehrere Gruppen konnten bei Patienten mit ALL oder nach Organtransplantation einen Zusammenhang zwischen der 6-TGN-Konzentration und dem Risiko einer Leukopenie beobachten (Schutz et al. 1996; Chrzanowska et al. 1999; Chrzanowska & Krzymanski 1999; Dervieux et al. 2001). Allerdings war das nicht immer der Fall, so z.B. bei Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen oder Glomerulonephritis (Cuffari et al. 1996a; Chrzanowska & Krzymanski 1999).

Andere Untersuchungen haben ergeben, dass möglicherweise auch die Bestimmung der MMP-Konzentration eine Rolle für die Optimierung der Therapie mit 6-Mercaptopurin und Azathioprin spielen kann. Es konnte bei Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen zwar kein Zusammenhang zwischen MMP-Konzentration und klinischem Erfolg der Therapie beobachtet werden, allerdings kam es in Einzelfällen zu Hepatotoxizität (Cuffari et al. 1996b; Dubinsky et al. 2000)

Aufgrund dieser Tatsachen sollte auf die Bestimmung der 6-TGN-Konzentration in Erythrozyten während der Therapie nicht verzichtet werden. Das therapeutische Drug Monitoring kann die Messung der allgemeinen Toxizitäts-Parameter nicht ersetzen, sondern liefert ergänzende Informationen, wie z. B. Patientencompliance. Es hilft einerseits, bei der Dosisanpassung durch die Messung der 6-TGN-Spiegel in Erythrozyten und andererseits kann es das Auftreten von Komplikationen wie Myelodepression frühzeitig verhindern (Seinen et al. 2010). Diese Vorgehensweise ermöglicht eine sichere, effektive und nebenwirkungsarme Therapie mit Thiopurinmedikamenten.

5 Ausblick

In dieser Arbeit wurde das Gene-scanning zur Suche nach einer neuen *TPMT*-Mutation eingesetzt. Die beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass viele Proben weiterhin eine ungeklärt niedrige *TPMT*-Aktivität aufweisen. Zielsetzung weiterer Untersuchung könnte es sein, den Zusammenhang zwischen der VNTR in der Promotorregion und einer veränderten *TPMT*-Aktivität zu klären. Es ist nicht ausgeschlossen, dass Mutationen in der VNTR-Region zur subtotalen Enzymdefizienz führen können. Das Wissen um so eine Mutation wäre wichtig bei Patienten, die in den letzten 3 Monaten Bluttransfusionen erhalten haben und denen durch Genotypisierung keine der drei häufigsten Mutationen nachgewiesen werden kann. In solch einem Fall hätte eine nachgewiesene Mutation in der VNTR-Region Konsequenzen auf die Azathioprintherapie.

Weitere Modifikationen könnten das Gene-scanning optimieren, um es als Methode zur Routinediagnostik einzusetzen. Dadurch wären evtl. andere Diagnostikverfahren durch diese schnelle Methode ablösbar.

6 Zusammenfassung

Seit über 40 Jahren sind die Thiopurine zur Behandlung von hämatologischen Neoplasien, Unterdrückung von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation, Autoimmunerkrankungen, wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, und Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis bewährte Medikamente. Das zurzeit in Europa am häufigsten eingesetzte Thiopurin ist das Azathioprin (Imurek®). Weitere Vertreter dieser Stoffgruppe sind das 6-Mercaptopurin und 6-Thioguanin. Bei der Verstoffwechslung dieser Medikamente ist die Thiopurin-S-Methyl-Transferase (*TPMT*) als ein wichtiges Enzym für Entgiftung entdeckt worden. Die physiologische Funktion dieses Enzyms ist bis heute ungeklärt. Eine totale Defizienz bleibt bis zur Gabe von Thiopurinen ohne Folgen.

Seit über 25 Jahren ist ein genetischer Polymorphismus der TPMT bekannt. Zurzeit sind 26 unterschiedliche Mutationen auf dem *TPMT*-Gen bekannt. Eine totale Defizienz führt zu einer hohen Konzentration an aktiven Metaboliten unter Standardtherapie mit Thiopurinen. Damit konnte die bei einigen Patienten aufgetretene Myelodepression erklärt werden. Seit der Entdeckung der Pharmakogenetik der Thiopurine wird eine TPMT-Aktivitätsmessung vor Beginn der Therapie angestrebt, um etwaige Komplikationen zu vermeiden. Die TPMT-Aktivität wird dabei in den Erythrozyten gemessen, weshalb bei Patienten, die in den letzten 2-3 Monaten eine Bluttransfusion erhalten haben, eine Genotypisierung die Methode der Wahl ist. Die Genotypisierung kann heute mittels HPLC- Assays oder PCR-Techniken durchgeführt werden. Allerdings besteht bei der Genotypisierung ein gewisses Restrisiko bezüglich der Prädiktion einer TPMT-Defizienz, da routinemäßig nur auf die drei häufigsten Mutationen (*TPMT**3A, *2, *3C) untersucht werden kann.

In dieser Arbeit wurden 346 Proben mittels PCR und der FRET-Methode genotypisiert. Alle Proben sind zuvor in der TPMT-Aktivitätsmessung durch eine niedrige TPMT-Aktivität aufgefallen. Diejenigen, denen in der Genotypisierung keine der drei häufigsten *TPMT*-Mutationen nachgewiesen werden konnten, wurden weiter mittels Gene-scanning untersucht. Das Gene-scanning ist eine Methode, bei der die einzelnen Exone mittels Primer amplifiziert werden. Dem Reaktionsansatz wird der Farbstoff *syto9* zugefügt, welcher an Doppelstrang-DNA bindet. Beim Schmelzen der DNA wird der Reaktionsansatz mit Licht der Wellenlänge 450nm angeregt. Syto9 absorbiert und emittiert daraus Licht der Wellenlänge 498nm, sofern der Farbstoff an die DNA gebunden ist. Für die Schmelzkurve wird die Fluoreszenz beim langsamen Erhitzen der DNA gegen die Temperatur aufgetragen. So kann durch die Analyse der Schmelzkurven eine Aussage über eine vorhandene Mutation im entsprechenden PCR-Produkt gemacht werden. Heterozygote Proben werden durch die Schmelzkurvenveränderung im Bezug zur normalen (im Allgemeinen der *Wild-type*) Schmelzkurve identifiziert. Die Amplifikation einer Mutation ergibt sowohl früh schmelzende heterozygote Produkte, als auch normal schmelzende homozygote-Produkte. Das Resultat ist eine Veränderung der Schmelzkurve. Die HRM Schmelzkurvenanalyse hat den Vorteil, dass keine weiteren post-PCR -Verfahren zur Mutationserkennung nötig sind. Dadurch bekommt man die Ergebnisse schnell und kosteneffektiv. Im Gene-scanning wurde im Exon 3 bei einer Probe eine aberrante Schmelzkurve gefunden. Durch anschließendes Sequenzieren konnte die *TPMT**18-Mutation nachgewiesen werden.

In Exon 6 sind 31 Proben durch eine aberrante Schmelzkurve aufgefallen. Die Sequenzierung zeigte eine *TPMT*1S*-Mutation. Die Häufigkeit lag in unserem Kollektiv mit 38% über der beschriebenen Häufigkeit von 34% bei Patienten mit normaler *TPMT*-Aktivität.

Daraufhin wurden 342 Proben, jeweils oberes (mittlere *TPMT*-Aktivität: 12,13 nmol/(ml ery*h)) und unteres (mittlere *TPMT*-Aktivität: 19,9 nmol/(ml ery*h)) Drittel, aus dem Jahr 2008, hinsichtlich der *TPMT*1S*-Mutation genotypisiert, um evtl. einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten oder erniedrigten *TPMT*-Aktivität und der *TPMT*1S*-Mutation festzustellen. Das Ergebnis zeigte keinen Zusammenhang zwischen der *TPMT*1S*-Mutation und einer erhöhten oder herabgesetzten *TPMT*-Aktivität.

Am ehesten ist eine herabgesetzte *TPMT*-Aktivität ohne nachweisbare Mutation im Gen durch eine Veränderung der VNTR in der Promotorregion des *TPMT*-Gens zu erklären. Allerdings besteht hier noch Aufklärungsbedarf.

Aufgrund der individuellen Thiopurinpharmakokinetik sollte auf die Bestimmung der 6-Thioguaninnukleotid-Konzentration in Erythrozyten während der Therapie nicht verzichtet werden. Das therapeutische Drug Monitoring kann die Messung der allgemeinen Toxizitäts-Parameter nicht ersetzen. Es liefert ergänzende Informationen, wie z. B. zur Patientencompliance, und macht die Therapie mit Thioguaninen effektiv und sicherer.

7 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Ethnische Varianten des TPMT-Gens; *: errechnet; mut: mutiert; wt: Wild-type (nach McLeod & Siva 2002)</i>	10
<i>Tabelle 2: Ergebnis der Genotypisierung auf die *1S-Mutation</i>	54

8 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Struktur des TPMT-Gens; Die römischen Zahlen nummerieren die Exone, Nur farblich ausgefüllte Exone kodieren für das Enzym (Ensemble Genome Browser 2008)</i>	8
<i>Abbildung 2: Verteilung der 26 bekannten Mutationen auf dem TPMT-Gen</i>	9
<i>Abbildung 3: Verteilung der 3 häufigsten TPMT-Allele weltweit (nach McLeod & Siva 2002)</i>	10
<i>Abbildung 4: TPMT-Aktivität in Erythrozyten von 298 randomisiert ausgesuchten kaukasischen Patienten; RBC: Erythrozyten (Weinshilboum 2001 S.602)</i>	11
<i>Abbildung 5: Enzymexpression in Zellkulturen mit Mutationen im Vergleich zum TPMT-Wild-type; ND: not detectable (Ujii et al. 2008 S.890)</i>	13
<i>Abbildung 6: kinetische Darstellung der 6 Thioguanin-S-methylierung von rekombinanten TPMT-Mutationen, exponiert in Zellkulturen.</i>	13
<i>Abbildung 7: Strukturformel von Azathioprin</i>	14
<i>Abbildung 8: Strukturformel von 6-Mercaptopurin</i>	14
<i>Abbildung 9: Biochemischer Reaktionsweg der 6-TGN -Synthese aus Azathioprin (Derijks et al. 2006 S. 718). Abkürzungen im Text</i>	15
<i>Abbildung 10: Schmelzkurve einer Genotypisierung (aud der Abteilung Klinische Chemie der Uni. Göttingen 2010)</i>	18
<i>Abbildung 11: Thermobock des Light Cycler LC 480[®] (Roche)</i>	19
<i>Abbildung 12 :Schematische Darstellung der Detektionseinheit des LC480 (Roche)</i>	20
<i>Abbildung 13: Light Cycler LC 480[®] -Schmelzkurve</i>	21
<i>Abbildung 14: Schmelzkurve Exon 2.1: schwarz: normale unauffällige Schmelzkurve; rot und blau: Fehl-Cluster</i>	43
<i>Abbildung 15: Schmelzkurve Exon 2.2: schwarz: normale unauffällige Schmelzkurve; rot und blau: Fehl-Cluster</i>	43
<i>Abbildung 16: Schmelzkurve Exon 3.1: schwarz: normale Schmelzkurve; rot: Versager; blau: Fehl-Cluster</i>	44
<i>Abbildung 17: Schmelzkurve Exon 3.2: grün: *18-Mutation; rot: Fehl-Cluster; blau: Versager</i>	44
<i>Abbildung 18: Sequenzanalyse der DNA 72 im Exon 3.2</i>	44
<i>Abbildung 19: Schmelzkurve Exon 4.1: schwarz: normale Schmelzkurve; rot: *2-Mutation; blau: Versager</i>	45
<i>Abbildung 20: Schmelzkurve Exon 4.1: schwarz: normale Schmelzkurve</i>	45
<i>Abbildung 21: Schmelzkurve Exon 5.1: schwarz: normale Schmelzkurve; rot, blau, grün, gelb: Versager</i>	46
<i>Abbildung 22: Schmelzkurve Exon 5.2: schwarz: normale Schmelzkurve; rot, blau: Fehl-Cluster</i>	46
<i>Abbildung 23: Schmelzkurve Exon 6: schwarz: normale Schmelzkurve; rot, blau: *1S- Mutation</i>	46
<i>Abbildung 24: Schmelzkurve Exon 6: schwarz: normale Schmelzkurve; rot: *1S; blau, grün: Versager</i>	47
<i>Abbildung 25: Schmelzkurve Exon 7.1: schwarz: normale Schmelzkurve; grün, blau, rot: Versager</i>	47
<i>Abbildung 26: Schmelzkurve Exon 7.2: schwarz: normale Schmelzkurve; grün, blau: Fehl-Cluster</i>	47
<i>Abbildung 27: Schmelzkurve Exon 8: schwarz: normale Schmelzkurve; blau: fehl Fehl-Cluster; rot: Auffällige Schmelzkurve</i>	48
<i>Abbildung 29: Schmelzkurve des gesamten Exon 9 mit cg-Clamp</i>	48
<i>Abbildung 30: Sequenzanalyse der DNA 311 im Exon 3.1</i>	49
<i>Abbildung 31: Sequenzanalyse der DNA 338 im Exon 3.1</i>	49

<i>Abbildung 32: Sequenzanalyse der DNA 389 im Exon 3.1</i>	49
<i>Abbildung 33: Sequenzanalyse der DNA 415 im Exon 5.1</i>	50
<i>Abbildung 34: Sequenzanalyse der DNA 155 im Exon 8</i>	50
<i>Abbildung 35: Sequenzanalyse der DNA V19 im Exon 8</i>	50
<i>Abbildung 36: Sequenzanalyse der DNA 155 im Exon 9.1</i>	50
<i>Abbildung 37: Monoklonale-Sequenzanalyse der DNA V19 Exon 8</i>	51
<i>Abbildung 38: Monoklonale-Sequenzanalyse der DNA 72 im Exon 3.2</i>	51
<i>Abbildung 39: Sequenzanalyse DNA188 Exon 6</i>	52
<i>Abbildung 40: Sequenzanalyse DNA V 19 Exon 6</i>	52

9 Literaturverzeichnis

- Alves S, Amorim A, Ferreira F, Prata MJ (2001): Influence of the variable number of tandem repeats located in the promoter region of the thiopurine methyltransferase gene on enzymatic activity. *Clin.Pharmacol.Ther.* 70, 165-174
- Ameyaw M M, Collie-Duguid E S, Powrie, R H, Ofori-Adjei D, McLeod HL (1999): Thiopurine methyltransferase alleles in British and Ghanaian populations. *Hum.Mol.Genet.* 8, 367-370
- Breen DP, Marinaki AM, Arenas M, Hayes PC (2005): Pharmacogenetic association with adverse drug reactions to azathioprine immunosuppressive therapy following liver transplantation. *Liver Transpl.* 11, 826-833
- Chrzanowska M, Krzymanski M (1999): Determination of 6-thioguanine and 6-methylmercaptopurine metabolites in renal transplantation recipients and patients with glomerulonephritis treated with azathioprine. *Ther.Drug Monit.* 21, 231-237
- Chrzanowska M, Kolecki P, Duczmal-Cichocka B, and Fiet J (1999): 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.* 8, 329-334
- Collie-Duguid ES, Pritchard SC, Powrie RH, Sludden J, Collier DA, Li T, McLeod HL (1999): The frequency and distribution of thiopurine methyltransferase alleles in Caucasian and Asian populations. *Pharmacogenetics* 9, 37-42
- Cuffari C, Seidman EG, Latour S, Theoret Y (1996a): Quantitation of 6-thioguanine in peripheral blood leukocyte DNA in Crohn's disease patients on maintenance 6-mercaptopurine therapy. *Can.J.Physiol Pharmacol.* 74, 580-585
- Cuffari C, Theoret Y, Latour S, Seidman G (1996b): 6-Mercaptopurine metabolism in Crohn's disease: correlation with efficacy and toxicity. *Gut* 39, 401-406

- Derijks LJ, Gilissen LP, Hooymans PM, Hommes DW (2006): Review article: thiopurines in inflammatory bowel disease. *Aliment.Pharmacol.Ther.* 24, 715-729
- Dervieux T, Medard Y, Verpillat P, Guigonis V, Duval M, Lescoeur B, Suci S, Vilmer E, Jacqz-Aigrain E (2001): Possible implication of thiopurine S-methyltransferase in occurrence of infectious episodes during maintenance therapy for childhood lymphoblastic leukemia with mercaptopurine. *Leukemia* 15, 1706-1712
- Dubinsky MC, Lamothe S, Yang HY, Targan SR, Sinnott D, Theoret Y, Seidman EG (2000): Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 118, 705-713
- Egan LJ, Derijks LJ, Hommes DW (2006): Pharmacogenomics in inflammatory bowel disease. *Clin.Gastroenterol.Hepatol.* 4, 21-28
- Elion GB (1989): Nobel Lecture. The purine path to chemotherapy. *Biosci.Rep.* 9, 509-529
- Escousse A, Rifle G, Sgro C, Mousson C, Zanetta G, Chevet D (1995): Azathioprine toxicity, 6-mercaptopurine accumulation and the "poor" 6-thiopurine methylator phenotype. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* 48, 309-310
- Evans WE (2004): Pharmacogenetics of thiopurine S-methyltransferase and thiopurine therapy. *Ther Drug Monit.* 26, 186-191
- Garat A, Cauffiez C, Renault N, Lo-Guidice JM, Allorge D, Chevalier D, Houdret N, Chavatte P, Lorient MA, Gala JL (2008): Characterisation of novel defective thiopurine S-methyltransferase allelic variants. *Biochem.Pharmacol.* 76, 404-415
- Hon YY, Fessing MY, Pui CH, Relling MV, Krynetski EY, Evans WE (1999): Polymorphism of the thiopurine S-methyltransferase gene in African-Americans. *Hum.Mol.Genet.* 8, 371-376
- Honchel R, Aksoy IA, Szumlanski C, Wood TC, Otterness DM, Wieben ED, Weinshilboum RM (1993): Human thiopurine methyltransferase: molecular cloning and expression of T84 colon carcinoma cell cDNA. *Mol.Pharmacol.* 43, 878-887

<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>

<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?org=Human&db=hg19&hgsid=203381157>

<http://howdy.jst.go.jp/HOWDYCL/HOWDY.pl?Cls=Gene&Key=UKEY&Val=7172>

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000137364;r=6:18128542-18155305;t=ENST00000309983

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/Compara_Alignments?g=ENSG00000137364;r=6:18128542-18155305;t=ENST00000309983

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?g=ENSG00000137364;r=6:18128542-18155305;t=ENST00000309983

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000137364;r=6:17641924-18641923;t=ENST00000309983

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000137364;r=6:17641924-18641923;t=ENST00000309983

<http://www.ensembl.org/index.html>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=azathioprin>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=tpmt>

<https://www.rocheappliedscience.com/servlet/RCProductDisplay?storeId=10201&catalogId=10201&langId=-3&countryId=de&forCountryId=de&productId=3.8.1.4.2.4>

https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/htc/htc_docs/LC480_0608_LR_final.pdf

<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/htc/index.jsp>

https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/htc/index.jsp?&id=htc_010000

https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/htc/index.jsp?&id=htc_010300

https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/htc/index.jsp?&id=htc_010500

https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/htc/index.jsp?&id=htc_010700

https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/htc/index.jsp?id=htc_070400

Invitrogen: Syto Green- Fluorescent Nucleic Acid Stains. Invitrogen European Headquarters, Invitrogen, Ltd. 3 Fountain Drive Inchinnan Business Park Paisley PA4 9RF UK 2008

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

Krynetski EY, Evans WE (2000): Genetic polymorphism of thiopurine S-methyltransferase: molecular mechanisms and clinical importance. *Pharmacology* 61, 136-146

Krynetski EY, Evans WE (2003): Drug methylation in cancer therapy: lessons from the TPMT polymorphism. *Oncogene* 22, 7403-7413

Krynetski EY, Schuetz JD, Galpin AJ, Pui CH, Relling MV, Evans WE (1995): 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

Krynetski EY, Fessing MY, Yates CR, Sun D, Schuetz JD, Evans WE (1997): Promoter and intronic sequences of the human thiopurine S-methyltransferase (TPMT) gene isolated from a human PAC1 genomic library. *Pharm.Res.* 14, 1672-1678

- Krypuy M, Ahmed AA, Etemadmoghadam D, Hyland SJ, DeFazio A, Fox SB, Brenton JD, Bowtell DD, Dobrovic A (2007): High resolution melting for mutation scanning of TP53 exons 5-8. *BMC Cancer* 7, 168-175
- Laurie AD, Smith MP, George PM (2007): Detection of factor VIII gene mutations by high-resolution melting analysis. *Clin.Chem.* 53, 2211-2214
- Lee D, Szumlanski C, Houtman J, Honchel R, Rojas K, Overhauser J, Wieben ED, Weinshilboum RM (1995): Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics. Cloning of human liver cDNA and a processed pseudogene on human chromosome 18q21. *Drug Metab Dispos.* 23, 398-405
- Lennard L (1992): The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* 43, 329-339
- Lennard L (1999): Therapeutic drug monitoring of antimetabolic cytotoxic drugs. *Br.J.Clin.Pharmacol.* 47, 131-143
- Lennard L (2002): TPMT in the treatment of Crohn's disease with azathioprine. *Gut* 51, 143-146
- Lennard L, Lilleyman JS (1996): Individualizing therapy with 6-mercaptopurine and 6-thioguanine related to the thiopurine methyltransferase genetic polymorphism. *Ther.Drug Monit.* 18, 328-334
- Lennard L, Lilleyman JS, Van Loon J, Weinshilboum RM (1990): Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 336, 225-229
- Liew M, Pryor R, Palais R, Meadows C, Erali M, Lyon E, Wittwer C (2004): Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clin.Chem.* 50, 1156-1164
- Lilleyman JS, Lennard L (1994): Mercaptopurine metabolism and risk of relapse in childhood lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 343, 1188-1190
- Löffler G, Petrides PE, Montenarh M: Replikation und Gentechnik; in: *Biochemie und Pathobiochemie*; Springer-Verlag Heidelberg 2007, 219- 254

- Lyon E, Wittwer CT (2009): Light Cycler technology in molecular diagnostics. *J.Mol.Diagn.* 11, 93-101
- McLeod HL, Siva C (2002): The thiopurine S-methyltransferase gene locus -- implications for clinical pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* 3, 89-98
- Montgomery J, Wittwer CT, Kent JO, Zhou L (2007a): Scanning the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene using high-resolution DNA melting analysis. *Clin.Chem.* 53, 1891-1898
- Montgomery J, Wittwer CT, Palais R, Zhou L (2007b): Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis. *Nat.Protoc.* 2, 59-66
- Ogino S, Wilson RB (2003): Genotype and haplotype distributions of MTHFR677C>T and 1298A>C single nucleotide polymorphisms: a meta-analysis. *J.Hum.Genet.* 48, 1-7
- Okada Y, Nakamura K, Wada M, Nakamura T, Tsukamoto N, Nojima Y, Horiuchi R, Yamamoto K (2005): Genotyping of thiopurine methyltransferase using pyrosequencing. *Biol.Pharm.Bull.* 28, 677-681
- Polakova KM, Lopotova T, Klamova H, Moravcova J (2008): High-resolution melt curve analysis: initial screening for mutations in BCR-ABL kinase domain. *Leuk.Res.* 32, 1236-1243
- Reed GH, Wittwer CT (2004): Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. *Clin.Chem.* 50, 1748-1754
- Reinshagen M, Schutz, E, Armstrong VW, Behrens C, von Tirpitz C, Stallmach A, Herfarth H, Stein J, Bias P, Adler G, Shipkova M, Kruis W, Oellerich M, von Ahsen N (2007): 6-thioguanine nucleotide-adapted azathioprine therapy does not lead to higher remission rates than standard therapy in chronic active crohn disease: results from a randomized, controlled, open trial. *Clin.Chem.* 53, 1306-1314
- Roberts RL, Gearry RB, Bland MV, Sies CW, George PM, Burt M, Marinaki AM, Arenas M, Barclay ML, Kennedy MA (2008): Trinucleotide repeat variants in the promoter of the thiopurine S-methyltransferase gene of patients exhibiting ultra-high enzyme activity. *Pharmacogenet. Genomics* 18, 434-438

- Schaeffeler E, Lang T, Zanger UM, Eichelbaum M, Schwab M (2001): High-throughput genotyping of thiopurine S-methyltransferase by denaturing HPLC. *Clin.Chem.* 47, 548-555
- Schutz E, Gummert J, Mohr FW, Armstrong VW, Oellerich M (1996): Should 6-thioguanine nucleotides be monitored in heart transplant recipients given azathioprine? *Ther.Drug Monit.* 18, 228-233
- Schutz E, von Ahsen N, Oellerich M (2000): 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
- Schwab M, Klotz U (2001): Pharmacokinetic considerations in the treatment of inflammatory bowel disease. *Clin.Pharmacokinet.* 40, 723-751
- Seinen ML, van Asseldonk DP, Mulder CJ, de Boer NK (2010): Dosing 6-thioguanine in inflammatory bowel disease: expert-based guidelines for daily practice. *J.Gastrointestin.Liver Dis.* 19, 291-294
- Seki T, Tanaka T, Nakamura Y (2000): Genomic structure and multiple single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of the thiopurine S-methyltransferase (TPMT) gene. *Am.J.Hum.Genet.* 45, 299-302
- Shazia A, Seshadri M (2009): Characterization of TPMT minisatellite locus in five ethnic groups of India. *Genetika* 45, 137-141
- Spire-Vayron de la Moureyre, Debuysere H, Fazio F, Sergent E, Bernard C, Sabbagh N, Marez D, Lo Guidice JM, D'halluin JC, Broly F (1999): Characterization of a variable number tandem repeat region in the thiopurine S-methyltransferase gene promoter. *Pharmacogenetics* 9, 189-198
- Szumilanski C, Otterness D, Her C, Lee D, Brandriff B, Kellsell D, Spurr N, Lennard L, Wieben E, Weinshilboum R (1996): Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: Human gene cloning and characterization of a common polymorphism. *DNA Cell Biol.* 15, 17-30

- Tai HL, Fessing MY, Bonten EJ, Yanishevsky Y, d'Azzo A, Krynetski EY, Evans WE (1999): Enhanced proteasomal degradation of mutant human thiopurine S-methyltransferase (TPMT) in mammalian cells: mechanism for TPMT protein deficiency inherited by TPMT*2, TPMT*3A, TPMT*3B or TPMT*3C. *Pharmacogenetics* 9, 641-650
- Tindall EA, Petersen DC, Woodbridge P, Schipany K, Hayes VM (2009): Assessing high-resolution melt curve analysis for accurate detection of gene variants in complex DNA fragments. *Hum.Mutat.* 30, 876-883
- Ujii S, Sasaki T, Mizugaki M, Ishikawa M, Hiratsuka M (2008): Functional characterization of 23 allelic variants of thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT*2 - *24). *Pharmacogenet. Genomics* 18, 887-893
- Weinshilboum R (2001): Thiopurine pharmacogenetics: clinical and molecular studies of thiopurine methyltransferase. *Drug Metab. Dispos.* 29, 601-605
- Weinshilboum RM, Sladek SL (1980): Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am.J.Hum.Genet.* 32, 651-662
- Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ (2003): High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin.Chem.* 49, 853-860
- Wu H, Horton JR, Battaile K, Allali-Hassani A, Martin F, Zeng H, Loppnau P, Vedadi M, Bochkarev A, Plotnikov AN, Cheng X (2007): Structural basis of allele variation of human thiopurine-S-methyltransferase. *Proteins* 67, 198-208
- Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T, Fessin, MY, Tai HL, Pui CH, Relling MV, Evans WE (1997): Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Ann.Intern.Med.* 126, 608-614
- Zukic B, Radmilovic M, Stojiljkovic M, Tosic N, Pourfarzad F, Dokmanovic L, Janic D, Colovic N, Philipsen, S Patrinos GP, Pavlovic S (2010): Functional analysis of the role of the TPMT gene promoter VNTR polymorphism in TPMT gene transcription. *Pharmacogenomics* 11, 547-557