

Aus dem Institut für experimentelle und klinische  
Pharmakologie und Toxikologie  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. P. Dominiak

---

**Neue HPLC-Methode zur parallelen Bestimmung und  
Quantifizierung der Nukleotide von 6-Thioguanin,  
6-Mercaptopurin und ihrer Metabolite.  
Evaluation der Methode durch Untersuchung der Metabolite  
und Stoffwechselwege in vitro und bei Patienten.**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

**- Aus der Medizinischen Fakultät -**

vorgelegt von

**Adam Kotalczyk-Zepke**

aus Deutsch Piekar (Polen)

Lübeck 2006

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Heiko Iven
2. Berichterstatter: Priv. -Doz. Dr. rer. nat. Christian Ludwig Schmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 16.08.2006

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 16.08.2006

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Meinen Eltern,  
meiner Frau Cornelia und  
meiner Tochter Louisa

# Inhaltsverzeichnis

	<b>Seite</b>
<b>1. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	1
<b>2. Einleitung</b> .....	4
<b>2.1. Thiopurine</b> .....	4
<b>2.2. Pharmakokinetik und Metabolismus der Thiopurine</b> .....	5
<b>2.3. Genetischer Polymorphismus der Thiopurin-S-Methyltransferase</b> .....	8
<b>2.4. Klinische Bedeutung der Thiopurin-S-Methylierung</b> .....	10
<b>2.5. Wirkungsmechanismen</b> .....	11
2.5.1. Zytotoxizität durch Einbau in die DNS.....	11
2.5.2. Hemmung der Purin-de-novo-Synthese (PDNS).....	11
2.5.3. Weitere Mechanismen der immunsuppressiven Wirkung.....	12
<b>2.6. Thiopurine und Leukämie</b> .....	13
<b>2.7. Bestimmung von Thiopurinen zur Therapieüberwachung</b> .....	14
2.7.1. Bestimmung der Gesamtthiopurine.....	15
2.7.2. Bestimmung als Nukleotide.....	16
2.7.2.1. Ionenaustauschchromatographie.....	17
2.7.2.2. Ionenpaarchromatographie.....	17
<b>2.8. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit</b> .....	18
<b>3. Material und Methoden</b> .....	19
<b>3.1. Materialien</b> .....	19
3.1.1. Thiopurin-Stammlösungen.....	19
<b>3.2. Aufarbeitung der Proben</b> .....	19
3.2.1. Gewinnung von gepackten Erythrozyten.....	19
3.2.2. Erythrozytenhämolysat .....	20
3.2.3. Proteinfällung .....	20
<b>3.3. In vitro Inkubationen</b> .....	21
3.3.1. Inkubationen von frischen Erythrozyten mit Thiopurinen.....	21
3.3.2. Inkubationen von Zelllinien mit Thiopurinen.....	21
<b>3.4. HPLC-Analytik</b> .....	22

	<b>Seite</b>
3.4.1. Nachsäulenderivatisierung der freien Thiole durch photochemische Reaktion.....	22
3.4.2. Isokratische HPLC.....	24
3.4.3. Gradienten-HPLC.....	25
3.4.4. Bestimmung der UV-Maxima und des molaren Absorptionskoeffizienten.....	29
3.4.5. Statistik.....	29
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>30</b>
<b>4.1. Methodenoptimierung.....</b>	<b>30</b>
4.1.1. Retentionszeiten und Fluoreszenzcharakteristika der Purin-Derivate...	30
4.1.2. Identifizierung und Standardisierung der Thiopurin-Nukleotide.....	32
4.1.3. Bestimmung von 6-Thioguanosin-Nukleotiden durch Gradienten-HPLC.....	34
4.1.4. Linearität und Nachweisgrenze.....	35
4.1.5. Präzision der Methode.....	37
4.1.6. Selektivität.....	39
4.1.7. Stabilität.....	41
4.1.7.1. Stabilität der 6-Thioguanosin-Nukleotide im Überstand.....	41
4.1.7.2. Stabilität der Thiopurine im Überstand nach Proteinfällung von Patientenproben.....	43
4.1.7.3. Stabilität der Nukleotide im Vollblut von behandelten Patienten..	44
4.1.7.4. Zeitlicher Abbau der Adenosinphosphate.....	46
4.1.7.5. Einfluss der Transportzeit der Blutproben auf die Konzentration der Thiopurin-Nukleotide im Vergleich zur Routinemethode (nach Erdmann).....	49
<b>4.2. Inkubation von Erythrozyten mit Thiopurinen.....</b>	<b>51</b>
4.2.1. Metabolismus von Thiopurinen in Erythrozyten.....	51
<b>4.3. Inkubation von Zelllinien mit 6-MP und 6-TG.....</b>	<b>69</b>
4.3.1. Eingesetzte Zelllinien.....	69
4.3.2. Humane Intestinalzellen (I-407).....	70
4.3.3. Humane Hepatomazellen (Hep G2).....	73
4.3.4. Nierenepithelzellen (LLC-MK2).....	75

	<b>Seite</b>
4.3.5. Humane Ovarialkarzinomzellen (Ovcar-3).....	77
4.3.6. Prostatakarzinomzellen (PC-3).....	79
4.3.7. Humane Colonkarzinomzellen (CaCo-2).....	81
4.3.8. Humane Nebennierenrindenzellen (NCI H 295).....	83
4.3.9. Humane Corneaepithelzellen (HCE).....	85
4.3.10. Herzmyoblasten (H9C2).....	87
4.3.11. Metabolisierungswege von 6-TG und 6-MP durch verschiedene Zelllinien.....	89
<b>4.4. Vergleich der Ergebnisse gewonnen mit der „Nukleotid“-Methode und der „Erdmann“-Methode aus Blutproben von ALL-Patienten unter Therapie.....</b>	<b>92</b>
4.4.1. 6-Thioguanin.....	92
4.4.2. 6-Methylmercaptapurin.....	95
4.4.3. 6-Methylthioguanin.....	97
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>99</b>
<b>5.1. Optimierung der „Nukleotid“-Methode.....</b>	<b>99</b>
5.1.1. Bisherige Methoden zur Quantifizierung der Thiopurin-Nukleotide.....	100
5.1.2. Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzspektroskopie.....	102
5.1.3. Nachweisgrenze bei fluorometrischer Detektion.....	103
5.1.4. Nachweisgrenze der UV-spektrometrischen Detektion.....	104
<b>5.2. Stoffwechsel von Thiopurinen in Erythrozyten.....</b>	<b>106</b>
<b>5.3. Inkubation von Zelllinien mit 6-MP und 6-TG.....</b>	<b>110</b>
<b>5.4. Versuche zur Identifizierung der unbekannt Substanzen.....</b>	<b>113</b>
<b>5.5. Vergleich der Methoden.....</b>	<b>115</b>
<b>5.6. Schlussfolgerung.....</b>	<b>116</b>
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>118</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>120</b>
<b>8. Anhang.....</b>	<b>140</b>
<b>9. Veröffentlichungen.....</b>	<b>147</b>
<b>10. Danksagung.....</b>	<b>150</b>
<b>11. Curriculum vitae.....</b>	<b>151</b>

## 1. Abkürzungsverzeichnis

<b>Thiopurine</b>	
AZA	Azathioprin
6-MP	6-Mercaptopurin
6-MP-R	6-Mercaptopurinribosid (6-Thioinosin)
6-MMP	6-Methylmercaptopurin
6-MMP-R	6-Methylmercaptopurinribosid (6-Methylthioinosin)
6-MMP-MP	6-Methylthioinosin-5'-Monophosphat
6-MMP-DP	6-Methylthioinosin-5'-Diphosphat
6-MMP-TR	6-Methylthioinosin-5'-Triphosphat
6-MTG	6-Methylthioguanin
6-MTG-R	6-Methylthioguanosin
6-MTG-MP	6-Methylthioguanosin-5'-Monophosphat
6-MTG-DP	6-Methylthioguanosin-5'-Diphosphat
6-MTG-TP	6-Methylthioguanosin-5'-Triphosphat
8-OH-6-MP	8-Hydroxy-6-Mercaptopurin
6-TG	6-Thioguanin
6-TG-R	6-Thioguanosin
6-TG-MP	6-Thioguanosin-5'-Monophosphat
6-TG-DP	6-Thioguanosin-5'-Diphosphat
6-TG-TP	6-Thioguanosin-5'-Triphosphat
6-TI-MP	6-Thioinosin-5'-Monophosphat
6-TGN	6-Thioguanin-Nukleotide
6-THS	6-Thioharnsäure
6-TX	6-Thioxanthin
6-TX-MP	6-Thioxanthin-5'-Monophosphat

<b>Purine</b>	
AMP	Adenosin-5'-Monophosphat
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
GMP	Guanosin-5'-Monophosphat
GDP	Guanosin-5'-Diphosphat
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat

<b>Enzyme</b>	
AO	Aldehydoxidase
AP	Alkalische Phosphatase
GDA	Guanindesaminase
GMPS	Guanosin-Monophosphat-Synthase
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
IMPDH	Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase
NUK	Nukleotidase
TPMT	Thiopurin-S-Methyltransferase
XO	Xanthinoxidase

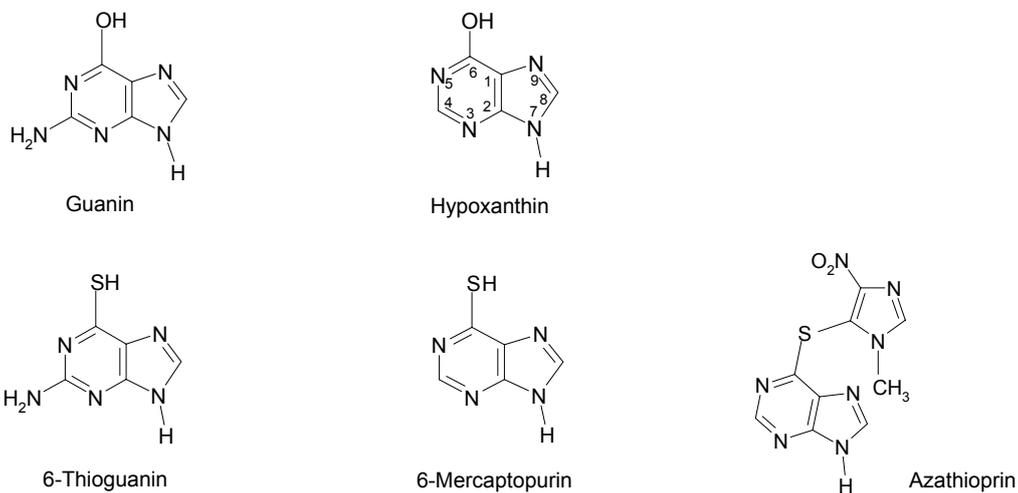
<b>Erkrankungen</b>	
ALL	Akute Lymphoblastische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
CML	Chronische Myeloische Leukämie
LNS	Lesch Nyhan Syndrom

<b>Sonstige</b>	
DTT	Dithiothreitol
FM	Fließmittel
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
HPLC	High performance liquid chromatography
N	Normalität
min	Minute
RBC	red blood cells
Rt	Retentionszeit
sec	Sekunde
UV	Ultraviolett-

## 2. Einleitung

### 2.1. Thiopurine

6-Mercaptopurin (6-MP, Puri-Nethol<sup>®</sup>), 6-Thioguanin (6-TG, Thioguanin-Wellcome<sup>®</sup>) und Azathioprin (AZA, Imurek<sup>®</sup>) sind Purinanaloga. Sie werden entsprechend ihrer chemischen Struktur auch als Thiopurine bezeichnet, da die 6-Hydroxy-Gruppe der physiologisch vorkommenden Purinbasen Hypoxanthin und Guanin durch eine Sulfhydryl-Gruppe ersetzt ist (Abb. 1; Nummerierung der Ringatome siehe Hypoxanthin).



**Abb. 1:** Physiologische Purinbasen (Guanin und Hypoxanthin) und die analogen Thiopurine. Aus AZA entsteht *in vivo* nichtenzymatisch 6-MP.

6-MP wurde von Elion und Hitchings synthetisiert und 1951 erstmalig als „potential antitumor agent“ an Tieren getestet (nach Van Scoik et al., 1985). 6-MP war das erste Thiopurin, welches bei der Behandlung der Akuten Lymphoblastischen Leukämie (ALL), der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) und der Chronischen Myeloischen Leukämie (CML) wirksam war (Burchenal et al., 1953; Adamson et al., 1994). 6-MP und auch das erst später eingesetzte 6-TG sind heute feste Bestandteile in den Therapieprotokollen zur Behandlung der Leukämien.

Daneben haben Thiopurine ein breites Anwendungsspektrum bei anderen neoplastischen Erkrankungen (z. B. Lymphomen), Behandlung von Autoimmunkrank-

heiten sowie zur Immunsuppression nach Organtransplantationen gefunden (Chocair et al., 1992; Chrzanowska und Krzymanski, 1999; Herfindal et al., 2000). 1961 wurde AZA (Abb. 1) synthetisiert und seine ausgeprägte immunsuppressive Wirkung erkannt (Murray et al., 1963). Wegen seiner geringeren Knochenmarktoxizität war die klinische Effektivität derjenigen des 6-MP überlegen (Calne, 1961; Calne et al., 1962). AZA, ein S-Nitro-Imidazol-Derivat und Prodrug von 6-MP, wird heute außer bei der Nieren-, Herz-, Leber- und Knochenmarktransplantation vor allem bei immunologisch vermittelten Krankheiten angewendet, wie z. B. bei rheumatoider Arthritis (Gaffney und Scott, 1998; Clunie und Lennard, 2004), Lupus erythrematodes disseminatus (Mosca et al., 2001), Multipler Sklerose (Totaro et al., 2005; Markovic-Plese et al., 2003), Myasthenia gravis (Mantegazza et al., 1988), Autoimmunhepatitis (Rumbo et al., 2002), Morbus Crohn und Colitis Ulzerosa (Schwab und Klotz, 2001).

## **2.2. Pharmakokinetik und Metabolismus der Thiopurine**

6-MP wird fast ausschließlich oral verabreicht, obwohl dessen mittlere orale Bioverfügbarkeit von 16 % relativ niedrig ist und mit einer großen Schwankungsbreite (5-37 %) einhergeht (Zimm et al., 1983; Fachinformation, 6-Mercaptopurin 2005). Im Plasma lässt sich 6-MP nach oraler Gabe einer therapeutischen Dosis nur für kurze Zeit in niedriger Konzentration nachweisen; die Halbwertszeit wurde mit 90 min berechnet (Fachinformation, 6-Mercaptopurin 2005). Dies wurde mit einem hohen First-Pass-Metabolismus erklärt, durch den nicht zytostatisch wirksame Metaboliten entstehen. Deshalb wurde als Prodrug AZA entwickelt, dessen systemische Bioverfügbarkeit aber auch nur mit 41-50 % ermittelt wurde (Sandborn et al., 1995). AZA wird in vivo zu 88 % zu 6-MP umgewandelt. Diese Reaktion erfolgt nichtenzymatisch; Gluthathion als Cofaktor übernimmt dabei den Imidazolrest (Chalmers et al., 1967; Elion und Hitchings, 1975; Elion, 1989; Lennard 1992a).

Thiopurine besitzen einen komplexen Metabolismus, der umfangreicher ist als der der normalen Purine (Zimm et al., 1985; Martin, 1987; Elion, 1989; Keuzenkamp-Jansen et al., 1995; Aubrecht et al., 1997). Abb. 2 zeigt einen Überblick über die Stoffwechselwege der Thiopurine in kernhaltigen Zellen.

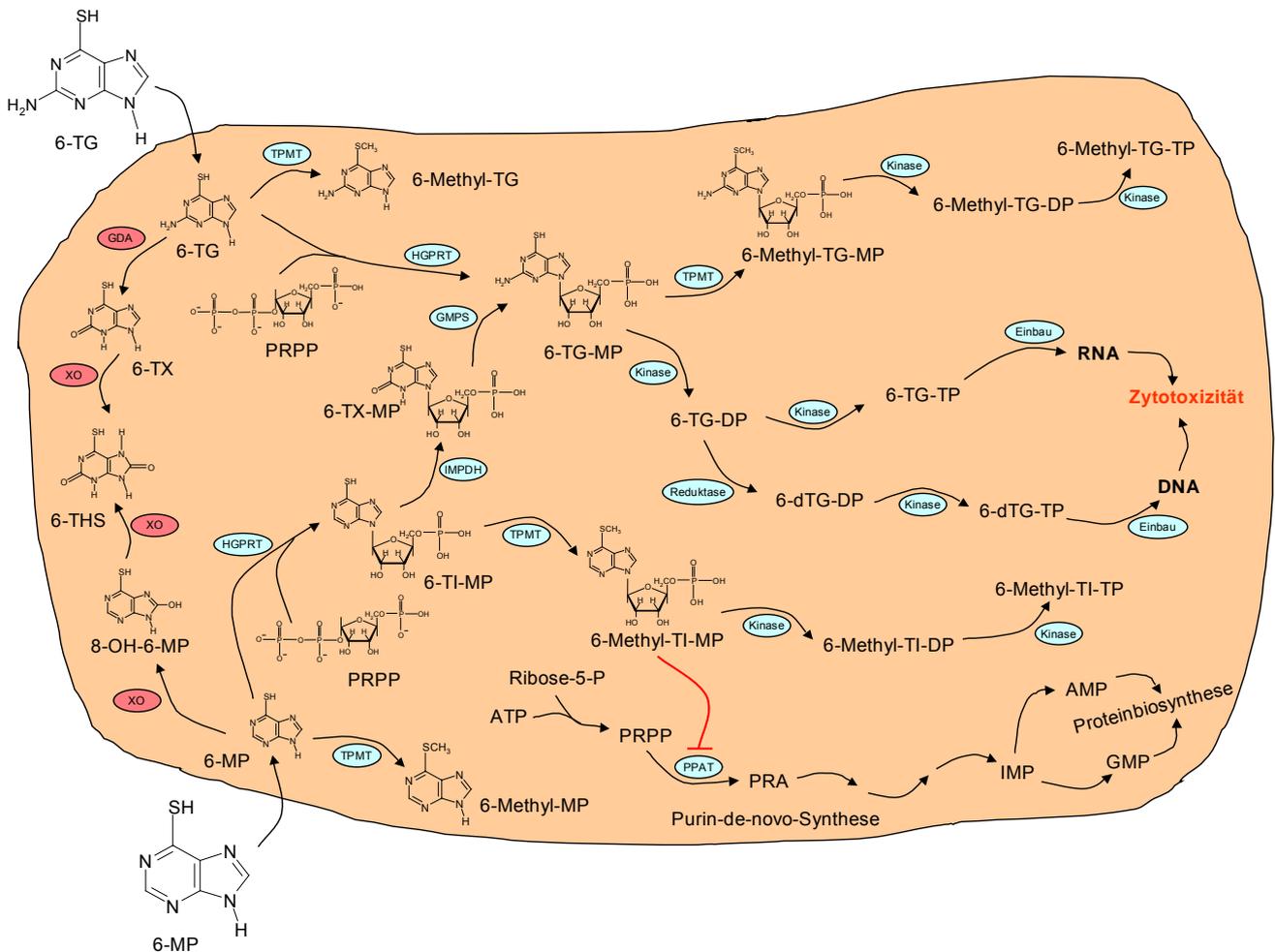
Bei der intrazellulären Metabolisierung von 6-MP kommt es sowohl zur Aktivierung als auch zur Inaktivierung. Die jeweiligen Reaktionen konkurrieren miteinander. Folgende drei Metabolisierungswege werden unterschieden:

1. Aktivierung von 6-MP und 6-TG durch Phosphoribosylierung zu -5'-Monophosphaten. Enzym: Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT).
2. Oxidation und Inaktivierung von 6-MP durch die Xanthinoxidase (XO) zu 6-Thioharnsäure (6-THS).
3. Methylierung durch Thiopurin-S-Methyltransferase (TPMT) (Elion und Hitchings, 1975).

Die Bildungsgeschwindigkeit aktiver und inaktiver Metabolite wird im wesentlichen durch die Aktivität der Schlüsselenzyme HGPRT, XO und TPMT bestimmt.

HGPRT (EC 2.4.2.8) ist X-chromosomal lokalisiert und katalysiert die Synthese von 6-Thioinosin-5'-Monophosphat (6-TI-MP) aus 6-MP mit Phosphoribosyl-Pyrophosphat (PRPP) als Cofaktor. Das 6-TI-MP wird durch Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH, EC 1.2.1.14) zu 6-Thioxanthosin-5'-Monophosphat (6-TX-MP) und durch die Guanosin-Monophosphat-Synthetase (GMPS, EC 6.3.4.1) in das 6-Thioguanosin-5'-Monophosphat (6-TG-MP) überführt (De Abreu et al., 1995).

6-Thioguanin wird in Gegenwart von PRPP über HGPRT direkt in 6-Thioguanosin-5'-Monophosphat umgewandelt. 6-TG-MP kann weiter über eine Diphosphokinase (EC 2.7.6.1) zu 6-Thioguanosin-5'-Diphosphat und weiter über eine Guanylatkinase (EC 2.7.4.8) zu 6-Thioguanosin-5'-Triphosphat phosphoryliert werden (Abb. 2, Breter und Zahn, 1979; Uchida et al., 1985). 6-TG-DP wird durch eine Reduktase zu 6-Desoxy-Thioguanosin-5'-Diphosphat (6-dTG-DP) umgewandelt, das weiter zu 6-Desoxy-Thioguanosin-5'-Triphosphat (6-dTG-TP) phosphoryliert wird. Ferner wurden 6-Desoxy-Thioguanosin-Nukleotide in der DNS 6-Mercaptopurin behandelte Tumorzellen nachgewiesen (Scannell und Hitching, 1966; Tidd und Paterson, 1974b).



**Abb. 2:** Metabolismus der Thiopurine. Erklärung siehe Text. Dargestellt sind bisher bekannte enzymatische Reaktionen von 6-MP, 6-TG und deren Metabolite.

6-MP: 6-Mercaptopurin, 6-TG: 6-Thioguanin, XO: Xanthinoxidase, 6-THS: 6-Thioharnsäure, GDA: Guanylatdesaminase, 8-OH-6-MP: 8-Hydroxy-6-Mercaptopurin, TPMT: Thiopurin-S-Methyltransferase, 6-Methyl-MP: 6-Methylmercaptapurin, 6-Methyl-TG: 6-Methylthioguanin, GMPS: Guanotin-Monophosphat-Synthetase, HGPRT: Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase, IMPDH: Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase, 6-TI-MP: 6-Thioinosin-5'-Monophosphat, 6-Methyl-TI-MP: 6-Methylthioinosin-5'-Monophosphat, 6-Methyl-TI-DP: 6-Methylthioinosin-5'-Diphosphat, 6-Methyl-TI-TP: 6-Methylthioinosin-5'-Triphosphat, 6-TX-MP: 6-Thioxanthin-5'-Monophosphat, 6-TG-MP: 6-Thioguanosin-5'-Monophosphat, 6-TG-DP: 6-Thioguanosin-5'-Diphosphat, 6-TG-TP: 6-Thioguanosin-5'-Triphosphat, 6-dTG-DP: 6-Desoxy-Thioguanosin-5'-Diphosphat, 6-dTG-TP: 6-Desoxy-Thioguanosin-5'-Triphosphat, 6-Methyl-TG-MP: 6-Methylthioguanosin-5'-Monophosphat, 6-Methyl-TG-DP: 6-Methylthioguanosin-5'-Diphosphat, 6-Methyl-TG-TP: 6-Methylthioguanosin-5'-Triphosphat, PRPP: Phosphoribosyl-Pyrophosphat, PRA: 5-Phospho- $\beta$ -D-Ribosylamin, PPAT: Phosphoribosyl-Pyrophosphat-Amidotransferase, IMP: Inosin-5'-Monophosphat, AMP: Adenosin-5'-Monophosphat, ATP: Adenosin-5'-Triphosphat, GMP: Guanotin-5'-Monophosphat.

Die Metabolisierung durch die HGPRT ist der wichtigste Schritt zur Bildung aktiver, zytotoxischer Thiopurin-Nukleotide. Die HGPRT-Aktivität ist somit limitierend für die Entstehung aller 6-Thioguanosin-Nukleotide.

Die Bedeutung der HGPRT für den Nukleotidstoffwechsel zeigt sich auch bei Patienten mit Lesch Nyhan Syndrom. Diese homozygoten Träger dieser HGPRT-Defizienz zeigen keine Wirkung/Toxizität nach Gabe von 6-MP (Zimm et al., 1985; Schütz et al., 1996a).

6-MP wird durch die Xanthinoxidase zu 6-Thioxanthin (6-TX) und zur inaktiven 6-THS oxidiert, die renal eliminiert wird (Bergmann und Ungar, 1960; Parks und Granger, 1986; Guercioli et al., 1991). Die zirkulierenden Erythrozyten besitzen keine Xanthinoxidase (Parks und Granger, 1986; Lennard und Lilleyman, 1996).

Im Gegensatz zu 6-MP ist 6-TG kein Substrat der Xanthinoxidase. Es muss erst durch die Guanylatdesaminase zu 6-TX konvertiert werden, bevor es durch die Xanthinoxidase zu 6-THS umgewandelt wird. Dieser katabole Metabolismus ist individuell unterschiedlich stark ausgeprägt.

Die TPMT (EC 2.1.1.67) ist ein Enzym des Phase II-Stoffwechsels, das auf dem Chromosom 6 kodiert ist. Es methyliert 6-Mercaptopurin und 6-Thioguanin zu den entsprechenden Methylthiopurin-Derivaten (Abb. 2). Die hierfür benötigte Methylgruppe wird vom S-Adenosylmethionin bereitgestellt.

### **2.3. Genetischer Polymorphismus der Thiopurin-S-Methyltransferase**

Für die interindividuell stark schwankende TPMT-Aktivität wurde ein genetischer Polymorphismus entdeckt (Weinshilboum und Sladek, 1980; Erb et al., 1998). In allen bisher untersuchten Bevölkerungsgruppen ist die TPMT-Enzymaktivität trimodal verteilt. Dies konnte durch Untersuchungen weltweit bestätigt werden (Tinel et al., 1991; Klemetsdal et al., 1992; Chocair, 1993; Jones et al., 1993; Lee und Kalow, 1993; Jacqz-Aigrain et al., 1994; Lennard und Singleton, 1994; Ferroni et al., 1996; Jang et al., 1996; Park-Hah et al., 1996; Schütz et al., 1996b; Kröplin et al., 1998; Kurzawski et al., 2004). Die Allele TPMT<sup>H</sup> und TPMT<sup>L</sup> codieren jeweils für eine hohe bzw. eine niedrigere Enzymaktivität. Sie werden autosomal codominant vererbt.

**Tab. 1:** TPMT-Allele auf dem Chromosom 6 und ihre Mutationen.

Aufgelistet sind Wildtyp, der für eine hohe TPMT-Aktivität codiert und 19 Allel-Varianten, die für eine niedrige Enzymaktivität codieren. Die Häufigkeit (%) zeigt die Allel-Variationen, die zu einem inaktivierten Enzym führt.

Allel-Bezeichnung	Häufigkeit %	Nukleotidaustausch Position und Base	Resultierende Änderung der Aminosäuresequenz	Literatur
<b>TPMT*1</b>	— —	<b>wild type</b>	— —	—
TPMT*1S		474 T>C	Silent	Szumlanski et al., 1996
TPMT*2	10	238 G>C	Ala→Pro	Krynetski et al., 1995
TPMT*3A	70	<b>460 G&gt;A</b> 719 A>G	Ala→Thr Tyr→Cys	Tai et al., 1996
TPMT*3B	10	<b>460 G&gt;A</b>	Ala→Thr	Szumlanski et al., 1996
TPMT*3C		719 A>G	Tyr→Cys	Yates et al., 1997 Loennechen et al., 1997
TPMT*3D		292 G>T <b>460 G&gt;A</b> 719 A>G	Glu→Stop Ala→Thr Tyr→Cys	Otterness et al., 1997
TPMT*4		Intron 9 A>G	Splicing site	Otterness et al., 1998
TPMT*5		146 T>C	Leu→Ser	Otterness et al., 1997
TPMT*6		539 A>T	Tyr→Phe	Spire-Vayron de la Moureyre et al., 1998
TPMT*7		681 T>G	His→Glu	Spire-Vayron de la Moureyre et al., 1998
TPMT*8		644 G>A	Arg→His	Hon et al., 1999
TPMT*10		430 G>C	Gly→Arg	Colombel et al., 2000
TPMT*11		395 G>A	Cys→Tyr	Schaeffeler et al., 2003
TPMT*12		374 C>T	Ser→Leu	Hamdan-Khalil et al., 2003
TPMT*13		83 A>T	Glu→Val	Hamdan-Khalil et al., 2003
TPMT*14		1 A>G	Met→Val	Lindqvist et al., 2004
TPMT*15		Intron 1 G>A	Splicing site	Lindqvist et al., 2004
TPMT*16		488 G>A	Arg→His	Hamdan-Khalil et al., 2005
TPMT*19		365 A>C	Lys→Thr	Hamdan-Khalil et al., 2005

Aus dem Wildtyp in homozygoter Form (TPMT<sup>H</sup>/TPMT<sup>H</sup>) resultiert phänotypisch eine normale Enzymaktivität; dieser Typ tritt mit einer Häufigkeit von 89 % auf.

Homozygot TPMT-defiziente Patienten (TPMT<sup>L</sup>/TPMT<sup>L</sup>) treten mit einer Häufigkeit von 0,3 % auf. Bis heute (Oktober 2005) wurden 19 defiziente TPMT-Allele charakterisiert (Tab. 1). Die TPMT Allele \*2, \*3A und 3C treten am häufigsten auf und sind für 65-95 % aller defizienten Allele verantwortlich (McLeod et al., 1994; Yates et al., 1997; Rossi et al., 2001; Indjova et al., 2003). Alle anderen Allele sind nur in Einzelfällen beschrieben. In Europa ist das TPMT \*3A Allel mit einer absoluten Häufigkeit von ca. 4 % (etwa 70 % aller defizienten Allele) am weitesten verbreitet (McLeod und Siva, 2002).

Ca. 11 % der Bevölkerung, die eine genotypisch heterozygote Form aufweisen (TPMT<sup>H</sup>/TPMT<sup>L</sup>), zeigen eine intermediäre Aktivität. Die phänotypische Abgrenzung zwischen einer normalen und einer intermediären TPMT-Aktivität ist methodenabhängig und liegt bei unserer Methode bei 23,5 U/gHb [nmol 6-MTG x g<sup>-1</sup> Hb x h<sup>-1</sup>] (Kröplin et al., 1998).

#### **2.4. Klinische Bedeutung der Thiopurin-S-Methylierung**

Die Methylierung durch die TPMT spielt im Stoffwechsel der Thiopurine eine besondere Rolle, da sie nicht allein aktivierend oder inaktivierend ist. Klinische Beobachtungen haben dazu geführt, dass der TPMT eine große Bedeutung für die Wirksamkeit der Thiopurine zugesprochen wird. Dies wurde aus folgenden Beobachtungen an Patienten geschlossen. Die TPMT-Aktivität war umgekehrt proportional zu 6-TGN-Konzentrationen in den Erythrozyten von Kindern mit Akuter Lymphoblastischer Leukämie (ALL), die mit 6-MP behandelt wurden (Lennard et al., 1987b). Eine hohe TPMT-Aktivität vermindert die Bildung von 6-TG-TP und bewirkt hierdurch eine geringere Zytotoxizität mit einer dadurch verminderten antileukämischen Wirkung und einem höheren Rezidivrisiko bei ALL-Kindern (Lennard und Maddocks, 1983; Lennard und Lilleyman, 1987a; Lennard und Lilleyman, 1989; Lennard et al., 1990; Lilleyman und Lennard, 1994; Lennard und Lilleyman, 1996; Lennard et al., 1997). Somit wurde diesem Stoffwechselweg eine inaktivierende Funktion zugewiesen (Lennard, 1999). Bei Patienten, die eine geringe bzw. fehlende TPMT-Aktivität aufweisen, kommt es nach Gabe geringer Dosen von 6-MP zu einer sehr hohen Konzentration der zytotoxischen Metabolite 6-TGN (Andersen et al., 1998).

## 2.5. Wirkungsmechanismen

Für die Thiopurine werden folgende Wirkungen diskutiert:

### 2.5.1. Zytotoxizität durch Einbau in die DNS

Schon 1974 wurde gezeigt, dass 6-TGN als aktive 6-MP-Metabolite in die DNS und RNS inkorporiert werden (Abb. 2) und dass eine Beziehung zwischen dem Umfang der Inkorporation und der zytotoxischen Wirkung von 6-MP bestand (Tidd und Paterson, 1974b; Lennard und Maddocks, 1983). 6-dTG-TP kann als falscher Baustein in die DNS eingebaut werden. Durch veränderte Basenpaarungen und Doppelstrangstabilität wird die chromosomale Replikation und die DNS-Reparatur gestört; es werden Replikationsschäden an der DNS induziert (Tidd und Paterson, 1974b).

Studien haben gezeigt, dass die Zytotoxizität verzögert eintritt und mit der Hemmung der Zellteilung in den S- und G<sub>2</sub>-Phasen verbunden ist. Der Effekt tritt während der ersten Zellteilung nach der Inkorporation von 6-dTG-TP in die DNS auf. Es wurde gezeigt, dass der Einbau von 6-dTG-TP in die DNS die Aktivität der RNase H hemmt, einem wichtigen Enzym, das an der Replikation der DNS beteiligt ist (Maybaum und Mandel, 1983; Krynetskaia et al., 1999). Außerdem wird beim Einbau von 6-TG-TP in die RNS mit der mRNS-Synthese die Proteinbiosynthese gehemmt (Swann et al., 1996).

### 2.5.2. Hemmung der Purin-de-novo-Synthese (PDNS)

6-Methyl-TI-MP, ein Hauptmetabolit im 6-MP-Metabolismus, ist ein stark wirksamer Hemmstoff der Phosphoribosyl-Pyrophosphat-Amidotransferase (PPAT, EC 2.4.2.14), dem Schlüsselenzym der PDNS (Tay et al., 1969; Bennett und Allan, 1971; Bokkerink et al., 1993). PPAT katalysiert in der PDNS die Umwandlung von PRPP zu 5-Phospho-β-D-Ribosylamin (PRA) (Abb. 2). Die Hemmung der PPAT führt zu einer Akkumulation von PRPP in den Zellen. Dieses steht als Co-Substrat für die Umwandlung von 6-MP zu 6-TI-MP vermehrt zur

Verfügung, das dann durch die TPMT zu 6-Methyl-TI-MP methyliert wird. Eine vermehrte Konzentration von PRPP führt somit zur erhöhten Bildung von 6-Methyl-TI-MP aus 6-MP (Bokkerink et al., 1993), was wiederum die PDNS hemmt (Tay et al., 1969; Bokkerink et al., 1993; Vogt et al., 1993, Dervieux et al., 2001b). Die Zellen verarmen an endogenen Nukleotiden, da die schnell proliferierenden Zellen, insbesondere aber Lymphozyten von der PDNS abhängig sind. Dies führt zur Abnahme der DNS- und RNS-Synthese. Bokkerink et al. (1993) diskutieren, dass eine Abnahme der Purinsynthese zu einer gleichzeitigen Erhöhung der Pyrimidinsynthese führen würde, die mit einem Ungleichgewicht des Zellwachstums und dem Zelltod einhergeht.

Eine Hemmung der Inosin-5'-Monophosphat-Dehydrogenase wird als weiterer Wirkmechanismus der Thiopurine diskutiert. Auch hierfür soll 6-Methyl-TI-MP verantwortlich sein (Tidd und Paterson, 1974a).

Die Hemmung der Purinnukleotid-Interkonversion und der PDNS behindern die zelluläre Replikation. Über diesen Mechanismus wird die antiproliferative und immunsuppressive Wirkung der Thiopurine erklärt (Erb et al., 1998; Bo et al., 1999). Beide Effekte tragen zur Zytotoxizität der Verbindungen bei (LePage, 1960; Nelson et al., 1975; Tidd und Dedhar, 1978; Maybaum et al., 1985; Rudy et al., 1988; Warren et al., 1995; Aarbakke et al., 1997).

### **2.5.3. Weitere Mechanismen der immunsuppressiven Wirkung**

T-Lymphozyten spielen eine sehr wichtige Rolle bei vielen Autoimmunerkrankheiten und bei Abstoßungsreaktionen (Maltzman und Koretzky, 2003). Die Thiopurine sollen die Produktion von Interferon- $\gamma$  und Tumornekrosefaktor durch T-Lymphozyten hemmen (Hildner et al., 1998). In einer Studie wird die immunsuppressive Wirkung der Thiopurine durch die Konkurrenz von 6-TG-TP mit GTP an der GTP-Bindungsstelle von Rac1 als möglicher molekularer Wirkmechanismus postuliert. Eine durch 6-TG-TP vermittelte funktionelle Hemmung der GTPase Rac1 wird diskutiert. Rac1 gehört zur Ras-Familie kleiner Guanosin-Triphosphatasen (GTPasen), die als molekularer Schalter die Reorganisation des Zytoskeletts und das Zellwachstum kontrollieren. In Folge der Hemmung kommt es zu einer mitochondrial vermittelten, Caspase 9-abhängigen Apoptose der

aktivierten T-Lymphozyten (Tiede et al., 2003). In einer weiteren Studie wurde über die selektive Hemmung der Genexpression von Entzündungsparametern durch Thiopurine in aktivierten T-Lymphozyten berichtet (Thomas et al., 2005).

## 2.6. Thiopurine und Leukämie

Bei Leukämien handelt es sich um eine maligne Neoplasie des blutbildenden Gewebes, meist mit Störungen der Reifungsregulation. Das autonome Wachstum der malignen Zellen führt zur Infiltration des Knochenmarks und zum sekundären Befall weiterer Organe. Die Knochenmarkinsuffizienz durch Verdrängung aller drei Zellreihen führt zu Infektionen, Anämien und Blutungen. Die unreifen Leukämiezellen können im Blut auftreten, müssen dies aber nicht; die Diagnose wird durch eine Knochenmarkspunktion gestellt. Hier finden sich typischerweise viele Granulozyten einer bestimmten Reifungsstufe, während Granulozyten anderer Reifungsstufen selten sind; dieses Phänomen wird als „hiatus leukämicus“ bezeichnet.

Die Leukämien sind die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter. Jährlich erkranken etwa 600 Kinder in der Bundesrepublik Deutschland an einer Leukämie, d. h. etwa eines von 1400 Kindern erkrankt in den ersten 15 Jahren an Leukämie (Kaatsch et al., 1998). Im Gegensatz zum Erwachsenenalter handelt es sich bei Kindern fast ausnahmslos um akute Leukämien, die unbehandelt innerhalb weniger Monate zum Tod des Patienten führen. 80 % dieser Leukämien entfallen auf die ALL.

Dank moderner Therapien überleben heutzutage 80 % der betroffenen Kinder. Umgekehrt sterben noch 120 Kinder im Jahr an ihrer Erkrankung.

Die Behandlung der Kinder mit ALL lässt sich in zwei Abschnitte unterteilen, die Remissionsinduktion und -erhaltung. Der erste besteht aus mehreren Blöcken intensiver Chemotherapie. Der zweite Abschnitt ist die Erhaltungstherapie und dauert 1½ Jahre. Während dieser Zeit werden die Kinder täglich mit 6-MP und einmal wöchentlich mit Methotrexat behandelt.

Da Lymphozyten einen begrenzten „salvage pathway“ haben und daher die Purinbasen nicht ausreichend wieder verwerten können, sind sie für die Zellteilung auf eine schnelle und effektive Neusynthese von Purinbasen angewiesen. Dies,

sowie der hohe Bedarf an Purinbasen für die Zellteilung, macht 6-Mercaptopurin und ihre Derivate besonders effektiv. Durch Hemmung der Zellteilung eignet sich 6-MP bevorzugt für die Behandlung von lymphoblastischen Leukämien und Erkrankungen mit einer Überaktivität des zellulären Immunsystems.

## **2.7. Bestimmung von Thiopurinen zur Therapieüberwachung**

Wegen der interindividuell sehr variablen Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit von 6-Mercaptopurin war eine Individualisierung der Therapie mit Thiopurinen anhand von Blutkonzentrationen angestrebt worden. Im Gegensatz zum Plasma/Serum, wo 6-TG und 6-MP nur direkt nach der Einnahme und zeitlich begrenzt nachweisbar waren, konnten Metabolite dieser Substanzen in Erythrozyten der behandelten Patienten gut nachgewiesen werden. Methoden zur Quantifizierung von 6-TG in den Erythrozyten haben eine große Akzeptanz zur Optimierung der Dosierung erlangt. Da Erythrozyten aber nicht die Zielzellen der Therapie mit Thiopurinen sind, können die Thiopurin-Nukleotide in Erythrozyten nur ein Surrogatparameter sein. Allerdings konnte eine gute Korrelation der Konzentration in den Erythrozyten zu anderen Geweben und zu leukämischen Blastenzellen gezeigt werden (Kurowski und Iven, 1991; McLeod et al., 1995; Coulthard et al., 1998). Ideal wäre die Nukleotid-Bestimmung in Leukozyten und Lymphozyten, welche bei immunologischen Erkrankungen die Zielzellen sind (Cuffari et al., 1996; Welch et al., 1997). Dazu wird jedoch ein größeres Blutvolumen benötigt, weil die Anzahl der Leukozyten im Blut erheblich niedriger ist als die der Erythrozyten. Bei Leukämien und Lymphomen sind Lymphozyten auch nur Surrogatzellen; es wird aber eine große physiologische Ähnlichkeit reifer Lymphozyten mit dem bei ALL vermehrten Leukämiezellen angenommen.

### 2.7.1. Bestimmung der Gesamtthiopurine

Eine für die Routine geeignete Methode zur getrennten Quantifizierung der 6-Thioguanosin-Nukleotide existiert nicht. Routinemäßig verwendete Methoden basieren auf der Bestimmung der Gesamtkonzentration an Thiopurinen. Hierzu werden die in den Erythrozyten vorliegenden Nukleotide durch Säure hydrolysiert und die Basen freigesetzt (Lennard, 1987c; Erdmann et al., 1990; Lennard und Singleton, 1992b; Dervieux und Boulieu, 1998; Mawatari et al., 1998; Pike et al., 2001). Anschließend werden die Basen mit der HPLC quantifiziert. Die Methoden unterscheiden sich wesentlich nach dem Untersuchungsmaterial, d. h. gewaschene Erythrozyten (Dooley und Maddocks, 1982; Lavi und Holcenberg, 1985; Lennard, 1987c; Erdmann et al., 1990; Lennard und Singleton, 1992b; Weller et al., 1995; Dervieux und Boulieu, 1998; Mawatari et al., 1998), Vollblut (Pike et al., 2001), Lymphozyten (Erdmann et al., 1991; Dervieux et al., 2002) und Leukozyten-DNA (Warren und Slordal, 1993; Cuffari et al., 1996).

Die Bestimmung nach Lennard et al. (1987c) ist die älteste und hat eine große Verbreitung gefunden. Durch saure Hydrolyse wird 6-TG im Hämolysat aus seinen Nukleotiden freigesetzt und als Phenylquecksilber-Derivat im alkalischen Milieu mit Toluol extrahiert. Durch Rückextraktion mit Salzsäure werden die Basen wieder freigesetzt und können mit der HPLC quantifiziert werden. 6-MMP kann jedoch mit Phenylquecksilberacetat nicht extrahiert werden, da die Sulfhydrylgruppe methyliert ist. Ein Zersetzungsprodukt von 6-MMP, das 4-Amino-5-(methylthio)-carbonylimidazol wird dagegen erfasst (Dervieux und Boulieu 1998, Erb et al., 2003).

Die Bestimmung ist zeitintensiv und erfordert einen großen materiellen Aufwand in der Durchführung; das Phenylquecksilberacetat ist giftig und bedarf besonderer Vorsichtsmaßnahmen bei der Probenaufarbeitung. Andere Autoren extrahieren die freien Thiopurin-Basen mit Quecksilbercellulose (Vermeidung von freiem Quecksilber und Verminderung der Kontaminationsgefahr; Dooley und Maddocks, 1980; Bruunshuus und Schmiegelow, 1989) oder mit Aluminiumhydroxid basierten Komplexbildnern (Su et al., 1999).

Bei der Bestimmung nach Erdmann et al. (1990) wird aus dem Hämolyolat nach Säurehydrolyse zuerst 6-MMP und 6-MTG mit Chloroform-Isopropylalkohol extrahiert. Das in der wässrigen Phase verbleibende 6-TG wird oxidiert und nach HPLC-Analyse fluorometrisch bestimmt. 6-MTG hat eine Eigenfluoreszenz und wird direkt fluorometrisch gemessen; 6-MMP wird durch UV-Absorption quantifiziert. Eine alternative Methode verwendet für die Extraktion ein Gemisch aus Ethylacetat-Dichlormethan (Erdmann et al., 1991).

Die Methode nach Dervieux und Boulieu (1998) bestimmt 6-TG und 6-MMP nach Proteinfällung mit Perchlorsäure und anschließender Säurehydrolyse. Die beiden Thiopurine werden nach HPLC-Trennung mit UV-Absorption detektiert.

Lowry et al. (2001), Shipkova et al. (2003a) und Stefan et al. (2004) zeigten, dass abhängig von dem verwendeten Analyseverfahren und der dafür erforderlichen Probenvorbereitung deutlich unterschiedliche Messwerte für 6-TG erhalten wurden. Diese Methoden liefern je nach eingesetzter Säure (Schwefel- oder Perchlorsäure), Dauer der Säurehydrolyse (15 bis 90 min) und der zugesetzten Menge an Dithiothreitol unterschiedliche Ergebnisse. Beim Vergleich der Methoden von Lennard (1987c) und Dervieux und Boulieu (1998) liefert die Methode nach Dervieux und Boulieu 2,6-fach höhere Werte als die Methode nach Lennard (Shipkova et al., 2003a). Stefan et al. (2004) fanden allerdings, dass die Methode nach Dervieux und Boulieu (1998) nur 1,38-fach höhere Werte als die Methode nach Lennard und Singleton (1992b) liefert. Einen um 1,6-fach höheren Wert für 6-TG liefert die modifizierte Methode nach Lennard und Singleton (1992b) im Vergleich mit der Methode nach Erdmann et al. (1990) (Lowry et al., 2001). Bei der Beurteilung der Ergebnisse ist es also sehr wichtig zu erwähnen, mit welcher Methode die 6-TGN-Konzentration bestimmt wurde.

### **2.7.2. Bestimmung als Nukleotide**

Für Trennung und Nachweis von Thiopurin-Nukleotiden wurden zwei Verfahren publiziert, die auf Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (HPLC, Ionenaustauschchromatographie bzw. Ionenpaarchromatographie) beruhen. Die beiden Trennprinzipien sollen im Folgenden kurz beschrieben werden. Die Ribonukleotide

und die Desoxyribonukleotide von 6-TG werden als 6-Thioguanosin-Nukleotide (6-TGN) bezeichnet (Lennard und Maddocks, 1983; Lennard, 1992a).

### **2.7.2.1. Ionenaustauschchromatographie**

Das Prinzip der Ionenaustauschchromatographie beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen geladener Substanzen mit den entgegen gesetzten Ladungen der Säulenmatrix. Die stationäre Phase besteht aus einem Harz oder Gel, die als funktionelle Gruppen gebundene Säuren (Kationenaustauscher) oder basische Gruppen (Anionenaustauscher) tragen. An diese stationären Ionen binden die zu analysierenden Substanzen. Durch Erhöhung der Ionenstärke im Laufmittel werden die gebundenen Substanzen von der stationären Phase verdrängt und eluiert; die Retentionszeit eines Ions beruht auf dem Verhältnis der Ionenstärke der zu analysierenden Substanz im Vergleich zu der Ionenstärke der zugesetzten Salze.

Lavi und Holcenberg (1985) und Keuzenkamp-Jansen et al. (1995) entwickelten zwei Methoden, die als Gradienten-Anionenaustauschchromatographie in der Lage waren, die Thiopurin-Nukleotide voneinander zu trennen. Lavi und Holcenberg verwendeten einen Gradienten mit Kaliumdihydrogenphosphat und Kaliumchlorid für die Elution und konnten so vier Thiopurin-Nukleotide in den Erythrozyten bestimmen. Keuzenkamp-Jansen et al. (1995) verwendeten einen 3-fachen Gradienten für die Bestimmung der 6-Thioguanosin-Nukleotide und 6-Methylthioinosin-Nukleotide in den Erythrozyten. Die 6-Thioguanosin-Nukleotide werden vor der HPLC-Analytik oxidiert und fluorometrisch quantifiziert, 6-Methylthioinosin-Nukleotide werden in einem zweiten Analysengang direkt mit UV-Detektion bestimmt.

### **2.7.2.2. Ionenpaarchromatographie**

Das Prinzip der Umkehrphasen-(„reversed phase“)-Ionenpaarchromatographie (Ally und Park, 1992; Fürst und Hallström, 1992; Gebelein et al., 1992) beruht auf der Bildung von Ionenpaaren zwischen verschiedenen geladenen Ionen. Anders als in der Ionenaustauschchromatographie mit einer geladenen, stationären Phase,

befindet sich hier das Gegenion des Ionenpaares in der mobilen Phase. Typischerweise werden Ampholyte verwendet, d. h. Substanzen mit einem langen unpolaren Rest sowie einer positiven (bei der Trennung von Anionen) oder negativen (für die Trennung von Kationen) Ladung. Als Ionenpaarreagenzien für Thiopurin-Nukleotide kommen z. B. quartäre Ammoniumverbindungen in Frage, wie Tetrabutylammoniumhydrogensulfat.

## **2.8. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

1. Entwicklung einer einfachen, schnellen, reproduzierbaren, automatisierbaren und kostengünstigen Methode zur Bestimmung und Quantifizierung der nativen Thiopurin-Nukleotide und -Nukleoside, die für die routinemäßigen Bestimmungen der Metabolite in den Erythrozyten geeignet ist.
2. Pharmakokinetische Untersuchungen zur Aufnahme der Thiopurine in humane Erythrozyten mit dem Ziel, einen Eindruck von der Entstehung der Thiopurin-Nukleotide zu gewinnen.
3. Pharmakokinetische Untersuchungen der Aufnahme und der Metabolisierung von 6-TG und 6-MP in verschiedenen Zelllinien.
4. Bestimmung der Thiopurin-Nukleotide bei pädiatrischen Leukämiepatienten.
5. Vergleich der neu zu entwickelnden Methode mit den Ergebnissen, die mit der bisher etablierten Methode nach Erdmann et al. (1990) erhalten wurden.

## **3. Material und Methoden**

### **3.1. Materialien**

Alle in den Versuchen verwendeten Substanzen und Chemikalien zur Herstellung von Fließmitteln und Inkubationspufferlösungen mit ihrer jeweiligen Bezugsquelle bzw. Lieferfirma sind in den Tabellen I bis VII des Anhangs aufgeführt. Alle benutzten Chemikalien waren von analytischer Reinheit (p. a.) und wurden nach den Angaben des Herstellers aufbewahrt. Zum Ansetzen der wässrigen Lösungen wurde Reinstwasser aus der Wasseraufbereitungsanlage verwendet.

#### **3.1.1. Thiopurin-Stammlösungen**

6-TG, 6-TG-R, 6-MP, 6-MP-R, 6-MMP, 6-MMP-R und 6-TX wurden als Stammlösungen mit einer Konzentration von 0,6 mmol/l, 6-MTG mit einer Konzentration von 0,55 mmol/l aus der Festsubstanz hergestellt (Anhang, Tab. IV). Die Stammlösungen wurden bei 4°C in lichtgeschützten Flaschen gelagert und waren etwa 14 Tage stabil. Vor Gebrauch wurden die Stammlösungen durch Messung der UV-Absorption (6-TG, 6-TGR, 6-TX 342 nm; 6-MP, 6-MP-R, 6-MTG 320 nm; 6-MMP, 6-MMP-R 290 nm) auf Zerfall überprüft.

### **3.2. Aufarbeitung der Proben**

#### **3.2.1. Gewinnung von gepackten Erythrozyten**

Für die Inkubationsversuche wurden gepackte Erythrozyten aus Resten von anonymisierten EDTA-Vollblutproben Lübecker Blutspender innerhalb von 3 h nach Blutabnahme isoliert. Die Probe wurde 10 min bei 3000 g zentrifugiert, das Plasma und der „buffy coat“ verworfen. Die Erythrozyten wurden in dem 3-fachen Volumen einer 0,9 %igen Kochsalzlösung (4°C) resuspendiert und

erneut für 10 min bei 3000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipetiert, übrig blieben die gepackten Erythrozyten.

Für die Bestimmung von Thiopurinen und ihren Metaboliten im Blut behandelter Patienten wurde EDTA-Blut von pädiatrischen Patienten aufgearbeitet, die an der ALL-BFM 2000 Studie (ALL-BFM 2000 Therapieprotokoll zur Behandlung von Kindern und Jugendlichen mit ALL) teilgenommen haben. Die Blutproben stammten aus der Kinderklinik der Universität Lübeck und 27 weiteren Kinderkliniken aus Deutschland und der Schweiz. Aus diesen Blutproben wurden die gepackten Erythrozyten wie oben beschrieben isoliert.

### **3.2.2. Erythrozytenhämolysat**

Anschließend wurden die gepackten Erythrozyten mit dem 5-fachen Volumen an Aqua dest. hämolysiert und zentrifugiert.

Da die Konzentrationen von Thiopurinen und ihren Metaboliten auf den Hämoglobingehalt bezogen werden, wurde dieser im Erythrozytenhämolysat mit der Cyanmethämoglobin-Methode bestimmt. Hierfür wurde ein Kit der Firma Randox (Cyanmethämoglobin Standard Set) verwendet.

### **3.2.3. Proteinfällung**

Das Hämolysat wurde in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen mit einem Heizblock 5320 (Eppendorf) 15 min auf 96°C erhitzt und anschließend sofort für 5 min auf Eis gestellt. Zur Sedimentierung der denaturierten Proteine wurden die Proben 10 min bei 14 000 g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde direkt für die HPLC-Analytik verwendet. Wurden die Proben nicht am gleichen Tag analysiert, so wurde der klare Überstand bei -20°C eingefroren. Unter diesen Bedingungen waren die Thiopurin-Metabolite über mehrere Monate stabil.

### **3.3. In vitro Inkubationen**

#### **3.3.1. Inkubationen von frischen Erythrozyten mit Thiopurinen**

200 µl gepackte Erythrozyten wurden mit 700 µl Inkubationspuffer versetzt. Durch Zugabe von 100 µl Thiopurin-Stammlösung wurde die Reaktion gestartet. Dem Leerwert wurde statt der Thiopurin-Stammlösung 100 µl Inkubationspuffer zugesetzt. Der Inkubationsansatz wurde mit einem Vortex-Mixer (Heidolph, Schwabach) 10 sec gemischt und in einem Thermomixer bei 37°C inkubiert. In Vorversuchen wurde sichergestellt, dass bei 650 U/min während der Inkubation keine Sedimentation der Erythrozyten im Reaktionsgefäß erfolgte. Die Inkubation der Proben erfolgte für 0, 5, 20, 45, 90 min bzw. 3, 6, 12 und 24 h. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Proteine im Ansatz durch Erhitzen denaturiert.

#### **3.3.2. Inkubation von Zelllinien mit Thiopurinen**

Alle in den Versuchen verwendeten Zelllinien wurden freundlicherweise von den Arbeitsgruppen Prof. C. P. Siegers und PD Dr. O. Jöhren Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck zur Verfügung gestellt. Verwendet wurden Nierenepithelzellen (LLC-MK2, Norval, 1979), humane Ovarialkarzinomzellen (Ovcar-3, Hamilton et al., 1983), humane Nebennierenrindenzellen (NCI H 295, Gazdar et al., 1990), Herzmyoblasten (H9C2, Kimes und Brandt, 1976), humane Dünndarmepithelzellen (I-407, Henle und Deinhardt, 1957), humane Colonkarzinomzellen (CaCO-2, Jumarie et al., 1991), humane Hepatomazellen (Hep G2, Pandak et al., 1996), humane Prostatakarzinomzellen (PC-3, Kaighn et al., 1979) und humane Corneaepithelzellen (HCE, SV-adenovirus immortalisiert, Araki-Sasaki et al., 1995). Die Anzüchtung und Isolierung der Zellen wurde von Frau Dannenberg durchgeführt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Kulturmedium in 75 cm<sup>2</sup> Gewebeschalen (Greiner bio-one) bei 37,5°C. Der Brutschrank wurde mit Carbogen (95 %

O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) bei 90 % relativer Feuchtigkeit belüftet. Konfluenz der Zellen war nach 48-72 h erreicht; die Zellen wurden mit Trypsin, NCI H 295 Zellen mit Accutase abgelöst.

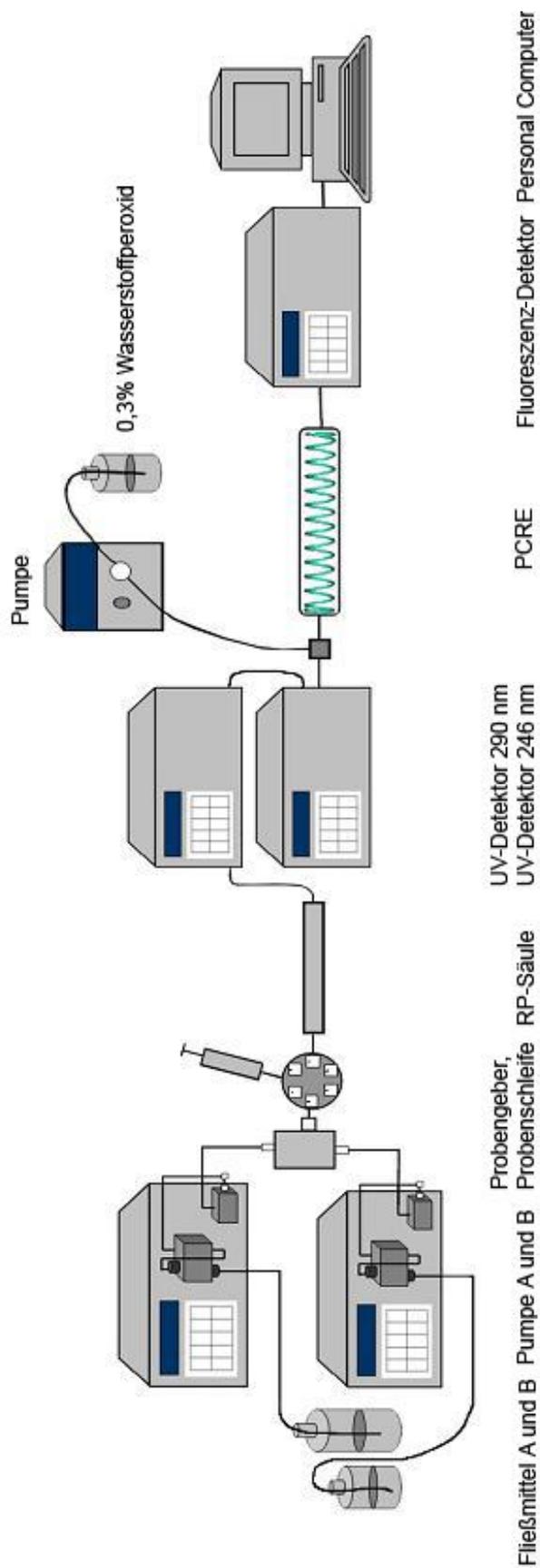
Medium und Zellen wurden entnommen, für eine Inkubation wurden die Zellen aus einer Gewebeschale verwendet. Solubilisierte Zellen wurden bei 3000 g sedimentiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden anschließend zur Entfernung von restlichem Medium zweimal mit 0,9 %iger Kochsalzlösung (4°C) gewaschen. Das verbleibende Zellpellet wurde mit 180 µl Inkubationspuffer versetzt und die Reaktion durch Zugabe von 20 µl einer 0,042 mmol/l 6-Thioguanin-Lösung bzw. 20 µl einer 0,6 mmol/l 6-Mercaptopurin-Lösung gestartet. Die Inkubation erfolgte für 0, 5, 20, 45, 90 min bzw. 3, 6, 12 und 24 h.

Nach dem Inkubationsende wurden die Zellen analog zum Vorgehen bei Inkubationen mit gepackten Erythrozyten erhitzt und zentrifugiert. Ca. 180 µl eines klaren Überstands konnten gewonnen werden. Wurden die Proben nicht direkt analysiert, so wurde der klare Überstand abpipetiert und bei -20°C eingefroren.

### **3.4. HPLC-Analytik**

#### **3.4.1. Nachsäulenderivatisierung der freien Thiole durch photochemische Reaktion**

Zur Oxidation der Thiolgruppen wurde dem Fließmittel nach Austritt aus der Säule über ein T-Stück (T-junction) 10 µl/min einer 0,3 % Wasserstoffperoxid-Lösung mit einer Knauer WellChromHPLC Pumpe K 1001 (KNAUER, Berlin) hinzugefügt. Die Reaktion (Oxidation) erfolgte in einer PTFE-Reaktionsschleife (ICT, Wien) von 2,5 m Länge, 0,3 mm Innendurchmesser, die um eine 8 W UV-Lampe ( $\lambda=254$  nm) aufgerollt war (Abb. 3). Die Reaktionsschleife und UV-Lampe bilden die photochemische Reaktionseinheit (PCRE). Unter diesen Bedingungen werden photolytisch OH-Radikale gebildet, die die Sulfhydryl-Gruppen der Thiopurine und deren Metabolite zum Sulfonat oxidieren. Nach dem Verlassen der PCRE werden die oxidierten, z. T. stark fluoreszierenden Substanzen mit einem Fluoreszenz-Detektor bei einer Anregungswellenlänge von 315 nm und einer Emissionswellenlänge von 390 nm nachgewiesen.

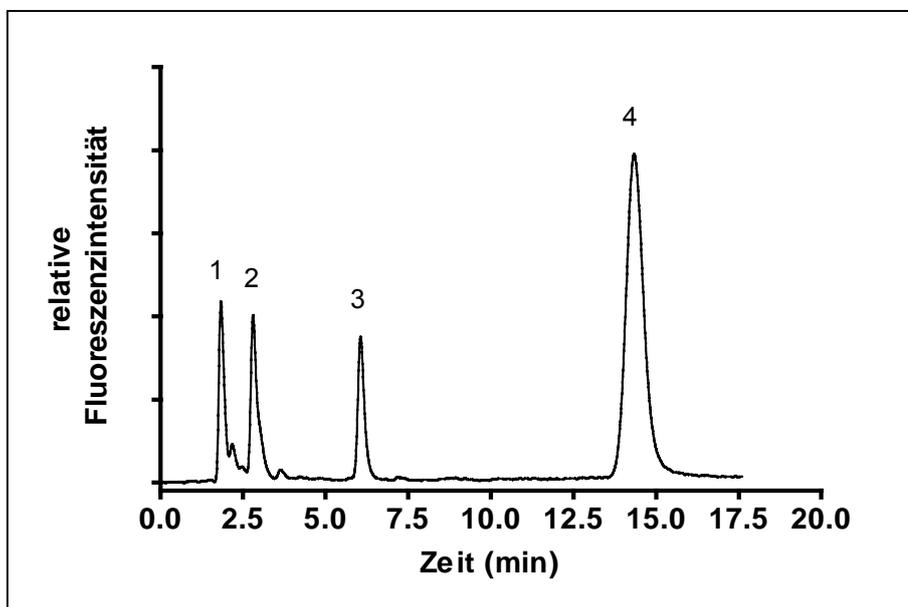


**Abb. 3:** Schematische Darstellung der HPLC-Anlage mit Gradienten-Analytik.

### 3.4.2. Isokratische HPLC

Die isokratische HPLC wurde durchgeführt wie von Steenbock (Diplomarbeit, 1995) beschrieben. Das chromatographische System bestand aus einem Shimadzu SIL 10 A Injektionsautomaten, einer Shimadzu LC 10 AT Pumpe und einem Shimadzu RF 10 A Fluoreszenz-Detektor, die Trennung erfolgte auf einer C<sub>18</sub>-Säule (LiChroCART<sup>®</sup> 125-4, Partikelgröße 5 µm) der Firma E. Merck (Darmstadt).

20 µl Probe wurden über eine 50 µl Injektionsschleife aufgegeben. Die Elution erfolgte mit 20 mmol/l Kaliumdihydrogenphosphat, pH 7,9 mit 15 % Acetonitril und 2 mmol/l N-Tetrabutylammoniumhydrogensulfat, bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min. Die 6-TG-Metabolite im Eluat wurden nach photochemischer Oxidation durch Fluoreszenz (Ex: 315 nm, Em: 390 nm) nachgewiesen. Die Abb. 4 zeigt ein Beispielchromatogramm; die Identifizierung der Peaks erfolgte durch Analyse von Standards unter identischen Bedingungen.



**Abb. 4:** Beispielchromatogramm nach isokratischer HPLC. Gezeigt werden 6-Thioguanosin-Nukleotide nach 90 min Inkubation von Erythrozyten mit 6-TG. Erklärung der Peaks: 1. Stör-„Peak“, 2. 6-Thioguanosin-5'-Monophosphat, 3. 6-Thioguanosin-5'-Diphosphat, 4. 6-Thioguanosin-5'-Triphosphat. Die Fließgeschwindigkeit betrug 0,5 ml/min.

### 3.4.3. Gradienten-HPLC

Zur Verbesserung der chromatographischen Trennung wurde von mir eine Gradienten-HPLC eingeführt.

Die Anlage bestand aus zwei LC 10AT Pumpen (2-Kolbenpumpen), einem SCL-10A system controller (Systemsteuerungseinheit), einem SIL-10A auto injector (Probengeber), einem SPD-10A UV-Vis detector (UV-Detektor) und einem RF-10A Fluoreszenz-Detektor (Abb. 3). Wurde ein zweiter UV-Detektor verwendet, wurde dessen Ausgangssignal über ein digitales Voltmeter mit einer seriellen Schnittstelle im ASCII-Format gespeichert und anschließend integriert. Dieser Vorgang war notwendig, da das Steuerungsprogramm nur zwei Detektionssignale verarbeiten konnte (UV-Detektor bei 290 nm und Fluoreszenz-Detektor). Die Anlage wurde mit dem Class LC 10 Steuerungsprogramm betrieben, die Peaks wurden durch das Integrationsprogramm quantifiziert und ausgewertet. Das Programm war unter Windows 95 auf einem Pentium I Personal Computer lauffähig.

Die Trennung erfolgte mit einer „reversed phase“ C<sub>18</sub>-Säule (Purosphere<sup>®</sup> Star RP 18 endcapped 60x4 mm, Partikelgröße 3 µm) der Firma E. Merck (Darmstadt); die Hauptsäule wurde durch eine Phenomenex SecurityGuard-Vorsäule vor Verunreinigungen geschützt. Die Vorsäule wurde nach jeweils 120 Analysen gewechselt.

Ein linearer Acetonitril-Gradient zwischen 3 % und 20 % wurde aus zwei Fließmitteln erstellt [FM A: 20 mmol/l Kaliumdihydrogenphosphatpuffer (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), pH 7,0, 3 % Acetonitril, 2 mmol/l N-Tetrabutylammoniumhydrogensulfat; FM B: 20 mmol/l Kaliumdihydrogenphosphatpuffer (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), pH 7,0, 20 % Acetonitril, 2 mmol/l N-Tetrabutylammoniumhydrogensulfat]. Der Gradient ist in Abb. 5 wiedergegeben, die Acetonitril-Konzentration stieg linear über 15 min von 3 % auf 20 % an, wurde 3 min bei 20 % konstant gehalten und dann auf 3 % zurückgeführt. Das System wurde anschließend mit FM A reäquilibriert. Alle 25 min wurde eine Probe injiziert.

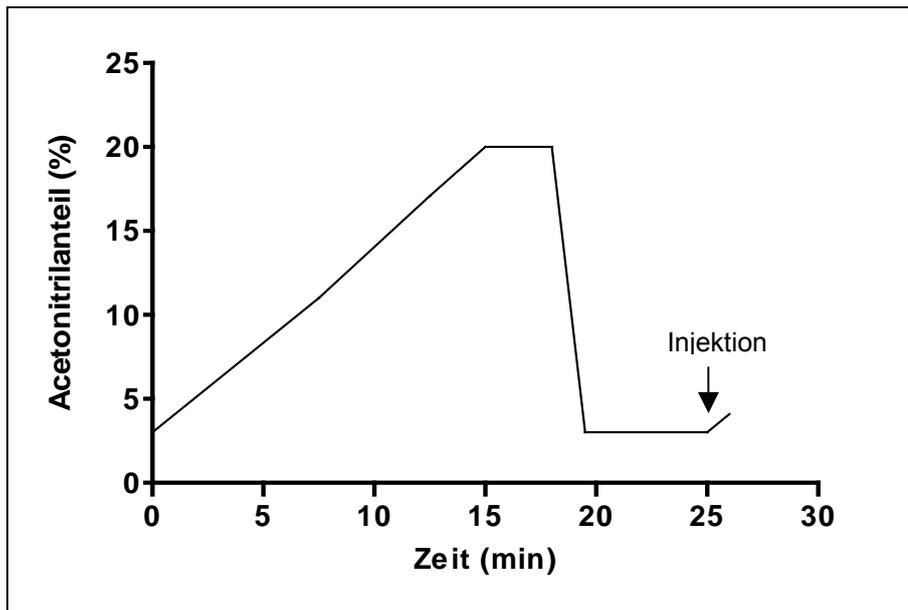
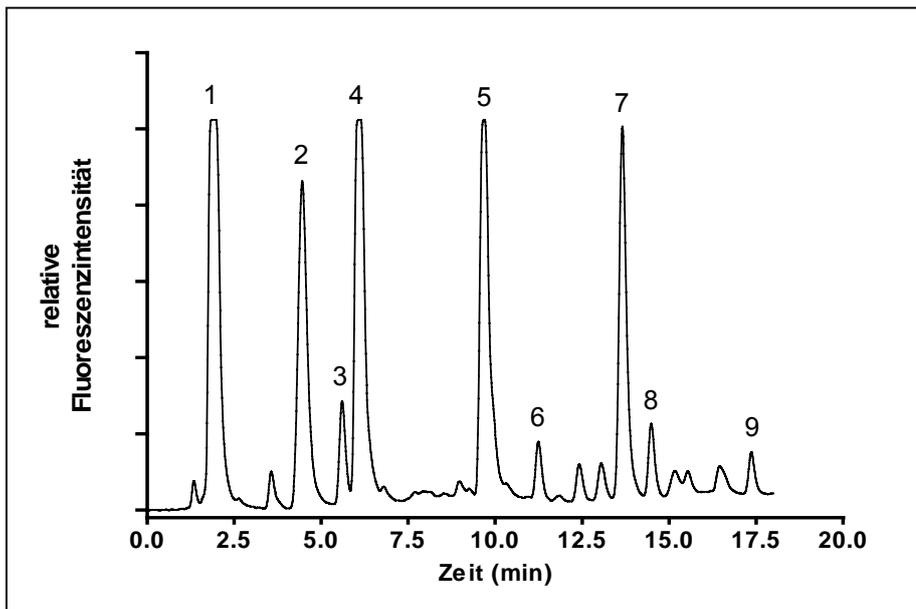


Abb. 5: Zeitlicher Verlauf des Gradienten.

Jeweils 20  $\mu$ l des klaren Überstandes mit 6-Thioguanosin-Nukleotiden wurden über eine 50  $\mu$ l Injektionsschleife auf das System aufgegeben. Die Fließmittelschwindigkeit betrug 1 ml/min, das Eluat passierte einen UV-Detektor (SPD 10A) bei 290 nm, anschließend einen 2. UV-Detektor (SPD 6A) bei 246 nm bevor die Oxidation der Thiolgruppen in der photochemischen Reaktionseinheit erfolgte. Anschließend wurde die Fluoreszenz bei Ex. 315 nm und Em. 390 nm gemessen. Nach 1,8 min war der erste Peak erkennbar; alle erwarteten Peaks eluierten innerhalb von 17 min.

Unter diesen chromatografischen Bedingungen konnten die Nukleotide in den untersuchten Patientenproben unter 6-MP- bzw. 6-TG-Therapie (Abb. 6, 7, 8) ausreichend getrennt und quantifiziert werden.

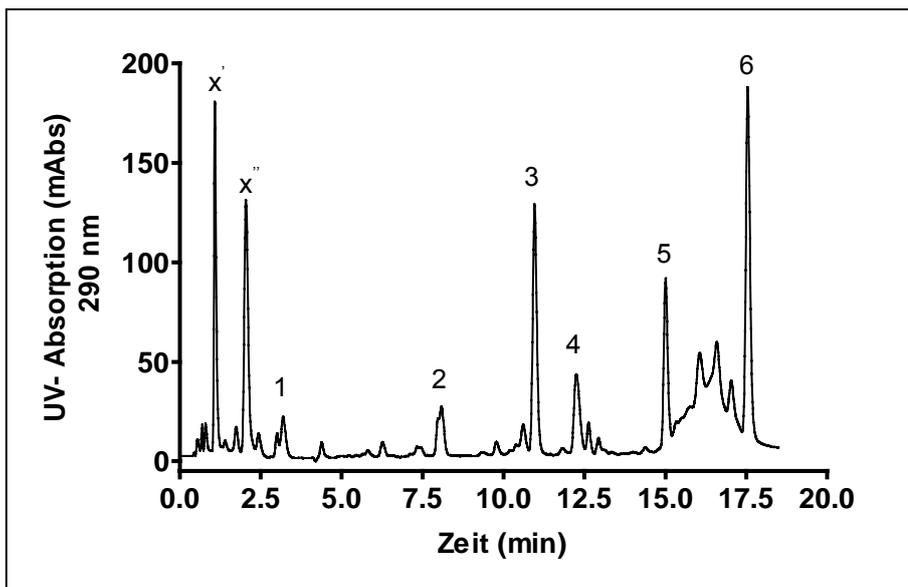
Die Abb. 6 zeigt ein Chromatogramm als Beispiel einer Patientenprobe nach Behandlung mit 6-TG.



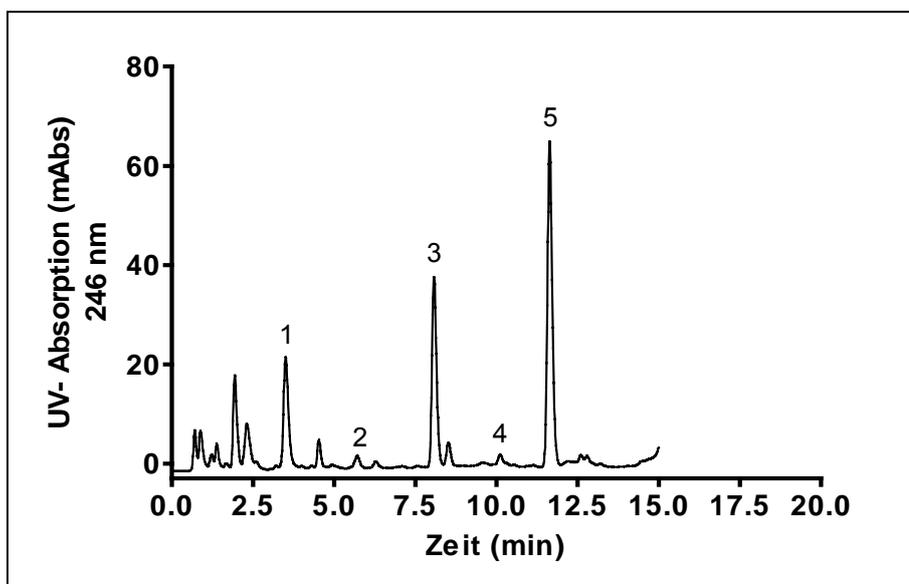
**Abb. 6:** Chromatogramm (Fluoreszenzsignal Ex. 315 nm, Em. 390 nm) einer Patientenprobe nach Behandlung mit 6-TG im Protokoll III/2 der ALL-BFM 2000 Studie. Gezeigt werden *in vivo* entstandene Nukleotide von 6-TG. Erklärung: 1. Stör-„Peak“, 2. 6-Thioguanosin-5'-Monophosphat, 3. und 4. unbekannte Metabolite, 5. 6-Thioguanosin-5'-Diphosphat, 6. 6-Methylthioguanosin-5'-Monophosphat, 7. 6-Thioguanosin-5'-Triphosphat, 8. 6-Methylthioguanosin-5'-Diphosphat, 9. 6-Methylthioguanosin-5'-Triphosphat.

Die Abb. 7 zeigt das Chromatogramm einer Patientenprobe nach Behandlung mit 6-MP im Protokoll I/2 der ALL-BFM 2000 Studie. Dargestellt ist die UV-Absorption bei 290 nm zum Nachweis der 6-Methylthioinosin-Nukleotide.

Für die Quantifizierung der endogenen Purinnukleotide wurde mit einem weiteren UV-Detektor (Shimadzu SPD 6A) die Absorption bei einer Wellenlänge von 246 nm gemessen (Abb. 8).



**Abb. 7:** Chromatogramm einer Patientenprobe nach Behandlung mit 6-MP im Protokoll I/2 der ALL-BFM 2000 Studie. Registrierung der UV-Absorption bei 290 nm. Dargestellt sind die *in vivo* entstandenen Metabolite von 6-MP und die Adenosin-Nukleotide. Erklärung: 1. Adenosin-5'-Monophosphat, 2. Adenosin-5'-Diphosphat, 3. 6-Methylthioinosin-5'-Monophosphat, 4. Adenosin-5'-Triphosphat, 5. 6-Methylthioinosin-5'-Triphosphat, 6. 6-Methylthioinosin-5'-Diphosphat, x' und x'' unbekannte Peaks.



**Abb. 8:** Chromatogramm einer Patientenprobe registriert bei 246 nm, dem UV-Maximum der Adenosin-Nukleotide. Erklärung: 1: Adenosin-5'-Monophosphat, 2: Guanosin-5'-Diphosphat, 3: Adenosin-5'-Diphosphat, 4: Guanosin-5'-Triphosphat, 5: Adenosin-5'-Triphosphat.

#### **3.4.4. Bestimmung der UV-Maxima und des molaren Absorptionskoeffizienten**

Zur Bestimmung der spezifischen Absorption von 6-Thioguanin und seinen Metaboliten wurden Verdünnungen (0,024 mmol/l) aus den entsprechenden Stammlösungen (siehe 3.1.1.) hergestellt. Die von der Firma Jena Bioscience synthetisierten Substanzen 6-Thioguanosin-5'-Di- und Triphosphat lagen als wässrige Lösung mit einer nominalen Konzentration von 1 mmol/l vor.

Von Guanin und Guanosin wurden Stammlösungen mit 0,66 mmol/l in Aqua dest. hergestellt. Die Auflösung wurde durch 15 min Beschallung im Ultraschallbad beschleunigt. Die Stammlösungen von Guanosin-5'-Mono-, Di- und Triphosphat wurden auf eine Konzentration von 6,6 mmol/l gebracht und vor der Versuchsdurchführung auf die Konzentration von 0,66 mmol/l mit Aqua dest. verdünnt. Die Molekulargewichte und Reinheiten der Stoffe sind in der Tab. VII im Anhang zusammengestellt.

Alle Thiopurin-Stammlösungen wie auch die Stammlösungen von Guanin, Guanosin und deren Nukleotiden wurden bei 4°C gelagert und direkt vor der Versuchsdurchführung auf die gewünschte Konzentration von 0,024 mmol/l mit einem 0,2 mol/l Citratpuffer pH 5,2 verdünnt. Wässrige 1 mmol/l Lösungen der 6-Thioguanosin-5'-Di- und Triphosphate wurden bei -20°C gelagert. Sie wiesen eine Stabilität von 12 Monaten auf.

Von 6-TG, 6-TG-R, 6-TG-DP, 6-TG-TP, 6-MTG, 6-MP, 6-MP-R, 6-MMP und 6-MMP-R wurden mit einem Uvikon-Zweistrahlspektrometer in Quarzküvetten die UV-Spektren bestimmt. Aus den Spektren wurden die Absorptionsmaxima bestimmt und mit den publizierten Daten verglichen. Diese wurden für 6-Thioguanin, 6-Thioguanosin sowie ihren Nukleotiden zu 342 nm ermittelt und der molare Absorptionskoeffizient berechnet.

#### **3.4.5. Statistik**

Alle Inkubationen wurden als Doppelansätze durchgeführt. Für die Auswertung der Ergebnisse wurde das Programm Graph Pad Prism 4.0 verwendet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Methodenoptimierung

#### 4.1.1. Retentionszeiten und Fluoreszenzcharakteristika der Purin-Derivate

Die chromatographischen Eigenschaften von 6-Thioguanin, 6-Mercaptopurin und ihren Metaboliten wurden, soweit kommerziell erhältlich, mit Standardsubstanzen ermittelt. In den Tab. 2 a-d sind die absoluten Retentionszeiten ( $R_t$ ) der untersuchten Purine in Minuten angegeben. Die Durchbruchzeit unter den gewählten chromatographischen Bedingungen betrug 1,8 min. Die „Peak“-Fläche der Fluoreszenzintensität wurde jeweils mit und ohne photochemischer Reaktionseinheit (PCRE) ermittelt. Zur Standardisierung sind die Messintensitäten jeweils in Prozent des Messwertes für 6-Thioguanin angegeben. In gleicher Weise wie für 6-Thioguanin wurden auch für 6-Mercaptopurin (Tab. 2b) sowie für 6-Thioxanthin (Tab. 2c) die Eigenfluoreszenz sowie die Fluoreszenz nach Aktivierung durch die PCRE bestimmt. Wie aus der Tab. 2a zu ersehen ist, war bei 6-TG und den nicht methylierten Metaboliten des 6-TG im nativen Zustand kein Fluoreszenzsignal nachweisbar. Bei den methylierten 6-Thioguanin-Metaboliten (6-Methylthioguanin und 6-Methylthioguanosin), bei denen auch ohne PCRE ein Signal gefunden wurde, war die Fluoreszenzintensität bei äquimolarer Konzentration in etwa gleich der Intensität von 6-Thioguanin mit PCRE.

Die Tab. 2d zeigt die Retentionszeiten von Adenin, Guanin und deren Phosphoribosiden sowie die für die Messung eingesetzte Wellenlänge. Alle untersuchten endogenen Purine wiesen unter den gegebenen Bedingungen weder mit noch ohne PCRE eine Fluoreszenz auf.

Die in den Tab. 2 a-d angegebenen UV-Maxima sind aus Spektren selbst ermittelt oder aus der Literatur übernommen worden.

**Tab. 2a:** Chromatographische Kenngrößen, Fluoreszenzintensität und UV-Maxima von 6-Thioguanin und seinen Metaboliten.

Nr.	Substanzen	Rt (min)	Intensität (%)		UV-max $\alpha$ (nm)
			mit PCRE	ohne PCRE	
1	6-Thioguanin	1,8	100	Ø	342
2	6-Thioguanosin	2,6	120	Ø	342
3	6-Thioguanosin-5'-Monophosphat	4,3	keine Referenzsubstanzen		342
4	6-Thioguanosin-5'-Diphosphat	9,3	115	Ø	342
5	6-Thioguanosin-5'-Triphosphat	13,1	130	Ø	342
6	6-Methylthioguanin	4,8	80	95	320
7	6-Methylthioguanosin	6,3	80	90	320
8	6-Methylthioguanosin-5'-Monophosphat	10,9	keine Referenzsubstanzen		320
9	6-Methylthioguanosin-5'-Diphosphat	14,2	keine Referenzsubstanzen		320
10	6-Methylthioguanosin-5'-Triphosphat	16,5	30	30	320

Ø= kein Fluoreszenzsignal

**Tab. 2b:** Chromatographische Kenngrößen, Fluoreszenzintensität und UV-Maxima von 6-Mercaptopurin und seinen Metaboliten.

Nr.	Substanzen	Rt (min)	Intensität (%)		UV-max $\alpha$ (nm)
			mit PCRE	ohne PCRE	
11	6-Mercaptopurin	2,0	4,4	Ø	320
12	6-Mercaptopurinribosid	2,8	3,5	Ø	320
13	6-Thioinosin-5'-Monophosphat	5,0	3,5	Ø	320
14	6-Methylmercaptopurin	5,1	Ø	Ø	290
15	6-Methylmercaptopurinribosid	7,2	Ø	Ø	290
16	6-Methylthioinosin-5'-Monophosphat	10,8	Ø	Ø	290
17	6-Methylthioinosin-5'-Diphosphat	14,5	keine Referenzsubstanzen		290
18	6-Methylthioinosin-5'-Triphosphat	17,1	keine Referenzsubstanzen		290

Ø= kein Fluoreszenzsignal

**Tab. 2c:** Chromatographische Kenngrößen, Fluoreszenzintensität und UV-Maxima der Metaboliten von 6-Mercaptopurin und 6-Thioguanin.

Nr.	Substanzen	Rt (min)	Intensität (%)		UV-max $\alpha$ (nm)
			mit PCRE	ohne PCRE	
19	6-Thioxanthin	3,1	22	Ø	342
20	6-Thioharnsäure	3	qualitativ	Ø	342
21	8-Hydroxy-6-Mercaptopurin	2,4	12,1	Ø	290

Ø= kein Fluoreszenzsignal

**Tab. 2d:** Chromatographische Kenngrößen von Adenin, Adenosin, Adenosin-Nukleotiden, Guanin, Guanosin, Guanosin-Nukleotiden und dem Metaboliten Hypoxanthin.

Nr.	Substanzen	Rt (min)	verwendete UV $\alpha$ (nm)	gemessene Absorption bei 246 nm (0,024 mmol/l)
22	Adenin	1,2	246	
23	Adenosin	2,3	246	
24	Adenosin-5'-Monophosphat	3,5	246	
25	Adenosin-5'-Diphosphat	7,7	246	
26	Adenosin-5'-Triphosphat	11,3	246	
27	Guanin	0,8	246*	0,298
28	Guanosin	1,4	246*	0,326
29	Guanosin-5'-Monophosphat	2,1	246*	0,284
30	Guanosin-5'-Diphosphat	5,9	246*	0,296
31	Guanosin-5'-Triphosphat	10,1	246*	0,312
32	Hypoxanthin	0,8	246*	

\* Für Guanin und -Derivate und Hypoxanthin entspricht diese Wellenlänge nicht dem Maximum.

#### 4.1.2. Identifizierung und Standardisierung der Thiopurin-Nukleotide

Zu Beginn meiner Untersuchungen waren von den Thiopurin-Ribosiden und -Nukleotiden nur das 6-Thioguanosin, 6-Mercaptopurin-Ribosid (6-Thioinosin),

6-Thioinosinsäure und 6-Methylthioinosin käuflich zu erwerben bzw. lagen als Reinsubstanz vor. 6-Methylthioguanosin wurde von mir nach Keuzenkamp-Jansen et al. 1995 synthetisiert.

Nach Inkubation von Erythrozyten mit 6-TG entstanden in der Zeit drei Substanzen, die nach Trennung auf der HPLC durch Analogie im chromatographischen Verhalten zu Adenosin-5'-Mono-, Di- und Triphosphat als 6-Thioguanosin-5'-Mono-, Di- und Triphosphat eingestuft wurden. Zur weiteren Abklärung wurden die Fraktionen aufgefangen und einer Säurehydrolyse unterzogen. Alle drei Substanzen eluierten danach als 6-TG von der Säule. Zusätzlich wurden die aufgefangenen Fraktionen mit saurer Phosphatase behandelt, wobei das spekulative Triphosphat, über Di- und Monophosphat zum Ribosid umgesetzt wurde. Damit war die Identität der gefundenen Substanzen gegeben. In Analogie wurde mit den in Patientenerthrozyten gefundenen unbekanntem Substanzen verfahren, die ich aufgrund von Retentionszeiten und UV- bzw. Fluoreszenzverhalten spekulativ als Mono-, Di- und Triphosphat von 6-Methylthioinosin bzw. 6-Methylthioguanosin angesehen hatte.

Die Quantifizierung erfolgte über die Fläche der eluierenden Substanzen (Peaks) im Chromatogramm. Für 6-TG, 6-TG-Ribosid und 6-TGN wurde die Fluoreszenz bei Ex. 315 nm und Em. 390 nm nach Oxidation in der PCRE registriert. Dabei zeigte sich bei den Inkubationsversuchen mit Erythrozyten, dass die Gesamtfläche der Peaks (Mono-, Di- und Triphosphat) trotz Umwandlung ineinander in der Zeit praktisch konstant war und der Fläche des zugesetzten 6-TG entsprach. Hieraus habe ich geschlossen, dass die nach der Oxidation in der PCRE entstehende Fluoreszenz von 6-TG und der 6-Thioguanosin-Nukleotide identisch ist. Ich habe deshalb bei allen Untersuchungen die Eichung mit einem wässrigen 6-TG-Standard (25 ng/ml) durchgeführt.

Die Quantifizierung der 6-MTG-Nukleotide erfolgte über Fluoreszenz und Einpunkt-Kalibrierung mit 6-MTG (100 ng/ml). Es zeigte sich früh, dass bei 6-MTG-Ribosid die Phosphorylierung zu einer starken Abnahme der Fluoreszenzintensität führt.

Die 6-Methylthioinosin-Nukleotide werden über ihre UV-Absorption bei 290 nm detektiert und quantifiziert. Nach Auskunft von Prof. Breter (Institut für physiologische Chemie und Pathobiochemie, Universität Mainz), hat die Anzahl der

Phosphatreste keinen wesentlichen Einfluss auf die UV-Absorption der natürlichen Purin-Nukleotide. Deshalb habe ich die Quantifizierung der 6-Methylthioinosin-Nukleotide mit einem wässrigen Einpunkt-Standard (1 µg/ml) von 6-MMP durchgeführt.

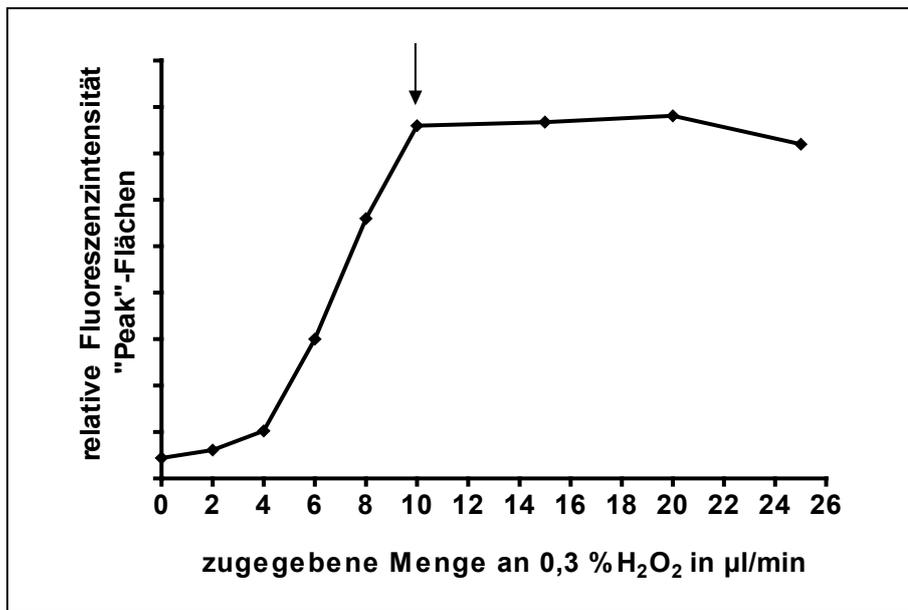
Im Januar 2003 konnte ich von der Firma Jena Bioscience 6-Thioguanosin-5'-Triphosphat erwerben. Die Substanz wurde als 1 mmol/l wässrige Lösung vertrieben. Eigene Untersuchungen mit HPLC und UV-Absorption ergaben, dass die nominale Konzentration nicht stimmen konnte, dies wurde auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt. Somit konnte die Substanz ebenso wie das gleichzeitig gelieferte 6-Thioguanosin-5'-Diphosphat nur zur Identifizierung aber nicht zur Quantifizierung verwendet werden.

#### **4.1.3. Bestimmung von 6-Thioguanosin-Nukleotiden durch Gradienten-HPLC**

Durch die Umstellung des isokratischen HPLC-Verfahrens auf eine HPLC mit binärem Gradienten wurde die Trennleistung deutlich verbessert. Die Verwendung einer kürzeren Säule (LiChroCART<sup>®</sup> 55-4, Purosphere<sup>®</sup> Star RP 18 endcapped 60x4 mm, Partikeldurchmesser 3 µm, Firma E. Merck, Darmstadt), die Senkung des pH-Wertes von 7,9 auf 7,0 und eine Erhöhung der Fließgeschwindigkeit auf 1 ml/min verkürzte die Retentionszeit und erhöhte die Symmetrie der Peaks.

Da die Nachweisbarkeit des nicht fluoreszierenden 6-Thioguanins und seiner Nukleotide von der Menge an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sowie der UV-Bestrahlung abhängt, wurden diese beiden Parameter variiert. Die Erhöhung des Wasserstoffperoxids von 5 µl/min auf 10 µl/min führte zum Anstieg des Fluoreszenzsignals (Abb. 9). Im Bereich zwischen 10 und 20 µl/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> blieb die Fluoreszenzintensität von 6-Thioguanin konstant.

Für die HPLC-Analytik wurde 10 µl/min H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gewählt, da durch größere Mengen an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> das 6-Methylthioguanin und seine Nukleotide zerstört wurden.



**Abb. 9:** Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Menge. Jeweils 20 µl einer 25 ng/ml 6-Thioguanin-Lösung wurden injiziert.

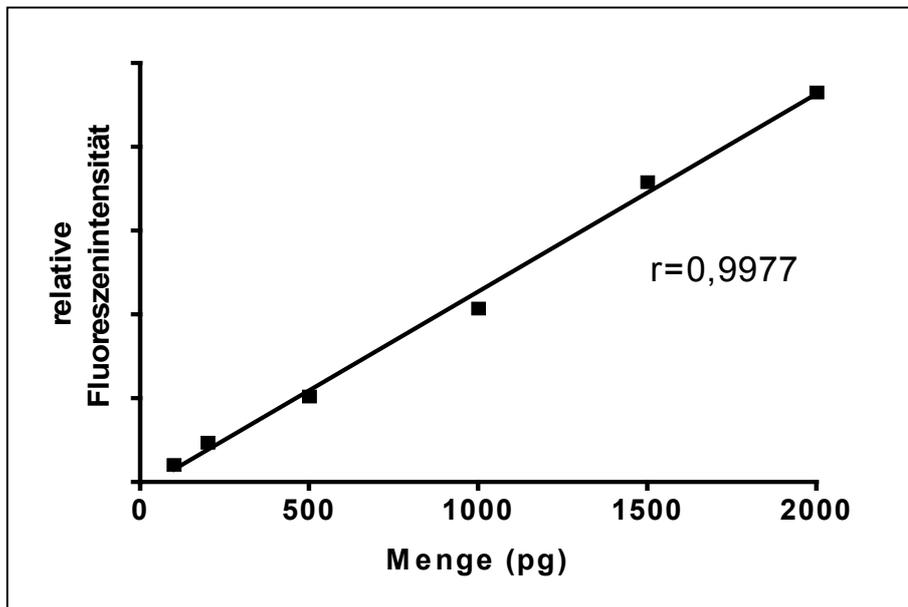
Die Durchflusszeit des Eluates durch den 2,5 m langen, 0,3 mm Durchmesser PTFE-Schlauch (Reaktionsschleife) in der PCRE beträgt bei einer Laufmittelschwindigkeit von 1 ml/min 11 sec. Eine Änderung der Länge der Reaktionsschleife zwischen 2 und 5 m hatte keinen wesentlichen Einfluss auf das 6-TG-Signal, während das Signal bei einer Reaktionsschleifenlänge von 1 m durch fehlende Oxidation und über 5 m durch oxidative Zerstörung abnahm.

Eine Erhöhung der Säulentemperatur auf bis zu 70°C brachte keine bessere Trennleistung. Eine Verkürzung der Retentionszeiten trat zwar ein, allerdings verschob sich der erste Peak (6-TG-MP) in einen Stör-„Peak“ zum Retentionszeitpunkt von 1,8 min. Daher wurden die Untersuchungen bei Raumtemperatur durchgeführt.

#### 4.1.4. Linearität und Nachweisgrenze

Die Linearität wurde durch Analyse steigender 6-TG-Mengen (100-2000 pg aufgegebene Substanzmenge) bestimmt; jede Analyse wurde dreimal durchgeführt. In der Abb. 10 sind die erhaltenen „Peak“-Flächen gegen die aufgegebene 6-TG-Menge aufgetragen; wegen der geringen Streuung der Messwerte sind die

Fehlerbalken kleiner als die Symbole. Für die Bestimmung des 6-TG über die Fluoreszenz ergab sich ein Korrelationskoeffizient von  $r=0,9977$ .



**Abb. 10:** Zusammenhang zwischen 6-TG und Fluoreszenzdetektion. Auf die HPLC wurden 100 bis 2000 pg 6-TG aufgegeben und gegen das erhaltene Fluoreszenzsignal aufgetragen (Mittelwert von drei Analysen).

Auch für 6-MMP und 6-MTG wurde die Linearität der Eichkurven ermittelt, die über einen Konzentrationsbereich von 100 bis 1200 pg bei 6-MTG und von 2000 bis 12000 pg bei 6-MMP ebenfalls linear waren.

Die Nachweisgrenze von 6-Thioguanin, 6-Methylthioguanin und 6-Methylmercaptapurin wurde durch Analyse von Standardlösungen ermittelt. Als Peak wird bezeichnet, wenn der Flächeninhalt eines Signals mehr als das Dreifache des Grundrauschens entspricht. Diese Menge ist unter den Analysebedingungen detektierbar, d. h. vom Nullwert sicher zu unterscheiden, aber nicht notwendigerweise quantifizierbar.

Die Nachweisgrenze lag für 6-Thioguanin bei 15 pg (0,1 pmol), für 6-Methylthioguanin bei 20 pg (0,11 pmol) und für 6-Methylmercaptapurin bei 30 pg (0,2 pmol). Die Quantifizierungsgrenze der Substanzen lag für 6-TG bei 50 pg, für 6-Methylthioguanin bei 70 pg und für 6-Methylmercaptapurin bei 150 pg. Bei den Werten handelt es sich um die Werte für die Basen der Thiopurine. Die Nachweisgrenze der Nukleotide ist unterschiedlich und von der Retentionszeit und der

Fluoreszenzintensität abhängig. Da die Nukleotide längere Retentionszeiten als die freien Basen haben, ist die Nachweisgrenze der Nukleotide bei gleicher Fluoreszenzintensität größer, d. h. die erforderliche Konzentration höher.

#### 4.1.5. Präzision der Methode

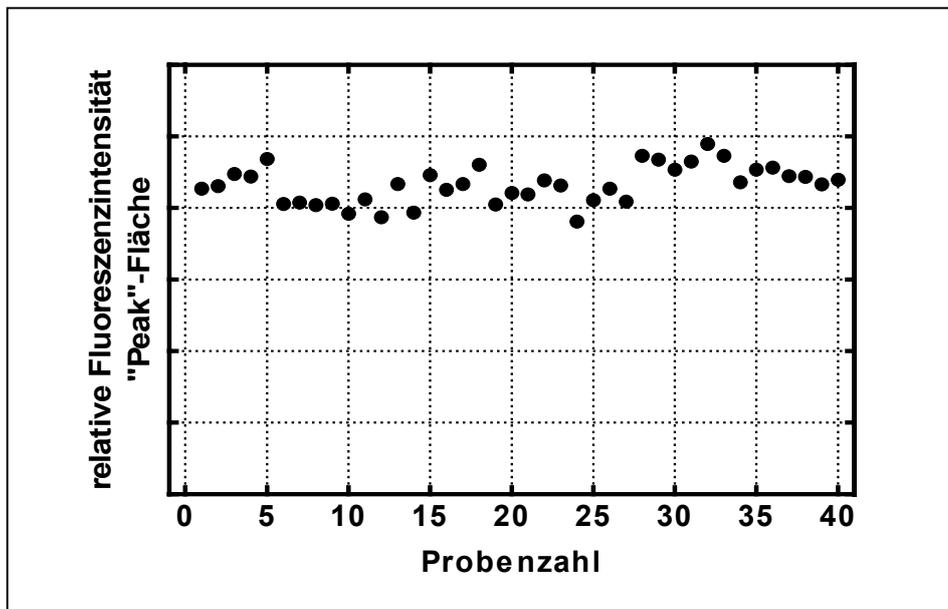
Zur Bestimmung der Präzision der Methode wurde eine Lösung mit 6-TGN 10 mal am gleichen Tag („Intraday“-Variability) bzw. 40 mal an aufeinander folgenden Tagen während eines Zeitraums von 6 Monaten analysiert („Interday“-Variability). Die Lösung wurde durch Inkubation von frischen Erythrozyten mit 0,042 mmol/l 6-TG-Lösung für 1,5 h hergestellt. Nach der Proteinfällung wurde der nukleotidhaltige Überstand (Testlösung) aliquotiert und eingefroren. Zur Analyse wurde die Testlösung 1:10 verdünnt.

Aus den „Peak“-Flächen des 6-Thioguanosin-5'-Monophosphates, 6-Thioguanosin-5'-Diphosphates und 6-Thioguanosin-5'-Triphosphates wurde der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt. Die Summe der Flächen der 6-TGN streuten nur wenig ( $VK < 1,8\%$ ). Für die einzelnen Phosphate sind die Variationskoeffizienten der Tab. 3 zu entnehmen.

**Tab. 3:** „Intraday“-Variabilität der gemessenen 6-TGN in der Testlösung (n=10).

Substanz	MW-„Peak“-Fläche	SD±	VK (%)
6-TG-MP	1211,7	61,1	5,04
6-TG-DP	1292,2	63,6	4,92
6-TG-TP	10798,7	220,9	2,05

Für die „Interday“-Variabilität wurde die Testlösung an 40 verschiedenen Tagen jeweils doppelt gemessen. Aus den „Peak“-Flächen des 6-Thioguanosin-5'-Mono-, 6-Thioguanosin-5'-Di- und 6-Thioguanosin-5'-Triphosphates wurden der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt (Tab. 4).



**Abb. 11:** Präzision der 6-TGN-Bestimmung. Eine durch Inkubation von Erythrozyten mit 6-TG erhaltene Lösung mit 6-TGN wurde an 40 aufeinander folgenden Tagen analysiert. Die Summe der Fluoreszenzsignale für 6-TG-MP, 6-TG-DP und 6-TG-TP sind in der zeitlichen Reihenfolge der Analyse aufgetragen.

Die Summe der Flächen der 6-Thioguanosin-Nukleotide streute in den 40 Tagen um 6 %. Die Schwankungen zeigen, dass während der 6 Monate keine systematischen Abweichungen auftraten (Abb. 11). Ähnliche Streuungen wurden für die einzelnen Phosphate erhalten (Tab. 4).

**Tab. 4:** „Interday“-Variabilität der gemessenen 6-TGN in der Testlösung (n=40).

Substanz	MW-„Peak“-Fläche	SD±	VK (%)
6-TG-MP	1159,9	97,4	8,4
6-TG-DP	1377,3	111,4	8,1
6-TG-TP	10440,5	686,7	6,6

Außerdem wurde die Präzision auch mit einer 6-Thioguanin-Lösung bestimmt. Für die „Intraday“-Variabilität wurde die Lösung, wie oben beschrieben, 10 mal am gleichen Tag bzw. für die „Interday“-Variabilität 20 mal in einem Zeitraum von 2 Monaten analysiert. Die „Peak“-Flächen des 6-Thioguanins streuten bei der

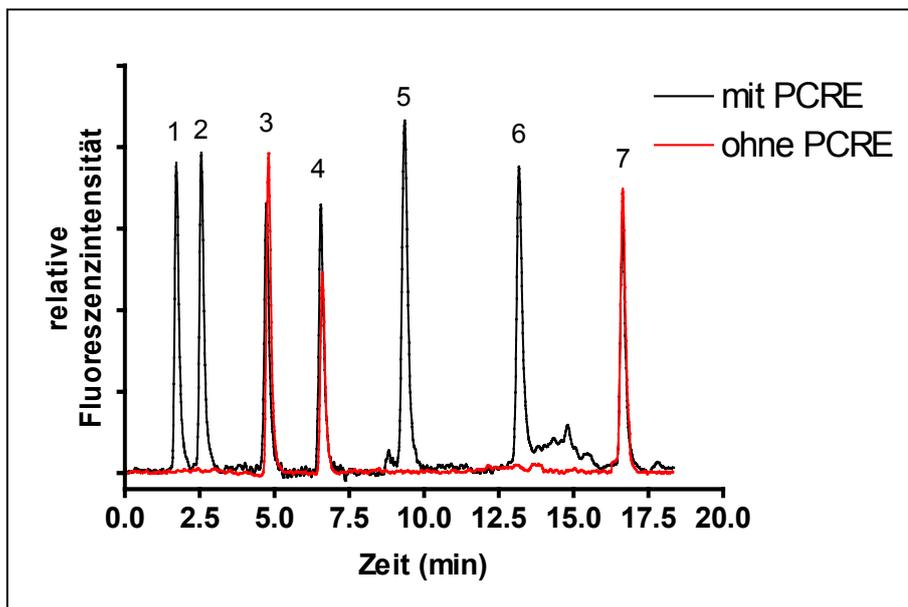
„Intraday“-Variabilität wenig (VK 2,2 %). Bei der „Interday“-Variabilität lag der Variationskoeffizient bei 7 % (Tab. 5).

**Tab. 5:** Präzision der Methode bei der Bestimmung einer 25 ng/ml 6-Thioguanin-Lösung. „Intraday“-Variabilität der 6-TG (n=10) und „Interday“-Variabilität der 6-TG (n=20).

6-Thioguanin	MW-„Peak“-Fläche	SD±	VK (%)
„Intraday“-Variabilität	3528	76,1	2,2
„Interday“-Variabilität	3711	262,5	7,0

#### 4.1.6. Selektivität

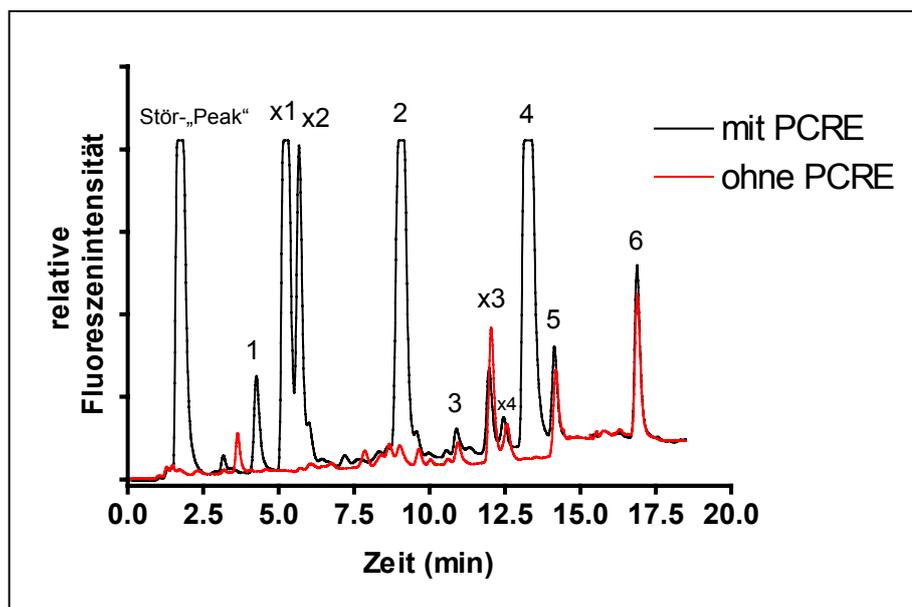
Zur Bestimmung der Selektivität wurden Reinsubstanzen von 6-TG, 6-TG-R, 6-MTG, 6-MTG-R und die Nukleotide in einem Gemisch hergestellt. Jeweils ein Aliquot dieser Mischung wurde ohne bzw. mit PCRE analysiert. Die aus diesen Analysen erhaltenen Chromatogramme sind in der Abb. 12 wiedergegeben.



**Abb. 12:** HPLC-Trennung der Thiopurine. Ein Gemisch aus Reinsubstanzen von 6-TG und seinen Metaboliten wurde ohne bzw. mit PCRE analysiert. Die Peaks entsprechen: 1. 6-Thioguanin, 2. 6-Thioguanosin, 3. 6-Methylthioguanin, 4. 6-Methylthioguanosin, 5. 6-Thioguanosin-5'-Diphosphat, 6. 6-Thioguanosin-5'-Triphosphat, 7. 6-Methylthioguanosin-5'-Triphosphat.

Ohne Oxidation sind 6-Thioguanin [1] und seine Metabolite [2, 5, 6] nicht nachweisbar, während 6-Methylthioguanin [3], 6-Methylthioguanosin [4] und 6-Methylthioguanosin-5'-Triphosphat [7] deutlich als Peaks erkennbar sind. Mit PCRE werden auch 6-Thioguanin und seine anabolen Metabolite nachweisbar, während die „Peak“-Fläche für 6-Methylthioguanin größer wird. Die Flächenzunahme entspricht den in der Tab. 2a angegebenen Verhältnissen der Fluoreszenz ohne bzw. mit PCRE.

Dieses Ergebnis wurde mit einer Patientenprobe bestätigt (Abb. 13). Mit PCRE sind: 6-Thioguanosin-5'-Monophosphat [1], 6-Thioguanosin-5'-Diphosphat [2] und 6-Thioguanosin-5'-Triphosphat [4] sichtbar. Zusätzlich sind Peaks unbekannter Struktur (x1 und x2) bei einer Rt von 5,2 min und 5,8 min, sowie zwei weitere unbekannte Peaks x3 und x4 bei Rt von 12 min und 12,5 min vorhanden. 6-Methylthioguanosin-5'-Mono- [3], Di- [5] und Triphosphat [6] sind ebenfalls zu sehen.



**Abb. 13:** HPLC-Trennung einer Patientenprobe mit und ohne PCRE. Die Peaks entsprechen: 1. 6-Thioguanosin-5'-Monophosphat, x1 und x2 unbekannte Peaks, 2. 6-Thioguanosin-5'-Diphosphat, 3. 6-Methylthioguanosin-5'-Monophosphat, x3 und x4 unbekannte Peaks, 4. 6-Thioguanosin-5'-Triphosphat, 5. 6-Methylthioguanosin-5'-Diphosphat, 6. 6-Methylthioguanosin-5'-Triphosphat.

Sicher können durch die Eigenfluoreszenz (ohne PCRE) nur die methylierten Metabolite (6-Methylthioguanosin-5'-Mono-, Di- und Triphosphat) nachgewiesen werden. Auch die unbekannt Peaks x3 und x4 haben eine Eigenfluoreszenz und sind ohne PCRE nachweisbar.

Unter den gewählten chromatographischen Standardbedingungen konnten alle in den Tab. 2 a-d aufgelisteten Substanzen gut voneinander getrennt werden. Die Abb. 12 zeigt die Trennung der Thiopurine, aufgegeben als Reinsubstanzen. Alle identifizierten Substanzen konnten als Peaks auf der Basislinie getrennt werden. Die Halbwertsbreite der Peaks betrug im Durchschnitt 15 sec.

Probleme der „Peak“-Trennung traten bei Patientenproben auf, wenn sie in sehr großer Menge die unbekannt Peaks x1 und x2 aufwiesen. Hier kam es zur teilweisen Überlagerung der beiden Peaks. Durch manuelles Setzen der Integrationsgrenzen konnten beide Peaks getrennt quantifiziert werden.

Analoge Probleme durch sehr nahe beieinander eluierende Peaks traten auch in anderen Experimenten auf, vor allem wenn große Peaks nachweisbar waren, bei denen es durch „Tailing“ zu einem verzögerten Abfall des Signals auf die Nulllinie kam. Bei der Inkubation von Zelllinien trat eine Überlagerung der Metabolite von 6-Mercaptopurin auf, bei dem das entstandene 6-Thioguanosin-5'-Monophosphat durch den Hauptmetaboliten 6-Thioinosin-5'-Monophosphat leicht überlagert wurde. Auch bei der Inkubation von 6-Thioguanin mit Zelllinien wurde das 6-Thioguanosin-5'-Monophosphat von dem nur *in vitro* entstandenen 6-Methylthioguanin überlagert. In beiden Fällen handelt es sich allerdings um Substanzen, die in Patientenproben nicht nachweisbar waren.

#### **4.1.7. Stabilität**

##### **4.1.7.1. Stabilität der 6-Thioguanosin-Nukleotide im Überstand**

Da die HPLC-Analytik mit einem Injektionsautomaten durchgeführt wird und je nach Anzahl der Proben die letzten 12-18 h bei Raumtemperatur stehen, musste die Stabilität der 6-TGN im Überstand nach Proteinfällung überprüft werden.

Die Stabilität der 6-TGN im Überstand nach Proteinfällung wurde bei Raumtemperatur über 6 Tage (Kurzzeitstabilität) und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  über 18 Monate (Langzeitstabilität) ermittelt.

Für die Stabilität des Überstandes nach Proteinfällung bei Raumtemperatur wurde eine frisch hergestellte 6-TGN-Testlösung verwendet. Die Probe wurde sofort bzw. nach 24, 48 und 144 h analysiert.

Die erhaltenen „Peak“-Flächen für die 6-TGN sind in der Tab. 6 zusammengestellt. Bei bis zu 48 h Lagerung der Proben bei Raumtemperatur konnte keine wesentliche Umwandlung der Nukleotide vom Triphosphat zum Monophosphat festgestellt werden. Nach 144 h war allerdings die Gesamtmenge der 6-TGN deutlich auf 43 % abgefallen. Bei den parallel gemessenen Phosphaten des Adenosins trat innerhalb von 48 h ebenfalls nur eine geringe Umwandlung auf. Nach 144 h wurden 64 % der Nukleotide als Adenosin wieder gefunden.

Daraus lässt sich schließen, dass die Phosphate des 6-Thioguanosins im Überstand nach Proteinfällung des Hämolyrates bei Raumtemperatur eine Stabilität von 48 h aufweisen.

Die 6-TGN-Testlösung wurde bei allen routinemäßigen Analysen während einer Zeit von 18 Monaten mituntersucht, um die einwandfreie Funktion der Methode zu kontrollieren. Hieraus lässt sich eine Aussage zur Langzeitstabilität bei Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  herleiten. Exemplarisch sind im Abstand von jeweils 135 Tagen erhaltene „Peak“-Flächen in der Tab. 7 wiedergegeben. Auch 18 Monate nach der Inkubation und Lagerung der Proben bei  $-20^{\circ}\text{C}$  wurde kein Abfall bzw. Verlust bei den Nukleotiden beobachtet.

Die im gleichen Ansatz mitgemessenen Adenosin-Nukleotide zeigten die gleiche Kurzzeitstabilität bei Raumtemperatur und Langzeitstabilität bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Tab. 6:** Kurzzeitstabilität von 6-TG und seinen Metaboliten über 144 h Lagerung der Überstände bei Raumtemperatur.

Stunden	6-TG-MP	6TG-DP	6-TG-TP	Σ Nukleotide
0	1191	1347	10176	12714
24	1139	1425	9660	12224
48	1384	1165	9714	12263
144	216	411	4898	5525

**Tab. 7:** Langzeitstabilität von 6-TG und seinen Metaboliten über 18 Monate Lagerung der Überstände bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Tage	6-TG-MP	6-TG-DP	6-TG-TP	Σ Nukleotide
1	1261	1326	10999	13586
135	1197	1281	11026	13504
270	1193	1357	10550	13100
405	1142	1244	10731	13117
540	1204	1251	10759	13214

#### 4.1.7.2. Stabilität der Thiopurine im Überstand nach Proteinfällung von Patientenproben

Da in den Blutproben von Patienten, die mit Azathioprin oder 6-Mercaptopurin behandelt werden, neben den 6-TGN noch 6-Methylthioguanosin- und 6-Methylthioinosin-Nukleotide vorhanden sind, wurde der Versuch zur Stabilität der Nukleotide bei Raumtemperatur mit der Blutprobe eines behandelten Patienten wiederholt.

Hierzu wurde die Blutprobe aufgearbeitet und der Überstand sofort bzw. nach 24 und 48 h Lagerung des Aliquots bei  $22^{\circ}\text{C}$  analysiert.

Nach den ersten 24 h Lagerung des Überstandes konnte kein Abfall bei den Thiopurin-Nukleotiden festgestellt werden. Jedoch wurde nach 48 h Lagerung der Proben bei  $22^{\circ}\text{C}$  eine Abweichung von 12 % in der Gesamtfläche der 6-TGN

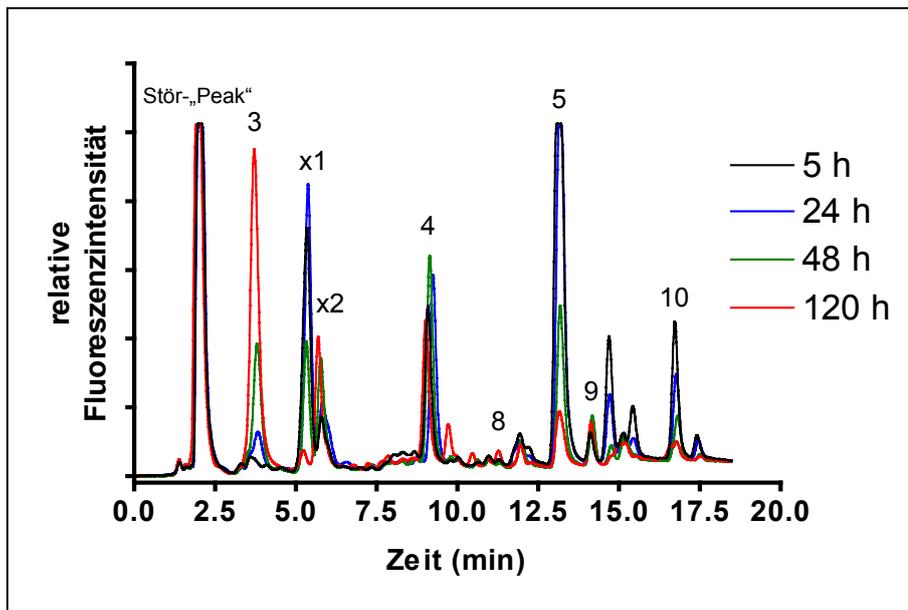
beobachtet. Ebenfalls konnte ein Abfall der 6-Methylthioguanosin- und 6-Methylthioinosin-Nukleotide zwischen den beiden Analysezeitpunkten (24 und 48 h) gesehen werden. Die Nukleotide in einem Überstand einer Patientenprobe nach Proteinfällung eines Hämolysates weisen eine Stabilität von 24 h auf.

#### **4.1.7.3. Stabilität der Nukleotide im Vollblut von behandelten Patienten**

Die Stabilität von 6-TGN wurde an einer Patientenprobe aus Lübeck untersucht. Diese Probe war für die routinemäßige Bestimmung von 6-TGN abgenommen worden und gelangte ca. 5 h nach Abnahme in unser Labor. Sie wurde auf dem Labortisch bei Raumtemperatur (22°C) stehen gelassen und ein Aliquot sofort entnommen, aufgeköcht und analysiert. Jeweils zu den Zeitpunkten 24, 48, 72, 96 und 120 h wurde ein weiteres Aliquot der Blutprobe aufgearbeitet. Die Abb. 14 zeigt die erhaltenen Chromatogramme.

Wie aus der Abb. 14 und der Tab. 8 zu erkennen ist, wurden die Nukleotide des 6-Thioguanins schnell abgebaut. Bereits 24 h nach der Blutabnahme fand sich eine Abnahme des 6-Thioguanosin-5'-Triphosphates [5] um 17 %, mit einer Zunahme des 6-Thioguanosin-5'-Diphosphates [4] um 16 % gegenüber den Werten nach 5 h. Nach 48 h fiel das 6-Thioguanosin-5'-Triphosphat [5] um 39 % ab, das Diphosphat nahm um 14 % zu, das 6-Thioguanosin-5'-Monophosphat [3] nahm um 68 % gegenüber 24 h zu.

Nach 120 h ist das 6-Thioguanosin-5'-Triphosphat [5] auf 14 % der Ausgangsmenge gefallen. Die Menge des 6-Thioguanosin-5'-Diphosphates [4] als Intermediärprodukt änderte sich kaum, während das 6-Thioguanosin-5'-Monophosphat [3] um das 8-fache im Vergleich zu den 24 h Werten zugenommen hat. Ähnlich verhalten sich die 6-Methylthioguanosin-Nukleotide. Das Triphosphat [10] des 6-Methylthioguanosins war nach 120 h auf 10 % des Ausgangswertes abgefallen, während das 6-Methylthioguanosin-5'-Monophosphat [8] nach 120 h um 45 % zunahm.



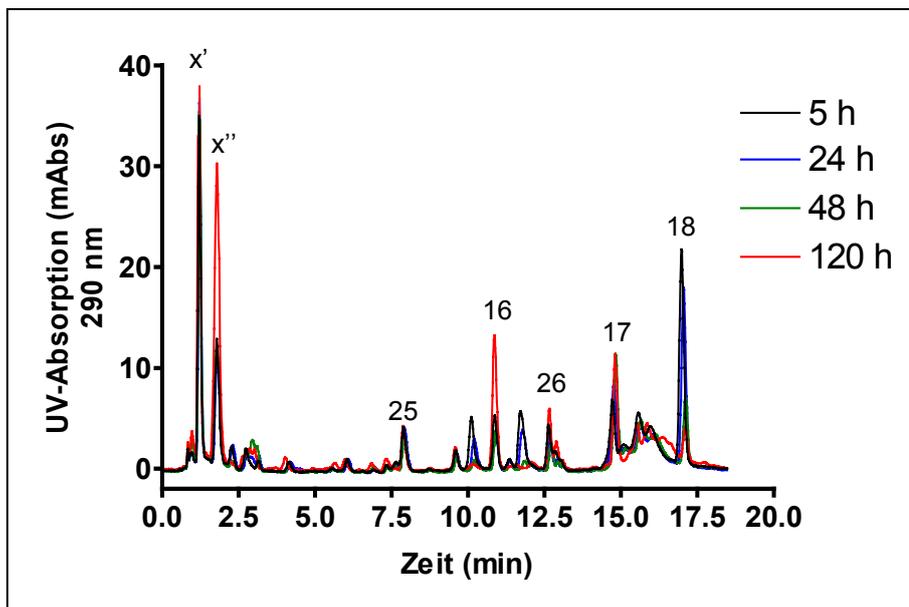
**Abb. 14:** Stabilität von 6-TG und seinen Metaboliten in der Vollblutprobe über 120 h. Die zu einem definierten Zeitpunkt entnommene Blutprobe eines behandelten Patienten wurde bei Raumtemperatur 5, 24, 48 und 120 h gelagert. Die nach der Aufarbeitung erhaltenen Überstände wurden direkt analysiert; die erhaltenen Chromatogramme sind in der Abbildung übereinander dargestellt. Die Zahlen über den Einzel-„Peaks“ entsprechen der Nummerierung der Tab. 2a.

**Tab. 8:** Stabilität von 6-TG und seinen Metaboliten in der Vollblutprobe über 120 h.

Zeitpunkt	6-TG-MP	6-TG-DP	6-TG-TP	Peak x1	Peak x2	6-MTG-MP	6-MTG-DP	6-MTG-TP
5 h	0	6185	24772	11748	2620	218	959	5348
24 h	1961	7267	19924	11872	3854	174	983	3423
48 h	6226	8298	7480	5201	5005	204	1792	1940
72 h	8604	4496	2578	2106	4822	222	1143	1591
96 h	12592	6363	2607	1190	5117	352	1672	961
120 h	17770	5760	3103	789	5689	394	1584	582

Die parallel aufgezeichneten Chromatogramme der 6-Methylthioinosin-Nukleotide (Abb. 15) zeigten einen ähnlichen Abfall wie die Nukleotide des 6-Thioguanosins (Abb. 14). Nach 24 bzw. 48 h bei Raumtemperatur beobachtete man einen

deutlichen Abfall des 6-Methylthioinosin-5'-Triphosphates [18] um 18 bzw. 58 %. Das 6-Methylthioinosin-5'-Diphosphat [17] nahm in der Zeit um 20 bzw. 26 % zu. Nach 120 h ist das 6-Methylthioinosin-5'-Triphosphat um 82 % abgefallen. Das 6-Methylthioinosin-5'-Diphosphat nahm in der Zeit um 40 % und das 6-Methylthioinosin-5'-Monophosphat [16] um 52 % zu, jeweils im Vergleich zum Zeitpunkt 5 h. Ferner entstehen nach 120 h zwei unbekannte ( $x'$  und  $x''$ ) Peaks bei einer  $R_t$  von 1,2 min und 1,7 min.



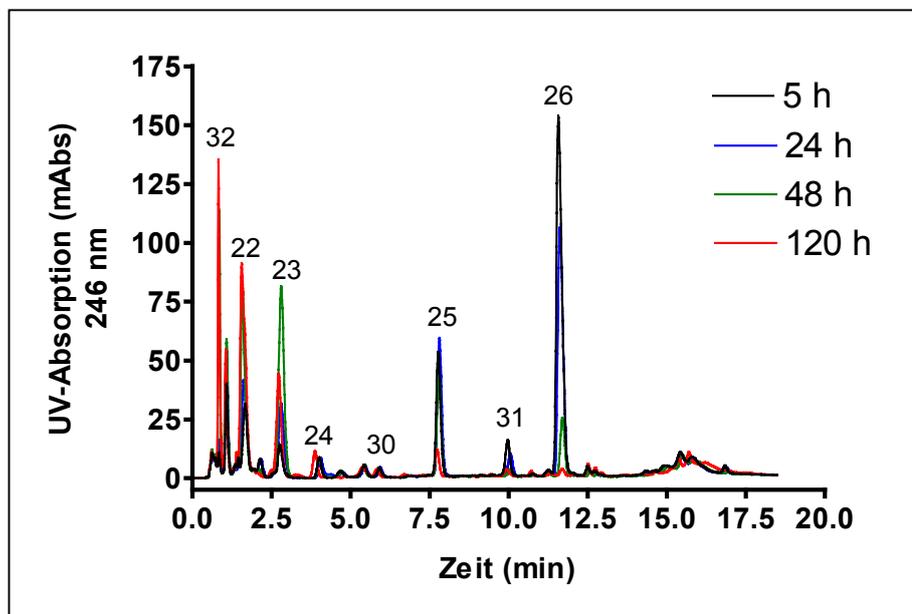
**Abb. 15:** Stabilität von 6-MMP-Nukleotiden in einer Vollblutprobe. Eine Blutprobe wurde zu einem definierten Zeitpunkt entnommen und bei Raumtemperatur 5, 24, 48 und 120 h gelagert. Die nach der Aufarbeitung erhaltenen Überstände wurden direkt analysiert. Die erhaltenen UV-Chromatogramme (290 nm) sind in der Abbildung übereinander dargestellt. Die Zahlen über den Einzel-„Peaks“ entsprechen der Nummerierung der Tab. 2b und 2d.

#### 4.1.7.4. Zeitlicher Abbau der Adenosinphosphate

Die endogenen Adenosin-Nukleotide wurden durch UV-Absorption bei 246 nm gemessen (Abb. 16). 5 h nach Abnahme wird für die Adenosin-Nukleotide im Blut des Patienten ein Mengenverhältnis von 4 % zu 25 % zu 71 % gefunden, das dem Verhältnis in den frischen Proben der Blutspender entspricht (Adenosin-5'-

Monophosphat 6,4 %, Adenosin-5'-Diphosphat 19,5 %, Adenosin-5'-Triphosphat 74,1 %).

Das Adenosin-5'-Triphosphat [26] nahm nach 24 h um 31 % ab, das Adenosin-5'-Diphosphat [25] nahm im gleichen Zeitraum um 9 % zu. Nach 48 h fiel das Adenosin-5'-Triphosphat um 84 % ab, nach 120 h war es fast verschwunden. Das Adenosin-5'-Diphosphat nahm ebenfalls um 78 % ab, während das Adenosin-5'-Monophosphat [24] nur wenig über die Zeit zunahm. Dafür erreichte Adenosin [23] nach 48 h sein Maximum, wurde aber nach 120 h über Adenin [22] zu Hypoxanthin [32] weiter abgebaut. Zur Verdeutlichung sind die Chromatogramme in der Abb. 16 übereinander dargestellt.



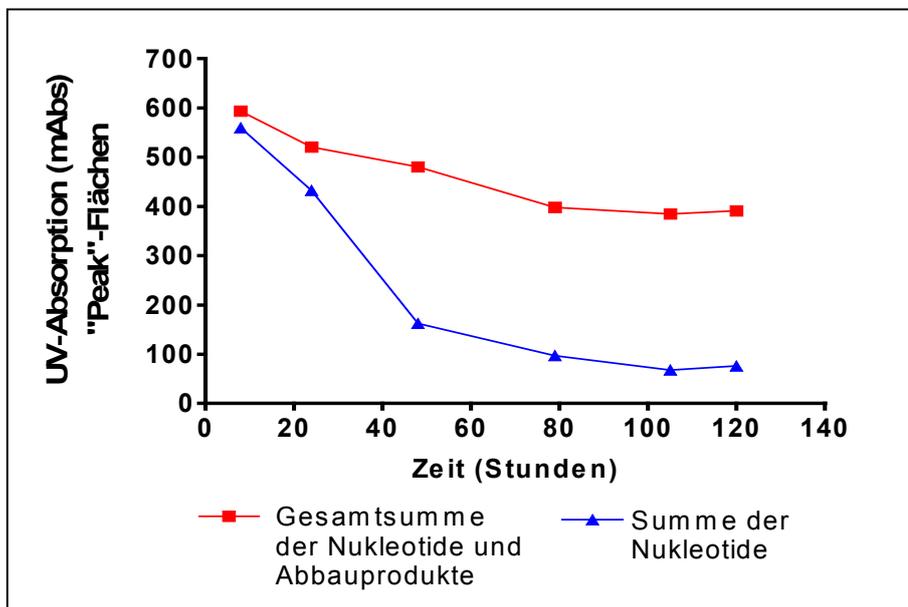
**Abb. 16:** Stabilität von Adenosin-Nukleotiden in einer Vollblutprobe. Eine Blutprobe wurde zu einem definierten Zeitpunkt entnommen und bei Raumtemperatur 5, 24, 48 und 120 h gelagert. Die nach der Aufarbeitung erhaltenen Überstände wurden direkt auf Adenosin und seine Nukleotide analysiert. Die erhaltenen UV-Chromatogramme (246 nm) sind in der Abbildung übereinander dargestellt. Die Zahlen über den Einzel-„Peaks“ entsprechen der Nummerierung der Tab. 2d.

Die zeitlichen Änderungen der Adenosin-Nukleotide sind in der Tab. 9 und Abb. 17 zusammengestellt.

**Tab. 9:** Zeitliche Änderung der Adenosin-Nukleotide in einer Patientenvollblutprobe nach 5 Tagen Lagerung bei Raumtemperatur. Im Vergleich die zeitliche Änderung der Nukleotide, die bei einer Probandenvollblutprobe gemessen wurde.

	AMP (%)	ADP (%)	ATP (%)
Proband 1 Tag	6,4	19,5	74,1
Proband 5 Tag	61,8	20	9,2
Patient 1 Tag	4	24,8	71,2
Patient 5 Tag	45	21,7	3,4

Bei der Analyse von Patientenproben ist die Stabilität der nachzuweisenden Substanzen während des Transportes und eventueller Lagerungszeiten nicht gegeben; vor allem die energiereichen Triphosphate werden durch den weiter bestehenden Stoffwechsel schnell abgebaut und umgewandelt. Daher wurde die Stabilität von ATP als Markersubstanz untersucht. Hierzu wurden zwei freiwilligen Blutspendern Blut mit EDTA-Vollblut Röhrchen entnommen und dieses Blut sofort bearbeitet.



**Abb. 17:** Abbau der Adenosin-Nukleotide bei Lagerung einer Probandenvollblutprobe über 5 Tage bei Raumtemperatur. Der Summe der Nukleotide ist die Summe aller Substanzen, einschließlich der Abbauprodukte Adenosin, Adenin und Hypoxanthin, die in den 5 Tagen entstanden sind, gegenübergestellt. Die Substanzen wurden mit UV-Absorption bei 246 nm gemessen. Hypoxanthin wurde mit dem Faktor 1,38 multipliziert, um die Differenz zum Adenin in der Absorption auszugleichen.

Um den Einfluss von Glucose auf den Energiehaushalt der Erythrozyten zu bestimmen, wurde dem entnommenen Blut jeweils 0, 5 oder 10 mg Glucose in 0,1 ml 0,9 % NaCl pro 2,7 ml Blutvolumen zugesetzt und für 5 Tage gelagert, um eine längere Transportzeit zu imitieren.

Durch Zusatz von Glucose verzögerte sich der Abfall der Adenosin-Nukleotide um 24 h gegenüber der Kontrolle. Es konnte jedoch kein wesentlicher Unterschied beim Abbau der Phosphate zwischen 5 mg und 10 mg Glucose festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

#### **4.1.7.5. Einfluss der Transportzeit der Blutproben auf die Konzentration der Thiopurin-Nukleotide im Vergleich zur Routinemethode (nach Erdmann)**

Da die mit der „Nukleotid“-Methode gemessenen Thiopurine stark durch die Zeit der Lagerung und des Transportes beeinflusst werden, sollte an einer weiteren Patientenprobe der Einfluss der Transportzeit auf das Ergebnis der „Nukleotid“-Methode im Vergleich zur Routinemethode untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurde eine Patientenvollblutprobe aus Lübeck bei Raumtemperatur 8 Tage gelagert. Alle 24 h wurde ein Aliquot dieser Blutprobe entnommen und die Thiopurin-Metabolite mit der Methode nach Erdmann et al. (1990) sowie mit der hier entwickelten HPLC-Methode vergleichend bestimmt.

Wie aus Tab. 10 ersichtlich, liefert die Routinemethode während der 8 Tage konstante Werte für die gemessenen Metabolite, während bei der „Nukleotid“-Methode die Gesamtkonzentrationen nach 24 h schon geringer sind und ein weiterer starker Abfall nach 48 h eintritt (Tab. 11).

**Tab. 10:** Konzentrationen in der Blutprobe eines Patienten in Abhängigkeit von Zeit der Lagerung bei Raumtemperatur. Die Bestimmung erfolgte mit der Methode nach Erdmann et al. (1990), d. h. nach Säurehydrolyse wurde die Gesamtkonzentration der einzelnen Thiopurine als freie Basen bestimmt.

	<b>Konzentrationen</b>		
	<b>6-MMP</b>	<b>6-MTG</b>	<b>6-TG</b>
<b>Stunden</b>	<b>ng/g Hb</b>	<b>ng/g Hb</b>	<b>ng/g Hb</b>
<b>24</b>	90063	643	648
<b>48</b>	85957	640	601
<b>72</b>	81919	732	655
<b>96</b>	84622	561	599
<b>120</b>	87511	577	791
<b>144</b>	85971	581	714
<b>168</b>	84711	518	678
<b>192</b>	75714	513	684
<b>MW</b>	84558,5	595,6	671,3
<b>SD±</b>	4279,3	73,1	62,5
<b>VK (%)</b>	5,1	12,3	9,3

**Tab. 11:** Einfluss der Lagerung bei Raumtemperatur auf die Summe der „Peak“-Flächen der Mono-, Di- und Triphosphate von 6-Thioguanosin, 6-Methylthioguanosin und 6-Methylthioinosin und die daraus berechneten Konzentrationen. Die Bestimmung erfolgte mit der „Nukleotid“-Methode.

	Konzentrationen		
	6-MMP	6-MTG	6-TG
Stunden	ng/g Hb	ng/g Hb	ng/g Hb
24	75150,1	291	224,6
48	34769,5	106,7	97,9
72	46843,9	137,6	134,7
96	41955,4	98,4	127,4
120	38605,4	77,8	118,1
144	44625,9	51,8	104,4
166	51181,5	65,1	128,4
192	33052,4	51	92,4

## 4.2. Inkubation von Erythrozyten mit Thiopurinen

### 4.2.1. Metabolismus von Thiopurinen in Erythrozyten

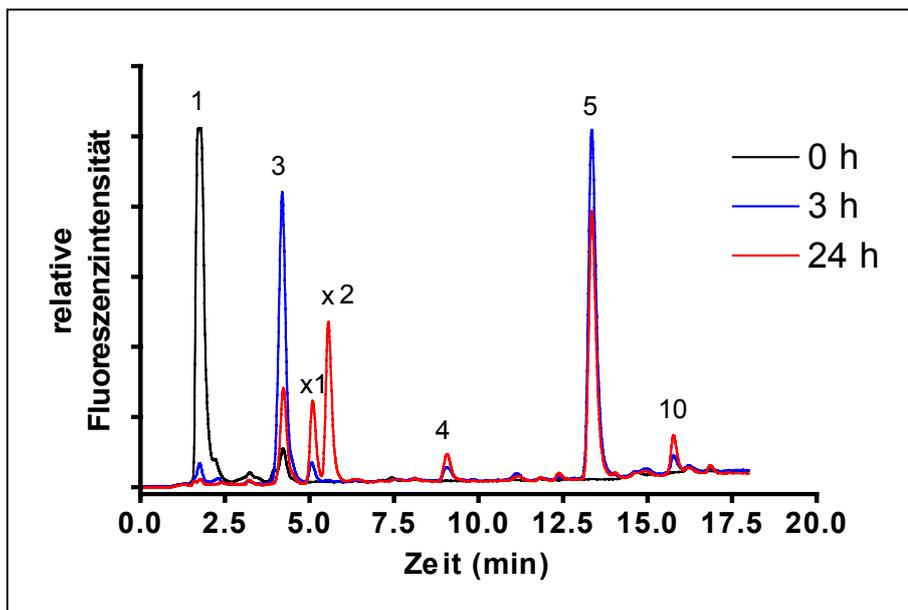
Auch wenn Erythrozyten nicht das Zielgewebe für die therapeutische Wirkung sind, wird für die Optimierung der Therapie die Konzentration der 6-TG- und 6-MMP-Nukleotide in Erythrozyten herangezogen. Wie sie in die Erythrozyten gelangen, ist bisher nicht geklärt. Deshalb wurden gewaschene Erythrozyten *in vitro* mit 6-Thioguanin und 6-Mercaptopurin sowie mit deren Metaboliten für bis zu 24 h inkubiert. Die Inkubationsansätze wurden aufgearbeitet und die hierin enthaltenen Substanzen mit der HPLC analysiert. Nach der Quantifizierung der Substanz-„Peaks“ wurde der zeitliche Verlauf der Bildung und Metabolisierung der Substrate und deren Hauptmetaboliten dargestellt.

Die Chromatogramme enthalten in der zeitlichen Reihenfolge der Elution folgende Substanzen:

6-Thioguanin [1], 6-Mercaptopurin [11], 8-Hydroxy-6-Mercaptopurin [21], 6-Thioguanosin [2], 6-Mercaptopurinribosid [12], 6-Thioxanthin [19], 6-Thioguanosin-5'-Monophosphat [3], 6-Methylthioguanin [6], 6-Thioinosin-5'-Monophosphat [13], 6-Methylmercaptapurin [14], 6-Methylthioguanosin [7], 6-Methylmercaptapurinribosid [15], 6-Thioguanosin-5'-Diphosphat [4], 6-Methylthioinosin-5'-Monophosphat [16], 6-Methylthioguanosin-5'-Monophosphat [8], 6-Thioguanosin-5'-Triphosphat [5], 6-Methylthioguanosin-5'-Diphosphat [9], 6-Methylthioinosin-5'-Diphosphat [17], 6-Methylthioguanosin-5'-Triphosphat [10], 6-Methylthioinosin-5'-Triphosphat [18].

#### **1a) Inkubation von Erythrozyten mit 6-Thioguanin**

Die Abb. 18 zeigt exemplarisch Chromatogramme nach Inkubation von Erythrozyten mit 6-TG für 0, 3 und 24 h. 6-Thioguanin selbst ist nach 3 h weitgehend umgesetzt, als Hauptmetaboliten sind 6-TG-MP [3] und 6-TG-TP [5] zu erkennen. Auch nach 24 h stellen diese beiden Substanzen die Hauptmetaboliten dar; als weitere Umsetzungsprodukte sind nach 3 h neben 6-TG-DP [4] noch 6-MTG-TP [10] sowie als Peak eine unbekannte Substanz [x1] zu erkennen. Nach 24 h nehmen die Nukleotidphosphate [3] und [5] mengenmäßig ab, das Methylierungsprodukt [10] findet sich dagegen zu einem größeren Anteil. Besonders stark zugenommen hat die Menge der beiden unbekannt Substanzen [x1] und [x2]. 6-Thioguanosin war nicht nachweisbar (Rt 2,4 min).

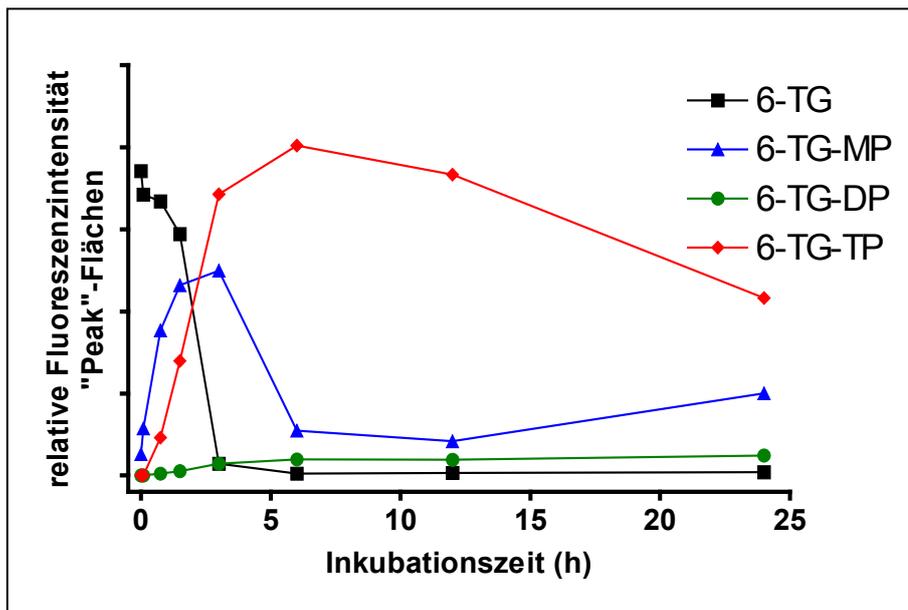


**Abb. 18:** Inkubation von Erythrozyten mit 6-TG. 200  $\mu$ l gepackte Erythrozyten wurden mit 60  $\mu$ mol/l 6-TG für 0, 3 und 24 h wie unter Material und Methoden beschrieben, inkubiert. Die Nummerierung der Peaks erfolgt nach den in der Tab. 2a angegebenen Ziffern.

### 1b) Zeitlicher Verlauf der Metabolisierung von 6-Thioguanin

Der zeitliche Verlauf der Bildung und Umsetzung der 6-TG-Metabolite ist in der Abb. 19 wiedergegeben.

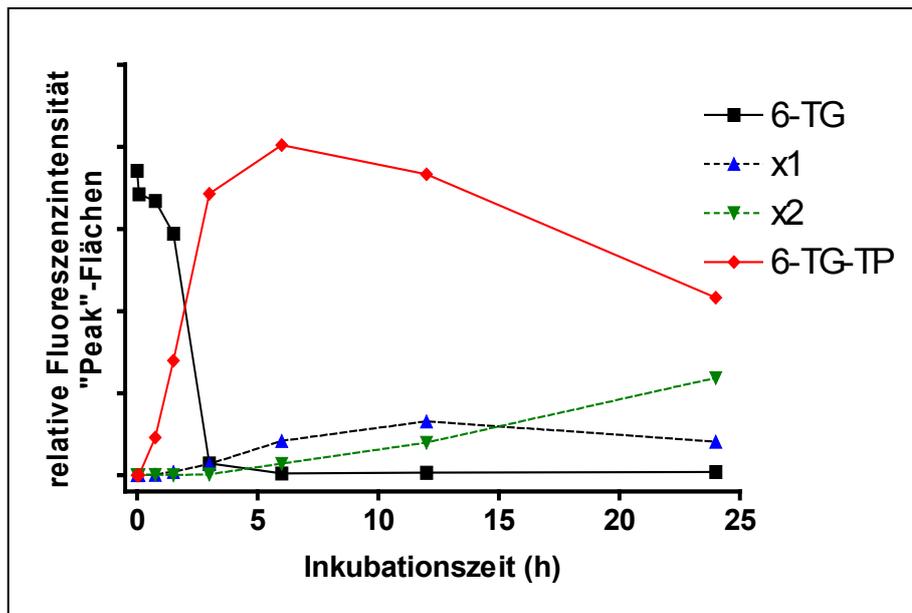
Während nach einer Stunde nicht verstoffwechseltes 6-TG noch die Hauptmenge ausmachte, waren nach 3 h nur noch geringe Mengen 6-TG (etwa 2 % der zugesetzten Menge) nachweisbar. Nach längeren Inkubationszeiten war 6-TG nicht mehr nachweisbar (< 0,1 % der zugesetzten Menge). Parallel zum Abfall des 6-TG wurden 6-TG-MP und 6-TG-TP in großen Mengen gebildet, während das nur intermediär gebildete 6-TG-DP in allen Chromatogrammen einen geringen Anteil der Gesamtfluoreszenz ausmachte. Im weiteren zeitlichen Verlauf fällt 6-TG-MP wieder ab (nach 6 und 12 h), während 6-TG-TP im Zeitraum zwischen 3 und 12 h weitgehend konstant bleibt. Erst bei längerer Inkubation nimmt die Menge an 6-TG-TP ab, während parallel hierzu wieder die Menge an 6-TG-MP zunimmt.



**Abb. 19:** Zeitlicher Verlauf des Abfalls von 6-TG und der Bildung von 6-TG-MP, 6-TG-DP und 6-TG-TP in den Erythrozyten während 24 h Inkubation mit 6-TG.

### 1c) Bildung unbekannter Metaboliten aus 6-Thioguanin

Neben den Nukleotiden lassen sich bei der Inkubation von isolierten Erythrozyten mit 6-TG auch zwei Substanzen in den Chromatogrammen nachweisen, deren Retentionszeit mit keiner der getesteten Standardsubstanzen übereinstimmt. Der zeitliche Verlauf der Bildung dieser beiden Substanzen im Vergleich zu 6-TG-TP ist in der Abb. 20 wiedergegeben. Bereits nach 3 h konnte die mit x1 bezeichnete Substanz deutlich nachgewiesen werden (vgl. Abb. 18), erreichte nach 6 h ihr Maximum und fiel im weiteren Verlauf um 40 % ab. Die Substanz x2 war erstmals nach 6 h sicher nachweisbar und nahm über den gesamten untersuchten Zeitraum (24 h) zu. Dabei verdoppelte sich die Substanzmenge zwischen den Zeitpunkten 12 und 24 h. Der Verlauf der Bildung und Umsetzung dieser Metabolite verläuft etwa parallel zur Bildung und zum Abbau des 6-TG-TP.

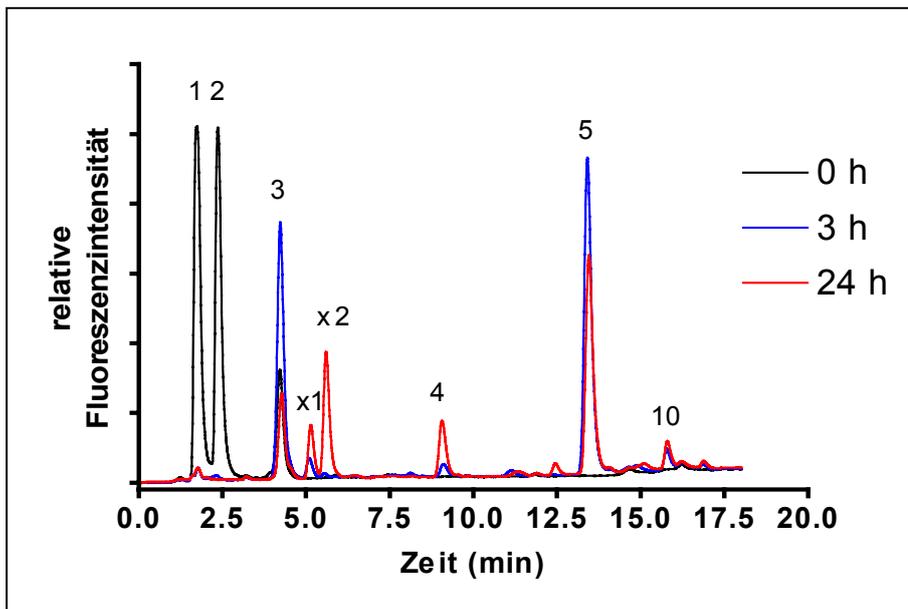


**Abb. 20:** Zeitlicher Verlauf des Abfalls von 6-TG und der Bildung von 6-TG-TP und den zwei unbekannt Substanzen x1 und x2 in den Erythrozyten während 24 h Inkubation mit 6-TG.

## 2 a) Inkubation von Erythrozyten mit 6-Thioguanosin

Die Chromatogramme nach 0, 3 und 24 h Inkubation sind in der Abb. 21 zusammengestellt. Bereits zum Zeitpunkt 0 h war etwa die Hälfte des zugesetzten 6-TG-R [2] in der zur Hitzedenaturierung erforderlichen Zeit in 6-TG [1] und 6-TG-MP [3] umgewandelt. Nach 5 min Inkubation ließen sich nur noch 6 % von 6-Thioguanosin nachweisen (Chromatogramm nicht gezeigt).

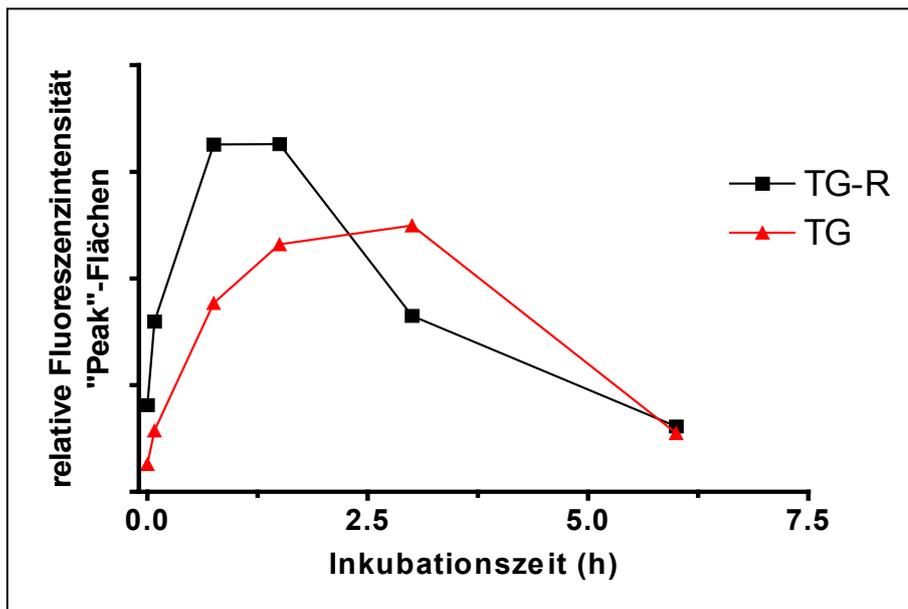
Der weitere Stoffwechsel des 6-TG-R verläuft weitgehend wie der des 6-TG. In den Chromatogrammen sind keine zusätzlichen Peaks zu erkennen, die die Bildung anderer Metaboliten anzeigen; auch die relativen Mengenverhältnisse des Mono-, Di- und Triphosphates sind vergleichbar. Lediglich die initiale Geschwindigkeit der Aufnahme und des Metabolismus waren unterschiedlich.



**Abb. 21:** Inkubation von Erythrozyten mit 6-TG-R. 200  $\mu$ l gepackte Erythrozyten wurden mit 60  $\mu$ mol/l 6-TG-R für 0, 3 und 24 h inkubiert. Die Nummerierung der Peaks erfolgt nach den in der Tab. 2a angegebenen Ziffern.

## 2 b) Geschwindigkeit der Aufnahme von 6-Thioguanin und 6-Thioguanosin in Erythrozyten

Bei der Inkubation von Erythrozyten mit 6-TG und 6-TG-R findet man das 6-TG-MP als ersten Metaboliten, aus dem dann im weiteren Verlauf das Triphosphat entsteht. Aus dem zeitlichen Verlauf der 6-TG-MP-Bildung lässt sich daher die Aufnahmegeschwindigkeit der beiden Substrate abschätzen. Die Abb. 22 zeigt den zeitlichen Verlauf der Bildung von 6-TG-MP aus 6-TG und 6-TG-R. Wie man sieht, wird 6-TG-R wesentlich schneller in die Erythrozyten aufgenommen als 6-TG. So war zum Zeitpunkt 45 min doppelt so viel 6-TG-MP bei Inkubation von 6-TG-R als mit 6-TG nachweisbar, andererseits fiel die 6-TG-MP-Menge nach Inkubation von 6-TG-R auch schneller wieder ab. Die Gesamtmenge der bis zum Zeitpunkt 6 h gebildete 6-TG-MP ist annähernd gleich (Vergleich der Fläche unter der Kurve).



**Abb. 22:** Bildung von 6-TG-MP nach Inkubation von Erythrozyten mit jeweils 4,2  $\mu\text{mol/l}$  6-TG und 6-TG-R für 0 bis 6 h.

### 3a) Inkubation von Erythrozyten mit 6-Methylthioguanin

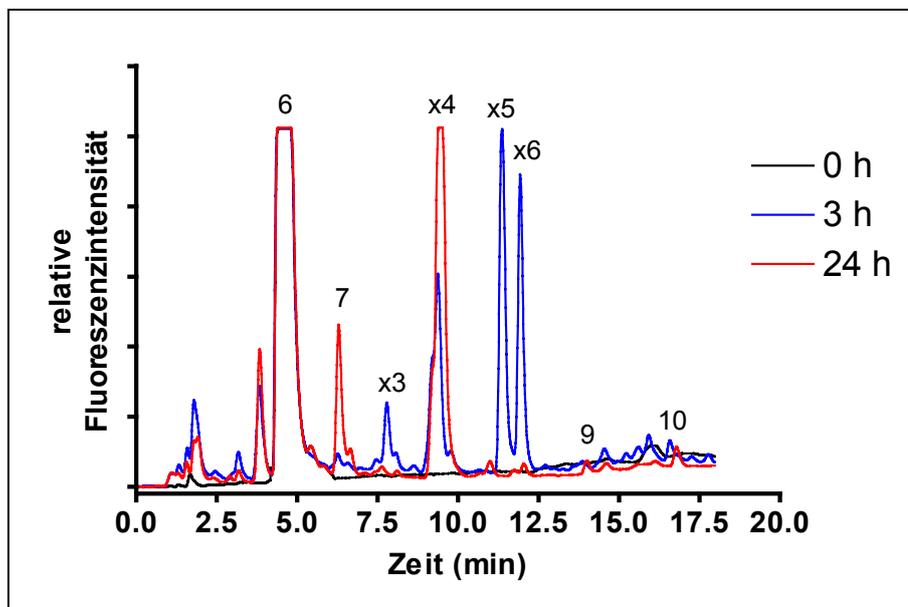
Unter einer Langzeittherapie von Patienten mit 6-MP/Azathioprin findet man in den Erythrozyten der Patienten neben den 6-Thioguanosin-Nukleotiden (6-TGN) auch in etwa die gleiche Menge an methylierten 6-TGN. Diese können durch Methylierung der 6-TGN oder durch Aufnahme von 6-MTG bzw. 6-MTG-Ribosid mit anschließendem Stoffwechsel zu den Nukleotiden entstanden sein.

Die nach 0, 3 und 24 h Inkubation von Erythrozyten mit 6-MTG erhaltenen Chromatogramme sind in der Abb. 23 wiedergegeben. Nach Angaben von Elion (persönliche Mitteilung, 1994) kann 6-MTG nicht wieder anabol verstoffwechselt werden. Aus den Chromatogrammen der Abb. 23 ist jedoch ersichtlich, dass bereits nach 3 h die Phosphate 6-MTG-DP [9] und 6-MTG-TP [10] in sehr geringen Mengen erkennbar sind. Entsprechende kleine Mengen an 6-MTG-MP mit einer  $R_t$  von 10,9 min könnten am Ende des unbekanntes Peaks  $x_{\text{MTG}4}$  koeluiieren, waren aber nicht eindeutig nachweisbar. Neben den Nukleotiden entstanden vier unbekannte Substanzen in bedeutsamen Mengen mit  $R_t$  von 7,7 min (Peak  $x_{\text{MTG}3}$ ), 9,4 min (Peak  $x_{\text{MTG}4}$ ), 11,3 min (Peak  $x_{\text{MTG}5}$ ) und 11,9 min (Peak  $x_{\text{MTG}6}$ ). Alle vier Substanzen haben Fluoreszenzcharakteristika wie

6-Thioguanin, d. h. sie fluoreszieren nur nach Oxidation mit der PCRE, ohne PCRE waren zu den ermittelten Retentionszeiten keine Substanzen nachweisbar (Chromatogramm nicht gezeigt).

Da 6-MTG und seine bekannten methylierten Metaboliten eine Eigenfluoreszenz aufweisen (Tab. 2a), gehe ich davon aus, dass es sich hierbei um demethylierte Umsetzungsprodukte handelt, ähnlich wie drei weitere Peaks, die bei Retentionszeiten zwischen 1,8 und 4,5 min eluierten.

Nach 24 h Inkubation waren die Substanzen  $x_{\text{MTG}3}$ ,  $x_{\text{MTG}5}$  und  $x_{\text{MTG}6}$  nicht mehr nachweisbar, während  $x_{\text{MTG}4}$  auf mehr als das Doppelte anstieg. Nach 24 h war auch 6-MTG-R [7] in größeren Mengen nachweisbar. Nach 3 h war die in diesem Peak nachweisbare Substanzmenge sehr gering.

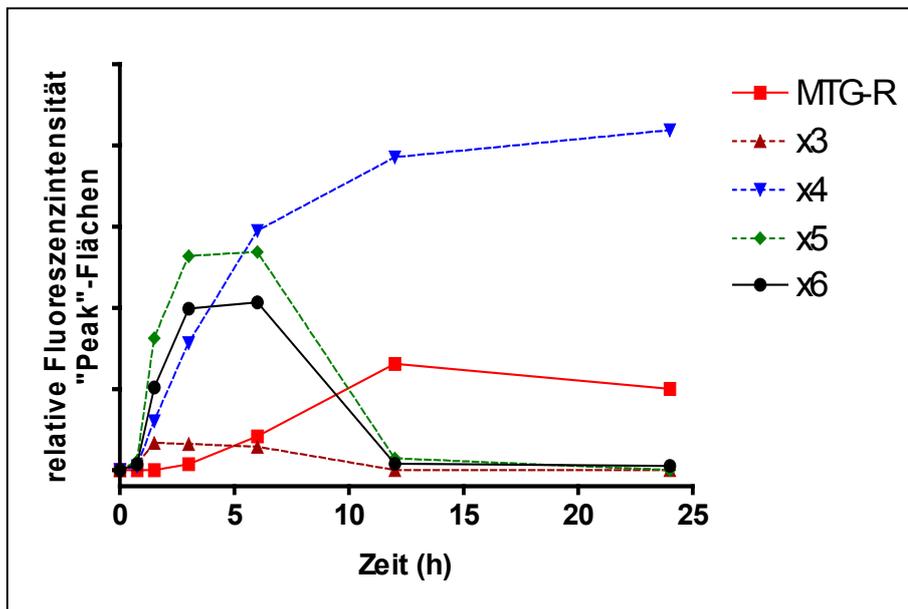


**Abb. 23:** Inkubation von Erythrozyten mit 6-MTG. 200  $\mu\text{l}$  gepackte Erythrozyten wurden mit 55  $\mu\text{mol/l}$  6-MTG für 0, 3 und 24 h wie unter Material und Methoden beschrieben, inkubiert. Die Nummerierung der Peaks erfolgt nach den in der Tab. 2a angegebenen Ziffern.

### 3b) Zeitlicher Verlauf des Metabolismus von 6-Methylthioguanin

Aus den zwischen 0 und 24 h erhaltenen Chromatogrammen nach der Inkubation von Erythrozyten mit 6-MTG wurden die Flächen der unbekannt Peaks  $x_{\text{MTG}3}$  bis  $x_{\text{MTG}6}$  im zeitlichen Verlauf in der Abb. 24 dargestellt. Daneben ist die Bildung von 6-MTG-R aufgetragen. Unter der Voraussetzung, dass die Fluoreszenz-

intensität aller Metabolite und 6-MTG auf molarer Basis gleich ist, betrug der Anteil aller Metabolite maximal 15 % der zugesetzten Menge an 6-MTG.

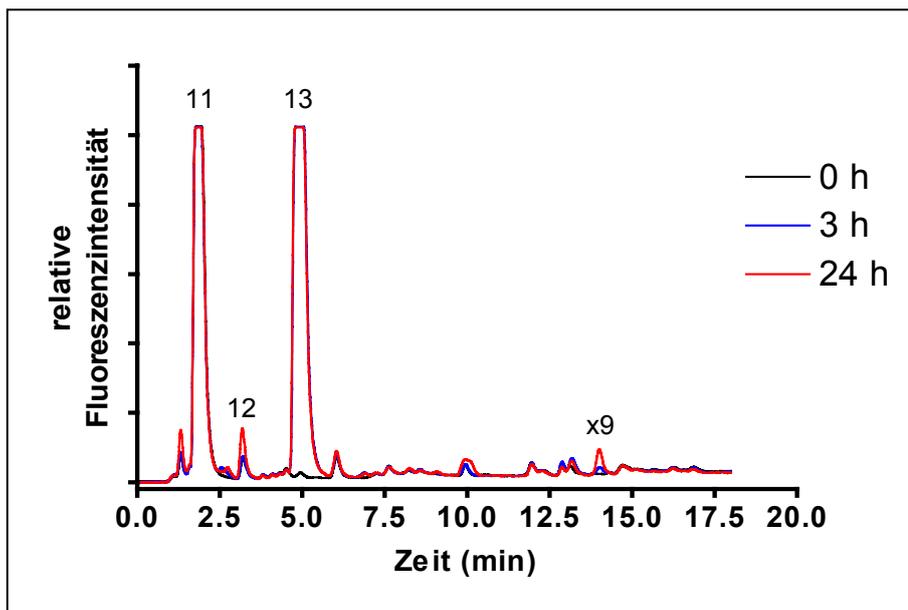


**Abb. 24:** Zeitlicher Verlauf des Metabolismus von 6-MTG. Erythrozyten wurden mit 55  $\mu\text{mol/l}$  6-MTG für 0 bis 24 h inkubiert. Der zeitliche Verlauf von 6-MTG-R und der unbekanntem Peaks  $x_{\text{MTG}3-6}$  ist aufgetragen.

Nach 3 h waren nachweisbare, aber kleine Mengen 6-MTG-R vorhanden. Diese erreichten nach 12 h ein Maximum und fielen nach 24 h um 26 % gegenüber dem 12 h Wert ab. Während der Peak  $x_{\text{MTG}4}$  in den ersten 12 h mit weitgehend gleicher Geschwindigkeit gebildet wurde, nahm er im weiteren Verlauf bis 24 h leicht wieder ab. Die Substanzen  $x_{\text{MTG}5}$  und  $x_{\text{MTG}6}$  erreichten die Maximalmenge bereits zwischen 3 und 6 h und waren nach 12 h nicht mehr nachweisbar; auch der nur in sehr geringen Mengen nachweisbare Peak  $x_{\text{MTG}3}$  war nur nach 3 und 6 h nachweisbar.

#### 4a) 6-Mercaptopurin

Nach der Inkubation von Erythrozyten mit 60  $\mu\text{mol/l}$  6-MP [11] wird das 6-TI-MP [13] sehr schnell gebildet und erreicht nach 3 h sein Maximum. In kleinen Mengen ist auch das 6-MP-R [12] nachweisbar, höhere Phosphate entstehen nicht.



**Abb. 25:** Inkubation von Erythrozyten mit 6-MP. 200  $\mu\text{l}$  gepackte Erythrozyten wurden mit 60  $\mu\text{mol/l}$  6-MP für 0, 3 und 24 h inkubiert. Die Nummerierung der Peaks erfolgt nach den in der Tab. 2b angegebenen Ziffern.

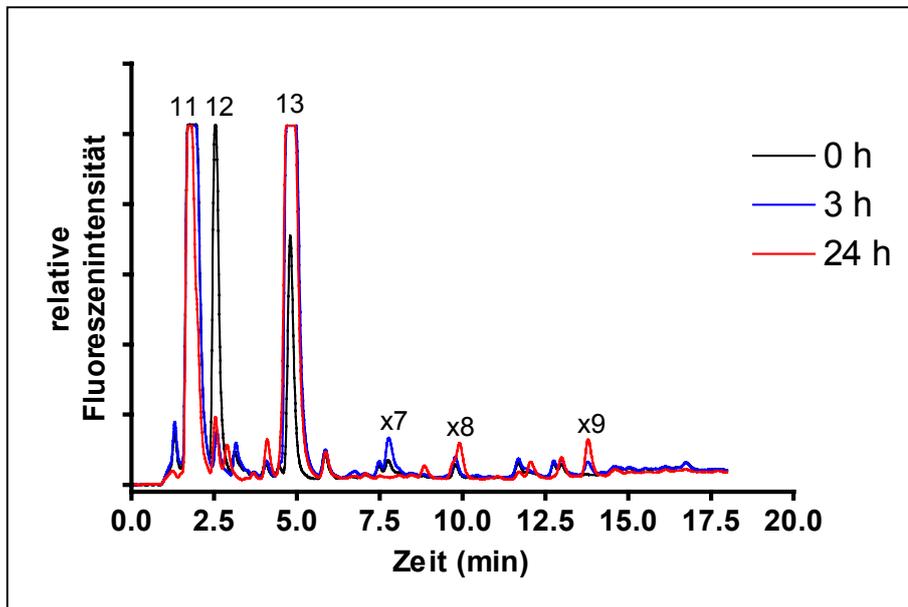
Erst nach 24 h zeigten sich neben dem 6-MP und dem 6-TI-MP geringe Mengen eines weiteren Metaboliten ( $x_{\text{MP}9}$ ) mit der  $R_t$  von 13,9 min, dessen Identität nicht geklärt ist (Abb. 25).

Auffallend ist, dass nur 6-TI-MP gebildet wird, dessen Konzentration nach 3 h maximal ist und bis 24 h fast konstant bleibt. Weitere Metabolite, insbesondere das Di- und Triphosphat waren zu keinem Zeitpunkt nachweisbar, so dass 6-TI-MP als Endprodukt des anabolen 6-MP-Stoffwechsels in Erythrozyten angesehen werden muss.

### 5a) 6-Mercaptopurinribosid

In Analogie zu den Ergebnissen nach der Inkubation von 6-TG-R sieht man in der Abb. 26, dass das eingesetzte 6-MP-Ribosid bereits während der Vorbereitung der Inkubation und des Denaturierens zum Zeitpunkt 0 h zum überwiegenden Teil in 6-MP [11] sowie 6-TI-MP [13] umgesetzt wurde. Nach 3 und 24 h waren nur noch kleine Mengen 6-MP-R nachweisbar. In Analogie zur Inkubation von Erythrozyten

mit 6-MP fand sich auch bei der Inkubation des 6-MP-R nur 6-TI-MP aber kein Di- oder Triphosphat.



**Abb. 26:** Inkubation von Erythrozyten mit 6-MP-R. 200  $\mu$ l gepackte Erythrozyten wurden mit 60  $\mu$ mol/l 6-MP-R für 0, 3 und 24 h inkubiert. Die Nummerierung der Peaks erfolgt nach den in der Tab. 2b angegebenen Ziffern.

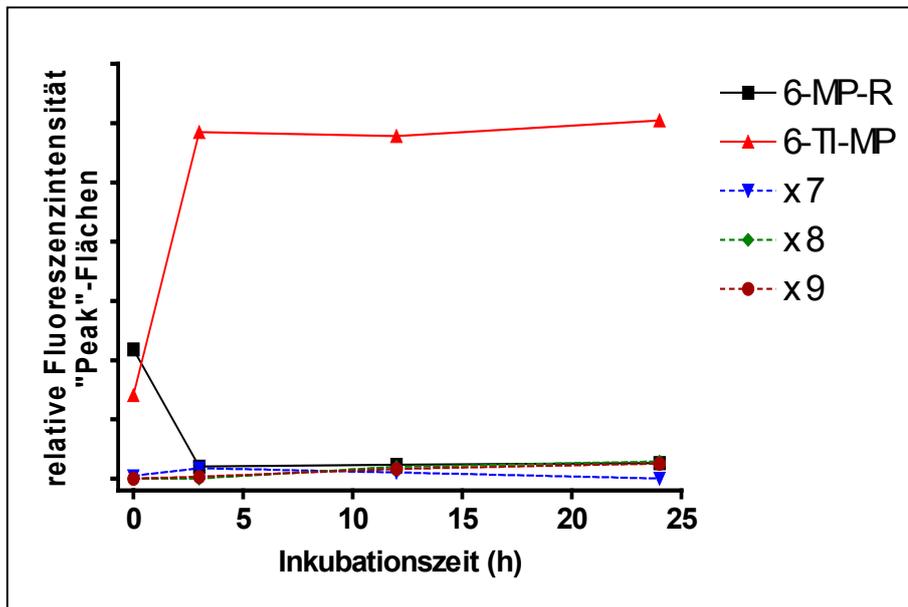
Neben 6-TI-MP entstanden zeitabhängig in sehr geringen Mengen drei weitere Metaboliten  $x_{MP7}$ ,  $x_{MP8}$  und  $x_{MP9}$  mit  $R_t$  von 7,7 min, 9,9 min und 13,9 min. Der unbekannte Peak  $x_{MP9}$  mit der  $R_t$  von 13,9 min konnte ebenfalls bei der Inkubation von 6-Mercaptopurin beobachtet werden.

### 5b) Zeitlicher Verlauf des Stoffwechsels von 6-Mercaptopurinribosid

Der zeitliche Verlauf des Metabolismus von 6-MP-R ist in der Abb. 27 zusammengefasst. Dargestellt ist die Menge des 6-TI-MP sowie der unbekannt Metaboliten  $x_{MP7}$ ,  $x_{MP8}$  und  $x_{MP9}$ .

Deutlich erkennbar ist der sehr schnelle Umsatz des 6-MP-R, welches nur bis zum Inkubationszeitpunkt 3 h nachweisbar war. Nach 3 h hatte 6-TI-MP sein Maximum erreicht, dass sich auch bis 24 h nicht wesentlich änderte. Von den unbekannt Metaboliten  $x_{MP7}$ ,  $x_{MP8}$  und  $x_{MP9}$  nahm die gebildete Menge der ersten beiden

Peaks kontinuierlich zu, während der Peak  $x_{MP7}$  nur zu den Inkubationszeitpunkten 3 und 12 h deutlich nachweisbar war, nicht jedoch nach 24 h.

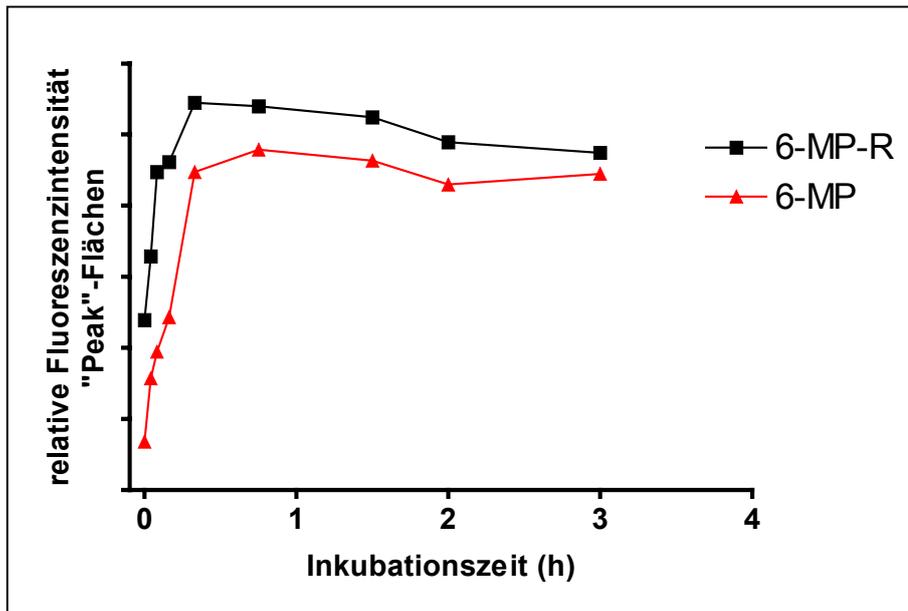


**Abb. 27:** Zeitlicher Verlauf der Entstehung von 6-TI-MP und den unbekannt Peaks  $x_{MP7-9}$  nach 24 h Inkubation von Erythrozyten mit 6-MP-R.

### 5c) Bildungsgeschwindigkeit von 6-Thioinosin-5'-Monophosphat

Um die Unterschiede in der Geschwindigkeit der Aufnahme und Metabolismus von 6-MP und 6-MP-Ribosid aufzuklären, wurde die Inkubation während der ersten 3 h in kurzen Zeitintervallen wiederholt.

Aus den Kurvenverläufen der Abb. 28 ist deutlich erkennbar, dass sich 6-TI-MP bei der Inkubation von Erythrozyten mit 6-MP-R wesentlich schneller bildet. Nach 10 min Inkubation war aus 6-MP-R 47 % mehr 6-TI-MP gebildet als aus 6-MP. Nach 45 Minuten war die aus 6-MP-R gebildete Menge an 6-TI-MP um 12 % größer; dieser Unterschied blieb über den Rest des untersuchten Zeitraumes in etwa gleich.



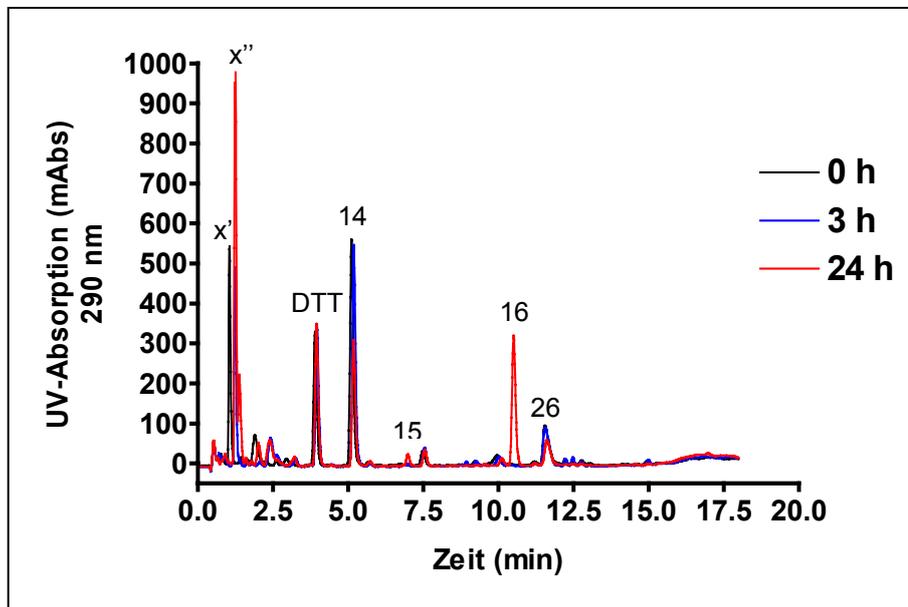
**Abb. 28:** Bildungsgeschwindigkeit von 6-TI-MP nach Inkubation von Erythrozyten mit jeweils 6  $\mu\text{mol/l}$  6-MP und 6-MP-R für 0 bis 3 h.

### 6a) Inkubation von Erythrozyten mit 6-Methylmercaptapurin

Aus 6-MP kann durch Methylierung an der Thiolgruppe der Metabolit 6-MMP entstehen, welcher ebenfalls als nicht weiter verstoffwechselbares Endprodukt angesehen wird (Elion, persönliche Mitteilung, 1994). Da nach der Inkubation von Erythrozyten mit 6-MTG ein zwar langsamer, aber gut nachweisbarer Umsatz zu weiteren Metaboliten beobachtet wurde, wurden Erythrozyten ebenfalls mit 6-MMP inkubiert.

Die nach 0, 3 und 24 h erhaltenen Chromatogramme sind in der Abb. 29 wiedergegeben. Während nach 3 h Inkubation kein Stoffwechsel beobachtet werden konnte (kein Auftreten eines neuen Peaks mit mehr als 1 % der Gesamt-„Peak“-Fläche, keine Flächenänderung des 6-MMP), wurde nach 24 h ein deutlicher Peak gefunden, der nach seiner Lage im Chromatogramm am ehesten dem 6-MMP-MP [16] entsprach. Auch nach 24 h konnte keine nennenswerte Menge an höheren Phosphaten von 6-MMP nachgewiesen werden (Retentionszeiten der Referenzsubstanzen liegen bei 14,5 min für 6-MMP-DP und 17,1 min für 6-MMP-TP). Zu dieser Zeit war in den Chromatogrammen ein Peak von 6-MMP-R [15] bei der Rt

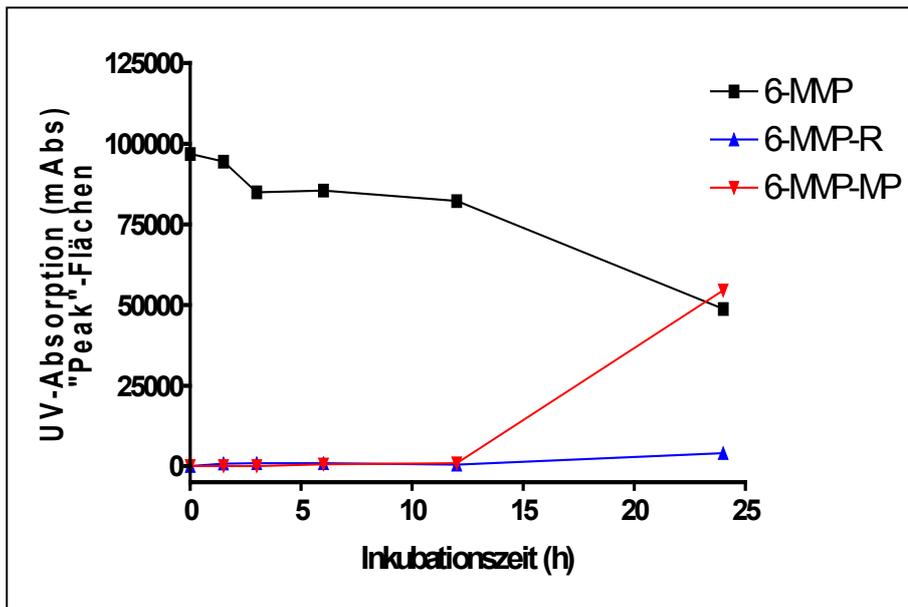
von 7,2 min nachweisbar, dessen Fläche etwa 4 % vom inkubierten 6-MMP ausmachte. Ferner entsteht nach 24 h ein unbekannter Peak (x'') bei einer Rt von 1,7 min.



**Abb. 29:** Chromatogramm des Inkubationsansatzes von Erythrozyten mit 6-MMP. 200  $\mu$ l gepackte Erythrozyten wurden mit 60  $\mu$ mol/l 6-MMP für 0, 3 und 24 h inkubiert. Die Nummerierung der Peaks erfolgt nach den in den Tab. 2b und 2d angegebenen Ziffern. (DTT= Dithiotreitol)

### 6b) Zeitlicher Verlauf des Stoffwechsels von 6-Methylmercaptapurin

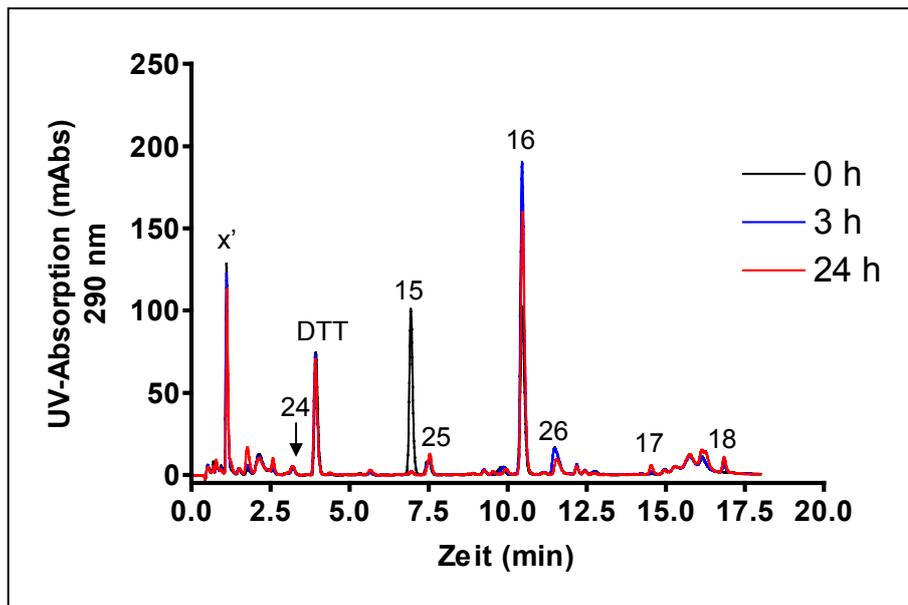
Bei der Inkubation von Erythrozyten mit 6-MMP konnte ein verzögert einsetzender, nach 24 h jedoch deutlicher Metabolismus beobachtet werden. Wie in der Abb. 30 zu erkennen ist, fällt in den ersten 3 h der Gehalt an 6-MMP um 10 % ab, bleibt aber bis 12 h weitgehend konstant. Nach 6 h wurde eine Phosphoribosylierung des 6-MMP beobachtet (0,6 % des Gesamtgehaltes). Nach 24 h wurde neben dem zugesetzten 6-MMP auch das 6-MMP-MP nachgewiesen, das etwa 56 % der eingesetzten 6-MMP-Menge entsprach. Daneben war nach 24 h 4 % der Gesamtmenge an 6-MMP als 6-MMP-R sichtbar.



**Abb. 30:** Zeitlicher Verlauf der Entstehung von 6-MMP-MP nach 24 h Inkubation von Erythrozyten mit 6-MMP.

### 7a) 6-Methylmercaptapurinribosid

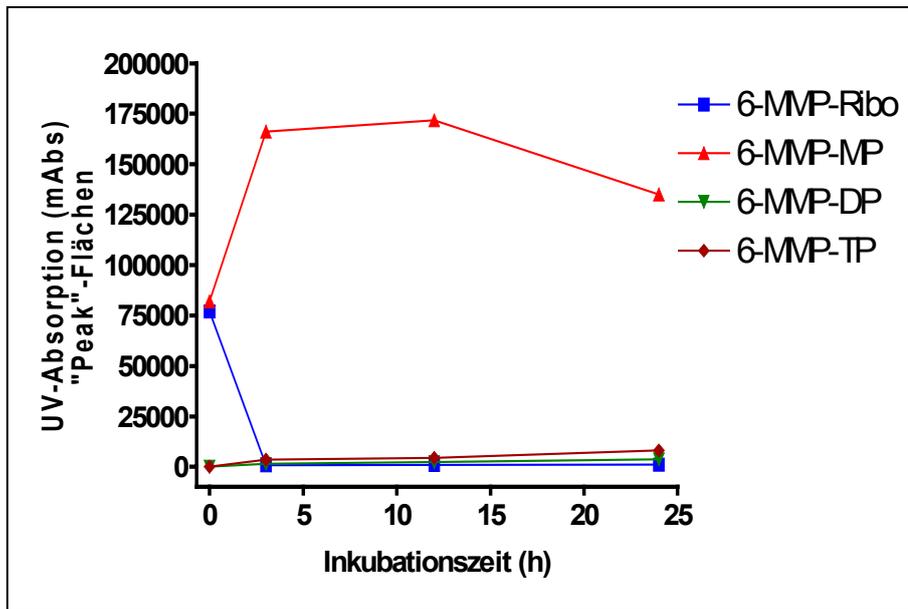
Die nach 0, 3 und 24 h Inkubation mit 6-MMP-R erhaltenen Chromatogramme sind in der Abb. 31 übereinander gelegt. Zum Zeitpunkt 0 h ist das 6-MMP-R [15] und das sehr schnell entstandene 6-MMP-MP [16] zu sehen. Nach 3 h ist kein 6-MMP-R mehr nachweisbar. Wie zu erkennen ist, wird das 6-MMP-R nicht in 6-MMP gespalten. Nach 24 h Inkubation fällt auch die Menge an 6-MMP-MP ab, wobei zu diesem Zeitpunkt 6-MMP-DP [17] und 6-MMP-TP [18] in kleinen Mengen zu sehen sind. Die Flächen der beiden Phosphate machen jedoch nur 7 % der Fläche vom 6-MMP-MP aus.



**Abb. 31:** Inkubation von Erythrozyten mit 6-MMP-R. 200  $\mu$ l gepackte Erythrozyten wurden mit 60  $\mu$ mol/l 6-MMP-R für 0, 3 und 24 h inkubiert. Die Nummerierung der Peaks erfolgt nach den in den Tab. 2b und 2d angegebenen Ziffern. (DTT= Dithiotreitol)

### 7b) Zeitlicher Verlauf des Stoffwechsels von 6-Methylmercaptipurinribosid

Der zeitliche Verlauf der Bildung von 6-MMP-MP aus 6-MMP-R unterscheidet sich deutlich von dem nach Inkubation mit 6-MMP. Bereits zum Zeitpunkt 0 h liegt 50 % des zugesetzten 6-MMP-R im Ansatz als 6-MMP-MP vor. Nach 3 h ist kein 6-MMP-R mehr nachweisbar, die „Peak“-Fläche des 6-MMP-MP nahm um weitere 50 % gegenüber dem Zeitpunkt 0 h zu. Auch nach 12 h war der Wert in etwa konstant geblieben. Nach 24 h Inkubation fällt das Monophosphat um 21 % ab. 6-MMP-MP ist der wesentliche Metabolit, auch wenn 6-MMP-DP und 6-MMP-TP deutlich nachweisbar sind, so sind diese beiden Metaboliten nur in geringen Konzentrationen vorhanden (Abb. 32).



**Abb. 32:** Zeitlicher Verlauf der Entstehung der 6-MMP-MP nach 24 h Inkubation von Erythrozyten mit 6-MMP-R.

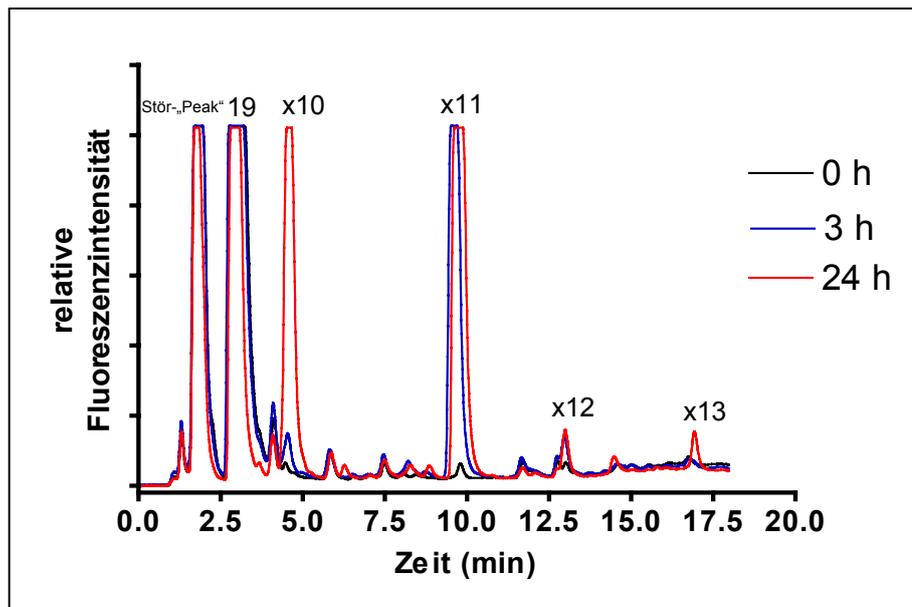
## 8) 6-Thioxanthin

6-TX ist ein Abbauprodukt des 6-TG, welches durch Guanylatdesaminase aus dem 6-TG entsteht. Unklar ist jedoch, ob 6-TX, ähnlich wie 6-TG oder 6-MP ein Substrat der HGPRT ist. Um dies zu prüfen, wurden Erythrozyten mit 6-TX für 0 bis 24 h inkubiert. Die nach 0, 3 und 24 h erhaltenen Chromatogramme sind in der Abb. 33 wiedergegeben.

Zum Zeitpunkt 0 h sind das zugegebene 6-TX sowie ein weiterer unbekannter Peak erkennbar (mit Stör-, „Peak“ markiert). Nach 3 h Inkubationszeit entstand ein größerer Peak unbekannter Struktur, mit einer  $R_t$  von 9,7 min [ $x_{TX11}$ ], dem sich nach 24 h ein zweiter Peak [ $x_{TX10}$ ] mit einer  $R_t$  von 4,7 min hinzugesellte.

Alle beobachteten Peaks enthalten wahrscheinlich eine Thiolgruppe, da keine Peaks gefunden werden, wenn die 24 h Probe ohne PCRE chromatographiert wird. Um zu untersuchen, ob diese unbekannt Peaks mögliche Nukleotidphosphate sind, wurde die nach 24 h erhaltene Probe mit saurer Phosphatase (EC 3.1.3.2) inkubiert, wodurch die Nukleotide zu dem Ribosid gespalten werden.

Nach dieser Inkubation waren die Peaks  $x_{TX11}$ ,  $x_{TX12}$  und  $x_{TX13}$  nicht mehr nachweisbar. Der Peak  $x_{TX10}$  blieb jedoch erhalten und vergrößerte seine Fläche. Daraus kann geschlossen werden, dass 6-TX in Erythrozyten zu 6-TX-MP ( $x_{TX11}$ ) und in geringen Mengen zu Di- ( $x_{TX12}$ ) und Triphosphat ( $x_{TX13}$ ) verstoffwechselt wird, aus dem beim Abbau das 6-Thioxanthosin ( $x_{TX10}$ ) entsteht.

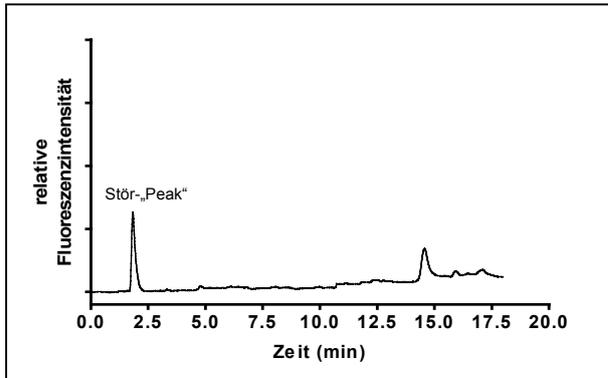


**Abb. 33:** Inkubation von Erythrozyten mit 6-TX. 200  $\mu$ l gepackte Erythrozyten wurden mit 60  $\mu$ mol/l 6-TX für 0, 3 und 24 h inkubiert. Die Nummerierung der Peaks erfolgt nach den in der Tab. 2c angegebenen Ziffern.

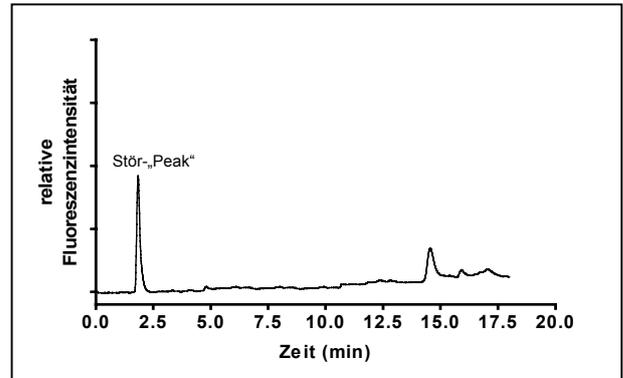
## 9) 6-Thioguanosin-5'-Diphosphat und 6-Thioguanosin-5'-Triphosphat

Bei der Inkubation von Erythrozyten ( $n=2$ ) mit 6-TG-DP und 6-TG-TP konnten nach 60 min und 90 min Inkubationszeit keine aufgenommenen 6-TGN in den Erythrozyten nachgewiesen werden. Das Chromatogramm (Abb. 34b) sieht fast identisch wie das Chromatogramm von Kontrollerythrozyten aus, die ohne die Nukleotide inkubiert wurden (Abb. 34a). Nur in dem vor (Abb. 34c) und nach (Abb. 34d) der Inkubation abgenommenen Inkubationspuffer wurden die Nukleotide gefunden.

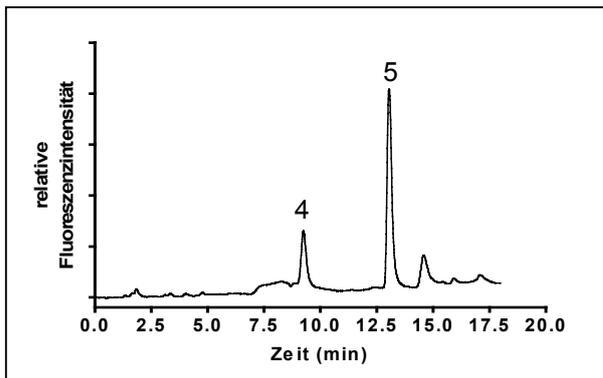
Somit nehmen Erythrozyten 6-TG-DP und 6-TG-TP nicht auf, auch findet kein wesentlicher Metabolismus im Inkubationspuffer außerhalb der Erythrozyten statt.



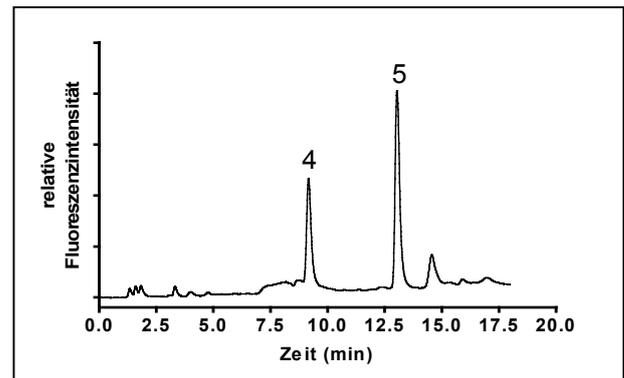
**Abb. 34a** zeigt ein Leerwert-Chromatogramm, bei dem Erythrozyten ohne Zusatz von 6-TG-DP und -TP für 60 min inkubiert und mit der „Nukleotid“-Methode nach der Proteinfällung bestimmt wurden.



**Abb. 34b** zeigt ein Chromatogramm, bei dem Erythrozyten mit 6-TG-DP und -TP für 60 min inkubiert und mit der „Nukleotid“-Methode nach der Proteinfällung bestimmt wurden.



**Abb. 34c** zeigt ein Chromatogramm des Inkubationspuffers mit 6-TG-DP und -TP vor der Inkubation.



**Abb. 34d** zeigt ein Chromatogramm des Inkubationspuffers mit 6-TG-DP und -TP nach der Inkubation.

### 4.3. Inkubation von Zelllinien mit 6-MP und 6-TG

#### 4.3.1. Eingesetzte Zelllinien

Der Stoffwechsel von 6-Mercaptopurin und 6-Thioguanin durch andere Zellen als Erythrozyten ist schlecht untersucht, obwohl z. B. Knochenmark, Leber und Niere

Hauptorte der pharmakologischen Wirkung und der Nebenwirkungen sind. Aus diesem Grunde wurden Zellkulturen aus verschiedenen Organen mit 6-TG bzw. 6-MP inkubiert und die hierbei entstandenen Metaboliten durch HPLC bestimmt. Dünndarmepithelzellen (I-407) und Leberzellen (Hep-G2) wurden als Organe der Resorption und des präsystemischen Metabolismus und Nierenepithelzellen (LLC-MK2) als Ausscheidungsorgan verwendet. Diese Organe spielen für die Pharmakokinetik eine wesentliche Rolle. Als Zelllinien von häufig auftretenden Tumoren wurden Colon- (CaCo-2), Ovarial- (Ovcar-3) und Prostatakarzinomzellen (PC-3) untersucht. Als Zelllinien von Organen, die nicht mit der Wirkung oder Toxizität von Thiopurinen in Verbindung gebracht werden, wurden Nebennierenrindenzellen (NCI H 295), Corneaepithelzellen (HEC) und Herzmyoblasten (H9C2) eingesetzt.

Mit der Methode von Kröplin et al. (1998) wurde die TPMT-Aktivität in diesen Zelllinien gemessen. Die Ergebnisse sind in der Tab. 12 zusammengestellt. Bemerkenswert ist insbesondere die relativ hohe TPMT-Aktivität in den Tumorzellen, die zwischen 160 mU/10<sup>6</sup> Zellen in Ovariakarzinomzellen und 360 mU/10<sup>6</sup> Zellen in Prostatakarzinomzellen liegt. Auch in Corneaepithelzellen findet sich mit 140 mU/10<sup>6</sup> Zellen eine vergleichsweise hohe TPMT-Aktivität. Erythrozyten besitzen mit 1,5 mU/10<sup>6</sup> RBC im Vergleich eine niedrige TPMT-Aktivität.

**Tabelle 12:** TPMT-Aktivität in den verwendeten Zelllinien. Die TPMT-Aktivität der untersuchten Zelllinien wurde mit der Methode von Kröplin et al. (1998) gemessen. Die erhaltenen Werte wurden zur Normierung auf 10<sup>6</sup> Zellen bezogen.

	Zelllinien								
	LLC-MK2	OVCAR 3	PC-3	NCI H 295	I-407	CaCo-2	Hep G2	HEC	H9C2
<b>TPMT-Aktivität (mU)/10<sup>6</sup> Zellen</b>	468	160	360	32	273	310	138	140	n. g.

#### 4.3.2. Humane Intestinalzellen (I-407)

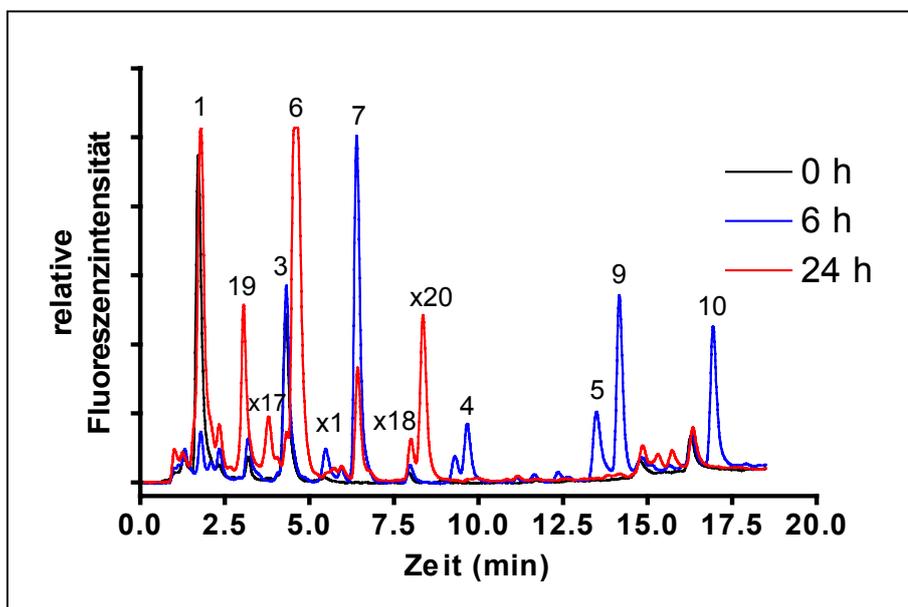
Humane intestinale Zellen weisen eine sehr hohe Stoffwechselaktivität auf.

### a) Inkubation von humanen Intestinalzellen mit 6-TG

Um den Stoffwechsel von 6-TG in Intestinalzellen zu untersuchen, wurden diese mit 4,2  $\mu\text{mol/l}$  6-TG inkubiert. Die Abb. 35 zeigt die nach 0, 6 bzw. 24 h erhaltenen Chromatogramme. Zum Zeitpunkt 0 h war bereits 6-TG-MP [3] nachweisbar. Nach 6 h war dieser Anteil nur wenig weiter angestiegen. Auffällig ist, dass nur geringe Mengen an 6-TG-DP [4] und 6-TG-TP [5] bei 6 bzw. 24 h gefunden wurden.

In den Dünndarmepithelzellen wurden größere Mengen an methylierten Metaboliten gefunden. Nach 6 h sind deutliche Peaks an 6-MTG [6] sowie den Nukleotiden 6-MTD-DP [9] und 6-MTG-TP [10] erkennbar.

Für die Quantifizierung von 6-Methylthioguanosin-Nukleotiden muss berücksichtigt werden, dass 6-MTG-TP nur 30 % der Fluoreszenzintensität von 6-TG aufweist; dementsprechend ist die absolute Menge dieser Metaboliten wesentlich höher, als es aus der „Peak“-Größe der Abb. 25 erkenntlich ist. So ist die Absolutmenge an 6-MTG-R [7] größer als die Menge an 6-TG [1].



**Abb. 35:** Inkubation von humanen Intestinalzellen mit 6-TG. Die Zellen wurden mit 4,2  $\mu\text{mol/l}$  6-TG für 0 bis 24 h inkubiert. Die Nummerierung der Peaks erfolgt nach den in der Tab. 2a angegebenen Ziffern.

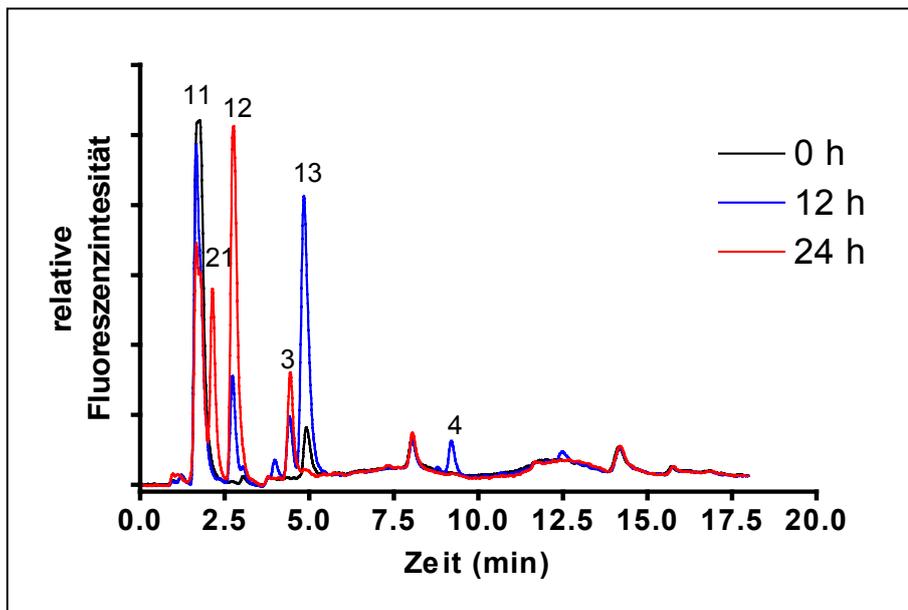
Nach 24 h sind keine 6-Thioguanosin- und 6-Methylthioguanosin-Nukleotide mehr nachweisbar, auch der Peak von 6-MTG-R [7] war um 65 % reduziert. Stattdessen entstanden 6-MTG [6], 6-TX [19] und zwei unbekannte Peaks x17 und x18 (Rt 3,5 und 8,0 min), die auch bei Hepatomazellen (Hep G2) nachweisbar waren. Peak x20 (Rt 8,3 min) war in anderen untersuchten Zelllinien nicht aufgetreten.

#### **b) Inkubation von humanen Intestinalzellen mit 6-MP**

Dünndarmepithelzellen wurden mit 60  $\mu\text{mol/l}$  6-MP für 0 bis 24 h inkubiert. Die bei 0, 12 und 24 h erhaltenen Chromatogramme sind in der Abb. 36 wiedergegeben. Bereits zum Zeitpunkt 0 h waren geringe Mengen an 6-TI-MP [13] nachweisbar; dieser Metabolit war nach 12 h auf die 5-fache Menge angestiegen. Gleichzeitig entstanden kleine Mengen an 6-TG-MP [3] und -DP [4] als Konversionsprodukte des 6-Mercaptopurins.

Auch 6-MP-R [12] war nach 12 h nachweisbar. Nach 24 h war kein 6-TG-DP [4] mehr zu sehen. Als wesentliche Produkte wurden größere Mengen an 6-TI-MP [13] und 6-MP-R [12] gefunden. Daneben war 6-TG-MP [3] als Produkt des Interkonversionsstoffwechsels, sowie größere Mengen des Abbauproduktes 8-OH-6-MP [21] (2,2 min) vorhanden.

Bei allen Zellen, die mit 6-MP inkubiert wurden, wurde parallel zur Fluoreszenz auch die Absorption bei 290 nm gemessen, um zu sehen, ob 6-MMP und seine Nukleotide gebildet wurden. In 5 Zelllinien (Dünndarmepithel-, Nierenepithel-, Corneaepithel-, Ovarialkarzinom- und Prostatakarzinomzellen) wurden geringere Mengen (< 1% der Gesamtmenge) an 6-MMP-MP gefunden. Wegen der geringen Menge sind diese Ergebnisse im folgenden Text nicht aufgeführt.



**Abb. 36:** Inkubation von humanen Intestinalzellen mit 6-MP. Die Zellen wurden mit 60  $\mu\text{mol/l}$  6-MP für 0 bis 24 h inkubiert. Die Nummerierung der Peaks erfolgt nach den in der Tabelle 2b angegebenen Ziffern.

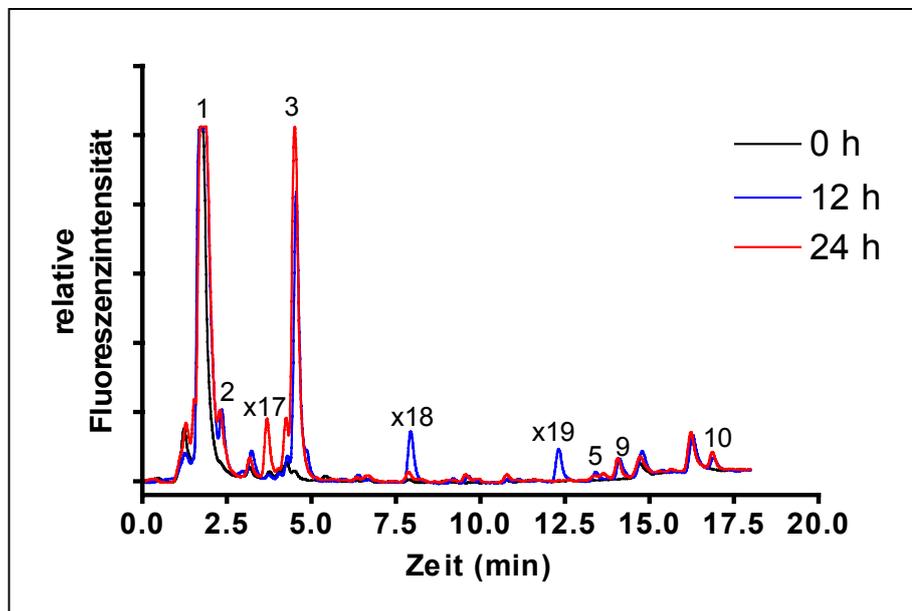
#### 4.3.3. Humane Hepatomazellen (Hep G2)

##### a) Inkubation von humanen Hepatomazellen mit 6-TG

Humane Hepatomazellen wurden mit 4,2  $\mu\text{mol/l}$  6-TG für 0 bis 24 h inkubiert. In der Abb. 37 sind die nach 0, 12 bzw. 24 h erhaltenen Chromatogramme abgebildet.

Auffällig ist, dass in Hep G2-Zellen - anders als die I-407-Zellen- zum Zeitpunkt 0 h keine Stoffwechselprodukte nachweisbar waren, nur das eingesetzte 6-TG war im Chromatogramm sichtbar. Auch nach 12 h waren im Vergleich zu den intestinalen Zellen nur wenige Metaboliten zu erkennen. 6-TG-MP [3] bildete den Hauptmetaboliten, während die Methylierungsprodukte 6-MTG-DP [9] und -TP [10] in geringen Mengen nachweisbar waren. Bemerkenswert ist, dass von den Nukleotiden des 6-TG nur 6-TG-TP [5] an der Nachweisgrenze nachgewiesen werden konnte. Zwei unbekannte Peaks x18 und x19 (8,0 min und 12,4 min) waren nach 12 h sichtbar, nicht aber nach 24 h. 6-TG-MP [3] und kleine Mengen an 6-TG-R [2] waren nach 24 h nachweisbar. Ein unbekannter Peak x17 erschien

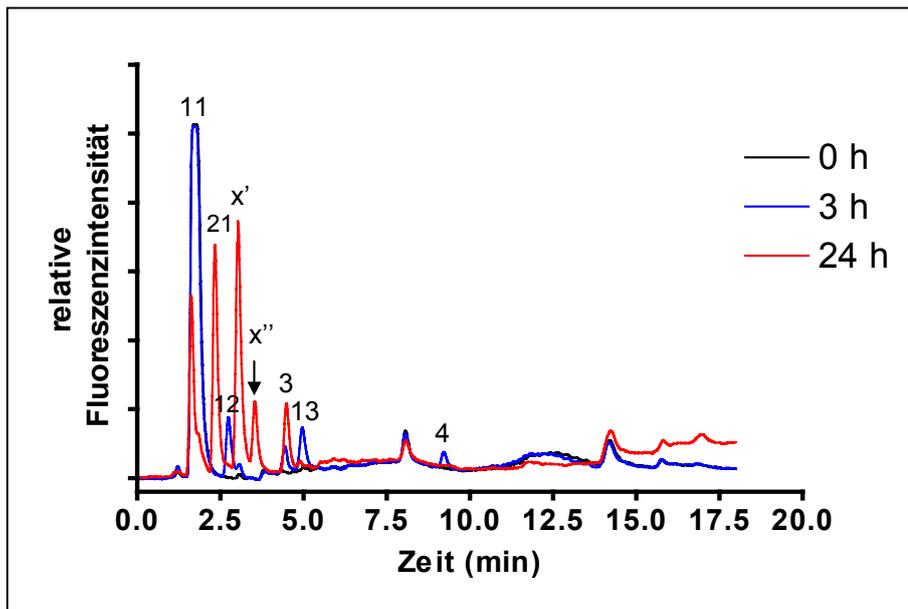
nach 24 h bei Rt von 3,5 min. Im Vergleich zu den Intestinalzellen war der Metabolismus der Leberzellen gering.



**Abb. 37:** Inkubation von humanen Hepatomazellen mit 6-TG. Die Zellen wurden mit 4,2  $\mu\text{mol/l}$  6-TG für 0 bis 24 h inkubiert. Die Nummerierung der Peaks erfolgt nach den in der Tab. 2a angegebenen Ziffern.

#### b) Inkubation von humanen Hepatomazellen mit 6-MP

6-MP [11] war zum Zeitpunkt 0 h nur als Ausgangssubstanz sichtbar. Nach 3 h waren kleine Mengen an 6-TI-MP [13], 6-TG-MP [3], 6-TG-DP [4] und 6-MP-R [12] nachweisbar. 6-TG-MP [3] nahm nach 24 h zu, 6-TG-DP [4] dagegen war nicht mehr vorhanden. Daneben entstanden 8-OH-6-MP [21] und zwei unbekannte Peaks ( $x'$  und  $x''$ ), die zeitlich sehr nah nebeneinander aufgetreten sind (3,1 min und 3,4 min). Beim Peak mit der Retentionszeit von 3,1 min könnte es sich um 6-TX handeln. Die Gesamtmenge an 6-MP betrug nach 24 h noch 80 % der Ausgangsmenge, was auf einen geringen Umsatz der Hepatomazellen schließen lässt (Abb. 38).

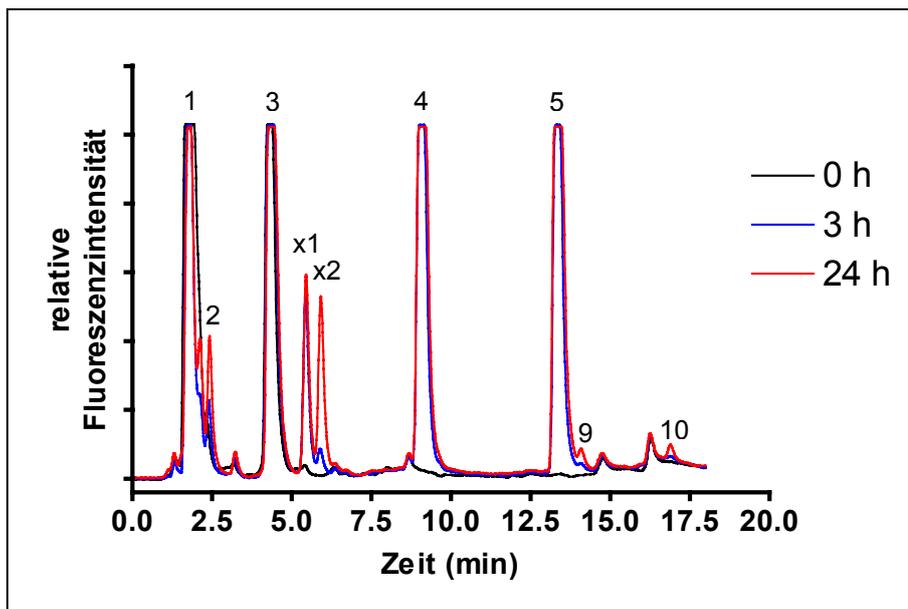


**Abb. 38:** Inkubation von humanen Hepatomazellen mit 6-MP. Die Zellen wurden mit 60  $\mu\text{mol/l}$  6-MP für 0 bis 24 h inkubiert. Die Nummerierung der Peaks erfolgt nach den in der Tab. 2b angegebenen Ziffern.

#### 4.3.4. Nierene epithelzellen (LLC-MK2)

##### a) Inkubation von Nierene epithelzellen mit 6-TG

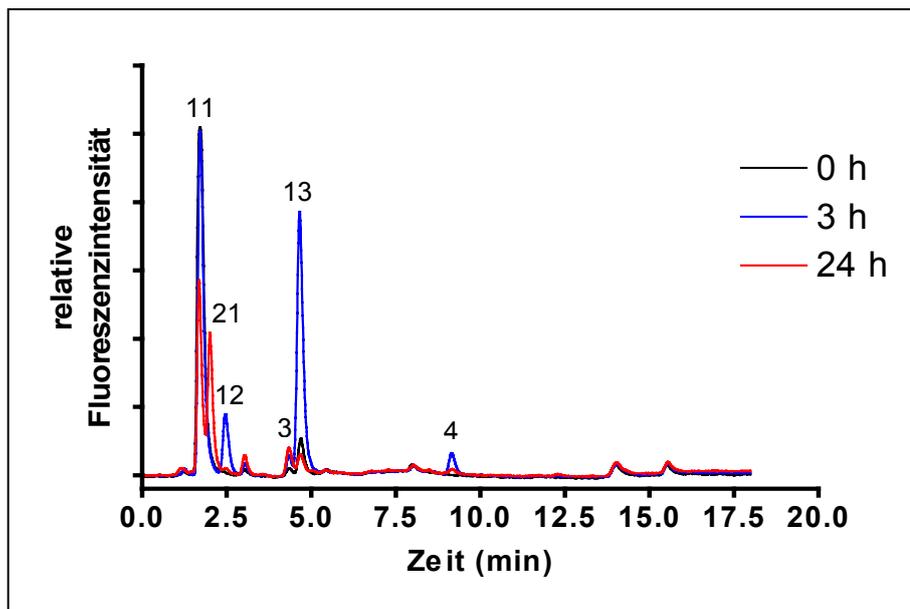
Nierene epithelzellen nehmen 6-TG [1] schnell auf und verstoffwechseln es zu Nukleosid und Nukleotiden. Die bei Inkubation der Zelllinien nach 0, 3 und 24 h erhaltenen Chromatogramme sind in der Abb. 39 übereinander dargestellt. Bereits zum Zeitpunkt 0 h entstand sofort und in großer Menge das 6-TG-MP [3]. Nach 3 h waren auch das 6-TG-DP [4] und 6-TG-TP [5] in großen Mengen nachweisbar, alle drei Phosphate wurden zu diesen Zeiten in gleichen Mengen gefunden. Zusätzlich konnten zwei Zusatz-„Peaks“ bei 5,4 min [x1] und 5,9 min [x2] beobachtet werden. Auch nach 24 h waren die drei Phosphate in gleichen Mengen in den Zellen enthalten. Die Fläche des Peaks x2 bei Rt von 5,9 min nahm um das 8-fache zu. Kleine Mengen an methylierten 6-TG in Form von 6-MTG-DP [9] und 6-MTG-TP [10] waren zu sehen, wie auch das aus den 6-TGN durch Abspaltung der Phosphate gebildete 6-TG-R [2] bei 2,5 min.



**Abb. 39:** Inkubation von Nierenepithelzellen mit 6-TG. Die Zellen wurden mit 4,2  $\mu\text{mol/l}$  6-TG für 0 bis 24 h inkubiert. Die Nummerierung der Peaks erfolgt nach den in der Tab. 2a angegebenen Ziffern.

#### b) Inkubation von Nierenepithelzellen mit 6-MP

6-MP wird durch Nierenepithelzellen nur langsam metabolisiert. In der Abb. 40 sind die nach 0, 3 und 24 h erhaltenen Chromatogramme dargestellt. Zum Zeitpunkt 0 h fand sich neben 6-MP [11] eine kleine Menge an 6-TI-MP [13]. Nach 3 h erreichte das 6-TI-MP sein Maximum. Daneben waren mit 6-TG-MP [3], 6-TG-DP [4], 6-MP-R [12] auch weitere Produkte des Purinkonversionsstoffwechsels nachweisbar. Das 6-TG-TP war nicht nachweisbar. Nach 24 h Inkubation war nur noch 8-OH-6-MP [21] in größeren Mengen als Abbauprodukt des 6-Mercaptopurins zu sehen, während alle anderen Metaboliten nur in geringen Mengen vorhanden waren.



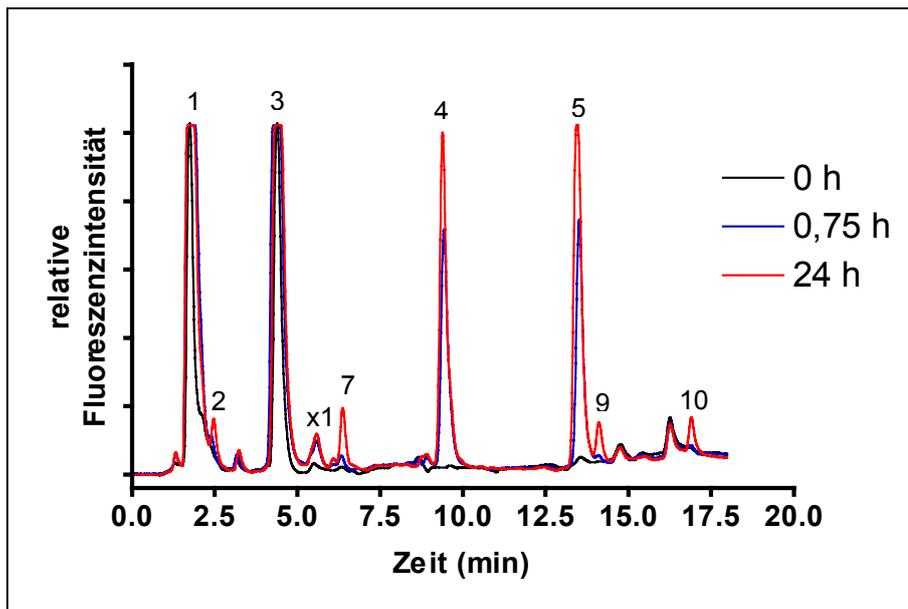
**Abb. 40:** Inkubation von Nierenepithelzellen mit 6-MP. Die Zellen wurden mit 60  $\mu\text{mol/l}$  6-MP für 0 bis 24 h inkubiert. Die Nummerierung der Peaks erfolgt nach den in der Tab. 2b angegebenen Ziffern.

#### 4.3.5. Humane Ovarialkarzinomzellen (Ovcar-3)

##### a) Inkubation von humanen Ovarialkarzinomzellen mit 6-TG

Die Ovcar-3-Zellen bildeten sehr schnell das 6-TG-MP [3], welches bereits zum Zeitpunkt 0 h als großer Peak imponierte (Abb. 40). Nach 45 min waren auch 6-TG-DP [4] und -TP [5] als große Peaks nachweisbar.

Nach 24 h Inkubation blieb die Fläche des Monophosphates [3] in etwa gleich, während die Flächen des Di- [4] und Triphosphates [5] jeweils um 23 % zunahm. Nach 24 h waren auch 6-MTG-DP [9] und -TP [10] nachweisbar, ebenso das 6-MTG-R [7]. Der unbekannte Peak x1 war schon nach 45 min zu sehen, seine Fläche nahm mit längerer Inkubationszeit nicht zu. Der Peak x2, der in Nierenepithelzellen in gleich großen Mengen gebildet worden war, konnte in Ovcar-3-Zellen nicht nachgewiesen werden.

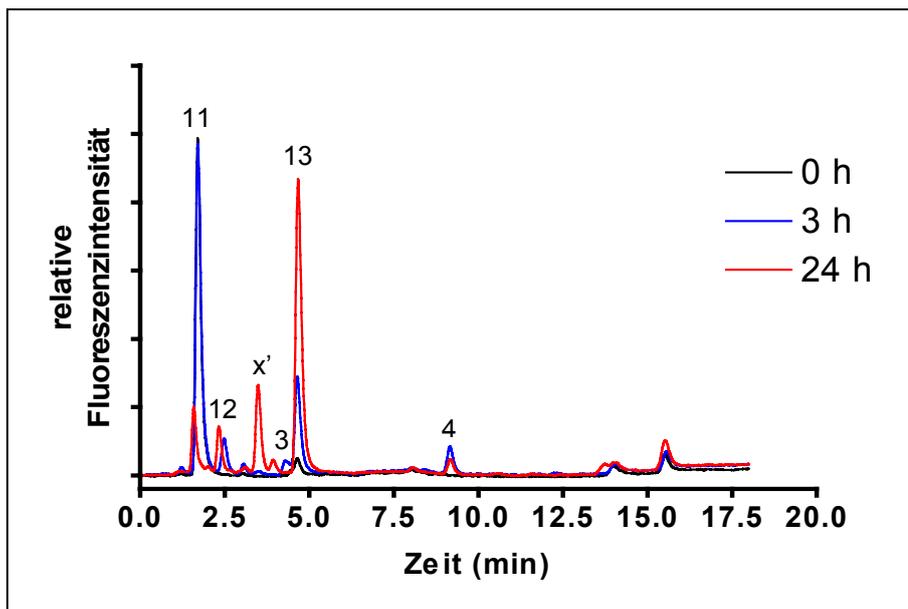


**Abb. 41:** Inkubation von Ovarialkarzinomzellen mit 6-TG. Die Zellen wurden mit 4,2  $\mu\text{mol/l}$  6-TG für 0 bis 24 h inkubiert. Die Nummerierung der Peaks erfolgt nach den in der Tab. 2a angegebenen Ziffern.

#### b) Inkubation von humanen Ovarialkarzinomzellen mit 6-MP

6-MP wurde durch Ovar-3-Zellen wesentlich schneller metabolisiert als von den vorher erwähnten Zelllinien. Die Abb. 42 zeigt die Chromatogramme, die nach 0, 3 und 24 h Inkubation erhalten wurden.

Nach 3 h waren 25 % des zugesetzten 6-Mercaptopurins zu 6-TI-MP [13] umgesetzt. Auch 6-TG-MP [3] und 6-TG-DP [4] sind nach 3 h entstanden, allerdings in sehr kleinen Mengen. Nach 24 h fiel das 6-MP [11] stark ab und 6-TI-MP bildete neben geringen Mengen an 6-MP-R [12] den Hauptmetaboliten. Zusätzlich erschien ein unbekannter Zusatz-„Peak“ [x'] bei Rt von 3,2 min; die Retentionszeit entsprach der des 6-TX. 6-TG-DP [4] war nach 24 h nur noch in Spuren nachweisbar.



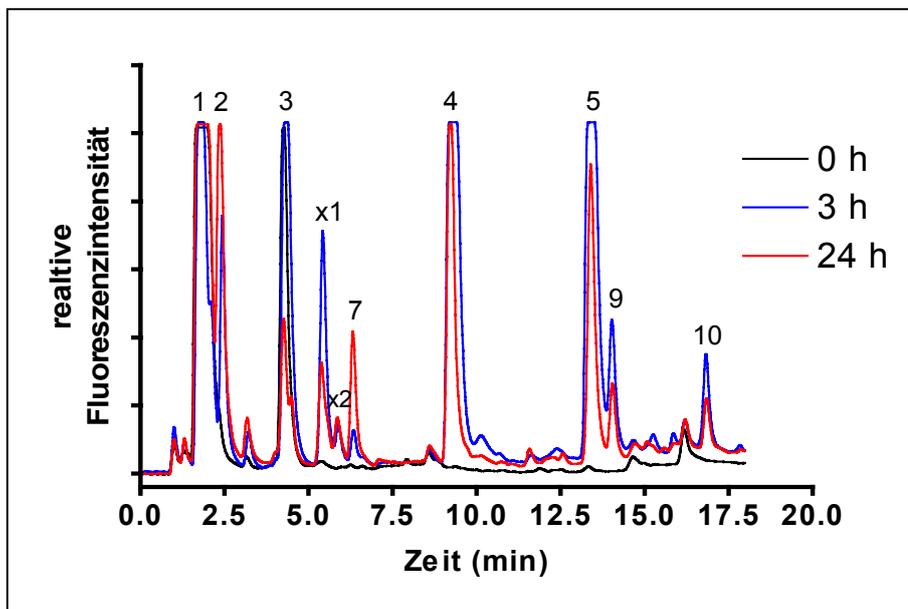
**Abb. 42:** Inkubation von Ovarialkarzinomzellen mit 6-MP. Die Zellen wurden mit 60  $\mu\text{mol/l}$  6-MP für 0 bis 24 h inkubiert. Die Nummerierung der Peaks erfolgt nach den in der Tab. 2b angegebenen Ziffern.

#### 4.3.6. Prostatakarzinomzellen (PC-3)

##### a) Inkubation von Prostatakarzinomzellen mit 6-TG

Auch Prostatakarzinomzellen verstoffwechselten 6-TG [1] sehr schnell zum 6-TG-MP [3], welches bereits zum Zeitpunkt 0 h nachweisbar war. Nach 3 h konnten alle spezifischen Phosphate von 6-TG in großen Mengen nachgewiesen werden [3, 4, 5]. Daneben fand sich der unbekannte Peak x1, sowie die Methylierungsprodukte 6-MTG-DP [9] und -TP [10].

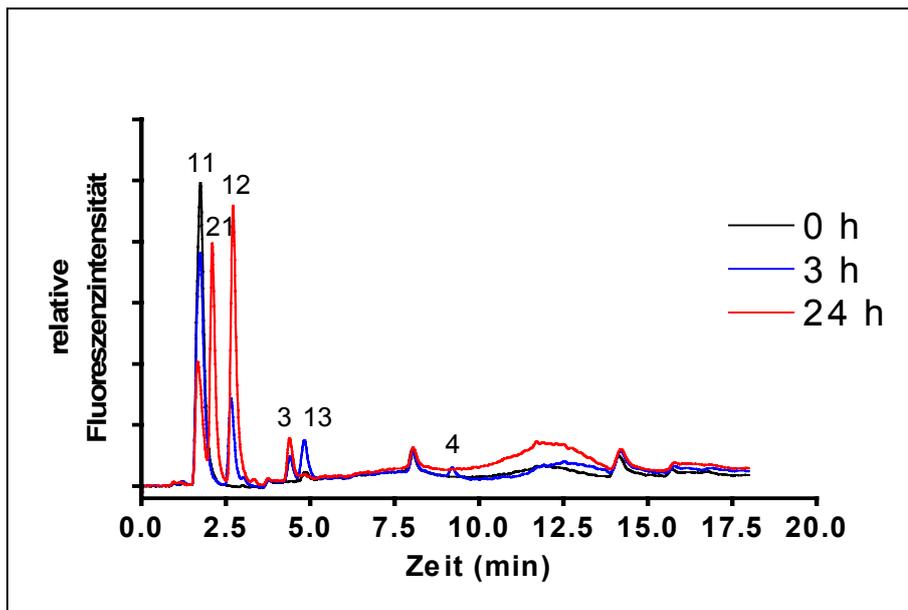
Nach 24 h Inkubation waren die Phosphate des 6-TG und des 6-MTG rückläufig, als Abbauprodukte sind das 6-TG-R [2] und 6-MTG-R [7] zu sehen. Bemerkenswert war weiterhin, dass, wie in einigen anderen Zelllinien, x1 und x2 als Metaboliten unbekannter Struktur nachweisbar waren, wobei die Menge an x2 allerdings gering blieb. Abb. 43 gibt die Chromatogramme nach 0, 3 und 24 h Inkubationszeit wieder.



**Abb. 43:** Inkubation von Prostatakarzinomzellen mit 6-TG. Die Zellen wurden mit 4,2  $\mu\text{mol/l}$  6-TG für 0 bis 24 h inkubiert. Die Nummerierung der Peaks erfolgt nach den in der Tab. 2a angegebenen Ziffern.

#### b) Inkubation von Prostatakarzinomzellen mit 6-MP

Die Abb. 44 gibt die Chromatogramme wieder, die nach 0, 3 und 24 h Inkubation von PC-3-Zellen mit 60  $\mu\text{mol/l}$  6-MP erhalten wurden. Zum Zeitpunkt 0 h konnte nur 6-MP [11] nachgewiesen werden. Nach 3 h war zwar eine kleine Menge vom 6-TI-MP [13] gebildet worden, gleichzeitig waren sehr kleine Mengen an 6-TG-MP [3] und -DP [4] vorhanden. Nach 24 h ist kein 6-TI-MP [13] mehr nachweisbar, dagegen wurde 6-TG-MP [3] deutlich zu sehen. Die Fläche des 6-MP-„Peaks“ ist in dieser Zeit um 45 % abgefallen. 6-MP-R [12] war nach 3 h bereits sichtbar, seine Fläche nahm nach 24 h deutlich zu. Zusätzlich entstand nach 24 h das Abbauprodukt 8-OH-6-MP [21].



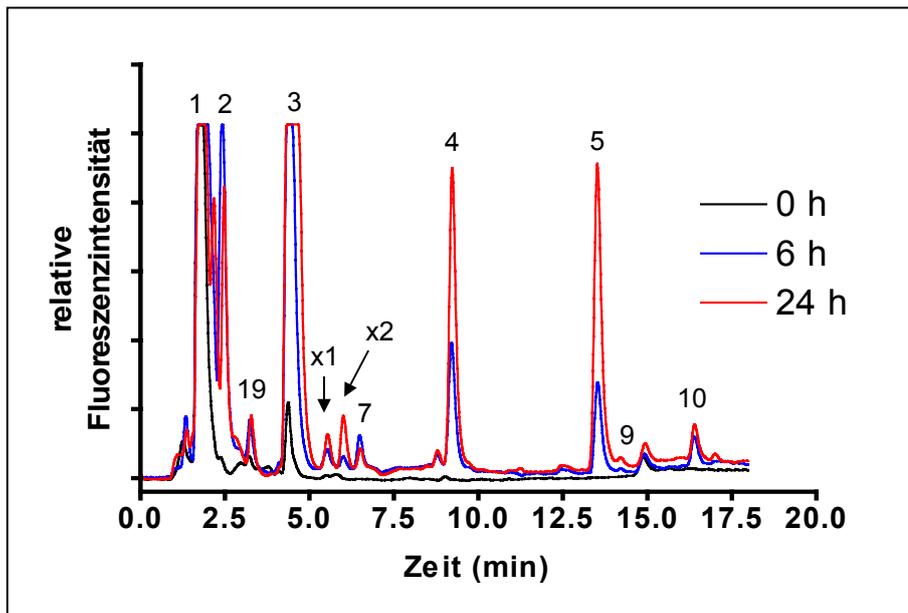
**Abb. 44:** Inkubation von Prostatakarzinomzellen mit 6-MP. Die Zellen wurden mit 60  $\mu\text{mol/l}$  6-MP für 0 bis 24 h inkubiert. Die Nummerierung der Peaks erfolgt nach den in der Tab. 2b angegebenen Ziffern.

#### 4.3.7. Humane Colonkarzinomzellen (CaCo-2)

Neben Ovarial- und Prostatakarzinomzellen wurden Colonkarzinomzellen (CaCo-2) als drittes Beispiel eines Tumors eingesetzt. Auch CaCo-2-Zellen zeigten einen deutlichen 6-TG-Umsatz; die Abb. 45 zeigt die nach 0, 6 und 24 h erhaltenen Chromatogramme.

##### a) Inkubation von humanen Colonkarzinomzellen mit 6-TG

Humane Colonkarzinomzellen bildeten bereits zum Zeitpunkt 0 h geringe Mengen an 6-TG-MP [3]. Nach 6 h entstanden neben 6-TG-MP auch 6-TG-DP [4], 6-TG-TP [5] und das 6-TG-R [2]. Eine kleine Menge an 6-MTG-DP [9] und -TP [10] ist neben 6-MTG-R [7] entstanden. Nach 24 h nahm die Menge an 6-TGN weiter zu und stellte die Hauptmetabolite dar. Die unbekannt Peaks x1 und x2 konnten neben 6-TX [19] nach 24 h in kleinen Mengen beobachtet werden.



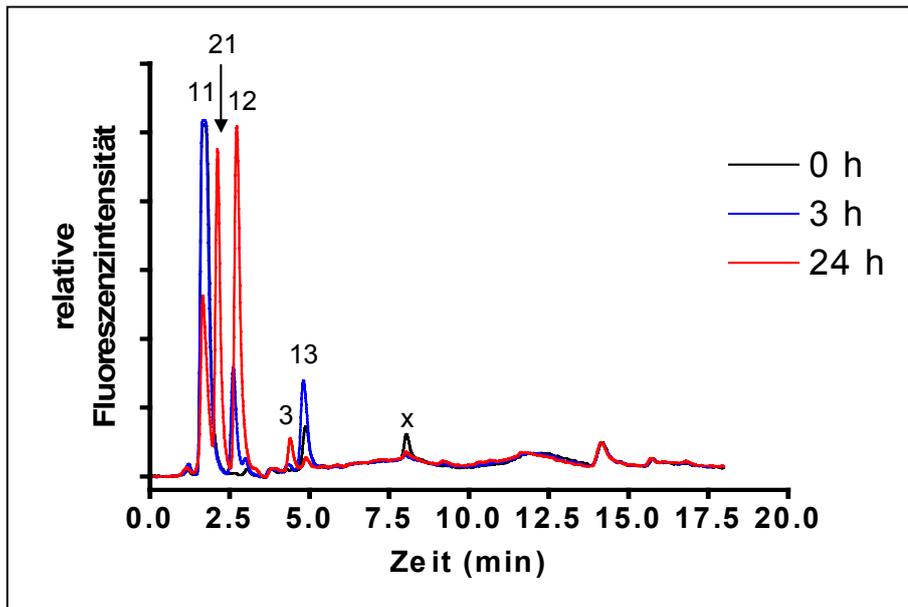
**Abb. 45:** Inkubation von humanen Colonkarzinomzellen mit 6-TG. Die Zellen wurden mit 4,2  $\mu\text{mol/l}$  6-TG für 0 bis 24 h inkubiert. Die Nummerierung der Peaks erfolgt nach den in der Tab. 2a angegebenen Ziffern.

#### b) Inkubation von humanen Colonkarzinomzellen mit 6-MP

6-MP wurde von CaCo-2-Zellen nur in geringem Maße verstoffwechselt. Die Abb. 46 zeigt die nach 0, 3 und 24 h Inkubation erhaltenen Chromatogramme.

Zum Zeitpunkt 0 h entstand eine kleine Menge an 6-TI-MP [13]. Ein Zusatz-„Peak“ [x] bei 8,1 min war nur beim Zeitpunkt 0 h sichtbar. Nach 3 h vergrößerte sich die Fläche des 6-TI-MP um 46 %; das 6-TI-DP und -TP waren jedoch nicht nachweisbar. Zugleich konnte das 6-MP-R [12] nachgewiesen werden.

Nach 24 h ist kein 6-TI-MP mehr sichtbar, 6-MP-R nahm in der Zeit zu und war neben dem 8-OH-6-MP [21] als Hauptmetabolit zu sehen. Kleine Mengen an 6-TG-MP [3] waren sichtbar, jedoch kein 6-TG-DP und -TP. Innerhalb von 24 h nahm die 6-MP-Menge um insgesamt 55 % ab.



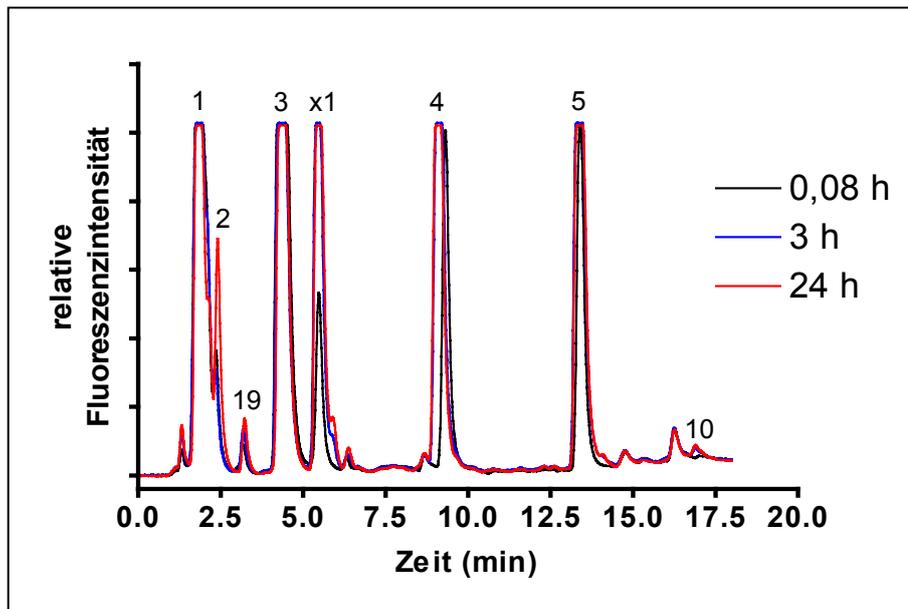
**Abb. 46:** Inkubation von humanen Colonkarzinomzellen mit 6-MP. Die Zellen wurden mit 60  $\mu\text{mol/l}$  6-MP für 0 bis 24 h inkubiert. Die Nummerierung der Peaks erfolgt nach den in der Tab. 2b angegebenen Ziffern.

#### 4.3.8. Humane Nebennierenrindenzellen (NCI H 295)

Humane Nebennierenrindenzellen, Corneaepithelzellen und Herzmyoblastenzellen wurden als Beispiele für Zellen untersucht, die weder zu den Zielzellen der Thiopurinwirkungen gehören, noch von denen ein größerer Stoffwechsel erwartet wird.

##### a) Inkubation von humanen Nebennierenrindenzellen mit 6-TG

Die humanen Nebennierenrindenzellen zeigten einen ausgeprägten Stoffwechsel des 6-TG. In der Abb. 47 sind die nach Inkubationszeiten von 5 min, 3 und 24 h erhaltenen Chromatogramme zusammengestellt. Bereits nach 5 min war die Masse des 6-TG zu Metaboliten umgesetzt; die Nukleotidphosphate 6-TG-MP [3], -DP [4] und -TP [5] sind gut zu erkennen. Auch der in Erythrozyten und in mehreren anderen Zelllinien gefundene unbekannte Peak x1 war schon nach 5 min in größeren Mengen gebildet. Nach 3 h war 6-TG-R [2] als weiterer Metabolit nachweisbar.



**Abb. 47:** Inkubation von humanen Nebennierenrindenzellen mit 6-TG. Die Zellen wurden mit  $4,2 \mu\text{mol/l}$  6-TG für 0 bis 24 h inkubiert. Die Nummerierung der Peaks erfolgt nach den in der Tab. 2a angegebenen Ziffern.

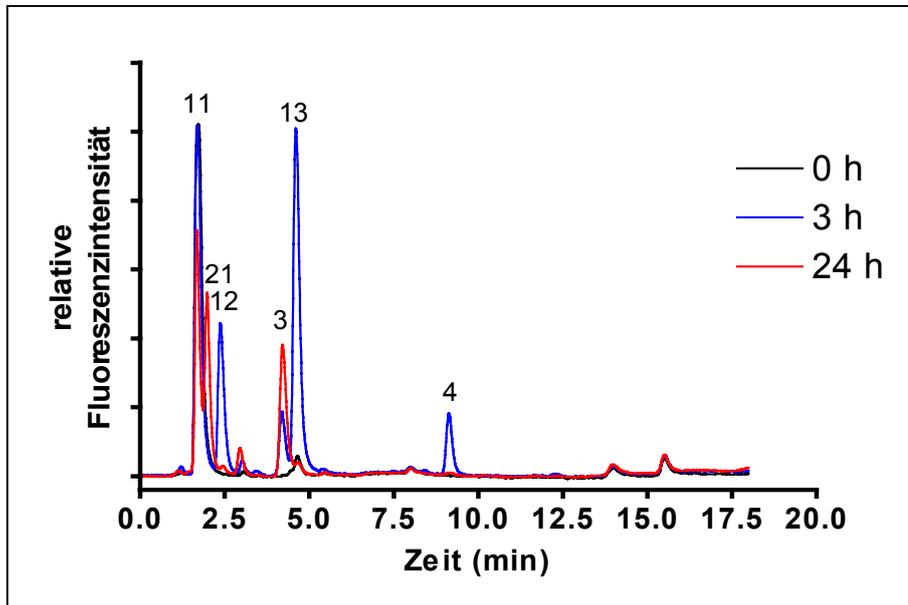
Alle drei 6-Thioguanosin-Nukleotide wurden bei untersuchten Inkubationszeiten von 3 und 24 h in gleichen Verhältnissen gebildet. Eine sehr kleine Menge an 6-MTG-TP [10], die unter 1 % lag, wurde nach 3 und 24 h nachgewiesen.

Nebennierenrindenzellen nahmen 6-TG also schnell auf und verstoffwechselten dieses zum Nukleosid und den Nukleotiden mit einer den Nierenepithelzellen oder Prostatakarzinomzellen vergleichbaren Geschwindigkeit. Der oxidative Abbau oder der Umsatz zu Metaboliten noch unbekannter Struktur verlaufen dagegen langsamer und sind hier nur als untergeordnete Stoffwechselwege anzusehen (6-TX, [19]).

#### b) Inkubation von humanen Nebennierenrindenzellen mit 6-MP

Wie bei den meisten anderen untersuchten Zellen haben auch Nebennierenrindenzellen 6-MP nur langsam umgesetzt (Abb. 48). Zum Zeitpunkt 0 h war nur sehr wenig 6-TI-MP [13] entstanden, welches erst nach 3 h den Hauptmetaboliten darstellte. Daneben wurden nach 3 h 6-TG-MP [3] und 6-TG-DP [4] identifiziert. Nach 24 h war kein 6-TI-MP mehr nachweisbar, dafür war jetzt 6-MP-R [12] und

6-TG-MP in größeren Mengen vorhanden. Zudem war nach 24 h 8-OH-6-MP [21] entstanden.



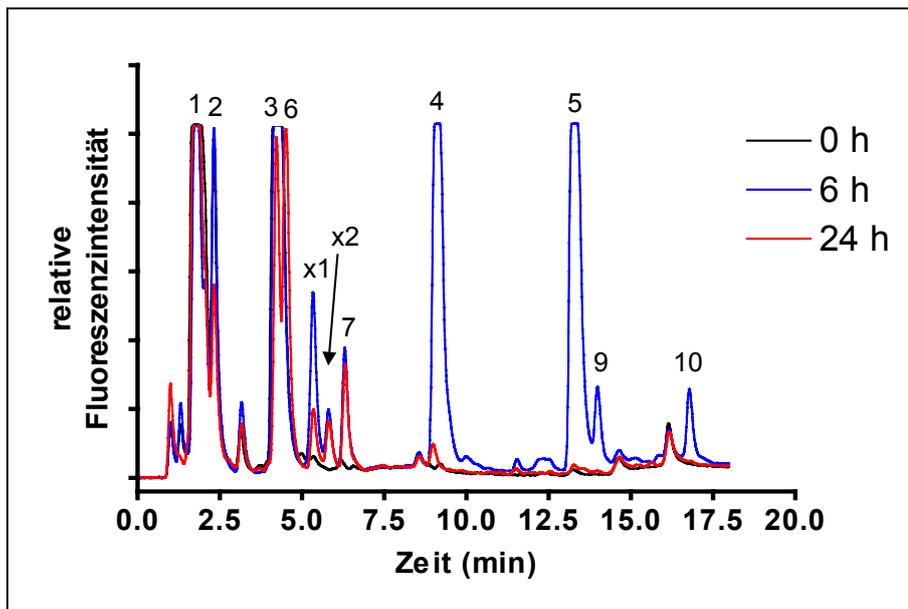
**Abb. 48:** Inkubation von humanen Nebennierenrindenzellen mit 6-MP. Die Zellen wurden mit 60  $\mu\text{mol/l}$  6-MP für 0 bis 24 h inkubiert. Die Nummerierung der Peaks erfolgt nach den in der Tab. 2b angegebenen Ziffern.

#### 4.3.9. Humane Corneaepithelzellen (HCE)

Humane Corneaepithelzellen kommen auch bei 6-TG behandelten Patienten kaum mit 6-TG in Kontakt. Außerdem teilen sich diese Zellen normalerweise nur langsam und haben von daher keinen großen endogenen Purin-Metabolismus. Daher stellen diese Zellen ein Beispiel für einen Zelltyp mit nur geringer Thiopurin-Exposition in behandelten Patienten dar.

##### a) Inkubation von humanen Corneaepithelzellen mit 6-TG

Wie auch in anderen Zelllinien war bereits nach 0 h Inkubation ein beträchtlicher Anteil des 6-TG zum 6-TG-MP [3] umgewandelt; auch das 6-TG-R [2] ist nachweisbar (Abb. 49).



**Abb. 49:** Inkubation von humanen Corneaepithelzellen mit 6-TG. Die Zellen wurden mit  $4,2 \mu\text{mol/l}$  6-TG für 0 bis 24 h inkubiert. Die Nummerierung der Peaks erfolgt nach den in der Tab. 2a angegebenen Ziffern.

Nach 6 h waren 6-TG-MP [3], 6-TG-DP [4] und 6-TG-TP [5] in gleich großen Mengen gebildet worden. Auch 6-Thioguanosin [2] und die Produkte der S-Methylierung, 6-MTG-R [7], 6-MTG-DP [9] und -TP [10] waren nach 6 h deutlich erkennbar, nicht aber zu Inkubationsbeginn. Die zwei unbekannt Substanzen x1 und x2 sind vor allem nach 6 h deutlich sichtbar; von x1 nimmt die Gesamtmenge nach 24 h wieder ab.

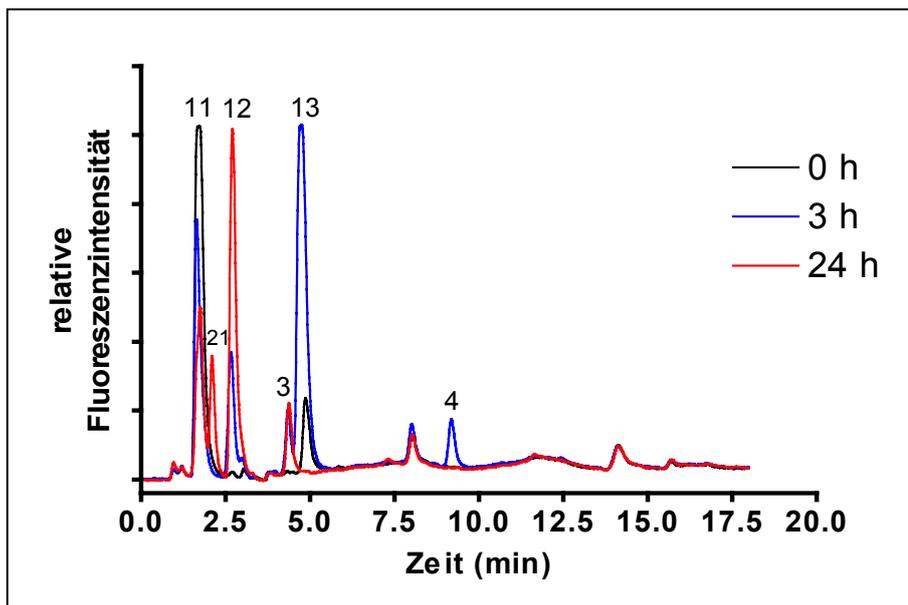
Nach 24 h sind keine Di- und Triphosphate des 6-Thioguanosins und 6-Methylthioguanosins mehr nachweisbar. Das 6-TG-MP [3] war ebenso wie 6-TG-R [2] und der unbekannte Peak x1 wesentlich kleiner. In den größten Anteilen werden nach 24 h das 6-MTG [6] und das 6-MTG-R [7] sichtbar.

#### **b) Inkubation von humanen Corneaepithelzellen mit 6-MP**

Der 6-MP-Metabolismus durch Corneaepithelzellen unterschied sich nicht wesentlich von demjenigen der anderen untersuchten Zelllinien. Zum Zeitpunkt 0 h entstand bereits eine kleine Menge an 6-TI-MP [13]. Nach 3 h war dieser Peak um

das 5-fache größer; gleichzeitig entstand 6-MP-R [12]. Die Konvertierungsprodukte von 6-MP, die durch Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase und Guanosin-Monohydrat-Dehydrogenase zu den 6-Thioguanosin-Derivaten entstanden sind, waren nach 6 h ebenfalls sichtbar, nämlich das 6-TG-MP [3] und 6-TG-DP [4].

Nach 24 h war kein 6-TI-MP mehr nachweisbar, auch das 6-TG-DP war nicht mehr zu sehen. Die Fläche des 6-TG-MP blieb dagegen konstant und 6-MP-R [12] war vermehrt sichtbar. Zusätzlich entstand 8-OH-6-MP [21]. Innerhalb von 24 h nahm die 6-MP-Menge um 57 % ab (Abb. 50).



**Abb. 50:** Inkubation von humanen Corneaepithelzellen mit 6-MP. Die Zellen wurden mit 60  $\mu\text{mol/l}$  6-MP für 0 bis 24 h inkubiert. Die Nummerierung der Peaks erfolgt nach den in der Tab. 2b angegebenen Ziffern.

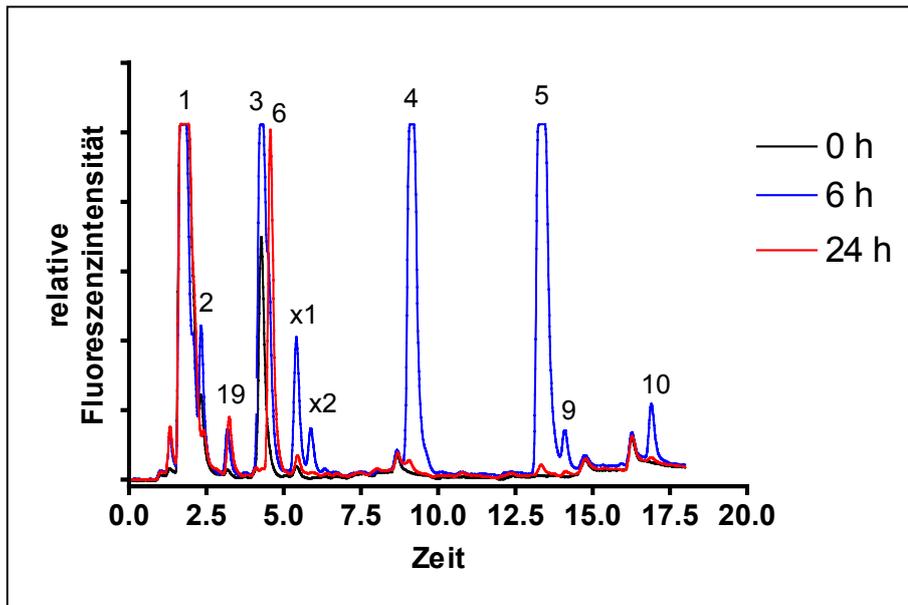
#### 4.3.10. Herzmyoblasten (H9C2)

##### a) Inkubation von Herzmyoblasten mit 6-TG

Zum Zeitpunkt 0 h war das 6-TG-MP [3] bereits entstanden (Abb. 51). Nach 6 h waren alle Nukleotide [3, 4, 5] und das 6-TG-R [2] als Produkte der metabolischen

Aktivierung zu erkennen, daneben die unbekannt Substanzen x1 und x2 sowie 6-TX [19] als Abbauprodukt.

Nach 24 h konnte fast ausschließlich 6-MTG [6] beobachtet werden, während die Nukleotide des 6-Thioguanosins und des 6-Methylthioguanosins sowie die unbekannt Peaks x1 und x2 nicht mehr zu erkennen waren.



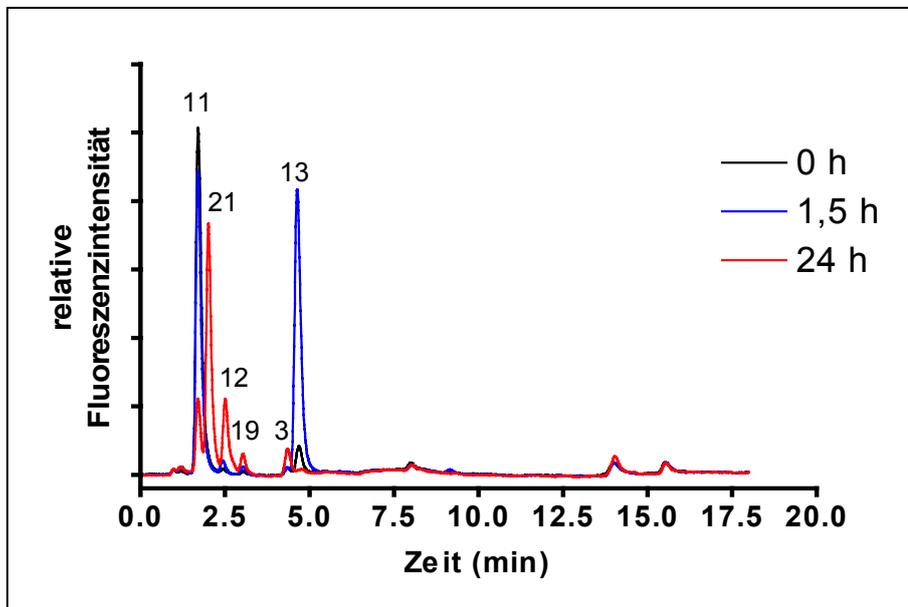
**Abb. 51:** Inkubation von Herzmyoblasten mit 6-TG. Die Zellen wurden mit 4,2  $\mu\text{mol/l}$  6-TG für 0 bis 24 h inkubiert. Die Nummerierung der Peaks erfolgt nach den in der Tab. 2a angegebenen Ziffern.

#### b) Inkubation von Herzmyoblasten mit 6-MP

Wie bei anderen Zellen wurde 6-MP auch durch Herzmuskelzellen nur zu wenigen Produkten umgesetzt. Bereits zum Zeitpunkt 0 h war eine kleine Menge zu 6-TI-MP [13] metabolisiert, die Fläche des Peaks von 6-TI-MP war bereits nach 90 min um den Faktor 12 größer. Zu diesem Zeitpunkt wurden aber nur kleine Mengen an weiteren Stoffwechselprodukten beobachtet.

Nach 24 h nahm die Fläche des 6-TI-MP fast auf Null wieder ab. Neben 6-TG-MP [3] entstand das 6-MP-R [12] und 8-OH-6-MP [21] und kleine Mengen an 6-TX [19].

Nach 24 h Inkubation konnte eine starke Abnahme von 6-MP [11] um 80 % zugunsten des 8-OH-6-MP [21] beobachtet werden. Die Chromatogramme nach 0, 1,5 und 24 h Inkubation sind in der Abb. 52 wiedergegeben.



**Abb. 52:** Inkubation von Herzmyoblasten mit 6-MP. Die Zellen wurden mit 60  $\mu\text{mol/l}$  6-MP für 0 bis 24 h inkubiert. Die Nummerierung der Peaks erfolgt nach den in der Tab. 2b angegebenen Ziffern.

#### 4.3.11. Metabolisierungswege von 6-TG und 6-MP durch die verschiedenen Zelllinien

Leider war eine Quantifizierung der einzelnen Metaboliten nicht möglich, da ihre Fluoreszenzintensität unbekannt war und in einigen Fällen die „Peak“-Spitzen oberhalb des Messbereiches lagen. Außerdem war die Zellzahl im Inkubationsansatz bei den verschiedenen Zelllinien nicht einheitlich. Die folgenden Ausführungen müssen deshalb unter dieser Einschränkung gesehen werden.

In den Tab. 13 und 14 werden die in den Inkubationsansätzen gefundenen Metaboliten unterteilt in Hauptmetabolit (H), Nebenmetabolit (N; „Peak“-Fläche  $\geq 20\%$  der des Hauptmetaboliten) und Spurenmetabolit (S; „Peak“-Fläche  $< 20\%$  des Hauptmetaboliten).

Die Gegenüberstellung der Stoffwechselwege lässt einige Gemeinsamkeiten aller Zellen bzw. der drei Zellgruppen erkennen. In allen Zelllinien findet eine schnelle Aufnahme von 6-TG in den Nukleotid-Pool als 6-TG-MP statt. Während die Phosphorylierung zum 6-TG-TP in den meisten Zellen einen Hauptstoffwechselweg darstellt, trifft dies interessanterweise für intestinale und epitheliale Zellen nicht zu.

Auch wenn die Menge wesentlich geringer ist, so fällt doch auf, dass die beiden unbekannt Peaks x1 und x2 in I-407- und Hep G2-Zellen in den kleinsten Mengen gebildet werden und damit der kleineren Bildung des 6-TG-TP parallel laufen. 6-TX als Abbauprodukt des 6-Thioguanin-Stoffwechsels findet sich in Herzmyoblasten, Nebennierenrinden-, Dünndarmepithel- und Colonkarzinomzellen wieder. Die letzten beiden Zelltypen entstammen dem Darmtrakt (Dünn- und Dickdarm).

Bemerkenswert ist ebenfalls die Parallelität zwischen der Aktivität der TPMT und der Methylierung von 6-TG zu den 6-MTG-Metaboliten. Auch wenn die Di- und Triphosphate des 6-MTG in keiner Zelllinie als Hauptmetaboliten nachgewiesen werden konnten, so fanden sich doch hohe Anteile in Leber- und Dünndarmepithelzellen, sowie auffälligerweise in den Corneaepithelzellen. In den Zellen mit der geringsten TPMT-Aktivität (Nebennierenrindenzellen) war dagegen 6-MTG-TP nur in kleinen Mengen nachweisbar.

**Tab. 13:** Vergleich der Metabolisierung von 6-TG durch Zellkulturen. Die Zuordnung erfolgt im Vergleich zum größten Peak (Hauptmetabolit) aller Metaboliten in derselben Zelle. H= Hauptmetabolit; N= Peaks mit mehr als 20 % der Fläche des Hauptmetaboliten (Nebenmetabolite); S= Peaks mit weniger als 20 % der Fläche des Hauptmetaboliten („Spurenmetabolite“).

	I-407	Hep G2	LLC-MK2	Ovcar-3	PC-3	CaCo-2	NCI H 295	HEC	H9C2
<b>6-TG-R</b>	-	S	S	S	N	N	N	N	N
<b>6-TG-MP</b>	N	H	H	H	N	H	H	H	N
<b>6-TG-DP</b>	S	S	N	N	N	N	N	N	N
<b>6-TG-TP</b>	S	S	N	N	H	N	N	N	H
<b>unb. x1</b>	S	-	N	S	N	S	N	N	N
<b>unb. x2</b>	-	-	N	-	S	S	-	S	S



	I-407	Hep G2	LLC-MK2	Ovcar-3	PC-3	CaCo-2	NCI H 295	HEC	H9C2
6-TG-MP	N	N	S	S	S	S	N	S	S
6-TG-DP	S	S	S	S	S	-	S	S	-
6-TG-TP	-	-	-	-	-	-	-	-	-
unb. x1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
unb. x2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6-TX	-	N	-	N	-	-	-	-	S

Die weitere Phosphorylierung des 6-TG-MP zum -DP findet in allen Zelllinien außer den Darmzellen (CaCo-2) und Herzmyoblasten (H9C2) statt. Die Nebennierenrindenzellen bilden die größten Mengen an 6-TG-MP und 6-TG-DP. In den Nierenepithel-, Intestinal-, Ovarialkarzinom-, Prostatakarzinom- und Corneaepithelzellen lassen sich auch kleine Mengen an 6-MMP-MP nachweisen, dagegen kein 6-MMP-DP und -TP.

#### **4.4. Vergleich der Ergebnisse gewonnen mit der „Nukleotid“-Methode und der „Erdmann“-Methode aus Blutproben von ALL-Patienten unter Therapie**

##### **4.4.1. 6-Thioguanin**

Wie unter Material und Methoden beschrieben, wurde von Patienten, die im Rahmen der ALL-BFM 2000 Therapiestudie mit 6-TG und 6-MP behandelt wurden, an 11 definierten Zeitpunkten Blutproben abgenommen und nach Lübeck per Post geschickt. Hieraus wurden Erythrozytenhämolysate hergestellt und der Hämoglobingehalt dieser Hämolysate bestimmt. Ein Aliquot der Hämolysate wurde angesäuert und durch 15 min Kochen die Thiopurin-Nukleotide hydrolysiert und als freie Basen nach der Methode von Erdmann et al. (1990) quantifiziert. In einem

weiteren Aliquot wurden die Proteine durch Hitzedenaturierung entfernt, und der klare Überstand nach Zentrifugation durch HPLC analysiert („Nukleotid“-Methode).

Die Tab. 15 zeigt die 6-TG-Mengen in den Blutproben eines Patienten, zu den entsprechenden Zeitpunkten des Therapieprotokolls (ALL-BFM 2000 Therapieprotokoll zur Behandlung von Kindern und Jugendlichen mit ALL). Nebeneinander dargestellt sind die Ergebnisse, gewonnen mit der Routinemethode nach Erdmann et al. (1990) und der neu entwickelten „Nukleotid“-Methode.

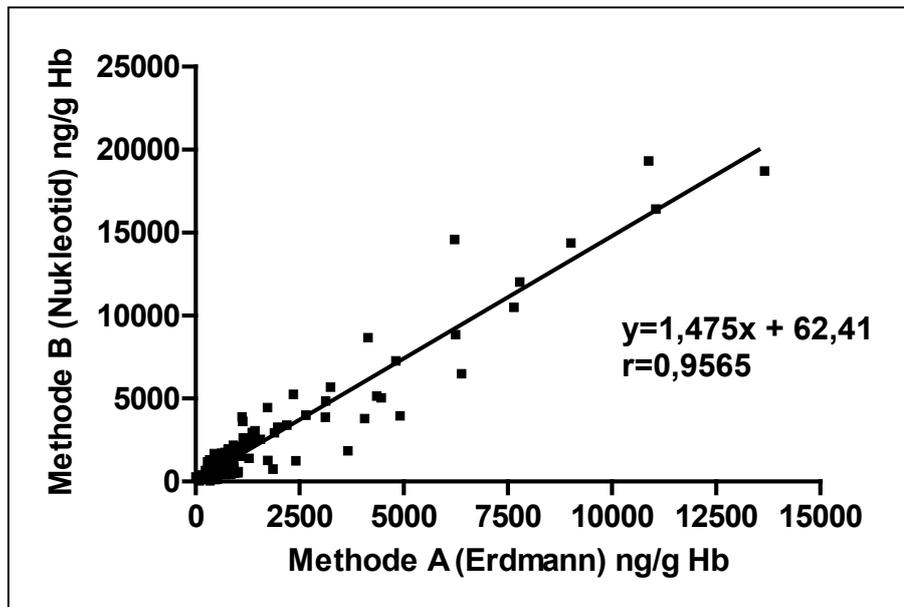
Die Routinemethode liefert die Gesamtsumme der 6-TG-Metaboliten, die nach der Säurebehandlung zu 6-TG hydrolysiert worden sind. Die „Nukleotid“-Methode quantifiziert alle Metaboliten getrennt. Für die Summe des 6-TG wurden alle Nukleotide des 6-Thioguanosins zusammengefasst. In den Chromatogrammen der Patientenproben, wie auch in vielen Inkubationsversuchen von Erythrozyten und Zellen mit 6-TG, fanden sich zwei unbekannte Peaks (x1 und x2), die in manchen Patientenproben als große Peaks imponierten (bis zu 30 % der Gesamt-„Peak“-Fläche).

Wie man sieht, liefert die direkte Bestimmung der 6-TG-Metaboliten mit der „Nukleotid“-Methode überwiegend höhere Werte im Vergleich zur Routinemethode nach Erdmann et al. (1990).

**Tab 15:** Vergleich der 6-TG-Bestimmung nach Erdmann et al. (1990) mit der „Nukleotid“-Methode. Die Ergebnisse der 6-TG-Quantifizierung zu den angegebenen Therapiezeitpunkten des ALL-Chemotherapieprotokolls sind exemplarisch am Beispiel eines ALL-BFM 2000 Patienten aufgelistet.

	Hb-Gehalt Hämolysat	Routinemethode 6-TG ng/g Hb	„Nukleotid“- Methode 6-TG ng/g Hb
Therapiebeginn	4,3	0	0
Ende Protokoll I(2)	4,9	515	1271
Beginn Protokoll M	3,8	45	0
Ende Protokoll M	5,6	182	386
Ende Protokoll III(2)1	4,9	3656	2864
Beginn Dauertherapie	5,6	684	463
Dauertherapie W55	4,6	590	918
Dauertherapie W62	5	387	624
Dauertherapie W74	4,5	239	372
Dauertherapie W86	4,9	324	608
Dauertherapie W98	4,8	16	0

Von 20 Patienten der ALL-BFM 2000 Studie wurden für alle in der Tab. 15 angegebenen Zeitpunkte die Konzentration an 6-TG einmal mit der Routine-methode nach Erdmann et al. (1990) zum anderen mit der „Nukleotid“-Methode in den Blutproben bestimmt. Diese Wertepaare wurden in der Abb. 53 gegeneinander aufgetragen; aus den insgesamt 160 Wertepaaren wurde die Regressionsgerade und der Korrelationskoeffizient berechnet.



**Abb. 53:** Zusammenhang zwischen der Konzentration an 6-TG-Nucleotiden gemessen mit der Routinemethode nach Erdmann et al. (1990) und der „Nucleotid“-Methode.

Die Steigung der Regressionsgeraden beträgt 1,475 und zeigt, dass im Mittel die mit der „Nucleotid“-Methode gemessenen Konzentrationen um diesen Faktor höher sind, als sie mit der Routinemethode nach Erdmann et al. (1990) gemessen werden.

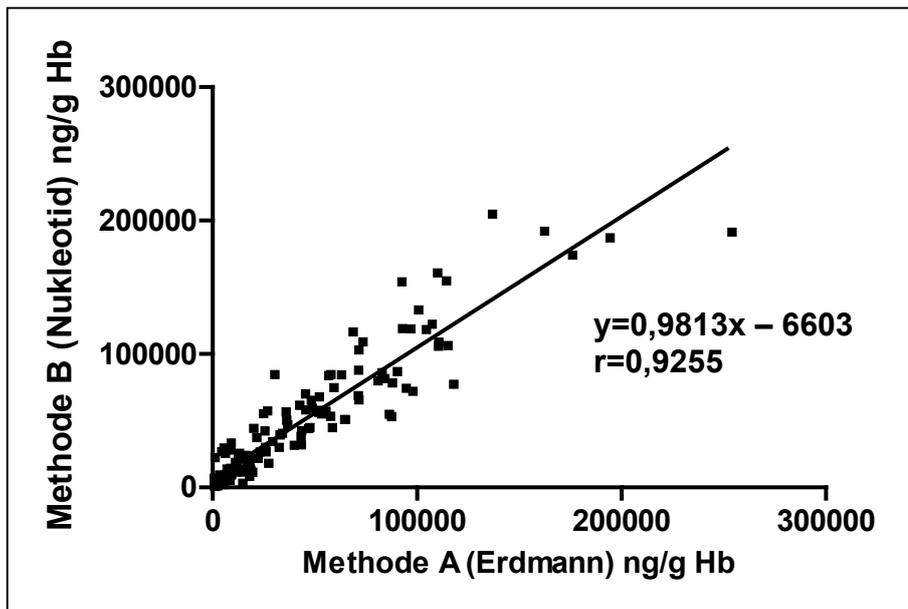
#### 4.4.2. 6-Methylmercaptapurin

Tab. 16 zeigt die 6-MMP-Mengen in den Blutproben eines Patienten zu den entsprechenden Zeitpunkten des ALL-BFM 2000 Therapieprotokolls, wie sie mit der Routinemethode nach Erdmann et al. (1990) gemessen wurden im Vergleich zu den Daten, die mit der neu entwickelten „Nucleotid“-Methode bestimmt worden sind.

**Tab. 16:** Vergleich der 6-MMP-Bestimmung nach Erdmann et al. (1990) mit der „Nukleotid“-Methode. Die Ergebnisse der 6-MMP-Quantifizierung zu den angegebenen Therapiezeitpunkten des ALL-Chemotherapieprotokolls sind exemplarisch am Beispiel eines ALL-BFM 2000 Patienten aufgelistet.

	Hb-Gehalt Hämolysat	Routinemethode	„Nukleotid“- Methode
		6-MMP ng/g Hb	6-MMP ng/g Hb
Therapiebeginn	4,3	0	0
Ende Protokoll I(2)	4,9	59412	74841
Beginn Protokoll M	3,8	8639	7265
Ende Protokoll M	5,6	5779	6818
Ende Protokoll III(2)1	4,9	0	0
Beginn Dauertherapie	5,6	0	0
Dauertherapie W55	4,6	48772	59319
Dauertherapie W62	5	45507	58005
Dauertherapie W74	4,5	57676	53360
Dauertherapie W86	4,9	71663	103173
Dauertherapie W98	4,8	11174	18987

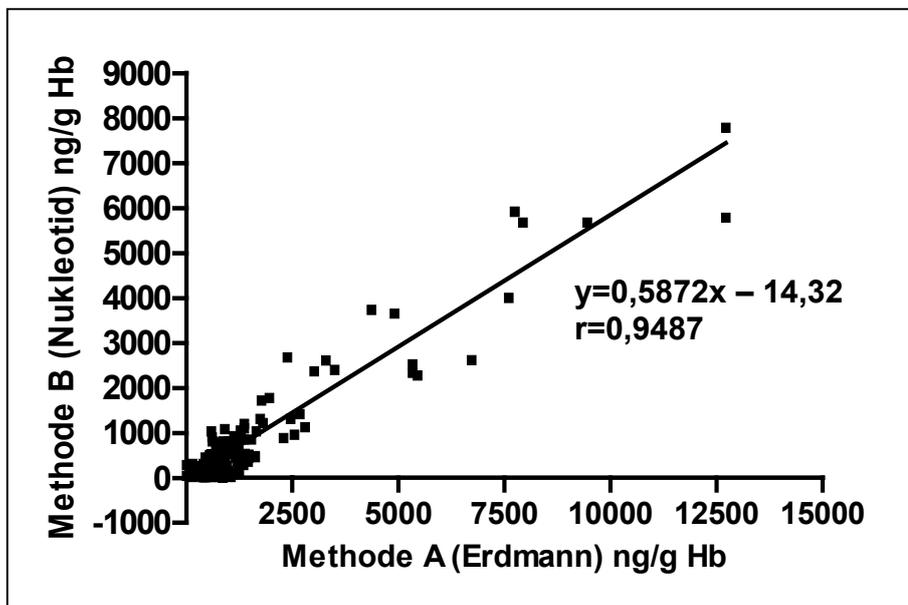
In gleicher Weise wie für 6-TG wurden für alle Zeitpunkte und für alle 20 Patienten die Konzentrationen von 6-MMP mit beiden Methoden unabhängig voneinander bestimmt. Für 6-MMP wurde aus 139 Wertepaaren die Regressionsgerade und der Korrelationskoeffizient berechnet. Die Zahl der Wertepaare ist geringer als für 6-TG, da am Ende von Protokoll II bzw. III und zu Beginn der Dauertherapie kein 6-MMP in den Proben der Patienten vorhanden ist. Die Wertepaare und die berechnete Regressionsgerade sind in der Abb. 54 wiedergegeben. Die Steigung der Regressionsgeraden von 0,9813 zeigt, dass statistisch beide Methoden das gleiche Ergebnis liefern.



**Abb. 54** zeigt den Zusammenhang zwischen der Konzentration an 6-MMP-Nukleotiden gemessen mit der Routinemethode nach Erdmann et al. (1990) und der „Nukleotid“-Methode.

#### 4.4.3. 6-Methylthioguanin

Beim Vergleich der 6-MTG Werte ( $n=165$ ) liefert die Methode nach Erdmann et al. (1990) höhere Werte als die „Nukleotid“-Methode (Abb. 55). Die Steigung der Regressionsgeraden beträgt 0,5872, d. h. die „Nukleotid“-Methode liefert nur ca. 60 % der mit der Routinemethode nach Erdmann et al. (1990) ermittelten Konzentration.



**Abb. 55** zeigt den Zusammenhang zwischen der Konzentration an 6-MTG-Nukleotiden gemessen mit der Routinemethode nach Erdmann et al. (1990) und der „Nukleotid“-Methode.

## 5. Diskussion

### 5.1. Optimierung der „Nukleotid“-Methode

Im Rahmen der individuell angepassten Therapie wird als Parameter für die Dosierung von 6-Mercaptopurin/Azathioprin die 6-TGN-Konzentration in Erythrozyten zunehmend herangezogen. Alle Routineverfahren bedienen sich der Säurehydrolyse der Nukleotide/Nukleoside zur freien Base und bestimmen diese dann als Summe aller vorhandenen 6-TG-Nukleotide/Nukleoside mit HPLC. Analog wird mit den methylierten Thiopurin-Nukleotiden verfahren (Erdmann et al., 1990; Dervieux und Bolieu 1998; Erb et al., 2003). Diese Methoden liefern je nach eingesetzter Säure (Schwefelsäure oder Perchlorsäure), Dauer der Hydrolyse (15 bis 90 min) und zugesetzter Menge an Dithiothreitol sehr unterschiedliche Ergebnisse (Lowry et al., 2001; Shipkova et al., 2003a; Stefan et al., 2004).

Das Ziel dieser Arbeit war, eine Methode zu entwickeln, mit der ohne präanalytische Manipulationen die Bestimmung und Quantifizierung der Thiopurine und ihrer Metaboliten in biologischem Material möglich ist. Die Methode sollte robust und ausreichend sensitiv sein, um auch aus geringem Probenmaterial reproduzierbare Ergebnisse zu liefern. Außerdem sollten kurze Analysezeiten den routinemäßigen Einsatz ermöglichen.

Die dargestellte Methode erlaubt es, den Stoffwechsel der Thiopurine sowohl nach *in vitro* Inkubation als auch bei Patienten unter der Therapie mit 6-Thioguanin oder 6-Mercaptopurin/Azathioprin qualitativ und quantitativ zu erfassen. Die mit der Methode in einem Analysengang nachweisbaren Metaboliten umfassen:

- das 6-Thioguanin, 6-Thioguanosin und seine Nukleotide 6-Thioguanosin-5'-Monophosphat (6-TG-MP), 6-Thioguanosin-5'-Diphosphat (6-TG-DP) und 6-Thioguanosin-5'-Triphosphat (6-TG-TP),
- die Produkte der S-Methylierung 6-Methylthioguanin, 6-Methylthioguanosin, 6-Methylthioguanosin-5'-Monophosphat (6-MTG-MP), 6-Methylthioguanosin-5'-

- Diphosphat (6-MTG-DP) und 6-Methylthioguanosin-5'-Triphosphat (6-MTG-TP),
- das 6-Mercaptopurin, 6-Mercaptopurinribosid (6-Thioinosin) und Metabolit 6-Thioinosin-5'-Monophosphat (6-TI-MP),
  - die Methylierungsprodukte 6-Methylmercaptapurin, 6-Methylmercaptapurinribosid und Metaboliten 6-Methylthioinosin-5'-Monophosphat (6-MMP-MP), 6-Methylthioinosin-5'-Diphosphat (6-MMP-DP) und 6-Methylthioinosin-5'-Triphosphat (6-MMP-TP),
  - die Abbauprodukte 6-Thioxanthin, 6-Thioharnsäure und 8-Hydroxy-6-Mercaptopurin,
  - die endogenen Purine Adenin, Adenosin, AMP, ADP, ATP, Guanin, Guanosin, GMP, GDP, GTP und Hypoxanthin.

Nur in sehr wenigen Fällen ließen sich zwei Substanzen nicht komplett trennen, vor allem wenn einer der beiden Peaks groß ist und ein „Tailing“ aufweist. So wird nach Inkubation von Zellen mit 6-MP neben 6-Thioinosin-5'-Monophosphat (Rt 5,0 min) auch das durch den Purininterkonversionsstoffwechsel entstandene 6-Thioguanosin-5'-Monophosphat (Rt 4,3 min) gefunden. Das 6-Thioguanosin-5'-Monophosphat (Rt 4,3 min) kann von 6-Methylthioguanin (Rt 4,8 min) überdeckt werden, das nach 24 h Inkubation mit 6-TG in den Zelllinien entsteht.

Neben den identifizierten Substanzen fanden sich weitere unbekannte Substanzen, die während *in vitro* Inkubation und *in vivo* bei den Patienten entstehen und auf weitere, bisher unbekannte Stoffwechselwege hindeuten.

### 5.1.1. Bisherige Methoden zur Quantifizierung der Thiopurin-Nukleotide

Methoden zur direkten Bestimmung der Thiopurin-Nukleotide wurden von Zimmerman et al. (1974), Lavi und Holcenberg (1985), Zimm et al. (1987) und Keuzenkamp-Jansen et al. (1995) publiziert. Alle Verfahren nutzen die HPLC-Analytik und haben die intakten 6-Thioguanosin-Nukleotide getrennt quantifiziert. Auch Dooley et al. (1982) beschreiben ein HPLC-Verfahren zur quantitativen Bestimmung von 6-Thioguanosin-5'-Monophosphat, das allerdings bestenfalls als Vorversuch gewertet werden kann.

- Zimmerman et al. (1974) verwendeten die Ionenaustauschchromatographie mit UV-Detektion. Sie konnten mit ihrer Methode das 6-Methylmercaptopurinribosid und die 6-Methylmercaptopurin-Nukleotide (6-Methylthioinosin-5'-Di- und das Triphosphat), sowie Adenosin und seine Nukleotide bestimmen. Die anderen Thiopurin-Nukleotide wurden aufgrund der geringen Menge und der verwendeten Wellenlänge (290 nm) nicht erfasst. Bei einer langen Analysedauer von 100 min und geringer Empfindlichkeit konnten insgesamt so nur drei Thiopurin-Metabolite getrennt erfasst werden.
- Lavi und Holcenberg (1985) trennten die Nukleotide mit HPLC auf einer Ionenaustauscher-Säule durch eine Gradienten-Elution. Die Quantifizierung erfolgte mit UV-Detektion bei 313 nm (6-Thioinosinsäure) und 342 nm (6-Thioguanosin-Nukleotide). Sie bestimmten nach Inkubation von Erythrozyten mit 6-TG oder 6-MP das 6-Thioguanosin-5'-Mono-, Di- und Triphosphat bzw. das 6-Thioinosin-5'-Monophosphat. Die verwendete Festphasen-Extraktion der Thiopurine mit Quecksilbercellulose (mercurial cellulose resin) kann zur Anreicherung genutzt werden und machte es möglich, 6-Thioguanosin-Nukleotide auch in Erythrozyten von Patienten unter der Therapie mit 6-MP zu bestimmen. Allerdings werden Methylderivate nicht erfasst. Die Methode ist insgesamt zeitaufwändig, außerdem ist Quecksilbercellulose nicht käuflich zu erwerben.
- Zimm und Strong (1987), in einer Weiterentwicklung der Methode von Zimmerman et al. (1974), benutzten eine „reversed phase“ C<sub>18</sub>-Säule mit isokratischer Ionenpaarchromatographie mit UV-Detektion bei 313 nm und 340 nm. Durch die Verwendung von Tetrabutylammoniumphosphat als Ionenpaarbildner war eine gute Trennung der einzelnen Nukleotide möglich. Bei einer Trennzeit von 20 min konnten in Extrakten aus Erythrozyten, malignen peripheren Monozyten oder malignen Knochenmarkzellen nur 6-Thioguanosin-5'-Monophosphat und 6-Thioinosin-5'-Monophosphat nachgewiesen werden aber keine anderen Nukleotide. Das Säulenmaterial erlaubte nacheinander nur 6 Analysengänge.
- Bei der Methode von Keuzenkamp-Jansen et al. (1995), können aus einer Blutprobe in zwei getrennten Extraktions- und Analysengängen 18 Substanzen nachgewiesen werden. In beiden Fällen ist eine Gradienten-Elution mit jeweils

60 min Laufzeit erforderlich, wobei die 6-Thioguanosin-Nukleotide und 6-Methylthioinosin-Nukleotide über Ionenaustauschchromatographie, die Basen und Nukleoside über eine „reversed phase“ C<sub>18</sub>-Säule analysiert werden. Um die Empfindlichkeit für 6-TG und seine Metabolite zu erhöhen, verwenden die Autoren vor der Chromatographie eine Oxidation mit KMnO<sub>4</sub> und anschließende Fluoreszenzdetektion. Da bei der Oxidation die methylierten 6-Thioinosin-Nukleotide zerstört werden, ist ein zweiter Analysengang der gleichen Probe mit UV-Detektion (290 nm) erforderlich. Diese Methode ist sehr zeitaufwändig und für eine Routineanalytik nicht geeignet.

Im Vergleich zu den oben aufgeführten Methoden zeichnet sich die von mir erarbeitete Analytik durch eine wesentlich einfachere Probenvorbereitung aus. Die Beschränkung auf das Hämolysieren und die Bestimmung des Hb-Wertes im Hämolysat (in gleicher Weise wie in den Routinemethoden) und der Proteinfällung durch Hitzedenaturierung lässt es zu, dass eine große Anzahl von Proben parallel aufgearbeitet werden können. Durch Verzicht auf eine Säurebehandlung bleiben die säurelabilen aber hitzestabilen Nukleoside und Nukleotide erhalten. Die Optimierung der Säulenmatrix und des Gradienten erlaubt kurze Analysezeiten von 25 min (Dauer des Gradienten 18 min, Reäquilibration der Säule 7 min), so dass über einen Injektionsautomaten jeden Tag bis zu 50 Proben per HPLC analysiert werden können. Unter der jetzigen apparativen Ausstattung ist die Auswertung jedoch durch das Nachintegrieren einer Vielzahl von Substanzen mit einem erheblichen Zeitaufwand verbunden, da pro Analysengang eines Patienten unter 6-MP Therapie drei Chromatogramme mit jeweils 3 bis 6 Substanzen anfallen. Somit ist die Auswertung der anfallenden Chromatogramme der zeitlich limitierende Faktor.

### **5.1.2. Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzspektroskopie**

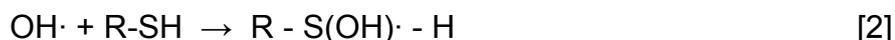
Die fluoreszenzspektroskopische Bestimmung der Thiopurine durch Kopplung einer post-column photochemischen Oxidation mit direkt anschließender Fluoreszenzmessung resultiert in einer sehr niedrigen Nachweisgrenze. Auch in der Routinemethode nach Erdmann et al. (1990) erfolgt die Detektion von 6-TG durch

Fluorometrie, allerdings erfolgt die Oxidation durch  $\text{KMnO}_4$  vor der HPLC-Auftrennung. Durch die unbegrenzte Mischbarkeit von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Wasser ist eine exakte und einfache Dosierung möglich. Die während der photochemischen Oxidation vermuteten Reaktionen zur Radikalbildung lassen sich wie folgt zusammenfassen:

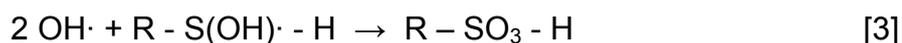
Photolyse des Peroxids unter Bildung von OH-Radikalen:



Oxidation der Sulfhydrylgruppe des 6-Thioguaninmoleküls mit OH-Radikalen:



Reaktion mit einem weiteren OH $\cdot$  und einer Umlagerung zum Sulfonat:



(Nebenreaktion: Reaktion der OH-Radikale mit undissoziiertem Peroxid):



Wie aus den Reaktionsgleichungen [2] und [3] erkennbar ist, ist dieser Reaktionsweg spezifisch für freie Thiole; bereits bei Methylthiopurinen erfolgt keine Oxidation zum Hydroxythiol-Radikal, so dass die Aktivierung selektiv ist. Wie aus den Ergebnissen der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Titration ersichtlich ist, gibt es ein optimales Verhältnis von  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Menge und Reaktionszeit (Abb. 9).

### 5.1.3. Nachweisgrenze bei fluorometrischer Detektion

Als absolute Nachweisgrenze wird diejenige Substanzmenge bezeichnet, die noch eindeutig als Peak vom Grundrauschen unterschieden werden kann. Bei einem Signal-Rauschverhältnis von 3:1 (Erdmann et al., 1990) beträgt sie 0,1 pmol 6-Thioguanin absolut. Sie liegt damit um etwa 200-300 niedriger als in der Methode von Lennard (1987c, 30 pmol für 6-TGN und 33 pmol für 6-TI-MP) oder Keuzenkamp-Jansen et al. (1995, 20 pmol). Von Dervieux und Bolieu (1998) wird

eine Nachweisgrenze von 1,8 pmol angegeben, die 18 mal unempfindlicher ist. Aus der absoluten Nachweisgrenze und dem Blutprobevolumen errechnet sich eine relative Nachweisgrenze. Bei dem hier aufgegebenen Probenvolumen von 20 µl entspricht die absolute Nachweisgrenze von 0,1 pmol 6-TG einer Konzentration von 5 nmol/l im Hämolyolat.

Vergleicht man die Nachweisgrenzen der Methode nach Erdmann et al. (1990) mit denen der „Nukleotid“-Methode, so misst die „Erdmann“-Methode empfindlicher, da bei der „Nukleotid“-Methode die einzeln integrierten Peaks der Nukleoside und Nukleotide aufsummiert werden müssen, wobei jede einzelne Substanz eine Nachweisgrenze hat.

Die durch die post-column Oxidation erreichte niedrige Nachweisgrenze ist die Vorbedingung für die direkte Analyse, da ohne Extraktionsschritte keine Anreicherung aus größeren Blutvolumina möglich ist. Das geringe Ausgangsvolumen ermöglicht die Bestimmung der Thiopurine auch aus kleinsten Blutmengen, z. B. bei Patienten aus der Pädiatrie.

Die direkte HPLC-Analyse ist robust und liefert bei wiederholter Analyse identischer Proben konstante Werte. Sie weist eine gute Reproduzierbarkeit auf, was an der niedrigen „Intraday“-Variabilität von 1,8 % ersichtlich ist. Die „Interday“-Variabilität über 40 Tage weist einen Variationskoeffizienten von 6 % auf; die Proben wurden hierzu bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren und direkt vor der Analyse aufgetaut. Die hier beschriebene Methode erfüllt damit die Voraussetzung für eine Routine-tauglichkeit, für die eine Streuung der Messwerte unterhalb 10 % gefordert wird.

#### **5.1.4. Nachweisgrenze der UV-spektrometrischen Detektion**

Die Konzentration von 6-Methylthioinosin-Nukleotiden in Blutproben der Patienten unter Therapie mit 6-Mercaptopurin ist 100 mal höher als die Konzentration der 6-TG- und 6-MTG-Nukleotide (Prof. H. Iven, unpublizierte Ergebnisse). So ist es möglich die 6-Methylthioinosin-Nukleotide mit UV-Detektion (290 nm) nachzuweisen. Durch parallele Aufzeichnung der Absorption bei 246 nm können auch die endogenen Adenin- und Guanin-Nukleotide bestimmt werden.

Im Folgenden sollen die Unterschiede, Stärken und Schwächen der routine-

mäßig verwendeten Methode nach Erdmann et al. (1990) und der in dieser Arbeit beschriebenen Methode verglichen werden.

**Tab. 17:** Gegenüberstellung der bisherigen Routinemethode mit Gradienten-HPLC bei der Bestimmung von 6-TG, 6-MMP und 6-MTG.

	<b>Erdmann-Methode 6-MTG/6-MMP</b>	<b>Erdmann-Methode 6-TG</b>	<b>„Nukleotid“-Methode Thiopurin-Nukleotide</b>
Blutabnahme	✓		✓
Versand	✓		✓
gepackte Erythrozyten	✓		✓
Hämolysat	✓		✓
Säurehydrolyse	2 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		---
	15 min 95°C		15 min 95°C
Zentrifugieren	10 min bei 14 000 g		10 min bei 14 000 g
Überstand	✓	✓	✓
Extraktion/ Proteinfällung	Isopropanol/ Chloroform	HClO <sub>4</sub>	---
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	---
	Eindampfen der organischen Phase	wässrige Phase + KMnO <sub>4</sub>	---
	Wiederaufnahme im Fließmittel	+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	---
	5 min bei 56°C	5 min bei 37°C	---
Zentrifugieren	10 min bei 14 000 g	10 min bei 14 000 g	---
klarer Überstand	HPLC	HPLC	HPLC
Detektion	Fluoreszenz, UV-Detektion	Fluoreszenz	Fluoreszenz, UV-Detektion

In der Tab. 17 sind die wichtigen Schritte beider Verfahren gegenübergestellt. Wie bereits diskutiert, unterscheiden sich die beiden Methoden im wesentlichen durch die Säurebehandlung mit starken Säuren, bei der Methode nach Erdmann et al. (1990) im Speziellen durch die Schwefelsäure (1 N).

## 5.2. Stoffwechsel von Thiopurinen in Erythrozyten

Bei Patienten, die mit 6-MP/Azathioprin behandelt werden, können in den Erythrozyten 6-Thioguanosin (Lennard et al., 1987b), 6-Methylthioguanosin und 6-Methylmercaptapurinribosid (Iven 1996; Erb et al., 1998; Dervieux et al., 2001a) in Form der Mono-, Di- und Triphosphate (Rowland et al., 1998) nachgewiesen werden.

Methylierungsprodukte entstehen durch die Thiopurin-S-Methyltransferase (TPMT) und stellen den katabolen Hauptstoffwechsel der Thiopurine dar (Rowland et al., 1999). Die Methylierungsrate ist interindividuell stark unterschiedlich, entsprechend dem TPMT-Phänotyp (Kröplin und Iven, 2000). Sowohl 6-Mercaptopurin als auch 6-Thioguanin sind Substrate der TPMT, die aus 6-Mercaptopurin die Methylierungsprodukte 6-Methylmercaptapurin und 6-Methylthioinosin-Nukleotide, aus 6-Thioguanin die Produkte 6-Methylthioguanin und 6-Methylthioguanosin-Nukleotide bildet. Ich konnte in eigenen Untersuchungen zeigen, dass während der Inkubation von 6-TG bzw. 6-TG-R nach 24 h eine kleine Menge 6-MTG-Triphosphat entstanden war (< 6 % des 6-TG-TP). Eine Methylierung von 6-MP und 6-MP-R durch die TPMT fand in meinen Untersuchungen bei Inkubation von Erythrozyten nur in sehr geringen Mengen statt (< 1 % der zugegebenen Substanzen). Nelson et al. (1977) zeigten, dass nach Inkubation von Erythrozyten mit 6-Mercaptopurin und [<sup>3</sup>H]-Methionin neben Tritium markiertem 6-Methylthioinosin-5'-Mono-, auch das Di- und Triphosphat gebildet wurden.

Nach Inkubation der Erythrozyten mit 6-Mercaptopurin oder 6-Mercaptopurinribosid (= 6-Thioinosin) konnte ich nur die Bildung von 6-Thioinosin-5'-Monophosphat beobachten, aber keine höheren Phosphate. Das 6-Mercaptopurinribosid wurde in den ersten drei Stunden deutlich schneller aufgenommen als das 6-Mercaptopurin. 6-Mercaptopurin und 6-Mercaptopurinribosid sind gute Substrate der HGPRT in Erythrozyten (Elgemeie, 2003), jedoch nicht der Phosphorylasen; dies zeigt sich auch in meinen Ergebnissen, da nur das 6-TI-MP nachgewiesen wurde.

Das Fehlen der höheren Phosphate von 6-Mercaptopurin wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Kong und Parks, 1974; Zimm et al., 1985). Nur Nelson et al. (1977) fanden bei Inkubation von Erythrozyten mit 6-Mercaptopurin nach 24 h neben dem 6-Thioinosin-5'-Monophosphat auch das 6-Thioinosin-5'-Di- und das Triphosphat (keine Mengenangabe).

Unklar ist, woher in den Erythrozyten von Patienten die hohen Konzentrationen an 6-MMP-Nukleotiden stammen. In meinen Untersuchungen konnte ich zwar nachweisen, dass Erythrozyten 6-MP schnell aufnehmen und zu 6-Thioinosinsäure metabolisieren, der Stoffwechsel zu 6-Methylthioinosin-5'-Monophosphat war allerdings nur sehr gering. Die in den Erythrozyten von Patienten gefundene oft große Menge an 6-Methylthioinosin-Nukleotiden kann m. E. hierdurch nicht erklärt werden. Da in Erythrozyten auch die Methylierung von 6-Thioguanosin-Nukleotiden zu 6-Methylthioguanosin-Nukleotiden nur begrenzt war, könnte ein Substratmangel (S-Adenosylmethionin) für den nur niedrigen Umsatz *in vitro* verantwortlich sein.

6-MMP ist nach Aussage von Elion (persönliche Mitteilung, 1994) ein schlechtes Substrat der HGPRT. So wurde auch in eigenen Experimenten 6-Methylmercaptapurin nur sehr langsam zum 6-Methylthioinosin-5'-Monophosphat umgewandelt, eine weitere Phosphorylierung zum Di- und Triphosphat fand nicht statt. Dagegen wurde 6-MMP-R sehr schnell zum 6-Methylthioinosin-5'-Mono- und in kleinen Mengen zum Di- und Triphosphat phosphoryliert.

Da die 6-Thioinosinsäure und die weiteren 6-Thioinosin-Nukleotide als Vorstufe der 6-Methylthioinosin-Nukleotide in Patientenblutproben bisher nicht gefunden wurden (Fletcher und Maddocks, 1980) und auch ich in Blutproben von Patienten, die mit 6-Mercaptopurin/Azathioprin behandelt wurden, kein 6-Thioinosin-5'-Monophosphat fand, möchte ich meine Ergebnisse wie folgt interpretieren: 6-MMP-Nukleotide werden in anderen Zellen, z. B. im Dünndarmepithel gebildet. 6-MMP-Ribosid erscheint im Blut und wird über den Nucleosid-Carrier schnell in die Erythrozyten aufgenommen. Als gutes Substrat der Phosphorylasen wird es zu den Nukleotiden verstoffwechselt.

Eine Metabolisierung von 6-Mercaptopurin zu 6-Thioguanosin-Nukleotiden konnte ich in Erythrozyten nicht nachweisen. Auch andere Arbeitsgruppen fanden

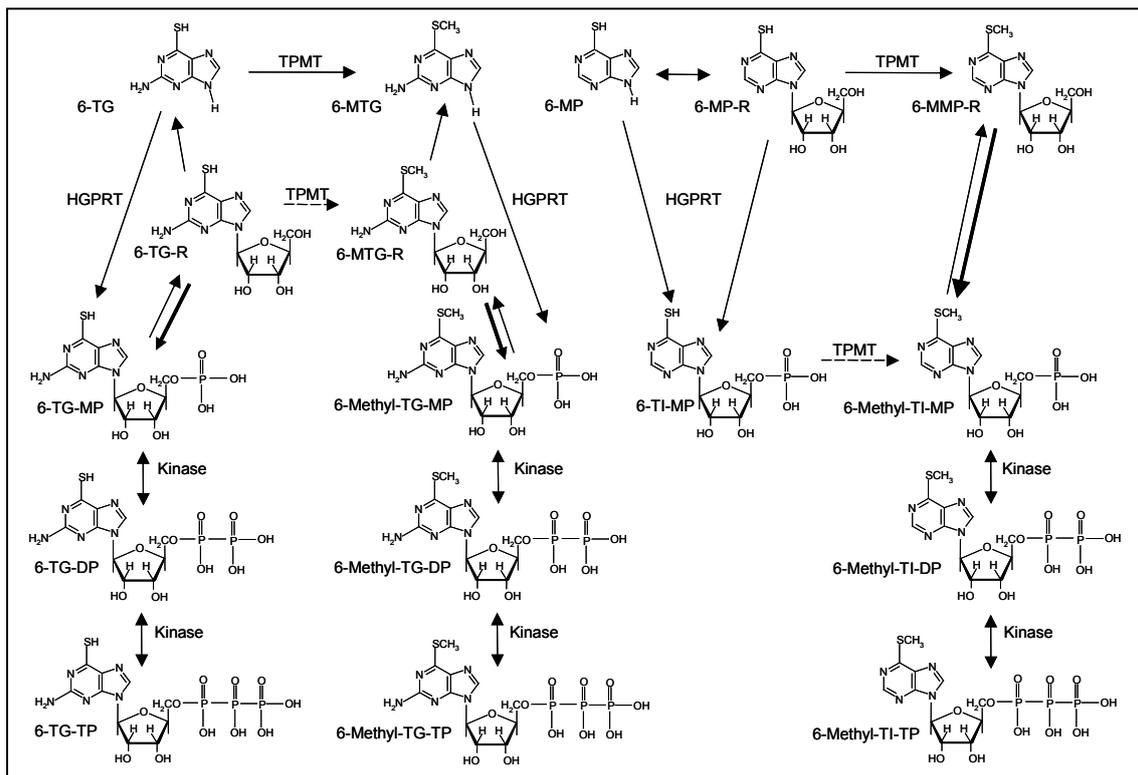
keine 6-Thioguanosin-Nukleotide nach Inkubation von Erythrozyten mit 6-MP (Kong und Parks, 1974; Zimm et al., 1985). Dies entspricht den Erwartungen, da Erythrozyten das Enzym Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) nur noch in sehr geringer Menge aufweisen, weil sie es beim Übergang vom Retikulozyten zum reifen Erythrozyten verlieren (Montero et al., 1995; Goldsmith et al., 2004). Da keine Interkonversion von 6-MP zu 6-TG in den Erythrozyten stattfinden kann, wird das an anderer Stelle im Körper gebildete 6-TG vermutlich in die Erythrozyten aufgenommen. Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass ich in allen 9 mit 6-MP inkubierten Zelllinien die Umwandlung des 6-Mercaptopurins zum 6-Thioguanosin-5'-Monophosphat über 6-Thioinosin-5'-Monophosphat nachweisen konnte (siehe Kapitel 4.3).

Erythrozyten bilden aus 6-Thioguanin und 6-Thioguanosin in kürzester Zeit die Mono-, Di- und Triphosphate als anabole Metabolite; diese sind bereits nach wenigen Minuten in großen Mengen nachweisbar. 6-TG ist ein Substrat der HGPRT und 6-TG-R ein Substrat der Phosphorylasen (Elgemeie, 2003). Der Metabolismus beider Substanzen ist qualitativ vergleichbar und unterscheidet sich nur in der initialen Geschwindigkeit. Während 6-Thioguanosin sehr schnell durch einen aktiven Transport aufgenommen wird, erfolgt die Aufnahme des 6-Thioguanins langsamer. Für beide Substrate überwiegt in den ersten sechs Inkubationsstunden der Stoffwechsel zum 6-Thioguanosin-5'-Triphosphat. Der katabole Stoffwechsel in den folgenden Stunden sorgt dafür, dass das gebildete Triphosphat wieder zum 6-Thioguanosin-5'-Monophosphat, aber auch in zwei unbekannte Substanzen umgewandelt wird. Eine Aufnahme von 6-Thioguanosin-Nukleotiden (6-Thioguanosin-5'-Di- und 6-Thioguanosin-5'-Triphosphat) in die Erythrozyten wurde in eigenen Untersuchungen nicht beobachtet. Ich konnte auch keine Literaturstellen finden, die eine solche Aufnahme beschreiben. Eine Aktivierung eines Purinnukleotids zum Triphosphat mit anschließendem Abbau zum Monophosphat wurde am Beispiel der Adenosin-Nukleotide publiziert (Tewari et al., 1991).

Nach Elion (persönliche Mitteilung, 1994) kann 6-Methylthioguanin nicht wieder in den anabolen Stoffwechsel eingeführt werden, so dass keine 6-Methylthioguanosin-Nukleotide daraus entstehen sollten. Nach Inkubation von Erythro-

zyten mit 6-MTG fand ich kleine Mengen von 6-Methylthioguanosin-Nukleotiden. Die höhere Empfindlichkeit meiner Methode kann den Gegensatz zur Arbeitsgruppe von Elion erklären. 6-Methylthioguanosin stand mir leider nicht zur Verfügung. Es wäre interessant, ob auch dieses Ribosid Substrat eines Carriers und Phosphorylasen ist und damit schnell und in großer Menge als Nukleotide in den Erythrozyten zu finden wäre.

Die Inkubation von Erythrozyten mit 6-Thioxanthin zeigt ein interessantes Metabolitenmuster. 6-Thioxanthin wird in die Erythrozyten aufgenommen und ist ein gutes Substrat der HGPRT und der Phosphorylasen. Ob es ein Substrat der TPMT ist, kann nicht gesagt werden, da mir die methylierten Reinsubstanzen nicht zur Verfügung standen. Nelson et al. (1977) beschreiben die Bildung kleiner Mengen von 6-Methylthioxanthin-5'-Mono- und Triphosphat nach Inkubation von Erythrozyten mit 6-Thioxanthin und [<sup>3</sup>H]-Methionin.



**Abb. 56:** Zusammenstellung der Methylierungsreaktionen an Thiopurinen. Die Abbildung zeigt die möglichen Methylierungsprodukte der Thiopurine durch Thiopurin-S-Methyltransferase.

Die Abb. 56 fasst die Entstehungswege von Methylierungsprodukten in Erythrozyten zusammen, wie sie sich aus meinen Untersuchungen und den wenigen Literaturangaben ergeben. Aufgrund der schnellen Aufnahme und Metabolisierung schlieÙe ich, dass die Riboside von 6-TG, 6-MTG und 6-MMP aus anderen Zellen freigesetzt, in die Erythrozyten aufgenommen und zu den Nukleotiden phosphoryliert werden.

### 5.3. Inkubation von Zelllinien mit 6-MP und 6-TG

Da Erythrozyten als kernlose Zellen nur ein Surrogatsystem darstellen, wurden verschiedene Zelllinien der Aufnahmegewebe (Dünndarm, und Colon), des präsystemischen Stoffwechsels (Leber) und der Ausscheidung (Niere) mit 6-Thioguanin und 6-Mercaptopurin inkubiert. Daneben wurden Zellen inkubiert, die wahrscheinlich von Thiopurinen nicht beeinflusst werden (Corneaepithel, Nebennierenrinde, Herzmuskel), sowie Zellen solider Tumoren (Prostata, Ovar). Diese Zellen decken sowohl die für die Pharmakokinetik relevanten Organe ab, als auch weniger differenzierte Tumorzellen und andere typische Gewebe. Mit diesen Versuchen sollte der anabole und katabole Stoffwechsel von 6-TG und 6-MP in den Körpergeweben charakterisiert werden. Zu erwarten ist, dass alle Zelllinien die Enzyme des anabolen und katabolen Purinstoffwechsels einschließlich des Interkonversionsstoffwechsels besitzen (Rowland et al., 1999). Bisher liegen keine Untersuchungen darüber vor, ob gewebespezifische Unterschiede in der Aktivierung von Thiopurinen existieren. Auch für die katabolen Reaktionen sind keine Daten publiziert worden; zumindest für Tumorzelllinien wird jedoch angenommen, dass die Aktivität der katabolen Enzyme im allgemeinen niedriger ist als in normalen Zellen (Elion, 1989).

Bei den *in vitro* Untersuchungen zur Aufnahme und Metabolisierung von 6-TG und 6-MP in die verschiedenen Zelllinien handelte es sich um Erstversuche. Die Zellzahl pro Inkubationsansatz war bei den untersuchten Zelllinien unterschiedlich. Dies kann einen Einfluss auf die beobachteten Unterschiede in der Geschwindigkeit der Aufnahme und Metabolisierung (Qualität) nicht aber auf das

Metabolisierungsmuster haben. Die anabole Aktivierung von 6-Thioguanin zu den Phosphaten wurde von den Zelllinien in der Reihenfolge: Nebennierenrinde > Dünndarm > Nierenepithel > Colon > Corneaepithel > Prostata > Herzmuskel > Ovar > Leber katalysiert. Die Bildung methylierter Produkte entsprach in etwa der TPMT-Aktivität dieser Zellen, wobei die Nebennierenrindenzellen mit der geringsten TPMT-Aktivität auch die geringste Menge methylierter Metaboliten aufwiesen (Tab. 13).

Ein qualitativ ähnliches Muster wurde auch nach der Inkubation der Zelllinien mit 6-Mercaptopurin gefunden, wobei 6-Thioinosin-5'-Monophosphat als einziges Phosphat des 6-Mercaptopurins nachgewiesen wurde. Geschwindigkeit und Ausmaß der Bildung war unterschiedlich, wobei die Prostatakarzinom- und Leberzellen nur sehr kleine Mengen 6-Thioinosin-5'-Monophosphat bildeten. 6-Thioguanosin-5'-Mono- und 6-Thioguanosin-5'-Diphosphat konnte bei fast allen Zelllinien nach 6-MP Inkubation identifiziert werden. Damit war der Interkonversionsstoffwechsel auch von mir *in vitro* nachweisbar. Bisherige Publikationen konzentrieren sich auf den Stoffwechsel von Thiopurinen in MOLT-4 Zellen (humane maligne lymphoblastische T-Zelllinie). Der Wirkungsmechanismus, die Zytotoxizität und die therapeutische Bedeutung von 6-Thioguanin und 6-Mercaptopurin bei der Therapie der ALL standen bei diesen Untersuchungen im Vordergrund (Bokkerink et al., 1993; Adamson et al., 1994; De Abreu et al., 2003). Shi et al. (1998) untersuchten CCRF-CEM-Leukämie Zelllinien (humane T-lymphoblastische Zelllinie) und fanden, dass 6-Mercaptopurin zu allen bekannten Metaboliten, die für die Hemmung der Purin-de-novo-Synthese verantwortlich sind, verstoffwechselt wird. Neben dem 6-Methyl-TI-MP und 6-TX-MP entstanden das Mono-, Di- und Triphosphat von 6-Thioguanosin. Nach 6-TG Inkubation entstanden neben 6-TX-MP, ebenfalls das Mono-, Di- und Triphosphat von 6-Thioguanosin. In diesen Zellen hemmt 6-Methyl-TI-MP bevorzugt die Phosphoribosyl-Pyrophosphat-Amidotransferase (PPAT), das Schlüsselenzym der Purin-de-novo-Synthese, die Nukleotide von 6-Thioguanin und 6-Mercaptopurin dagegen die DNS-Synthese. Liliemark et al. (1990) inkubierten die murine Leukämie-Zelllinie WEHI-3b mit 6-Mercaptopurin; bei der Quantifizierung der DNS-Inkorporation fanden die Autoren, dass bei 1  $\mu\text{mol/l}$  6-MP mehr

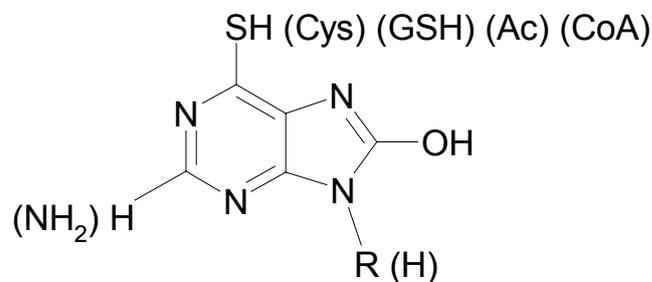
6-Thioguanosin-5'-Triphosphat in die DNS eingebaut wurde als bei 50  $\mu\text{mol/l}$  6-MP. Die Autoren führen den überraschend geringen 6-MP-Einbau in die DNS bei der hohen Substratkonzentration auf den beobachteten ATP-Mangel zurück („self-limiting“ phenomenon; Liliemark et al., 1990). Aufgrund der limitierten Anzahl der quantifizierten Metaboliten in diesen Arbeiten sind keine Vergleiche mit meinen Ergebnissen möglich, obwohl im Rahmen dieser Arbeit mit 60  $\mu\text{mol/l}$  6-MP ebenfalls eine hohe Substratkonzentration verwendet wurde.

Rowland et al. (1999), untersuchten den Stoffwechsel von 6-MP in humanem Leberzytosol. Nach Zusatz von 500  $\mu\text{mol/l}$  6-MP wurden, 6-Thioharnsäure (31  $\mu\text{mol}$ ), 8-Hydroxy-6-Mercaptopurin 19,5  $\mu\text{mol}$ ), 6-Methylmercaptopurin (8,8  $\mu\text{mol}$ ), 6-Thioxanthin (2,1  $\mu\text{mol}$ ) und eine sehr kleine Menge an 6-Thioguanin (0,79  $\mu\text{mol}$ ) nach 72 h Inkubation nachgewiesen. Da die Autoren zur Analytik eine Säurehydrolyse nach Lennard und Singleton (1992b) verwendeten, sind keine Aussagen zur Bildung von Nukleotiden möglich. Nach eigener Inkubation von Leberzellen mit 6-MP können nach 24 h ebenfalls katabole Stoffwechselprodukte nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich um kleine Mengen an 8-Hydroxy-6-Mercaptopurin und 6-Thioxanthin, welche als Base nachweisbar waren. 6-Thioharnsäure wurde nicht gefunden, obwohl die Xanthinoxidase in der Leber die höchste Aktivität besitzt (Guercioli et al., 1991).

Überraschend war, dass Thiopurine von allen untersuchten Zelllinien aufgenommen und aktiviert wurden. Unabhängig vom Gewebe wurden sie in den Nukleotidpool eingeschleust, so dass zu erwarten ist, dass die beschriebenen Wirkungen, d. h. die Hemmung der Purin-de-novo-Synthese durch 6-Methylthioinosin-5'-Monophosphat oder der Einbau von 6-dTG-TP/6-TG-TP in neu synthetisierte DNA und RNA in allen Geweben stattfinden kann. So kann auf diesem Wege die Zytotoxizität der Thiopurine in vielen Geweben erklärt werden (De Abreu et al., 1995). Spekulativ muss bleiben, ob der relativ niedrige anabole Umsatz des 6-TG, bei gleichzeitig recht hohem katabolen Stoffwechsel vor allem in intestinalen Zellen und Leberzellen einen Schutzmechanismus darstellt. Auch der überraschend hohe Umsatz von 6-TG und 6-MP in Nebennierenrindenzellen kann derzeit nicht erklärt werden.

#### 5.4. Versuche zur Identifizierung der unbekannt Substanzen

Während der Inkubation von Erythrozyten mit 6-Thioguanin, 6-Thioguanosin, 6-Mercaptopurin, 6-Mercaptopurin-Ribosid, 6-Methylthioguanin oder 6-Thioxanthin, konnte ich eine Vielzahl an unbekannt Substanzen beobachten. Es entstanden Metabolite, die unter den gegebenen chromatographischen Bedingungen mit keiner der als Standards verfügbaren Substanzen übereinstimmten. So entstanden x1 und x2 *in vitro* während der Inkubationen von Erythrozyten und Zelllinien mit 6-Thioguanin und 6-Thioguanosin. Sie waren auch *in vivo* bei Patienten nach Therapie mit 6-MP und 6-TG zu sehen. Bei den unbekannt Substanzen könnte es sich um homologe oder heterologe Disulfide mit anderen thiolhaltigen Gruppen wie Cystein oder Glutathion (Abb. 57) handeln. Homologe Disulfide zwischen zwei 6-Thioguanin-Molekülen wurden in eigenen Versuchen *in vitro* beobachtet, diese wurden erwartungsgemäß durch Zugabe von 2 mmol/l Dithiotreitol wieder gespalten.



**Abb. 57:** Mögliche Disulfid-Verbindungen von 6-TG. Dargestellt sind mögliche Reaktionsorte am 6-TG- und 6-MP-Gerüst, die zu homologen oder heterologen Disulfiden führen.

Folgende Aussagen zur möglichen Struktur von x1 und x2 können getroffen werden:

- Es kann sich nicht um Metaboliten handeln, die als Standard-Reinstoffen vorlagen (andere Retentionszeiten, Tab. 2a).
- Die Substanzen x1 und x2 müssen die Sulfhydryl-Gruppe besitzen, da sie nach Oxidation mit  $H_2O_2$  fluoreszieren, jedoch nicht ohne Oxidation. Sie verhalten sich damit wie 6-TG und seine anabolen Metabolite.
- Sie entstehen nur nach 6-Thioguanin und 6-Thioguanosin Zugabe, nicht aber nach Inkubation von Erythrozyten mit anderen Substanzen wie 6-Mercaptopurin, 6-Mercaptopurinribosid oder 6-Thioxanthin.
- Die unbekannt Substanzen besitzen gleiche Fluoreszenzspektren wie 6-TG.
- Eine Zugabe von Dithiotreitol zum Inkubationsansatz mit Erythrozyten und 6-TG oder 6-TG-R verhinderte nicht die Bildung der beiden Substanzen, d. h. Disulfide liegen nicht vor.
- Die Substanzen werden *in vitro* nur langsam gebildet.
- Nach Inkubation mit Purinnukleotid-Phosphatase (EC 2.4.2.1) oder saurer Phosphatase (EC 3.1.3.2) blieben die chromatographischen Eigenschaften von x1 und x2 unverändert, so dass eine Nukleosid- bzw. Nukleotid-Struktur unwahrscheinlich ist.

Eine strukturelle Aufklärung dieser beiden Substanzen wäre wünschenswert, da sie in relativ großen Mengen durch Erythrozyten und Zelllinien gebildet werden und auch in den Patientenproben in stark unterschiedlichen Mengen vorliegen.

Auch Lavi und Holcenberg (1985) fanden nach Inkubation von Erythrozyten mit 6-TG zwei Peaks unbekannter Struktur, die zwischen 6-Thioguanosin-5'-Mono- und 6-Thioguanosin-5'-Diphosphat eluieren und im Chromatogramm deutlich erkennbar sind. Als Methode benutzten sie eine Ionenaustauschchromatographie. Diese Peaks könnten den Peaks x1 und x2 entsprechen. Die Autoren haben keinen Versuch zur Strukturaufklärung der Substanzen unternommen.

Kitchen et al. (1999) konnten bei Patienten, die über 24 h intravenös mit 6-Thioguanin behandelt wurden, 8-Hydroxy-6-Thioguanin im Plasma charakterisieren. Den Autoren stand eine moderne HPLC/Mass Spektrometrie (HPLC-MS) Analytik zur Verfügung, die die Aufklärung der Struktur ermöglichte. 8-Hydroxy-6-Thioguanin entsteht wahrscheinlich durch die Aldehydoxidase (AO). 8-Hydroxy-

Thioguanin sollte eine Retentionszeit in der HPLC haben, die nur etwas länger ist als die der Ausgangssubstanz; dies zeigt sich am 8-OH-6-MP, welches mit 2,4 min eine gegenüber dem 6-MP mit 2,0 min nur unwesentlich längere Retentionszeit hatte. Die Substanzen x1 und x2 haben dagegen Retentionszeiten um 5 min und entsprechen damit keinem möglichen 8-Hydroxylierungsprodukt vom 6-Thioguanin.

Keuzenkamp-Jansen et al. (1996) konnten bei 17 Patienten, die über 24 h intravenös mit einer Hochdosis 6-Mercaptopurin behandelt wurden, 8-Hydroxy-6-Methylmercaptapurin im Plasma von allen Patienten charakterisieren. Die Autoren konnten die Substanz mit Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC-MS) identifizieren. Sie schrieben, dass ein Fünftel der verabreichten 6-MP-Dosis im Plasma der Patienten als 8-OH-6-MMP gefunden wurde.

Weitere unbekannte Produkte entstanden bei der Inkubation von Erythrozyten mit 6-MTG. Zwei der vier gebildeten Substanzen fluoreszierten ohne PCRE, zwei Substanzen waren ohne PCRE nicht mehr nachweisbar. Da 6-Methylthioguanin, 6-Methylthioguanosin und ihre Nukleotide durch den ausgeprägten Chromophor auch ohne Oxidation fluoreszieren, ist für die entsprechenden Metabolite mit Eigenfluoreszenz anzunehmen, dass sie die 6-Methylthioguanin-Struktur beinhalten. Bei den beiden anderen unbekanntem Substanzen ohne Eigenfluoreszenz ist dies wahrscheinlich nicht gegeben.

Nach der Inkubation von Erythrozyten mit 6-TX konnten die entstandenen unbekanntem Substanzen mit saurer Phosphatase (EC 3.1.3.2) eindeutig als 6-Thioxathosin und 6-Thioxanthosin-Nukleotide identifiziert werden.

## 5.5. Vergleich der Methoden

Die direkte Quantifizierung der 6-Thioguanosin-Nukleotide in Blutproben von Patienten kann genutzt werden, um die Gesamtkonzentration an 6-Thioguanin zu bestimmen. Diese setzt sich zusammen aus der Summe der Flächen aller Einzelmetabolite. Addiert man die Flächen der drei Nukleotide des 6-Thioguanosins zusammen, und rechnet diese Flächen anhand einer Eichkurve in absolute 6-TG-Mengen um, so ergeben sich gegenüber der Routinemethode nach Erdmann et al.

(1990) höhere 6-TG-Mengen. Der errechnete Faktor von 1,475 für 6-Thioguanosin-Nukleotide zeigt an, dass durch die HPLC rechnerisch im Mittel etwa 1,5 mal soviel 6-TG-Äquivalente gemessen werden.

Auch andere Autoren haben zwei Methoden zur Bestimmung von 6-Thioguanin miteinander verglichen. Shipkova et al. (2003a) verglichen die Methode von Lennard (1987c) mit der Methode nach Dervieux und Boulieu (1998). Dabei wurden bei der Methode nach Dervieux und Boulieu etwa 2,6-fach höhere 6-TGN-Konzentrationen als mit der Methode nach Lennard (1987c) gemessen, bei einer exzellenten Korrelation ( $r=0,98$ ). Wurde die in der Extraktion nach Lennard (1987c) eingesetzte Schwefelsäure durch die in der Methode nach Dervieux und Boulieu (1998) benutzte Perchlorsäure ersetzt, so reduzierte sich der Unterschied zwischen den beiden Methoden auf einen Faktor von 1,4. Einen ähnlichen Wert beim Vergleich der beiden Methoden fanden Stefan et al. (2004). Die Methode nach Dervieux und Boulieu liefert im Durchschnitt um 1,38-fach höhere 6-TG-Konzentration als die Methode nach Lennard und Singleton (1992b). Lowry et al. (2001) verglichen die Methode nach Erdmann et al. (1990) mit einer modifizierten Methode nach Lennard und Singleton (1992b). Die Methode nach Erdmann et al. (1990) liefert 1,6-fach niedrigere Werte als die Methode nach Lennard und Singleton (1992b). Der Unterschied zwischen den Methoden könnte durch die unterschiedlich lange Zeit der Säurehydrolyse bedingt sein.

Die 6-MMP-Konzentrationen scheinen dagegen weniger abhängig von methodischen Unterschieden zu sein. Hierfür könnte eine höhere Stabilität des 6-MMP-Moleküls gegenüber einer Oxidation im Vergleich zum 6-Thioguanin-Molekül verantwortlich sein (Shipkova und Ahsen, 2003b). Auf Grund der analytischen Differenzen müssen die angegebenen therapeutischen Bereiche methodenabhängig betrachtet werden.

## 5.6. Schlussfolgerung

Die entwickelte HPLC-Methode erlaubt es, einen detaillierten Einblick in den Stoffwechsel der Thiopurine im Vergleich zu den natürlichen Purinen zu nehmen.

Durch einfache Probenaufbereitung (Hitzenaturierung), kurze Analysezeiten (25 min), großer Empfindlichkeit für 6-TG und seine Metabolite durch online post-column Oxidation (PCRE), Fluoreszenzdetektion und paralleler Bestimmung methylierter Metabolite und natürlicher Purine (Nukleotide) mit zwei in Serie geschalteten UV-Detektoren, eignet sich die Methode hervorragend zur Untersuchung des Stoffwechsels von Thiopurinen und endogenen Purinen *in vitro* und *in vivo*. Als Routinemethode für das Drug Monitoring ist sie weniger geeignet, weil

1. der apparative Aufwand mit Gradienten-HPLC und drei Detektoren sehr groß ist,
2. die Auswertung der Chromatogramme zu viel Zeit in Anspruch nimmt,
3. die Dauer des Versands und die Lagerung der Proben einen großen Einfluss auf das Ergebnis haben.

Woher kommen die Thiopurin-Nukleotide bei Patienten unter der Therapie mit 6-Mercaptopurin/Azathioprin in den Erythrozyten?

Meine *in vitro* Untersuchungen zeigen eine sehr schnelle Aufnahme von 6-TG und Metabolisierung zu den Nukleotiden. Eine geringe Methylierung zu den 6-Methylthioguanosin-Nukleotiden war ebenfalls nachweisbar. Da nach Inkubation mit 6-Mercaptopurin keine 6-Thioguanosin-Nukleotide nachweisbar waren, gehe ich davon aus, dass auch *in vivo* das 6-TG in den Erythrozyten an anderer Stelle gebildet wurde (kernhaltige Zellen, die den vollständigen Purininterkonversionsstoffwechsel haben), dieses dann ins Blut abgegeben und von den Erythrozyten aufgenommen wird. 6-Methylmercaptapurin war nach Inkubation von Erythrozyten mit 6-Mercaptopurin nicht nachweisbar und wurde von den Erythrozyten auch nur sehr langsam aufgenommen. Im Gegensatz dazu wurde 6-MMP-Ribosid sehr schnell aufgenommen und zu den entsprechenden Nukleotiden umgesetzt. Hieraus schließe ich, dass *in vivo* die Methylierung von 6-Mercaptopurin in anderen Zellen stattfindet (wie auch von mir *in vitro* mit den Zellkulturen beobachtet) als Ribosid ins Blut abgegeben wird und dann von den Erythrozyten aufgenommen und zu den Nukleotiden verstoffwechselt wird.

## 6. Zusammenfassung

Es wurde eine Methode zur direkten Quantifizierung von Thiopurin-Nukleotiden in biologischem Material erarbeitet und validiert. Hierzu wurden die Proteine in den Proben durch Hitze denaturiert und abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde direkt auf eine „reversed phase“-HPLC aufgegeben, die Metaboliten durch einen Acetonitril-Gradienten mit Ionenpaar-Reagenz getrennt. Thiopurine wurden nach Oxidation mit einer photochemischen Reaktionseinheit (PCRE) fluorometrisch nachgewiesen und quantifiziert, die Methylierungsprodukte von 6-Mercaptopurin wurden mit UV-Absorption bestimmt. Die Nachweisgrenze der Methode lag für 6-Thioguanin bei 15 pg (0,1 pmol), für 6-Methylthioguanin bei 20 pg (0,11 pmol) und für 6-Methylmercaptopurin bei 30 pg (0,2 pmol). Die „Intraday“-Variabilität für 6-Thioguanosin-Nukleotide ergab einen Variationskoeffizient von 2,1-5,0 %, die „Interday“-Variabilität betrug zwischen 6,6-8,8 %. 6-TGN-Lösungen waren nach der Deproteinierung bei Raumtemperatur 48 h, bei –20°C über 18 Monate stabil.

*In vitro* Inkubationen von Erythrozyten mit Thiopurinen bestätigen den komplexen Stoffwechsel. Es wurden mehrere bisher nicht beschriebene Metabolite nachgewiesen, die Identität konnte leider nicht aufgeklärt werden. Riboside der Thiopurine wurden sehr schnell in die Erythrozyten aufgenommen und bis zu den Triphosphaten phosphoryliert. 6-Mercaptopurin ist ein schlechteres Substrat der HGPRT im Vergleich zu 6-Thioguanin. Das 6-Thioinosin-5'-Monophosphat wird nicht weiter phosphoryliert. Die Methylierung durch die TPMT (Thiopurin-S-Methyltransferase) von 6-Thioguanin erfolgte *in vitro* langsam. Das bisher als Stoffwechselendprodukt aufgefasste 6-Methylthioguanin wird durch Erythrozyten in geringem Umfang zu den Nukleotiden verstoffwechselt.

Die neun untersuchten Zelllinien verstoffwechselten die Thiopurine in qualitativ und quantitativ unterschiedlichem Ausmaß. Alle Zelllinien waren in der Lage Thiopurine aufzunehmen und zu den Nukleotiden umzuwandeln. Methylierte Metabolite von 6-MP waren bei 4 der 9 Zelllinien, von 6-TG bei allen Zelllinien nachweisbar. In Erythrozyten von Leukämiepatienten wurden Mono-, Di- und

Triphosphat von 6-Thioguanosin, 6-Methylthioguanosin und 6-Methylthioinosin nachgewiesen.

Die 6-Thioguanin-Konzentration in den Patientenproben ergab mit der "Nukleotid"-Methode um den Faktor 1,5 höhere Werte im Vergleich zur Routine-methode nach Erdmann et al. (1990) bei guter Korrelation. Für 6-MMP wurde ein Faktor von 0,98 ermittelt. Ein Grund für die Abweichung der 6-Thioguanin-Werte durch die Methode war bisher nicht zu erkennen.

Die Methode erlaubt eine schnelle, parallele Bestimmung aller Nukleotide und der Methylierungsprodukte von 6-Thioguanin und 6-Mercaptopurin. Aufgrund der aufwändigen Auswertung ist ein Einsatz als Routinemethode nicht sinnvoll, für Forschungszwecke ist sie jedoch hervorragend geeignet.

## 7. Literaturverzeichnis

**Aarbakke J, Janka-Schaub G, Elion G:** Thiopurine biology and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* **18**, 3-7 (1997)

**Adamson PC, Poplack DG, Balis FM:** The cytotoxicity of thioguanine vs mercaptopurine in acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* **18**, 805-810 (1994)

**Ally A, Park G:** Rapid determination of creatine, phosphocreatine, purine bases and nucleotides (ATP, ADP, AMP, GTP, GDP) in heart biopsies by gradient-ion-pair reversed-liquid-chromatography. *J Chromatogr* **575**, 19-27 (1992)

**Andersen JB, Szumlanski C, Weinshilboum RM, Schmiegelow K:** Pharmacokinetics, dose adjustments, and 6-mercaptopurine/methotrexate drug interactions in two patients with thiopurine methyltransferase deficiency. *Acta Paediatr* **87**, 108-111 (1998)

**Araki-Sasaki K, Ohashi Y, Sasabe T, Hayashi K, Watanabe H, Tano Y, Handa H:** An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36**, 614-621 (1995)

**Aubrecht J, Goad ME, Schiestl RH:** Tissue specific toxicities of the anticancer drug 6-thioguanine is dependent on the Hprt status in transgenic mice. *J Pharmacol Exp Ther* **282**, 1102-1108 (1997)

**Bennett LL Jr, Allan PW:** Formation and significance of 6-methylthiopurine ribonucleotide as a metabolite of 6-mercaptopurine. *Cancer Res* **3**, 152-158 (1971)

**Bergmann F, Ungar H:** The enzymatic oxidation of mercaptopurine to 6-thiouric acid. *J Am Chem Soc* **82**, 3957-3960 (1960)

**Bo J, Schroder H, Kristinsson J, Madsen B, Szumlanski C, Weinshilboum R, Andersen JB, Schmiegelow K:** Possible carcinogenic effect of 6-mercaptopurine on bone marrow stem cells: relation to thiopurine metabolism. *Cancer* **86**, 1080-1086 (1999)

**Bokkerink JP, Stet EH, De Abreu RA, Damen FJ, Hulscher TW, Bakker MA, van Baal JA:** 6-Mercaptopurine: cytotoxicity and biochemical pharmacology in human malignant T-lymphoblasts. *Biochem Pharmacol* **45**, 1455-1463 (1993)

**Breter HJ, Zahn RK:** Quantitation of intracellular metabolites of <sup>35</sup>S-6-mercaptopurine in L5178Y cells grown in time-course incubates. *Cancer Res* **39**, 3744-3748 (1979)

**Bruunshuus I, Schmiegelow K:** Analysis of 6-mercaptopurine, 6-thioguanine nucleotides, and 6-thiouric acid in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *Scand J Clin Lab Invest* **49**, 779-784 (1989)

**Burchenal JH, Murphy ML, Ellision R, Sykes M, Tan T, Leone L, Karnofsky D, Craver L, Dargeon II, Rhoads CP:** Clinical evaluation of a new antimetabolite, 6-mercaptopurine, in the treatment of leukemia and allied diseases. *Blood* **8**, 965-999 (1953)

**Calne RY:** Inhibition of the rejection of renal homografts in dogs by purine analogues. *Transplant Bull* **28**, 4451-461 (1961)

**Calne RY, Alexandre GP, Murray JE:** A study of the effects of dogs in prolonging survival of homologous renal transplants in dogs. *Ann N Y Sci* **99**, 743-761 (1962)

**Chalmers AH, Knight PR, Atkinson MR:** Conversion of azathioprine into mercaptopurine and mercaptoimidazole derivatives in vitro and during immunosuppressive therapy. *Aust J Exp Biol Med Sci* **45**, 681-691 (1967)

**Chocair PR, Dulay JA, Simmonds HA, Cameron JS:** The importance of thiopurine methyltransferase activity for the use of azathioprine in transplant recipients. *Transplantation* **53**, 1051-1056 (1992)

**Chocair PR, Duley JA, Sabbaga E, Arap S, Simmonds HA, Cameron JS:** Fast and slow methylators: do racial differences influence risk of allograft rejection? *Q J Med* **86**, 359-363 (1993)

**Chrzanowska M, Krzymanski M:** Determination of 6-thioguanine and 6-methylmercaptapurine metabolites in renal transplantation recipients and patients with glomerulonephritis treated with azathioprine. *Ther Drug Monit* **21**, 231-237 (1999)

**Clunie GP, Lennard L:** Relevance of thiopurine methyltransferase status in rheumatology patients receiving azathioprine. *Rheumatology* **43**, 13-18 (2004)

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

**Coulthard SA, Howell C, Robson J, Hall AG:** The relationship between thiopurine methyltransferase activity and genotype in blasts from patients with acute leukemia. *Blood* **92**, 2856-2862 (1998)

**Cuffari C, Seidman EG, Latour S, Theoret Y:** Quantitation of 6-thioguanine in peripheral blood leukocyte DNA in Crohn's disease patients on maintenance 6-mercaptopurine therapy. *Can J Physiol Pharmacol* **74**, 580-585 (1996)

**De Abreu RA, Lambooy L, Stet E, Vogels-Mentink T, Van de Heuvel L:** Thiopurine induced disturbance of DNA methylation in human malignant cells. *Adv Enzyme Regul* **35**, 251-263 (1995)

**De Abreu RA, Trueworthy RC, van Kuilenburg AB, Vogels-Mentink TM, Lambooy LH, van Gennip AH:** Combination therapy in childhood leukaemia: in vitro studies of thiopurines and inhibitors of purine metabolism on apoptosis. *Ann Clin Biochem* **40**, 70-74 (2003)

**Dervieux T, Boulieu R:** Simultaneous determination of 6-thioguanine and methyl 6-mercaptopurine nucleotides of azathioprine in red blood cells by HPLC. *Clin Chem* **44**, 551-555 (1998)

**Dervieux T, Medard Y, Verpillat P, Guigonis V, Duval M, Lescoeur B, Suciú S, Vilmer E, Jacqz-Aigrain E:** Possible implication of thiopurine S-methyltransferase in occurrence of infectious episodes during maintenance therapy for childhood lymphoblastic leukemia with mercaptopurine. *Leukemia* **15**, 1706-1712 (2001a)

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

**Dervieux T, Chu Y, Su Y, Pui CH, Evans WE, Relling MV:** HPLC determination of thiopurine nucleosides and nucleotides in vivo in lymphoblasts following mercaptopurine therapy. *Clin Chem* **48**, 61-68 (2002)

**Dooley T, Maddocks JL:** Assay of 6-thioguanine in human plasma *Br J Clin Pharmacol* **9**, 77-82 (1980)

**Dooley T, Maddocks JL:** Assay of an active metabolite of 6-thioguanine 6-thioguanosine 5-monophosphate, in human red blood cells. *J Chromatogr* **229**, 121-127 (1982)

**Elgemeie GH:** Thioguanine, mercaptopurine: their analogs and nucleosides as antimetabolites. *Curr Pharm Des* **9**, 2627-2642 (2003)

**Elion GB und Hitchings GH:** "Azathioprine" In: Sartorelli AC, Johns DG (Hrsg.): Handbook of Experimental Pharmacology, Bd. 38/2, Antineoplastic and Immunosuppressive Agents, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 404-425 (1975)

**Elion GB:** The purine path to chemotherapy. *Science* **244**, 41-47 (1989)

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

**Erb N, Haverland U, Harms DO, Escherich G, Janka-Schaub G:** High-performance liquid chromatographic assay of metabolites of thioguanine and mercaptopurine in capillary blood. *Journal of Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **796**, 87-94 (2003)

**Erdmann GR, France LA, Bostrom BC, Canafax DM:** A reversed phase high performance liquid chromatography approach in determining total red blood cell concentrations of 6-thioguanine, 6-mercaptopurine, methylthioguanine, and methylmercaptopurine in a patient receiving thiopurine therapy. *Biomed Chromatogr* **4**, 47-51 (1990)

**Erdmann GR, Steury JC, Carleton BC, Stafford RJ, Bostrom BC, Canafax DM:** Reversed-phase high-performance liquid chromatographic approach to determine total lymphocyte concentrations of 6-thioguanine, methylmercaptopurine and methylthioguanine in humans. *J Chromatogr* **571**, 149-156 (1991)

**Fachinformation,** 6-Mercaptopurin, Oktober 2005

**Ferroni MA, Marchi G, Sansone E, Romeo P, Giulianotti PC, Pietrabissa A, Mosca F, Pacifici GM:** Variability in the rate of 6-mercaptopurine methylation in the erythrocytes, liver and kidney in an Italian population. *Eur J Clin Pharmacol* **51**, 23-29 (1996)

**Fletcher L, Maddocks JL:** Assay of thioinosinic acid, an active metabolite of azathioprine, in human lymphocytes. *Br J Clin Pharmacol* **10**, 287-292 (1980)

**Fürst W, Hallström S:** Simultaneous determination of myocardial nucleotides, nucleosides, purine bases and creatine phosphate by ion-pair high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **578**, 39-44 (1992)

**Gaffney RB, Scott DG:** Azathioprine and cyclophosphamide in the treatment of rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* **37**, 824-836 (1998)

**Gazdar AF, Oie HK, Shackleton CH, Chen TR, Triche TJ, Myers CE, Chrousos GP, Brennan MF, Stein CA, La Rocca RV:** Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res* **50**, 5488-5496 (1990)

**Gebelein M, Merdes G, Berger MR:** Nucleotide preparation from cells and determination of nucleotides by ion-pair high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **577**, 146-150 (1992)

**Goldsmith D, Carrey EA, Ebdury S, Smolenski RT, Jagodzinski P, Simmonds HA:** Mycophenolate mofetil, an inhibitor of inosine monophosphate dehydrogenase, causes a paradoxical elevation of GTP in erythrocytes of renal transplant patients. *Clinical Sci* **107**, 63-68 (2004)

**Guerciolini R, Szumlanski C, Weinshilboum RM:** Human liver xanthine oxidase: nature and extent of individual variation. *Clin Pharmacol Ther* **50**, 663-672 (1991)

**Hamdan-Khalil R, Allorge D, Lo-Guidice JM, Cauffiez C, Chevalier D, Spire C, Houdret N, Libersa C, Lhermitte M, Colombel JF, Gala JL, Broly F:** In vitro characterization of four novel non-functional variants of the thiopurine S-methyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun* **309**, 1005-1010 (2003)

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

**Hamilton TC, Young RC, McKoy WM, Grotzinger KR, Green JA, Chu EW, Whang-Peng J, Rogan AM, Green WR, Ozols RF:** Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer Res* **43**, 5379-5389 (1983)

**Henle G, Deinhardt F:** The establishment of strains of human cells in tissue culture. *J Immunol* **79**, 54-59 (1957)

**Herfindal ET, Gourley DR, Hart LL, (Hrsg.):** Textbook of Therapeutics: Drug and Disease Management, 6. Ausgabe, Williams and Wilkins, Baltimore (2000)

**Hildner K, Marker-Hermann E, Schlaak JF, Becker C, Germann T, Schmitt E, Meyer zum Buschenfelde KH, Neurath MF:** Azathioprine, mycophenolate mofetil, and methotrexate specifically modulate cytokine production by T cells. *Ann N Y Acad Sci* **859**, 204-207 (1998)

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

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

**Iven H:** Methylation of 6-mercaptopurine and 6-thioguanine in renal transplant recipients on azathioprine treatment. In: Kuhlmann J, Klotz U (Hrsg.): Clinical Pharmacology and Oncology, Vol. 14, W. Zuckerschwerdt Verlag München, Bern, Wien, New York, 89-95 (1996)

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

**Jang U, Shin SG, Lee KH, Yim DS, Lee MS, Koo HH, Kim HK, Sohn DR:** Erythrocyte thiopurine methyltransferase activity in a Korean population. *Br J Clin Pharmacol* **42**, 638-641 (1996)

**Jones CD, Smart C, Titus A, Blyden G, Dorvil M, Nwadike N:** Thiopurine methyltransferase activity in a sample population of black subjects in Florida. *Clin Pharmacol Ther* **53**, 348-353 (1993)

**Jumarie C, Malo C:** Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro. *J Cell Physiol* **149**, 24-33 (1991)

**Kaatsch P, Kaletsch U, Spix C, Michealis J:** Jahresbericht 1998. Deutsches Kinderkrebsregister (1998)

**Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW:** Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* **17**, 16-23 (1979)

**Keuzenkamp-Jansen CW, De Abreu RA, Bokkerink JP, and Trijbels JM:** Determination of extracellular and intracellular thiopurines and methylthiopurines by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* **672**, 53-61 (1995)

**Keuzenkamp-Jansen CW, van Baal JM, De Abreu RA, De Jong JG, Zuiderent R, Trijbels F:** Detection and identification of 6-methylmercapto-8-hydroxypurine, a major metabolite of 6-mercaptopurine, in plasma during intravenous administration. *Clin Chem* **42**, 380-386 (1996)

**Kimes BW, Brandt BL:** Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp Cell Res* **98**, 367-381 (1976)

**Kitchen BJ, Moser A, Lowe E, Balis FM, Widemann B, Anderson L, Strong J, Blaney SM, Berg SL, O'Brien M, Adamson PC:** Thioguanine administered as a continuous intravenous infusion to pediatric patients is metabolized to the novel metabolite 8-hydroxy-thioguanine. *J Pharmacol Exp Ther* **29**, 870-874 (1999)

**Klemetsdal B, Tollefsen E, Loennechen T, Johnsen K, Utsi E, Gisholt K, Wist E, Aarbakke J:** Interethnic difference in thiopurine methyltransferase activity. *Clin Pharmacol Ther* **51**, 24-31 (1992)

**Kong CM, Parks RE Jr:** Incorporation of the purine moieties of guanosine and inosine analogs into nucleotide pools of human erythrocytes. *Biochem Pharmacol* **24**, 807-813 (1974)

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

**Kröplin T, Weyer N, Gutsche S, Iven H:** Thiopurine S-methyltransferase activity in human erythrocytes: a new HPLC method using 6-thioguanine as substrate. *Eur J Clin Pharmacol* **54**, 263-269 (1998)

**Krynetskaia NF, Krynetski EY, Evans WE:** Human RNase H-mediated RNA cleavage from DNA-RNA duplexes is inhibited by 6-deoxythioguanosine incorporation into DNA. *Mol Pharmacol* **56**, 841-848 (1999)

**Krynetski E, Schuetz J, Galpin A, Pui CH, Relling M, Evans WE:** A single point mutation leading to loss of catalytic activity in human thiopurine S-methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 949-953 (1995)

**Kurowski V, Iven H:** Plasma concentrations and organ distribution of thiopurines after oral application of azathioprine in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* **28**, 7-14 (1991)

**Kurzawski M, Gawronska-Szklarz B, Drozdziak M:** Frequency distribution of thiopurine S-methyltransferase alleles in a polish population. *Ther Drug Monit* **26**, 541-545 (2004)

**LePage GA:** Incorporation of 6-thioguanine into nucleic acids. *Cancer Res* **20**, 403-408 (1960)

**Lavi LE, Holcenberg JS:** A rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic assay for 6-mercaptopurine metabolites in red blood cells. *Anal Biochem* **144**, 514-521 (1985)

**Lee EJ, Kalow W:** Thiopurine S-methyltransferase activity in a Chinese population. *Clin Pharmacol Ther* **54**, 28-33 (1993)

**Lennard L, Maddocks JL:** Assay of 6-thioguanine nucleotide, a major metabolic of azathioprine, 6-mercaptopurine and 6-thioguanine, in human red blood cells. *J Pharm Pharmacol* **35**, 15-18 (1983)

**Lennard L, Lilleyman JS:** Are children with lymphoblastic leukaemia given enough 6-mercaptopurine? *Lancet* **2**, 785-787 (1987a)

**Lennard L, Van Loon JA, Lilleyman JS, Weinshilboum RM:** Thiopurine-pharmacogenetics in leukemia: correlation of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity and 6-thioguanine nucleotide concentrations. *Clin Pharmacol Ther* **41**, 18-25 (1987b)

**Lennard L:** Assay of 6-thioinosinic acid and 6-thioguanine nucleotides, active metabolites of 6-mercaptopurine, in human red blood cells. *J Chromatogr* **423**, 169-178 (1987c)

**Lennard L, Lilleyman JS:** Variable 6-mercaptopurine metabolism and treatment outcome in childhood lymphoblastic leukaemia. *J Clin Oncol* **7**, 1816-1823 (1989)

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

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

**Lennard L, Singleton HJ:** High-performance liquid chromatographic assay of the methyl and nucleotide metabolites of 6-mercaptopurine: quantitation of red blood cell 6-thioguanine nucleotide, 6-thioinosinic acid and 6-methylmercaptopurine metabolites in a single sample. *J Chromatogr* **583**, 83-90 (1992b)

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

**Lennard L, Lilleyman JS:** Individualizing therapy with 6-mercaptopurine and 6-thioguanine related to the thiopurine methyltransferase genetic polymorphism. *Ther Drug Monit* **18**, 328-334 (1996)

**Lennard L, Welch JC, Lilleyman JS:** Thiopurine drugs in the treatment of childhood leukaemia: the influence of inherited thiopurine methyltransferase activity on drug metabolism and cytotoxicity. *Br J Clin Pharmacol* **44**, 455-461 (1997)

**Lennard L:** Therapeutic drug monitoring of antimetabolic cytotoxic drugs. *Br J Clin Pharmacol* **47**, 131-143 (1999)

**Liliemark JS, Pettersson B, Engberg B, Lafolie P, Masquelier M, Peterson C:** On the paradoxically concentration-dependent metabolism of 6-mercaptopurine in

WEHI-3b murine leukemia cells. *Cancer Res* **50**, 108-112 (1990)

**Lilleyman JS, Lennard L:** Mercaptopurine metabolism and risk of relapse in childhood lymphoblastic leukaemia. *Lancet* **343**, 1188-1190 (1994)

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

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

**Lowry PW, Franklin CL, Weaver AL, Pike MG, Mays DC, Tremaine WJ, Lipsky JJ, Sandborn WJ:** Measurement of thiopurine methyltransferase activity and azathioprine metabolites in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* **49**, 665-670 (2001)

**Mantegazza R, Antozzi C, Peluchetti D, Sghirlanzoni A, Cornelio F:** Azathioprine as a single drug or in combination with steroids in the treatment of myasthenia gravis. *J Neurol* **235**, 449-453 (1988)

**Markovic-Plese S, Bielekova B, Kadom N, Leist TP, Martin R, Frank JA, McFarland HF:** Longitudinal MRI study: the effects of azathioprine in MS patients refractory to interferon beta-1b. *Neurology* **60**, 1849-1851 (2003)

**Martin DS:** Purine and pyrimidine biochemistry and some relevant clinical and preclinical cancer chemotherapy research. In: Powis G, Prough AR (Hgrs.): *Metabolism and Action of Anti-Cancer Drugs*, Taylor and Francis, London, 91-139 (1987)

**Mawatari H, Kato Y, Nishimura S, Sakura N, Ueda K:** Reversed phase high-performance liquid chromatographic assay method for quantitating 6-mercaptopurine and its methylated and non-methylated metabolites in a single sample. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **716**, 392-396 (1998)

**Maybaum J, Mandel HG:** Unilateral chromatid damage: a new basis for 6-thioguanine cytotoxicity. *Cancer Res* **43**, 3852-3856 (1983)

**Maybaum J, Hink LA, Roethel WM, Mandel HG:** Dissimilar actions of 6-mercaptopurine and 6-thioguanine in Chinese hamster ovary cells. *Biochem Pharmacol* **34**, 3677-3682 (1985)

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

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

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

**Montero C, Duley JA, Fairbanks LD, McBride MB, Micheli V, Cant AJ, Morgan G:** Demonstration of induction of erythrocytes inosine monophosphate dehydrogenase activity in Ribavirin-treated patients using a high performance liquid chromatography linked method. *Clin Chim Acta* **238**, 169-178 (1995)

**Mosca M, Ruiz-Irastorza G, Khamashta MA, Hughes GR:** Treatment of systemic lupus erythematosus. *Int Immunopharmacol* **1**, 1065-1075 (2001)

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

**Nelson J, Carpenter J, Rose L, Adamson D:** Mechanisms of action of 6-thioguanine, 6-mercaptopurine, and 8-azaguanine. *Cancer Res* **35**, 2872-2878 (1975)

**Nelson DJ, Bugge C, Krasny HC:** Oxypurine and 6-thiopurine nucleoside triphosphate formation in human erythrocytes. *Adv Exp Med Biol* **76A**, 121-128 (1977)

**Norval M:** Mechanism of persistence of rubella virus in LLC-MK2 cells. *J Gen Virol* **43**, 289-298 (1979)

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

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

**Pandak WM, Stravitz RT, Lucas V, Heuman DM, Chiang JY:** Hep G2 cells: a model for studies on regulation of human cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase at the molecular level. *Am J Physiol* **270**, 401-410 (1996)

**Park-Hah JO, Klemetsdal B, Lysaa R, Choi KH, Aarbakke J:** Thiopurine methyltransferase activity in a Korean population sample of children. *Clin Pharmacol Ther* **60**, 68-74 (1996)

**Parks DA, Granger DN:** Xanthin oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol Scand Suppl* **548**, 87-99 (1986)

**Pike MG, Franklin CL, Mays DC, Lipsky JJ, Lowry PW, Sandborn WJ:** Improved methods for determining the concentration of 6-thioguanine nucleotides and 6-methylmercaptopurine nucleotides in blood. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **757**, 1-9 (2001)

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

**Rowland K, Lennard L, Lilleyman JS:** High-performance liquid chromatographic assay of methylthioguanine nucleotide. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **705**, 29-37 (1998)

**Rowland K, Lennard L, Lilleyman JS:** In vitro metabolism of 6-mercaptopurine by human liver cytosol. *Xenobiotica* **29**, 615-628 (1999)

**Rudy J, Argyle J, Winick N, Dreal P:** HPLC analysis of 6-mercaptopurine and metabolites in extracellular body fluids. *Ann Clin Biochem* **25**, 504-509 (1988)

**Rumbo C, Emerick KM, Emre S, Shneider BL:** Azathioprine metabolite measurements in the treatment of autoimmune hepatitis in pediatric patients: a preliminary report. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **35**, 391-398 (2002)

**Sandborn WJ, Van Os EC, Zins BJ, Tremaine WJ, Mays DC, Lipsky JJ:** An intravenous loading dose of azathioprine decreases the time to response in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **109**, 1808-1817 (1995)

**Scannell JP, Hitching GH:** Thioguanine in desoxyribonucleic acid from tumors of 6-mercaptopurine-treated mice. *Proc Soc Exp Bio Med* **122**, 627-629 (1966)

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

**Schütz E, Gummert J, Mohr FW, Armstrong VW, Oellerich M:** Should 6-thioguanine nucleotides be monitored in heart transplant recipients given azathioprine? *Ther Drug Monit.* **18**, 228-233 (1996a)

**Schütz E, Gummert J, Armstrong VW, Mohr FW, Oellerich M:** Azathioprine pharmacogenetics: the relationship between 6-thioguanine nucleotides and thiopurine methyltransferase in patients after heart and kidney transplantation. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* **34**, 199-205 (1996b)

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

**Shi RZ, Lyons SD, Christopherson RI:** Metabolic effects of thiopurine derivatives against human CCRF-CEM leukaemia cells. *Int J Biochem Cell Biol* **30**, 885-895 (1998)

**Shipkova M, Armstrong VW, Wieland E, Oellerich M:** Differences in nucleotide hydrolysis contribute to the differences between erythrocyte 6-thioguanine nucleotide concentrations determined by two widely used methods. *Clin Chem* **49**, 260-268 (2003a)

**Shipkova M, von Ahsen N:** Therapie mit Thiopurin-Medikamenten- TDM und Pharmakogenomik der TPMT. *J Lab Med* **27**, 211-221 (2003b)

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

**Stefan C, Walsh W, Banka T, Adeli K, Verjee Z:** Improved HPLC methodology for monitoring thiopurine metabolites in patients on thiopurine therapy. *Clin Biochem* **37**, 764-771 (2004)

**Su Y, Hon YY, Chu Y, Van de Poll ME, Relling MV:** Assay of 6-mercaptopurine and its metabolites in patient plasma by high performance liquid chromatography with diode-array detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **732**, 459-468 (1999)

**Swann PF, Waters TR, Moulton DC Xu YZ, Zheng Q, Edwards M, Mace R:** Role of postreplicative DNA mismatch repair in the cytotoxic action of thioguanine. *Science* **273**, 1109-1111 (1996)

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

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

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

**Tewari YB, Goldberg RN, Advani JV:** Thermodynamics of adenosine 5'-diphosphate to adenosine 5'-triphosphate and adenosine 5'-monophosphate. II. Experimental data. *Biophysical Chemistry* **40**, 263-276 (1991)

**Thomas CW, Myhre GM, Tschumper R, Sreekumar R, Jelinek D, McKean DJ, Lipsky JJ, Sandborn WJ, Egan LJ:** Selective inhibition of inflammatory gene expression in activated T lymphocytes: a mechanism of immune suppression by

thiopurines. *J Pharmacol Exp Ther* **312**, 537-545 (2005)

**Tidd DM, Dedhar S:** Specific and sensitive combined high performance liquid chromatographic-flow fluorometric assay for intracellular 6-thioguanine nucleotide metabolites of 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. *J Chromatogr* **145**, 237-246 (1978)

**Tidd DM, Paterson AR:** Distinction between inhibition of purine nucleotide synthesis and the delayed cytotoxic reaction of 6-mercaptopurine. *Cancer Res* **34**, 733-737 (1974a)

**Tidd DM, Paterson AR:** A biochemical mechanism for the delayed cytotoxic of 6-mercaptopurine. *Cancer Res* **34**, 738-746 (1974b)

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

**Tinel M, Berson A, Pessayre D, Letteron P, Cattoni MP, Horsmans Y, Larrey D:** Pharmacogenetics of human erythrocyte thiopurine methyltransferase activity in a French population. *Br J Clin Pharmacol* **32**, 729-734 (1991)

**Totaro R, Passacantando A, Russo T, Parzanese I, Rascente M, Marini C, Tonietti G, Carolei A:** Effects of interferon beta, cyclophosphamide and azathioprine on cytokine profile in patients with multiple sclerosis. *Int J Immunopathol Pharmacol* **18**, 377-383 (2005)

**Uchida M, Nakamura T, Uchino H:** Conversion of 6-mercaptopurine to 6-thioguanic acid in L-1210 cells and human leukemia cells. *Jpn J Cancer Res* **76**, 124-130 (1985)

**Van Scoik KG, Johanson CA, Porter WR:** The pharmacology and metabolism of the thiopurine drugs 6-mercaptopurine and azathioprine. *Drug Metab Rev* **19**, 157-174 (1985)

**Vogt MH, Stet EH, De Abreu RA, Bokkerink JP, Lambooy LH, Trijbels FJ:** The importance of methylthio-IMP for methylmercaptopurine ribonucleoside (Me-MPR) cytotoxicity in Molt F4 human malignant T-lymphoblasts. *Biochim Biophys Acta* **1181**, 189-194 (1993)

**Warren DJ, Slordal L:** A high-performance liquid chromatographic method for the determination of 6-thioguanine residues in DNA using precolumn derivatization and fluorescence detection. *Anal Biochem* **215**, 278-283 (1993)

**Warren D, Andersen A, Slordal L:** Quantitation of 6-thioguanine residues in peripheral blood leukocyte DNA obtained from patients receiving 6-mercaptopurine-based maintenance therapy. *Cancer Res* **55**, 1670-1674 (1995)

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

**Welch J, Lennard L, Morton GC, Lilleyman JS:** Pharmacokinetics of mercaptopurine: plasma drug and red cell metabolite concentrations after oral dose. *Ther Drug Monit* **19**, 382-385 (1997)

**Weller S, Thurmann P, Rietbrock N, Gossmann J, Scheuermann EH:** HPLC analysis of azathioprine metabolites in red blood cells, plasma and urine in renal transplant recipients. *Int J Clin Pharmacol Ther* **33**, 639-645 (1995)

**Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T, Fessing MY, Tai HL, Pui CH, Relling MV, Evans WE:** Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Ann Intern Med* **126**, 608-614 (1997)

**Zimm S, Collins JM, Riccardi R, O'Neill D, Narang PK, Chabner B, Poplack DG:** Variable bioavailability of oral mercaptopurine. Is maintenance chemotherapy in acute lymphoblastic leukemia being optimally delivered? *N Engl J Med* **308**, 1005-1009 (1983)

**Zimm S, Johnson GE, Chabner BA, and Poplack DG:** Cellular pharmacokinetics of mercaptopurine in human neoplastic cells and cell lines. *Cancer Res* **45**, 4156-4161 (1985)

**Zimm S, Strong JM:** A clinically useful ion-pairing high-performance liquid chromatographic assay for the monophosphate metabolites of thioguanine and mercaptopurine in human neoplastic cells. *Anal Biochem* **160**, 1-6 (1987)

**Zimmerman TP, Chu LC, Bugge CJ, Nelson DJ, Lyon GM, Elion GB:** Identification of 6-methylmercaptopurine ribonucleoside 5'-diphosphate and 5'-triphosphate as metabolites of 6-mercaptopurine in man. *Cancer Res* **34**, 221-224 (1974)

## 8. Anhang

Tab. I: Chemikalien und Reagenzien.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Acetonitril	Baker 8143
Dithiothreitol (DTT)	Sigma D-5545
Citronensäure	Merck 244
Cyanmethämoglobin Standard Set	Randox Laboratories LTD HG 1539
Glucose, für Mikrobiologie	Merck 108342
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck 4873
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck 105886
Natriumchlorid	Merck 106404
Natriumhydroxid	Fluka 71690
Salzsäure	Merck 109970
Schwefelsäure	Merck 109981
Tetrabutylammoniumhydrogensulfat	Serva 35854
Wasserstoffperoxid 30 %, reinst, stabilisiert	Merck 8597

**Tab. II:** Referenzsubstanzen und Enzyme.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Adeninhemisulfat	Sigma-Aldrich A-9126
Adenosin	Sigma-Aldrich A-9251
Adenosin-5'-Monophosphat	Sigma-Aldrich A-2002
Adenosin-5'-Diphosphat	Sigma-Aldrich A-2754
Adenosin-5'-Triphosphat	Sigma-Aldrich A-0770
Guanin	Sigma-Aldrich G-0506
Guanosin	Sigma-Aldrich G-6752
Guanosin-5'-Monophosphat	Sigma-Aldrich G-8377
Guanosin-5'-Diphosphat	Sigma-Aldrich G 7127
Guanosin-5'-Triphosphat	Sigma-Aldrich G 8877
Hypoxanthin	Sigma-Aldrich H-9377
8-Hydroxy-6-Mercaptopurin	Sigma-Aldrich
6-Mercaptopurin Monohydrat	Sigma-Aldrich M-7000
6-Mercaptopurinribosid	Sigma-Aldrich M-7250
6-Methylmercaptapurin	Sigma-Aldrich M-3877
6-Methylmercaptapurinribosid	Sigma-Aldrich M-4002
6-Mercaptopurinribosid-5'-Monophosphat (6-Thioinosin-5'-Monophosphat)	Sigma-Aldrich M-7638
6-Methylthioguanin	Sigma-Aldrich A-9546
6-Methylthioguanosin	eigene Synthese*
6-Methylthioguanosin-5'-Triphosphat	Jena Bioscience
6-Thioguanin	Sigma-Aldrich A-4882
6-Thioguanosin	Sigma-Aldrich A-6625

**Tab. II:** Fortsetzung. Referenzsubstanzen und Enzyme.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
6-Thioguanosin-5'-Diphosphat	Jena Bioscience, Jena
6-Thioguanosin-5'-Triphosphat	Jena Bioscience, Jena
6-Thioharnsäure	Geschenk von Burroghs Wellcome Co. Research
6-Thioxanthin	Sigma-Aldrich T-8125
Nucleosid Phosphorylase (EC 2.4.2.1)	Sigma-Aldrich N-8264
Saure Phosphatase (EC 3.1.3.2)	Sigma-Aldrich P-1146

\* 6-Methylthioguanosin wurde aus 6-Thioguanosin nach Keuzenkamp-Jansen et al. (1995) synthetisiert.

**Tab. III:** Lösungen.

<b>Inkubationspuffer</b>	75 mmol/l NaCl, 2 mmol/l MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O, 50 mmol/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mmol/l Glucose, 2 mmol/l DTT, mit 0,1 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt.
<b>Fließmittel A</b>	20 mmol/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 3 % Acetonitril; 2 mmol/l (Bu <sub>4</sub> N) <sup>+</sup> HSO <sub>4</sub> <sup>-</sup> , eingestellt auf pH 7,0; 15 min im Ultraschallbad entgasen.
<b>Fließmittel B</b>	20 mmol/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 20 % Acetonitril; 2 mmol/l (Bu <sub>4</sub> N) <sup>+</sup> HSO <sub>4</sub> <sup>-</sup> , Einstellung auf pH 7,0; 15 min im Ultraschallbad entgasen.
<b>Lösung zur Bestimmung von Hämoglobin</b>	1 Teil der Lösung mit 9 Teilen Aqua dest. verdünnen, bei Raumtemperatur im lichtgeschützten Behältnis aufbewahrt.

**Tab. IV:** Herstellung der Stammlösungen.

<b>6-Thioguanin</b> 0,6 mmol/l (100 µg/ml)	1 mg 6-TG (6 mmol/l) wird in 0,4 ml 0,1 N NaOH für 15 min in einem Ultraschallbad gelöst. Die Endkonzentration von 0,6 mmol/l wird durch Zugabe eines entsprechenden Volumens an Wasser eingestellt.
<b>6-Thioguanosin</b> 0,6 mmol/l (100 µg/ml)	1,79 mg 6-Thioguanosin (6 mmol/l bezogen auf das molekulare Gewicht von 6-TG) wird in 0,4 ml 0,1 N NaOH 15 min in einem Ultraschallbad gelöst. Die Endkonzentration von 0,6 mmol/l wird durch Zugabe eines entsprechenden Volumens an Wasser eingestellt.
<b>6-Methylthioguanin</b> 0,55 mmol/l (100 µg/ml)	1 mg 6-MTG (5,5 mmol/l) wird in 0,4 ml 0,1 N NaOH für 15 min in einem Ultraschallbad gelöst. Die Endkonzentration von 0,55 mmol/l wird durch Zugabe eines entsprechenden Volumens an Wasser eingestellt.
<b>6-Mercaptopurin</b> 0,6 mmol/l (100 µg/ml)	1 mg 6-MP (6 mmol/l) wird in 0,4 ml 0,1 N NaOH für 15 min in einem Ultraschallbad gelöst. Die Endkonzentration von 0,6 mmol/l wird durch Zugabe eines entsprechenden Volumens an Wasser eingestellt.
<b>6-Mercaptopurinribosid</b> 0,6 mmol/l (100 µg/ml)	1,67 mg 6-MP-R (6 mmol/l) wird in 0,4 ml 0,1 N NaOH für 15 min in einem Ultraschallbad gelöst. Die Endkonzentration von 0,6 mmol/l wird durch Zugabe eines entsprechenden Volumens an Wasser eingestellt.
<b>6-Methylmercaptopurin</b> 0,6 mmol/l (100 µg/ml)	Einwaage von 1 mg 6-MMP und Lösen in 0,4 ml 0,1 N NaOH in einem Ultraschallbad; neutralisieren mit 0,04 ml 1 N HCl. Anschließend wird das zum Erreichen der Endkonzentration benötigte Volumen (0,56 ml) Wasser zupipettiert.

Tab. IV: Fortsetzung.

<b>6-Methylmercaptapurin-ribosid</b> 0,6 mmol/l (100 µg/ml)	Einwaage von 1,78 mg 6-MMP (0,6 mmol/l) und Lösen in 0,4 ml 0,1 N NaOH in einem Ultraschallbad: neutralisieren mit 0,04 ml 1 N HCl. Anschließend wird das zum Erreichen der Endkonzentration benötigte Volumen (0,56 ml) Wasser zupipettiert.
<b>6-Thioxanthin</b> 0,6 mmol/l (100 µg/ml)	1 mg 6-TX (6 mmol/l) wird in 0,4 ml 0,1 N NaOH für 15 min in einem Ultraschallbad gelöst. Die Endkonzentration von 0,6 mmol/l wird durch Zugabe eines entsprechenden Volumens an Wasser eingestellt.

Tab. V: HPLC-Säulen.

LiChroCART <sup>®</sup> 55-4, Purosphere <sup>®</sup> Star RPe 18 60x4 mm (3 µm)	Merck, Darmsatdt
LiChroCART <sup>®</sup> 125-4, LiChrospher <sup>®</sup> 60 RP- select B (5 µm)	Merck, Darmsatdt
Nova-Pac <sup>®</sup> C <sub>18</sub> 3,9 x150 Column	Waters, Eschborn
Vorsäule: SecurityGuard Cartridge	Phenomenex, Aschaffenburg

**Tab. VI:** Geräte.

Beam Boost: (post-column Reaktionsschleife)	ICT Chemietechnik, Wien
BP 210 D Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Digital Multimeter M-4650 CR	Conrad Elektronik, Hirschau
Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
GR 4-12 Zentrifuge	Jouan, Dreieich/ Frankfurt
Inkubationsbad MGW Lauda CS 20	Lauda, Lauda-Königshofen
WellChromHPLC Pump K 1001	KNAUER, Berlin
pH-Meter GPHR 1400 A	Greisinger Electronic, Regenstauf
Rührer IKA-Combimag Typ Ret	Jahnke & Kunkel, Staufen i.Br.
Ultraschallbad Bransonic 220	Branson Ultrasonics, Danbury
Uvikon Spectrophotometer 932	Kontron Instruments, Italien
Tube UV 8 W 254 nm	Novodirect GmbH, Kehl/ Rhein
Vortex-Mixer Reax 2000	Heidolph, Schwabach

**Tab. VII:** Chemische Daten von Guanin und 6-Thioguanin sowie deren Metaboliten. Reinheit (%) nach Angaben des Herstellers.

<b>Nr.</b>	<b>Substanz</b>	<b>Mol. Gewicht g/mol</b>	<b>Reinheit %</b>
1.	6-Thioguanin	167,2	99
2.	6-Thioguanosin	299,31	98
3.	6-Thioguanosin-5'-Diphosphat	457,24	> 95
4.	6-Thioguanosin-5'-Triphosphat	536,22	> 95
5.	Guanin	151,13	99
6.	Guanosin	283,2	98
7.	Guanosin-5'-Monophosphat	362,2	99
8.	Guanosin-5'-Diphosphat	443,2	96
9.	Guanosin-5'-Triphosphat	523,2	97

## 9. Veröffentlichungen

**Poster:** **Is the first-pass metabolism of 6-mercaptopurine (6-MP) saturable in the therapeutic dose range?**

*Gutsche S, **Kotalczyk A**, Bucsky P, Iven H*

Klinische Pädiatr. 2002; 214, 255

**A time-saving and rapid HPLC-method for the determination of 6-thioguanine and 6-thioguanine nucleotide.**

***Kotalczyk A**, Gutsche S, Iven H*

11th International and 9<sup>th</sup> European Symposium on Purines and Pyrimidines in Man, Egmond aan Zee, 9-13 Juni 2003

**Can whole blood substitute washed red blood cells for the analysis of TPMT activity and 6-mercaptopurine metabolites?**

***Iven H**, Kotalczyk A, Gutsche S*

11<sup>th</sup> International and 9<sup>th</sup> European Symposium on Purines and Pyrimidines in Man, Egmond aan Zee, 9-13 Juni 2003

**6-Mercaptopurine (6-MP) metabolism in man and its fingerprints in erythrocytes (RBC).**

*Gutsche S, **Kotalczyk A**, Iven H*

International Symposium on ACUTE LEUKEMIAS X, prognostic factors and treatment strategies, München, 21-25 Februar 2004

**Uptake and metabolism of thiopurines in human red blood cells in vitro.**

*Kotalczyk A, Gutsche S, Iven H*

46. Frühjahrestagung der DGPT, Mainz, 15-17 März 2005, Archives of Pharmacology 371, Abstr. Nr. 606

**Thiopurine S-methyltransferase activity (TPMT) is modulated by disease.**

*Iven H, Kotalczyk A, Gutsche S*

46. Frühjahrestagung der DGPT, Mainz, 15-17 März 2005, Archives of Pharmacology 371, Abstr. Nr. 567

**Uptake and metabolism of 6-mercaptopurine (6-MP) and 6-thioguanine (6-TG) by different human and animal cell lines.**

*Kotalczyk A, Gutsche S, Iven H*

10<sup>th</sup> Symposium of the European Society for the Study of Purine and Pyrimidine Metabolism in Man (ESSPPMM), Prag, 8-11 Juni 2005

**Thiopurine S-methyltransferase activity (TPMT) is modulated by median age red blood cells.**

*Gutsche S, Kotalczyk A, Iven H*

10<sup>th</sup> Symposium of the European Society for the Study of Purine and Pyrimidine Metabolism in Man (ESSPPMM), Prag, 8-11 Juni 2005

**Artikel:**

**A simple HPLC method for the determination of thiopurine nucleotides in erythrocytes.**

***Kotalczyk A, Kröplin T, Gutsche S, Iven H***

Manuskript in Vorbereitung

## 10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. H. Iven für die Überlassung des Themas und die kompetente Unterstützung vor allem bei der Einarbeitung in die HPLC-Analytik und die Etablierung der „Nukleotid“-Methode. Ich danke für seine aufmerksame und persönliche Betreuung, konstruktive Anregungen und Ratschläge. Ich danke der José Carrera Stiftung für die finanzielle Unterstützung.

Herrn Dr. rer. nat. R. Pentz für die Bereitschaft und wertvollen Tipps bei Behebung vieler kleiner und großer Probleme, die während der Entwicklung der Methode entstanden sind.

Frau Dr. sc. hum. F. Qadri für die vielen motivierenden Gespräche und aufmunternden Worte.

Herrn Prof. Dr. med. J. Schulze für die vielen Diskussionen.

Danke auch an die Medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Kaul, Frau Stolte, Frau Neitzel und Frau Winter-Keil für das freundliche und angenehme Arbeitsklima.

Herrn R. Koch danke ich für die technische Unterstützung beim Reparieren meiner HPLC- Anlage und meines Fahrrads.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern für die jahrelange und großzügige Unterstützung während meines Studiums und der Promotionszeit von ganzem Herzen danken. Ohne sie wäre ich heute nicht das, was ich bin und diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen. Ich danke meinem Freund Marcin, dass er immer da war. Meiner liebsten Ehefrau Cornelia danke ich für die Liebe, ständige Geduld mit mir und für die Unterstützung. Ich danke Dir, dass Du Dich in den letzten Monaten mit so viel Liebe um unsere Tochter Louisa gekümmert hast und dass Du immer auf mich gewartet hast.

## 11. Curriculum vitae

### Persönliche Angaben

Name: Adam Ludwig Kotalczyk-Zepke, geb. Kotalczyk  
Geburtsdatum, -ort: 06. März 1973, Deutsch Piekar (Polen)  
Eltern: Jana Kotalczyk, geb. Woitzik und Eugen Kotalczyk

### Schulischer Werdegang

1980-1988 Grundschule, Deutsch Piekar  
1988-1992 Realschule in Bremerhaven  
1992-1995 Gymnasium „An der Bördestrasse“, Bremen  
Mai 1995 Abitur

### Studium

Oktober 1995-November 2000 Pharmaziestudium an der Christian Albrechts-Universität zu Kiel  
August 1998 Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
November 2000 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
Dezember 2001 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
Januar 2002 Approbation als Apotheker

### Praktisches Jahr

Dezember 2000-Mai 2001 Apotheke des Zentralkrankenhauses Reinkenheide, Bremerhaven  
Juni 2001-November 2001 Dr. Sievert Apotheke, Kiel

### Berufstätigkeit

Januar 2001-Dezember 2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität Lübeck  
seit Januar 2006 Assistent der Leitung der Qualitätskontrolle bei Lichtenheldt GmbH in Wahlstedt