

AUS DER I. MEDIZINISCHEN KLINIK UND POLIKLINIK
DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN
DER JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ

Messung von
6-Thioguanosin-5'-Monophosphat,
-Diphosphat und -Triphosphat
in Erythrozyten und Ansprechen
auf eine Azathioprin-Therapie
in chronisch entzündlichen
Darmerkrankungen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Ute Teichgräber
aus Mannheim

Mainz, 2011

**Wissenschaftlicher
Vorstand:**

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 05.07.2011

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	3
1.1.1 Morbus Crohn	3
1.1.2 Colitis ulcerosa	6
1.1.3 Ätiologie und Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen	9
1.1.4 Medikamentöse Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen	25
1.2 Azathioprin	27
1.2.1 Chemische Eigenschaften	28
1.2.2 Pharmakodynamik	29
1.2.3 Pharmakokinetik	29
1.2.4 Klinischer Einsatz in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	30
1.2.5 Unerwünschte Wirkungen	34
1.2.6 Arzneimittelinteraktionen	36
1.2.7 Metabolismus von Azathioprin	36
1.2.8 Wirkmechanismus von Azathioprin	39
2 Zielsetzung der Arbeit	40
3 Material und Methoden	42
3.1 Material	42
3.1.1 Materialien, Chemikalien und Geräte	44
3.1.2 Puffer, Medien und Lösungen für die Bestimmung von TGMP, TGDP und TGTP	49
3.1.3 Puffer, Medien und Lösungen für die Bestimmung von MMPN, MTGN und 6-TGN	53
3.1.4 Puffer, Medien und Lösungen für die TPMT-Bestimmung	58
3.2 Methodik	61
3.2.1 Durchführung der Bestimmung von TGMP, TGDP und TGTP	61
3.2.2 Durchführung der Bestimmung von MMPN, MTGN und 6-TGN	63

3.2.3	Durchführung der TPMT-Bestimmung	64
3.2.4	Software und Auswertung	66
3.3	Datenerhebung	67
3.3.1	Interview	67
3.3.2	Fragebogen	67
3.3.3	CDAI (Crohn's Disease Activity Index nach Best)	68
3.3.4	CAI (Clinical Activity Index)	68
3.3.5	IBDQ (Inflammatory Bowel Disease Questionnaire)	68
3.4	Statistische Auswertung	69
4	Ergebnisse	70
4.1	Patientenkollektiv	70
4.1.1	Einschlusskriterien	70
4.1.2	Ausschlusskriterien	71
4.1.3	Beschreibung der Stichproben	72
4.2	Deskriptive Statistik der Metaboliten-Messung und allgemeine Korrelationen	75
4.2.1	Deskriptive Statistik der Metaboliten	75
4.2.2	Korrelation der Metaboliten – Der Metabolit TGTP korreliert mit 6-TGN, TGDP und MTGN	78
4.2.3	Korrelation der Metaboliten im Morbus Crohn-Kollektiv	82
4.2.4	Korrelation der Metaboliten im Colitis ulcerosa-Kollektiv	85
4.2.5	Korrelationen im Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Kollektiv mit 6-TGN $>$ und $<$ $100 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ sowie Q $>$ und $<$ $85 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$	85
4.3	Inter- und Intra-Patienten-Variabilität	90
4.3.1	Serielle Messung im Morbus Crohn-Kollektiv	90
4.3.2	Serielle Messung im Colitis ulcerosa-Kollektiv	92
4.4	Ergebnisse der Aktivitätsmessung von TPMT	94
4.4.1	Bedeutung von TPMT für die Azathioprin-Metaboliten – TPMT korreliert mit dem Metaboliten 6-MMP	94
4.4.2	Morbus Crohn-Patienten mit fistulierendem Verlauf weisen eine erhöhte TPMT-Aktivität auf	95
4.5	Messung von Ansprechen <i>versus</i> Therapieversagen	97
4.5.1	CDAI, CAI und IBDQ – Ansprechen ist mit erniedrigtem CDAI und CAI sowie erhöhtem IBDQ assoziiert	97
4.5.2	Ansprechen und Dosierung von Azathioprin – Patienten mit höheren Azathioprin-Dosen sprechen nicht besser an	98
4.6	Ergebnisse der Metaboliten-Messung von TGTP	102
4.6.1	Anti-TNF α , Glukokortikoide und 5-Aminosalizylate – Einfluss der Komedikation auf die Höhe der TGTP-Spiegel	102
4.6.2	Morbus Crohn-Patienten mit stenosierendem Verlauf verfügen über hohe TGTP-Spiegel	104

4.6.3	Korrelationen der Metaboliten mit der Dosierung von Azathioprin – Der Metabolit TGTP korreliert mit der Azathioprin-Dosierung	105
4.6.4	Ansprechen und Azathioprin-Metaboliten – Hohe TGTP-Spiegel sind mit einem Ansprechen auf die Therapie assoziiert	110
5	Diskussion	114
5.1	Ausgangsfragestellung	114
5.2	Patientenkollektiv	115
5.3	Messung der Azathioprin-Metaboliten und TPMT-Aktivität in Erythrozyten durch die HPLC-Methode	116
5.4	Therapeutisches Drug Monitoring chronisch entzündlicher Darmerkrankungen	122
5.4.1	Monitoring mittels 6-TGN – wertvolle Hilfe oder entbehrlich?	124
5.4.2	TPMT – Reziproke Assoziation mit Ansprechen und Korrelation mit 6-MMP	125
5.4.3	Monitoring und Erfassung der Krankheitsaktivität	127
5.4.4	Non-Compliance	127
5.5	Inter- und Intra-Patienten-Variabilitäten: Mögliche Einflussgrößen	130
5.6	Azathioprin und Dosierung – Der Metabolit TGTP korreliert mit der Azathioprin-Dosierung	131
5.7	Hohe Azathioprin-Dosen führen nicht zu einem besseren Ansprechen	134
5.8	Metabolismus und Wirkmechanismus von Azathioprin	135
5.9	TGTP: Ein Metabolit mit Schlüsselfunktion?	140
5.9.1	Einfluss der Komedikation auf die Höhe der TGTP-Spiegel	140
5.9.2	Patienten mit fistulierendem Verlauf weisen eine erhöhte TPMT-Aktivität auf	142
5.9.3	Patienten mit stenosierendem Verlauf verfügen über hohe TGTP-Spiegel	142
5.9.4	TGTP korreliert mit 6-TGN, TGDP und MTGN	143
5.9.5	Hohe TGTP-Spiegel sind mit einem Ansprechen auf die Azathioprin-Therapie assoziiert	145
5.10	Ausblick	146
6	Zusammenfassung	147
7	Literaturverzeichnis	150
7.1	Internetquellen	197
8	Anhang	199

Abbildungsverzeichnis

1.1	G. B. Elion und G. H. Hitchings	2
1.2	Intestinales Immunsystem	17
1.3	Intestinales Immunsystem bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	18
1.4	Strukturformeln von Adenin, Guanin, Azathioprin, 6-Mercaptopurin, 6-Thioguanin und Hypoxanthin	28
1.5	Modell von Azathioprin	30
1.6	Metabolismus von Azathioprin – Strukturformeln	37
3.1	Metabolismus von Azathioprin, 6-Mercaptopurin und 6-Thioguanin – Schematische Darstellung	43
4.1	Box-Whisker-Plots von 6-TGN, TGDP und TGTP	76
4.2	Verteilung der Thioguanin-Nukleotide	76
4.3	Korrelation 6-TGN – TGMP	77
4.4	Korrelation 6-TGN – TGDP und 6-TGN – TGTP	79
4.5	Korrelation TGDP – TGTP und 6-TGN – MTGN	80
4.6	Korrelation von 6-TGN mit der Summe aus TGDP und TGTP	80
4.7	Serielle Messung von 6-TGN und TGDP bei Morbus Crohn	91
4.8	Serielle Messung von TGTP bei Morbus Crohn	91
4.9	Variabilität von TGDP und TGTP bei Morbus Crohn	92
4.10	Serielle Messung von 6-TGN und TGDP bei Colitis ulcerosa	93
4.11	Serielle Messung von TGTP bei Colitis ulcerosa	93
4.12	Variabilität von TGDP und TGTP bei Colitis ulcerosa	94
4.13	Box-Whisker-Plot von TPMT und Korrelation TPMT – 6-MMP	95
4.14	TPMT-Aktivität bei fistulierendem <i>versus</i> nicht fistulierendem Verlauf	96
4.15	Korrelation CAI – IBDQ und CDAI – IBDQ	98
4.16	CDAI/CAI und Remission <i>versus</i> keine Remission	99
4.17	IBDQ und Remission <i>versus</i> keine Remission	99
4.18	Azathioprin-Dosierung und Ansprechen	100
4.19	Box-Whisker-Plots für Remission und Azathioprin-Dosierung	101
4.20	Metaboliten-Spiegel bei Anti-TNF α <i>versus</i> ohne Anti-TNF α	103
4.21	Metaboliten-Spiegel bei stenosierendem <i>versus</i> nicht stenosierendem Verlauf	105
4.22	Korrelation von MTGN und TGDP mit der Azathioprin-Dosierung	106
4.23	Azathioprin-Dosierung und TGTP	106

4.24	Korrelation TGTP – Azathioprin-Dosierung	107
4.25	TGTP-Höhe, Azathioprin-Dosierung und Ansprechen einer Untergruppe	108
4.26	TGTP und die Anzahl der Schübe/Jahr	110
4.27	TGDP und die Anzahl der Schübe/Jahr	111
4.28	Der Quotient Q und die Anzahl der Schübe	111
4.29	TGTP und Ansprechen	112
5.1	Metabolismus von Azathioprin	136
5.2	Modell von TGTP	138

Tabellenverzeichnis

1.1	Indikationen für Azathioprin	31
3.1	Verwendete Materialien im Labor des Universitätsklinikums Mainz	44
3.2	Materialien des Instituts für klinische Pharmakologie Stuttgart	45
3.3	Pipettierschema – Kalibrierproben für die Bestimmung von TGMP, TGDP und TGTP	52
3.4	Pipettierschema – Qualitätskontrollen für die Bestimmung von TGMP, TGDP und TGTP	52
3.5	Pipettierschema – Kalibrierproben für die Bestimmung von 6-TGN	56
3.6	Pipettierschema – Kalibrierproben für die Bestimmung von MMPN und MTGN	56
3.7	Pipettierschema für MMP- und MTG-Qualitätskontrollen	57
3.8	Pipettierschema für TG-Qualitätskontrollen	57
3.9	Pipettierschema für Eichpunkte	60
3.10	Pipettierschema für Qualitätskontrollen	60
3.11	Pipettierschema – Inkubation von Erythrozytenlysat mit 6-TG	65
4.1	Deskriptive Statistik für Morbus Crohn und Colitis ulcerosa	72
4.2	Deskriptive Statistik für Morbus Crohn	73
4.3	Deskriptive Statistik für Colitis ulcerosa	74
4.4	Deskriptive Statistik der Azathioprin-Metaboliten	77
4.5	Korrelationstabelle für Morbus Crohn und Colitis ulcerosa	81
4.6	Korrelationstabelle für Morbus Crohn	83
4.7	Korrelationstabelle für Colitis ulcerosa	84
4.8	Morbus Crohn-Patienten mit 6-TGN > und < 100 pmol/8 x 10 ⁸ RBC	87
4.9	Colitis ulcerosa-Patienten mit 6-TGN > und < 100 pmol/8 x 10 ⁸ RBC	87
4.10	Aufteilung der Morbus Crohn-Patienten nach 6-TGN und Quotient	88
4.11	Aufteilung der Colitis ulcerosa-Patienten nach 6-TGN und Quotient	89
4.12	Deskriptive und explorative Statistik für Morbus Crohn	90
4.13	Deskriptive und explorative Statistik für Colitis ulcerosa	92
4.14	Metaboliten-Messung bei fistulierendem <i>versus</i> nicht fistulierendem Verlauf	96
4.15	Metaboliten-Messung bei Anti-TNF α -Therapie <i>versus</i> ohne Anti-TNF α -Therapie	102
4.16	Metaboliten-Messung bei stenosierendem <i>versus</i> nicht stenosierendem Verlauf	104

4.17	Metaboliten-Messung bei Patienten mit hoher Azathioprin-Dosierung	109
5.1	Literaturübersicht der Thiopurin-Lagerung und -Analyse	117
5.2	Literaturübersicht der Krankheitsaktivitäts-Messung	128
5.4	Literaturübersicht über die Korrelation von 6-TGN und Thiopurin-Dosierung	132

Abkürzungsverzeichnis

ADK	Adenosinkinase
AICD	<i>activation induced cell death</i>
AIH	Autoimmunhepatitis
ALL	akute lymphatische Leukämie
AMP	Adenosinmonophosphat
AO	Aldehydoxidase
Apaf	<i>apoptotic protease activating factor</i>
APC	<i>antigen-presenting cell</i>
Arg	Arginin
Art.	Artikel
5-ASA	5-Aminosalizylsäure
ATG16L1	<i>autophagy-related protein 16-like 1</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	<i>Bcl-x_L/Bcl-2-associated death promoter</i>
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-x _L	<i>B-cell lymphoma extra long</i>
Bcl-x _S	<i>B-cell lymphoma extra short</i>
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
Bik	<i>Bcl-2-interacting killer</i>
Bim	<i>Bcl-2-interacting mediator of cell death</i>
BIR	<i>baculovirus inhibitor of apoptosis repeat</i>
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
C	Celsius
ca.	circa
CAI	<i>Clinical activity index</i>
CARD15	<i>caspase activation and recruitment domain 15</i>
CARDIAK	<i>CARD-containing interleukin-1 β-converting enzyme-associated kinase</i>
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
Caspase	<i>cysteinyl-aspartate specific protease</i>
CATERPILLER	<i>CARD, transcription enhancer, R(purine)-binding, pyrim, lots of leucin rich repeats</i>

CCL20	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 20</i>
CD	<i>Crohn's disease</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD45RO	<i>cluster of differentiation 45 isoform RO</i>
CDAI	<i>Crohn's Disease Activity Index</i>
Cdc42	<i>cell division control protein 42 homolog</i>
CD-ROM	<i>Compact Disc Read-Only Memory</i>
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CIITA	<i>class II transactivator</i>
cm	Zentimeter
Co.	Compagnie
CRP	C-reaktives Protein
CTLA	<i>cytotoxic T-lymphocyte antigen</i>
CU	Colitis ulcerosa
d	Tag
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DALM	<i>dysplasia-associated lesion or mass</i>
DD	<i>death domain</i>
DED	<i>death effector domain</i>
dest.	destilliert
d. h.	das heißt
DIABLO	<i>Direct IAP Binding Protein with Low pI</i>
DIN	Deutsches Institut für Normung
DISC	<i>death-inducing signalling complex</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNPS	De Novo-Purin-Nukleotid-Synthese
DR	<i>death receptor</i>
dTGDP	2'-deoxy-6-Thioguanosin-Diphosphat
dTGTP	2'-deoxy-6-Thioguanosin-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EC	<i>Enzyme Commission</i>
EDAR	<i>ectodysplasin A receptor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EP	Eichpunkt
ERM	Ezrin/Radixin/Moesin
<i>et al.</i>	<i>et alii, et aliae, et alia</i>
Fab	<i>fragment antigen-binding</i>
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
Fas	Fas-Rezeptor

FasL	<i>Fas ligand</i>
FKBP	<i>FK 506 binding protein</i>
FOXP3	<i>forkhead box P3</i>
f. wt.	<i>fresh weight</i>
g	Gramm
G	<i>Gap</i> (Zellzyklus)
GALT	<i>gut-associated lymphoid tissue</i>
GAP	<i>GTPase activated protein</i>
GDI	<i>guanine nucleotide dissociation inhibitor</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
Gew.-%	Gewichtsprozent
Gly	Glycin
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GMPS	Guanosin-Monophosphat-Synthetase
GSH	Glutathion
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
HBI	Harvey-Bradshaw Index
hCNT	<i>human concentrative nucleoside transporter</i>
HCV	Hepatitis C-Virus
HD	<i>human α-defensin</i>
hENT	<i>human equilibrative nucleoside transporter</i>
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
hGST	humane Glutathion-Transferase
Hkt	Hämatokrit
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> , Hochleistungs- chromatography
HRQoL	<i>Health Related Quality of Life</i>
Huh7	<i>human hepatoma cell line 7</i>
IAP	<i>inhibitor of apoptosis protein</i>
IBD	<i>Inflammatory Bowel Disease</i>
IBDQ	<i>Inflammatory Bowel Disease Questionnaire</i>
IC ₉₀	<i>inhibitory concentration (90 %)</i>
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
I- κ B	<i>inhibitor of nuclear factor-κB</i>
IKK	I- κ B-Kinase
IKP	Institut für klinische Pharmakologie

IL	Interleukin
IL-23R	<i>Interleukin 23 receptor</i>
IMPDH	Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase
IRGM	<i>immunity-related GTPase family type M</i>
IRR	<i>incidence rate ratio</i>
IS	Interquartilspanne
ITPase	Inosin-Triphosphat-Pyrophosphatase
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
i. v.	intravenös
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KG	Kommanditgesellschaft
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
konz.	konzentriert
l	Liter
LD50	mittlere letale Dosis
Leu	Leucin
LRD	<i>ligand recognition domain</i> (Ligandenerkennungsdomäne)
LRR	<i>leucin-rich repeats</i>
M	molar (mol/l)
m	Meter
m ²	Quadratmeter
MAdCAM	<i>mucosal addressin cell adhesion molecule</i>
MAMP	<i>microbial-associated molecular patterns</i>
MAPKK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MAP3K	<i>mitogen-activated kinase kinase kinase</i>
Max	Maximum
MC	Morbus Crohn
MCV	<i>mean corpuscular volume</i>
MDBK-Zellen	<i>Madin-Darby bovine kidney-Zellen</i>
MDP	Muramyldipeptid
MEK	<i>Mitogen activated protein kinase kinase</i>
MEKK1	<i>mitogen-activated kinase kinase kinase</i>
meTG	Methyl-Thioguanin
meTGDP	6-Methyl-Thioguanosin-Diphosphat
meTGMP	6-Methyl-Thioguanosin-Monophosphat
meTGTP	6-Methyl-Thioguanosin-Triphosphat
meTIDP	6-Methyl-Thioinosin-Diphosphat
meTIMP	Methyl-Thioinosin-Monophosphat

meTIN	Methylthioinosin-Nukleotide
meTITP	6-Methyl-Thioinosin-Triphosphat
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
Min	Minimum
min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µM	mikromolar
µm	Mikrometer
mM	mmol/Liter
mm	Millimeter
6-MMP	6-Methyl-Mercaptopurin
6-MMPN	6-Methyl-Mercaptopurin-Nukleotide
6-MMPR	6-Methylmercaptopurin-Ribosid
MMPRib	6-Methylmercaptopurin-Ribosid
MMR	<i>Mismatch-Reparatur</i>
6-MP	6-Mercaptopurin
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRP	<i>multidrug resistance-associated protein</i>
MTG	Methyl-Thioguanin
MTGN	6-Methyl-Thioguanin-Nukleotide
Mur-NAc-L-Ala-D-isoGln	N-Acetylmuramyl-L-Alanyl-D-Isoglutamin
MW	Mittelwert
MW	Molekülmasse
M-Zelle	<i>microfold-Zelle</i>
N	Normalität
n	Größe der Stichprobe
NACHT	<i>NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein), CIITA (MHC class II transcription activator), HET-E (incompatibility locus protein from Podospora anserina) und TP1 (telomerase-associated protein)</i>
NaCl	Natriumchlorid
NAD	<i>NACHT association domain</i>
NAIP	<i>neuronal apoptosis inhibitory protein</i>
NaOH	Natriumhydroxid
NDPK	Nukleosid-Diphosphat-Kinase
NEMO	<i>NF-κB essential modifier</i>
NF-AT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NF-κB	<i>nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells</i>

ng	Nanogramm
NLR	<i>NOD-like receptor</i>
nmol	Nanomol
NMPK	Nukleosid-Monophosphat-Kinase
NNH	<i>number needed to harm</i>
NNT	<i>number needed to treat</i>
NOD2	<i>nucleotide-binding oligomerization domain containing 2</i>
Nr.	Nummer
5'-NT	Purin-5'-Nukleotidase
NTPase	Nukleosid-5'-Triphosphatase
8-OHMP	8-Hydroxy-Mercaptopurin
8-OHTG	8-Hydroxy-Thioguanin
p. a.	<i>pro analysi</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PCDAI	<i>Pediatric Crohn's Disease Activity Index</i>
pH	pondus Hydrogenii
pI	<i>isoelectric point</i>
pmol	Picomol
p. o.	<i>per os</i>
PPAT	Phosphoribosyl-Pyrophosphat-Amidotransferase
PRM	<i>pattern recognition molecule</i>
PRPP	Phosphoribosyl-Pyrophosphat
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PSC	primär sklerosierende Cholangitis
PSS	progressive systemische Sklerose
pSTAT	<i>phosphorylated signal transducer and activator of transcription</i>
PYD	<i>pyrin domain</i>
Q	Quotient
QK	Qualitätskontrolle
RA	rheumatoide Arthritis
Rab	<i>ras-like protein from rat brain</i>
Rac1	<i>ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
Rac2	<i>ras-related C3 botulinum toxin substrate 2</i>
Ran	<i>ras-related nuclear protein</i>
Rap1A	<i>ras-related protein 1 A</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
RBC	<i>red blood cell</i>
RhoA	<i>ras homolog gene family, member A</i>
RICK	<i>RIP-like interacting caspase-like apoptosis-regulatory protein kinase</i>

RIG-I	<i>retinoic acid inducible gene I</i>
RIP	<i>receptor interacting protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNR	Ribonukleosid-Diphosphat-Reduktase
R-Proteine	<i>resistance proteins</i>
S	Summe
SAH	<i>S</i> -Adenosyl-Homocystein
SAM	<i>S</i> -Adenosyl-Methionin
SD	Standardabweichung
sec	Sekunde
SH	<i>Src-homology</i>
SLE	systemischer Lupus erythematodes
SLEDAI	<i>Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index</i>
SLP76	<i>SH2 domain-containing leukocyte protein</i>
Smac	<i>Second Mitochondria-derived Activator of Caspases</i>
SNP	<i>single-nucleotide polymorphism</i>
S. p. A.	<i>società per azioni</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TBAHS	Tetrabutylammonium-Hydrogen-Sulfat
TCR	T-Zell-Rezeptor
TDM	<i>Therapeutic Drug Monitoring</i>
TdT	<i>Transmission disequilibrium Test</i>
6-TG	6-Thioguanin
TGDP	6-Thioguanosin-5'-Diphosphat
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TGMP	6-Thioguanosin-5'-Monophosphat
6-TGN	6-Thioguanin-Nukleotide
6-TG-Sulfonat	6-Thioguanin-Sulfonat
TGTP	6-Thioguanosin-5'-Triphosphat
Tgua	6-Mercaptoguanosin
T _H	<i>T helper cell</i>
THF	Tetrahydrofuran
TIDP	Thioinosin-Diphosphat
TIMP	6-Thioinosin-5'-Monophosphat
TITP	Thioinosin-Triphosphat
TL1A	<i>TNF-like cytokine</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
TNFRSF	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily</i>

TNFSF	<i>tumor necrosis factor superfamily</i>
TP1	<i>telomerase-associated protein</i>
TPMT	Thiopurin-S-Methyltransferase
TRADD	<i>Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein</i>
TRAILR	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand receptor</i>
T _{reg}	regulatorische T-Zelle
Trp	Tryptophan
6-TU	6-Thioharnsäure
TXMP	Thioxanthin-Monophosphat
6-TXN	6-Thioxanthin-Nukleotide
TX	Thioxanthin
U	Umdrehungen
U	<i>Unit</i>
UC	<i>ulcerative colitis</i>
UV	Ultraviolett
<i>vs.</i>	<i>versus</i>
v/v	<i>volume per volume</i>
XO	Xanthinoxidase
ZAP	<i>Zeta-chain-associated protein kinase</i>

1 Einleitung

Azathioprin wurde 1957 von Gertrude B. Elion und George H. Hitchings entwickelt (Hitchings und Elion, 1962, Abbildung 1.1). Die Vorgängersubstanz, 6-Mercaptopurin, erwies sich als ein wirksames Medikament gegen die akute Leukämie im Kindesalter. Aufgrund der Tatsache, dass 6-Mercaptopurin zum größten Teil durch das Enzym Xanthinoxidase abgebaut wird, bevor ein therapeutischer Effekt erreicht werden kann, wurde Azathioprin als Prodrug von 6-Mercaptopurin synthetisiert (Elion, 1993).

Erste klinische Studien brachten zunächst enttäuschende Resultate. 1961 jedoch verglichen Nathan und Hitchings in einer Studie 29 verschiedene Substanzen bezüglich ihrer Fähigkeit, die Hämagglutinationsreaktion in Mäusen, denen Erythrozyten von Schafen injiziert wurden, zu inhibieren (Nathan *et al.*, 1961). Azathioprin erwies sich in dieser Studie als das effektivste Medikament. 1988 erhielten Elion und Hitchings zusammen mit James Whyte Black den Nobelpreis für ihre Arbeiten.

Sir Roy Calne, der britische Pionier der Transplantationschirurgie, führte Azathioprin in die klinische Praxis zur Behandlung nierentransplantierter Patienten ein (Calne *et al.*, 1962). Azathioprin galt als nebenwirkungsärmer als sein Vorgänger 6-Mercaptopurin und sollte dieses ersetzen. Lange Jahre stellte Azathioprin zusammen mit Glukokortikoiden das wichtigste und wirksamste Medikament zur Immunsuppression nierentransplantierter Patienten dar, bis es 1978 von Ciclosporin, ebenfalls durch Calne eingeführt, abgelöst wurde. In den 60er Jahren gab es erste kontrollierte Studien über den Einsatz von Azathioprin bei Morbus Crohn mit teilweise vielversprechenden Ergebnissen (Brooke *et al.*, 1969). Bowen untersuchte 1966 erstmals in einer Studie die Wirkung von Azathioprin an Patienten mit Colitis ulcerosa, wobei sich bei acht von zehn Patienten eine klinische Besserung zeigte. Die Aussagekraft war jedoch bei geringer Fallzahl und kurzer Einnahmedauer begrenzt (Bowen *et al.*, 1966). In den darauf folgenden Jahren verschaffte sich Azathioprin auch in der Therapie anderer Erkrankungen mit vornehmlich immunologischer Genese wie rheumatoider Arthritis (Mason *et al.*, 1969), Lupus erythematodes, Multipler Sklerose (Mertin *et al.*, 1982; Ring *et al.*, 1974), Myasthenia gravis (Palace *et al.*, 1998), Sarkoidose (Müller-Quernheim *et al.*, 1999) und Autoimmunhepatitis (Johnson *et al.*, 1995) einen festen Platz.

Im Bereich der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen folgten weitere Studien: In der plazebokontrollierten „*National Cooperative Crohn's Disease Study*“ konnte für Azathioprin keinerlei Wirksamkeit in der Behandlung des Morbus Crohn nachgewiesen werden. Die Behandlungsdauer betrug jedoch lediglich vier Monate bei einer Azathioprin-Dosierung von 1 mg/kg Körpergewicht (Summers *et al.*, 1979). Present und Korelitz demonstrierten in einer großen prospektiven Doppelblindstudie

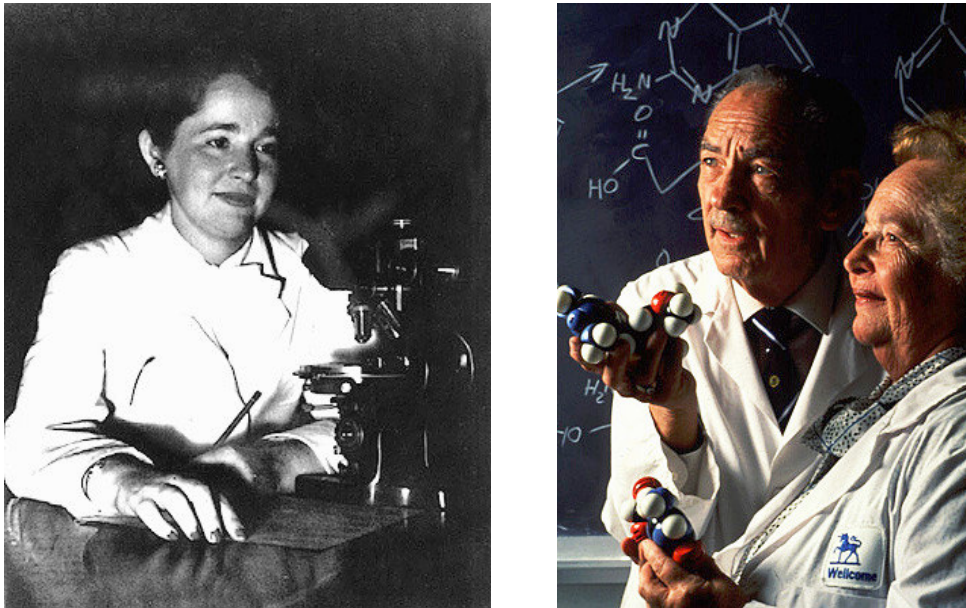


Abbildung 1.1: Gertrude B. Elion in ihrem Labor und mit ihrem Arbeitskollegen George H. Hitchings (Quellen: <http://www.achievement.org/autodoc/photocredit/achievers/eli0-008> und <http://www.achievement.org/autodoc/photocredit/achievers/eli0-024>).

an Morbus Crohn-Patienten die Wirksamkeit von 6-Mercaptopurin: Bei 67 % der 6-Mercaptopurin-behandelten Patienten *versus* 8 % der plazebobehandelten Patienten konnte eine klinische Besserung verzeichnet werden (Present *et al.*, 1980).

In den Siebziger und Achtziger Jahren etablierte sich Azathioprin nach und nach in der Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. 1993 führten Ewe und Mitarbeiter eine wichtige Studie an Morbus Crohn-Patienten durch, die den Stellenwert von Azathioprin unterstrich. Eine Kombinationstherapie aus Azathioprin plus Prednisolon zeigte sich in dieser Studie der Monotherapie mit Prednisolon überlegen.

Heute wird Azathioprin zur Remissionserhaltung des Morbus Crohn mit chronischer Krankheitsaktivität bzw. steroidabhängigem und steroidrefraktärem Verlauf, bei fistulierendem und stenosierendem Verlauf und bei häufigen Rezidiven eingesetzt (Kamm, 2004; Ludwig und Stange, 1999; Pearson *et al.*, 2000; Sandborn *et al.*, 2000). Darüber hinaus stellt es ein wichtiges Instrument der Remissionsinduktion dar (McGovern und Travis, 2003; Prefontaine *et al.*, 2009a). Als Erhaltungstherapie nach fulminantem Schub und bei chronisch aktivem Verlauf wird Azathioprin auch in der Colitis ulcerosa-Therapie verabreicht (Feagan *et al.*, 2000; Hawthorne *et al.*, 1992; Kirk und Lennard-Jones, 1982).

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Morbus Crohn und Colitis ulcerosa bilden die beiden wichtigsten Entitäten der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Im weiteren Sinne fallen auch die kollagene und lymphozytäre Kolitis, die Pouchitis, die Colitis indeterminata, die Colitis cystica profunda und andere seltenere Erkrankungen unter diesen Begriff.

1.1.1 Morbus Crohn

Morbus Crohn ist eine chronische transmurale Entzündung des Gastrointestinaltrakts, die generell jeden Abschnitt vom Mund bis zum Anus sowohl segmental als auch kontinuierlich befallen kann. Die häufigsten Lokalisationen stellen das terminale Ileum und das proximale Kolon dar (Baumgart und Sandborn, 2007).

Die Inzidenz beträgt 3,9/100 000/Jahr für Südeuropa und 7,0/100 000/Jahr für Nordeuropa, somit scheint ein Nord-Süd-Gefälle zu bestehen (Shivananda *et al.*, 1996). Für Deutschland wurde eine Prävalenz von 180/100 000 ermittelt (Timmer *et al.*, 1999). In den USA und in Kanada schwankt die Inzidenz je nach Region zwischen 3,1 und 14,6/100 000/Jahr, wobei sich interessanterweise in beiden Staaten ein Ost-West-Gradient herauszukristallisieren scheint (Bernstein *et al.*, 2006; Loftus Jr. *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2007). Die Prävalenz beträgt 174/100 000 (Loftus *et al.*, 2007). In Asien liegt die Inzidenz mit 0,05 bis 5,0/100 000/Jahr deutlich niedriger als in Europa und Nordamerika, allerdings mit steigender Tendenz. Für asiatische Migranten in Europa gilt ein ähnliches Risiko für die Entstehung eines Morbus Crohn wie für die europäische Bevölkerung (Thia *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2001). Menschen israelitischer Abstammung (insbesondere Ashkenazi-Juden aus Mitteleuropa) unterliegen einem erhöhten Risiko für die Entstehung einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung, welches unabhängig vom geographischen Aufenthaltsort zu bestehen scheint (Yang *et al.*, 1993). Morbus Crohn manifestiert sich vorwiegend im jungen Erwachsenenalter: Das mediane Erkrankungsalter beträgt 34 Jahre, die höchste altersspezifische Inzidenz liegt bei den 15- bis 24-Jährigen (Loftus *et al.*, 2007). Für Raucher besteht ein zweifach erhöhtes Risiko, an Morbus Crohn zu erkranken (Calkins, 1989).

Die monatlichen direkten (Arzneimittel, Arztkosten, Krankenhausaufenthalte, chirurgische Eingriffe) und indirekten (Arbeitsausfälle, Erwerbs- und Berufsunfähigkeit) Kosten für einen Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beziffern sich in Deutschland auf ca. 1400 €/Monat für Morbus Crohn und 1000 €/Monat für Colitis ulcerosa, wobei etwa $\frac{2}{3}$ der Kosten durch die Manifestation im Jugend- oder frühen Erwachsenenalter den indirekten Aufwendungen zuzuschreiben sind (Rösch *et al.*, 2002; Stark *et al.*, 2006). Da diese Berechnungen aus der Zeit vor dem vermehrten Einsatz von Biologika stammen, dürften die direkten Kosten in den letzten Jahren noch einmal angestiegen sein. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen verursachen somit jährlich Kosten in Höhe von etwa 3–4 Milliarden €.

Die Leitsymptome der Erkrankung stellen abdominelle Schmerzen und Diarrhoen dar. Bei Befall des terminalen Ileum bestehen die Schmerzen typischerweise im rechten Unterbauch. Diarrhoen von meist wässrig-schleimiger Konsistenz treten über den ganzen Tag verteilt und auch nachts auf. Fieber, Gewichtsverlust, Anämie und Symptome der Malabsorption können hinzukommen. Perianale Blutungen, welche insbesondere bei einem Kolon-Befall in Erscheinung treten, sind seltener als bei der Colitis ulcerosa. Im Gegensatz zur Colitis ulcerosa kann es jedoch zur Entstehung von Fisteln, Abszessen, Ulzerationen und Fissuren kommen (Baumgart und Sandborn, 2007; Kirsner, 1991). 17 bis 43 % der Patienten leiden an perianalen Fisteln, insbesondere dann, wenn das Kolon befallen ist. Bei Befall des Rektums beträgt die Rate an perianalen Fisteln nahezu 100 % (Schwartz *et al.*, 2001).

Stenosen oder Strikturen entstehen primär durch eine entzündlich bedingte Schleimhautschwellung, welche im Verlauf narbig abheilt. Neben narbigen Stenosen unterscheidet man entzündliche und gemischt narbig-entzündliche Stenosen (Kratzer *et al.*, 2002).

Bei 25 bis 40 % der Patienten ist das terminale Ileum betroffen, bei 15 bis 35 % das Kolon. 40 bis 55 % weisen einen Befall von terminalem Ileum und Kolon auf. Die Manifestation im oberen Gastrointestinaltrakt ist mit 5 bis 8 % seltener (Farmer *et al.*, 1975).

Generell werden für den Morbus Crohn drei Verlaufsformen definiert: Der inaktive, der akut rezidivierende und der chronisch-aktive Verlauf. Der rezidivierende Verlauf liegt bei 50 bis 60 % der Patienten vor und ist durch das Auftreten von weniger als zwei Schüben pro Jahr gekennzeichnet. Der chronisch-aktive Verlauf zeichnet sich durch eine persistierende oder rezidivierende Symptomatik über mindestens sechs Monate aus. Er tritt bei 40 bis 50 % der Patienten auf, wobei eine weitere Unterteilung in steroidabhängigen und steroidrefraktären Verlauf möglich ist. Ersterer ist gekennzeichnet durch Rezidive bei Dosisreduktion von Glukokortikoiden, letzterer zeichnet sich durch mangelndes Ansprechen auf Glukokortikoide aus (Faubion *et al.*, 2001).

In der Wiener Klassifikation wird weiterhin ein penetrierend-fistulierender Verlaufstyp mit häufigen Fisteln und Abszessen von einem strikturierenden Verlaufstyp mit dem Auftreten von Stenosen und einem nicht penetrierenden/nicht strikturierenden Verlaufstyp unterschieden (Gasche *et al.*, 2000). Mit 50 % ist die Mehrzahl der Patienten dem penetrierenden Verlaufstyp zuzuordnen, nur 10 % leiden an einem strikturierenden Verlauf und 40 % gehören keiner der beiden Gruppen an (Cosnes *et al.*, 2002).

Für Morbus Crohn lassen sich eine Vielzahl extraintestinaler Manifestationen differenzieren: Neben den häufig vorkommenden Arthritiden und Arthralgien kann es zu dermatologischen Symptomen wie Erythema nodosum und Pyoderma gangraenosum, ebenso wie zu ophthalmologischen Komplikationen mit Uveitis, Iritis oder Skleritis kommen. Auch Pankreatitiden entstehen gehäuft. Die primär sklerosierende Cholangitis manifestiert sich beim Morbus Crohn seltener als bei der Colitis ulcerosa, jedoch ist das Risiko zu erkranken größer, als in der Normalbevölkerung. Etwa ein Drittel der Patienten leidet an einer extraintestinalen Manifestation des Morbus Crohn

(Greenstein *et al.*, 1976).

Seltene und lebensbedrohliche Komplikationen des Morbus Crohn stellen eine Perforation und das toxische Megakolon dar. Letzteres tritt jedoch deutlich seltener in Erscheinung als bei der Colitis ulcerosa.

Bezüglich der Entstehung eines kolorektalen Karzinoms besteht eine widersprüchliche Datenlage. Verschiedene populationsbasierte Studien zeigen auf, dass für Patienten mit Morbus Crohn das Risiko für die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms ähnlich hoch ist wie für Colitis ulcerosa (Bernstein *et al.*, 2001a; Söderlund *et al.*, 2009). Eine langjährige Krankheitsdauer mit hoher Krankheitsaktivität sowie ein junges Erkrankungsalter scheinen die Entstehung zu begünstigen, bei einem alleinigen Befall des Ileums liegt kein erhöhtes Risiko vor (Jess *et al.*, 2007). Jedoch wird in anderen Studien kein vermehrtes Auftreten des kolorektalen Karzinoms postuliert (Munkholm *et al.*, 1993). Erschwert wird die abschließende Beurteilung durch chirurgische Eingriffe am Darm, beispielsweise im Zusammenhang mit Fisteln, Abszessen oder Stenosen.

Ebenso uneinheitlich ist die Datenlage in Bezug auf das Risiko für ein Dünndarmkarzinom, jedoch gibt es Hinweise, dass auch hier ein erhöhtes Risiko vorliegt, obwohl nur wenige Studien mit jeweils geringer Fallzahl existieren (Bernstein *et al.*, 2001a). Ein gering erhöhtes Risiko für das Entstehen eines malignen Lymphoms scheint ebenfalls vorzuliegen (Askling *et al.*, 2005).

Makroskopisch zeigen sich im entzündeten Darm bei Morbus Crohn konfluierende Ulzerationen, die zu Beginn flach und im Verlauf als tiefe transmurale Fisteln oder Fissuren imponieren. In diesem Stadium kann man möglicherweise ein sogenanntes Pflastersteinrelief erkennen. Weiterhin sind Pseudopolypen, perianale Abszesse, Konglomerattumore oder Stenosen zu beobachten. Typischerweise liegt mit den sogenannten *skip lesions* ein diskontinuierliches Verteilungsmuster vor (Cook und Dixon, 1973; Price und Morson, 1975). Histomorphologisch kann es zum Auftreten von epitheloidzelligen Granulomen kommen, jedoch gelingt dieser Nachweis nicht immer. Die Kryptenarchitektur ist destruiert. Es kommt zur Ausbildung einer transmuralen Entzündung mit Ansammlung von mononukleären Zellen mit lymphoiden Aggregaten. Weiterhin kann ein Stromaödem mit Lymphangiektasien und Fibrosierungen bestehen. Neutrophile Granulozyten finden sich vermehrt, auch Kryptenabszesse können identifiziert werden. Die Anzahl der Becherzellen kann reduziert sein. Pseudopylorische gastrale Epithel- und Panethzellmetaplasien können ebenfalls vorkommen. Nerven entzündliche Läsionen können vorhanden sein (Cook und Dixon, 1973; Jenkins *et al.*, 1997; Price und Morson, 1975).

Die chirurgische Intervention ist beim Morbus Crohn bei medikamentös nicht mehr beherrschbarem Krankheitsverlauf oder Fisteln, Abszessen und Stenosen indiziert. Die Darmlänge soll so weit wie möglich erhalten bleiben, Darmresektionen sollen daher sparsam ausgeführt werden (Fazio *et al.*, 1996). Bei ausgeprägten Resektionen des Dünndarms mit weniger als 70 cm verbleibendem Dünndarm muss mit einem Kurzdarmsyndrom mit Malabsorption und -digestion gerechnet werden. *Per definitionem* liegt ein Kurzdarmsyndrom jedoch bereits ab einer verbleibenden Dünndarmlänge

von < 200 cm vor (Buchman, 2006). Im akuten Schub oder bei entzündlichen Komplikationen wie Abszessen oder Fisteln soll möglichst keine Darmresektion erfolgen. Die Dignität von Stenosen sollte geklärt werden, eine Operationsindikation ist bei suspekter Dignität und funktionell relevanten Stenosen gegeben (Partridge und Hodin, 2004; Yamamoto *et al.*, 2007). Als Methode der Wahl hat sich für medikamentös therapierefraktäre und endoskopisch nicht erreichbare Stenosen bis 10 cm Länge die Strikturoplastik nach Heinecke-Mikulicz etabliert (Yamamoto *et al.*, 2007). Ein Hauptproblem stellt ein Rezidiv an der Anastomose dar, welches oft erneut einen chirurgischen Eingriff notwendig macht (Fichera *et al.*, 2006).

1.1.2 Colitis ulcerosa

Colitis ulcerosa ist eine chronische, sich kontinuierlich ausbreitende Entzündung des Kolons mit Beginn im Rektum. Das terminale Ileum kann bei einer *Backwash*-Ileitis befallen sein. Die Entzündung ist auf Mukosa und Submukosa begrenzt.

Die Inzidenz der Colitis ulcerosa liegt deutlich über der von Morbus Crohn: Sie beträgt in Südeuropa 8,7/100 000/Jahr und in Nordeuropa 11,8/100 000/Jahr. Für beide Erkrankungen bemisst sich die Inzidenz für Länder mit westlichem Lebensstil höher als für Länder mit geringerem ökonomischen Status (Shivananda *et al.*, 1996). Die Prävalenz beziffert sich für Colitis ulcerosa in Deutschland auf etwa 108/100 000. Für die USA und Kanada wurde eine Inzidenz von 8,8/100 000/Jahr und eine Prävalenz von 214/100 000 berechnet (Loftus *et al.*, 2007). Für den asiatischen Raum wird eine Inzidenz zwischen 0,3 und 6,0/100 000/Jahr angegeben, die Prävalenz schwankt je nach Region zwischen 2 und 167/100 000 (Thia *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2001). Das mediane Erkrankungsalter wurde, ähnlich wie beim Morbus Crohn, bei 35 Jahren ermittelt. Im Gegensatz zu diesem ist jedoch die Altersverteilung jenseits des 35. Lebensjahres relativ konstant, während sie beim Morbus Crohn steil abfällt (Loftus *et al.*, 2007). Eine inverse Korrelation von Nikotinkonsum und Colitis ulcerosa ist belegt (Calkins, 1989).

Leitsymptome der Colitis ulcerosa sind blutig-schleimige Diarrhoen und abdominelle Schmerzen. Weiterhin können Appetitlosigkeit, Gewichtsverlust, Eiweißmangel und Anämie Ausdruck der Erkrankung sein (Baumgart und Sandborn, 2007). 95 % der Patienten weisen einen Befall des Rektums auf, jedoch muss bei 54 % der Patienten mit einem Fortschreiten der Erkrankung nach proximal innerhalb von 10 Jahren gerechnet werden (Meucci *et al.*, 2000). Typisch ist ein häufiger Drang zur Defäkation in Verbindung mit einem Gefühl der inkompletten Stuhlentleerung. Es kann zu hohen Stuhlfrequenzen kommen.

Ähnlich wie der Morbus Crohn kann auch die Colitis ulcerosa entweder rezidivierend oder chronisch-aktiv verlaufen, darüber hinaus unterscheidet man bei der Colitis ulcerosa noch einen fulminanten bzw. schweren Verlauf (Hyde und Jewell, 1997; Stange *et al.*, 2006).

Auch die Colitis ulcerosa kann sich außerhalb des Darmes manifestieren. Ebenso wie beim Morbus Crohn können die Gelenke im Sinne einer Arthritis oder Arthralgie befallen sein. In Assoziation mit hoher Krankheitsaktivität können sich eine Stomatitis aphthosa oder ein Erythema nodosum und selten eine Pyoderma gangraenosum oder eine Episkleritis manifestieren. Die primär sklerosierende Cholangitis (PSC) ist eng mit der Colitis ulcerosa vergesellschaftet. Sie manifestiert sich bei ca. 2 % der Colitis ulcerosa-Patienten und zwischen 61 und 100 % der Patienten mit PSC leiden gleichzeitig an einer Colitis ulcerosa (Bernstein *et al.*, 2001b; Loftus Jr. *et al.*, 1996; Veloso *et al.*, 1996). Bei etwa der Hälfte der Patienten kann eine Osteopenie diagnostiziert werden (Bernstein *et al.*, 2003).

Neben einem fulminanten Schub der Colitis ulcerosa können als weitere Komplikationen ein toxisches Megakolon sowie eine Perforation auftreten. Letztere stellt eine Indikation zur notfallmäßigen Operation dar. Auch im therapierefraktären fulminanten Schub kann ein chirurgischer Eingriff notwendig werden. Ein toxisches Megakolon liegt ab einem Durchmesser von > 6 cm im Colon transversum vor und impliziert eine dringliche Operationsindikation (Latella *et al.*, 2002): Bei therapierefraktärem Verlauf sollte nach spätestens 72 Stunden eine Operation erfolgen (Berg *et al.*, 2002).

Makroskopisch bietet die Colitis ulcerosa das Bild einer kontinuierlichen Entzündung, die im Rektum beginnt und bei einer *Backwash*-Ileitis bis in das terminale Ileum reichen kann. Das Rektum kann allerdings auch von der Entzündung ausgespart bleiben. Die Schleimhaut erscheint samtartig, ist gerötet, vulnerabel und blutet leicht auf Kontakt. Das Faltenrelief ist verstrichen. Weiterhin kann man konfluierende erosive und ulzeröse Läsionen und gegebenenfalls Pseudopolypen ausmachen. Diese sind von sogenannten postentzündlichen Polypen zu differenzieren, welche bei ca. 20 % der Patienten vorhanden sind. Eine maligne Entartung dieser beiden Polypenarten ist untypisch, dennoch wurden Assoziationen zwischen postentzündlichen Polypen und der Entstehung eines kolorektalen Karzinoms postuliert (Velayos *et al.*, 2006). Bei starker entzündlicher Aktivität können sich die Ulzerationen auch bis in die Muskularis propria erstrecken und selten sind Nekrosen aller Darmwandschichten zu beobachten. In wenigen Fällen können sich nach Abklingen der entzündlichen Aktivität Stenosen oder Strikturen ausbilden (Cook und Dixon, 1973; Price und Morson, 1975).

Histomorphologisch besteht bei der Colitis ulcerosa eine Entzündung der Mukosa und Submukosa mit Infiltration von Lymphozyten, Makrophagen, Mastzellen, eosinophilen und insbesondere neutrophilen Granulozyten. Das Ausmaß der Infiltration durch neutrophile Granulozyten korreliert mit der Entzündungsaktivität. Plasmazellen liegen vermehrt vor. Weiterhin bilden sich Lymphfollikel aus. Es besteht eine Störung der Kryptenarchitektur mit Entstehung von Kryptenabszessen. Die Anzahl von Becherzellen kann vermindert sein. Panethzellmetaplasien können auftreten. Aufgrund dilatierter Blutkapillaren können Stromaeinblutungen in die Mukosa resultieren. Nach Abheilung kann eine Schleimhautatrophie mit aufgehobener Haustrierung bestehen bleiben (Cook und Dixon, 1973; Jenkins *et al.*, 1997; Price und Morson, 1975).

Mehrere Studien konstatieren ein erhöhtes Risiko für das Entstehen eines kolorek-

talen Karzinoms für die Colitis ulcerosa (Bernstein *et al.*, 2001a; Lennard-Jones *et al.*, 1983; Söderlund *et al.*, 2009). Eaden *et al.* demonstrierten 2001 in einer Metaanalyse, welche sich auf 116 Studien stützt, dass für die Pancolitis ulcerosa nach 10 Jahren ein kumulatives Karzinomrisiko von 2 %, nach 20 Jahren von 8 % und nach 30 Jahren von 18 % besteht. Die Prävalenz des kolorektalen Karzinoms bei Colitis ulcerosa-Patienten beträgt 3,7 % (Eaden *et al.*, 2001). Söderlund beschreibt eine dreifach erhöhte Gefährdung für die Colitis ulcerosa im Vergleich zur Normalbevölkerung, für die Pankolitis liegt ein sechsfach erhöhtes Risiko vor. Im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung ist die Wahrscheinlichkeit, an einem kolorektalen Karzinom zu versterben, zweifach erhöht (Söderlund *et al.*, 2009). Eine andere Studie beschreibt für Colitis ulcerosa keine Differenzen für die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms im Vergleich zur Gesamtbevölkerung, für die ausgedehnte oder Pankolitis jedoch ein zweifach erhöhtes Risiko (Jess *et al.*, 2006). Bernstein und Mitarbeiter konstatieren bezüglich des kolorektalen Karzinoms für Colitis ulcerosa eine erhöhte Gefährdung; ebenso wird ein erhöhtes Risiko für das Rektum-Karzinom beschrieben (Bernstein *et al.*, 2001a). Als Risikofaktoren konnten neben einer anhaltenden großflächigen Entzündung eine primär sklerosierende Cholangitis, eine *Backwash*-Ileitis sowie ein chronisch-aktiver Verlauf für mindestens ein Jahr identifiziert werden (Jess *et al.*, 2007). Einzelne Studien konnten einen protektiven Effekt einer Medikation mit 5-Aminosalizylsäure (5-ASA) nachweisen (Eaden *et al.*, 2000; Velayos *et al.*, 2006). Die Aufnahme in ein Überwachungsprogramm mit jährlichen endoskopischen Kontrollen wird empfohlen (Connell *et al.*, 1994a; Lennard-Jones *et al.*, 1983). Hierbei sollte alle 10 cm die Entnahme von Stufenbiopsien erfolgen (Quadrantenbiopsien alle 10 cm, ab dem Colon sigmoideum alle 5 cm), insgesamt sollten mindestens 33 Biopsien entnommen werden (Itzkowitz und Present, 2005). Je nach Ausdehnung der Kolitis sollte der Patient zwischen dem 8. und 15. Jahr nach Krankheitsmanifestation in das Überwachungsprogramm aufgenommen werden. Beim Vorliegen weiterer Risikofaktoren, wie einem frühen Erkrankungsalter, einer familiären Disposition bezüglich sporadischer kolorektaler Karzinome oder einer gleichzeitig bestehenden primär sklerosierenden Cholangitis sollte schon bei Erstdiagnose der Erkrankung die Aufnahme in ein Überwachungsprogramm erwogen werden (Itzkowitz und Present, 2005).

Indikationen zur notfallmäßigen und dringlichen Operationsindikation wurden bereits erläutert. Ein kolorektales Karzinom, eine hochgradige intraepitheliale Neoplasie, eine DALM (*dysplasia-associated lesion or mass*), eine Stenose unklarer Dignität, ein trotz immunsuppressiver Therapie schwerer Krankheitsverlauf sowie Wachstumsstörungen bei Kindern stellen elektive absolute Operationsindikationen dar (Cima und Pemberton, 2005). Für eine niedriggradige intraepitheliale Neoplasie besteht eine relative Operationsindikation (Gorfine *et al.*, 2000). Das Verfahren der Wahl ist die restaurative Proktokolektomie mit ileo-pouch-analer Anastomose und passagerem protektiven doppeläufigen Ileostoma (*loop ileostomy*). Auf die Entzündung bezogen erfolgt durch die Resektion eine Heilung der Colitis ulcerosa. Die Morbidität beträgt zwar < 1 %, jedoch treten postoperative Komplikationen in bis zu 60 % der Fälle auf (Fazio *et al.*, 1995).

1.1.3 Ätiologie und Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Bis heute ist die Ätiologie von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa zu weiten Teilen ungeklärt. Aktuell wird eine multifaktorielle Genese vermutet; ein singulärer Auslöser konnte bislang nicht ausgemacht werden. Unter anderem könnten Reaktionen auf Umwelt- und Ernährungseinflüsse, sozioökonomische Faktoren, Störungen des Darmmilieus und eine Dysregulation intestinaler Immunmechanismen eine Rolle spielen, möglicherweise sind auch psychische und infektiöse Faktoren beteiligt.

Zwillingsstudien Als gesichert anzusehen ist, dass beiden Erkrankungen eine genetische Komponente mit familiärer Häufung zugrunde liegt. Auch Burrill B. Crohn entdeckte schon in den Dreißiger Jahren familiäre Zusammenhänge zwischen Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Die genetische Komponente tritt beim Morbus Crohn deutlicher in Erscheinung als bei Colitis ulcerosa, was durch Studien an monozygoten und dizygoten Zwillingen belegt wird (Halfvarson *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 1996; Tysk *et al.*, 1988). Hiernach liegt die Konkordanzrate für Morbus Crohn bei monozygoten Zwillingen zwischen 20 und 50 %, wohingegen sie bei dizygoten Zwillingen weniger als 10 % beträgt. Zu erwarten wäre bei einer alleinigen genetischen Entstehung einer Erkrankung bei monozygoten Zwillingen eine Konformität von 100 % und bei dizygoten Zwillingen eine Übereinstimmung von 50 %. Die geringere tatsächliche Konkordanzrate deutet auf weitere, extrinsische Entstehungsfaktoren hin.

Die Studie von Halfvarson zeigt auf, dass auch der Phänotyp der Erkrankung mit Krankheitslokalisation und Erkrankungsalter bei monozygoten Zwillingen oft übereinzustimmen scheint, jedoch liegt mit nur 9 Paaren eine sehr geringe Fallzahl vor (Halfvarson *et al.*, 2003).

Die Konkordanzrate für die Colitis ulcerosa beträgt bei monozygoten Zwillingen etwa 16 %, bei dizygoten Zwillingen nur 4 %. Ein Zusammenhang bezüglich des Phänotyps konnte nicht eruiert werden (Halfvarson *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 1996; Tysk *et al.*, 1988).

Auffällig ist, dass Morbus Crohn-Erkrankungen mit familiärem Hintergrund durchschnittlich etwa 5 Jahre früher diagnostiziert werden, zudem wird oft ein komplexerer Verlauf der Erkrankung beobachtet als bei Patienten mit sporadischer Erkrankung (Colombel *et al.*, 1996). Eine Erklärung hierfür könnte eine genetische Antizipation wie etwa im Falle von Chorea Huntington darstellen (Polito 2nd *et al.*, 1996). Eine weitere Möglichkeit wäre die Existenz eines „*early onset gene*“. Ein Bias aufgrund einer erhöhten Wahrnehmungsschwelle von Symptomen bei Angehörigen von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist jedoch nicht auszuschließen.

NOD2/CARD15 Durch genomweite Assoziationsstudien konnten inzwischen etwa 40 verschiedene Genloci als Suszeptibilitätsregionen für chronisch entzündliche

Darmerkrankungen identifiziert werden, davon etwa 30 für Morbus Crohn (Barrett *et al.*, 2008). Durch die Suszeptibilitätsloci ist es gelungen, neue Krankheitspfade, wie den Autophagie-Pfad, den Einfluss des angeborenen unspezifischen Immunsystems und die intrazelluläre Prozessierung von Bakterien zu entschlüsseln (Noomen *et al.*, 2009). Seit 1996 wurden 12 genomweite Kopplungsstudien, dies sind Studien unter erstgradigen Verwandten mit einem bestimmten Merkmal, durchgeführt und dadurch mehrere chromosomale Kopplungsregionen lokalisiert, die als IBD1–9 bezeichnet werden (Brant und Shugart, 2004; Eri *et al.*, 2004; Rector *et al.*, 2001; Rodriguez-Bores *et al.*, 2007). Kopplungsregionen konnten bisher auf den Chromosomen 2q, 3q, 5q, 7q und 16 für chronisch entzündliche Darmerkrankungen, auf 2q, 3q, 6p, 16, 17q und 19p für Morbus Crohn und auf 2q für Colitis ulcerosa ermittelt werden (Heel *et al.*, 2004).

2001 wurde im Rahmen von Kopplungsstudien mit Hilfe des Tests auf Kopplungsungleichgewicht (*transmission disequilibrium test*, TdT) ein Zusammenhang zwischen drei Varianten der *nucleotide-binding oligomerization domain containing 2* (NOD2) und Morbus Crohn durch zwei Arbeitsgruppen aufgedeckt (Hugot *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001a). NOD2 ist auch bekannt als *caspase recruitment domain family, member 15* (CARD15) und befindet sich in der Kopplungsregion des IBD1-Locus auf Chromosom 16q12. Diese Entdeckung stellte nicht nur einen Durchbruch für die Forschung an chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, sondern für alle polygenetisch vererbten Erkrankungen dar.

Die beiden *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) Gly908Arg und Arg702Trp resultieren aus dem Austausch einer Aminosäure (*Missense*-Mutation), in Leu1007insC liegt eine Verschiebung des Leserasters durch Insertion eines Cystein-Restes vor, wodurch es zu einem verfrühten Stop-Codon und somit zu einem trunkierten Protein kommt. Die zuletzt genannte *Frameshift*-Mutation weist den engsten Bezug zu Morbus Crohn auf. Eine Assoziation mit Colitis ulcerosa zeigte sich nicht. Die Mutationen werden auch als SNP 8, SNP 12 und SNP 13 bezeichnet. Die drei SNPs umfassen 81 % der mutierten Allele aller NOD2-Mutationen in Morbus Crohn-Patienten (Lesage *et al.*, 2002). Die NOD2-Mutation wird bei Europäern, Nord- und Afroamerikanern und Lateinamerikanern beobachtet, nicht jedoch bei Japanern und Chinesen (Inoue *et al.*, 2002; Kugathasan *et al.*, 2005; Leong *et al.*, 2003). In Irland, Island, Skandinavien und Schottland ließ sich eine im Vergleich zu Mitteleuropa geringere Prävalenz nachweisen (Arnott *et al.*, 2004; Medici *et al.*, 2006). Für alle drei Varianten gilt bei Vorliegen eines NOD2-Risikoallels (einfache Heterozygotie) ein 2- bis 4-fach erhöhtes Risiko, bei Vorliegen von zwei Risikoallelen (Homozygotie oder Compound-Heterozygotie) ein 20- bis 40-fach erhöhtes Risiko für die Entstehung eines Morbus Crohn, somit besteht ein so genannter Gendosis-Effekt (Cuthbert *et al.*, 2002; Hugot *et al.*, 2001). Eine dieser drei Varianten wird jedoch nur bei 20 bis 30 % der Morbus Crohn-Patienten nachgewiesen. Die Mutation ist mit einem frühen Erkrankungsalter, mit dem Befall des terminalen Ileums und mit einem stenosierenden und/oder fistulierenden Verlauf assoziiert (Abreu *et al.*, 2002). Die Polymorphismen besitzen eine geringe Penetranz: Auf 500 gesunde Polymorphismen-Träger kommt ein Morbus

Crohn-Patient (Marks und Segal, 2008).

NOD2 gehört zur Familie der zytosolisch vorkommenden *NOD like*-Rezeptoren (NLRs) mit etwa 30 beschriebenen Mitgliedern. Die korrespondierenden Gene liegen insbesondere auf den Chromosomen 11, 16 und 19 (Harton *et al.*, 2002). Zusammen mit den membranständigen Rezeptoren, wie u. a. *Toll like*-Rezeptoren (TLRs), von denen bisher 11 dokumentiert wurden und einer großen Anzahl „löslicher Rezeptoren“ (z. B. Pentraxine) und den ebenfalls zytosolischen RIG-I-ähnlichen Proteinen werden die NLRs den *pattern recognition molecules* (PRMs) oder auch *pattern recognition receptors* (PRRs) zugeordnet. Diese sind in der Lage, Pathogene anhand unterschiedlicher Muster, so genannter *pathogen-associated* oder *microbial-associated molecular patterns* (PAMPs bzw. MAMPs) zu erkennen und eine entsprechende Immunantwort zu induzieren. Demnach können PRRs zwischen einem „Selbst“ und einem „Nicht-Selbst“ differenzieren. Zu den PAMPs zählen beispielsweise bakterielle Zellwandbestandteile (Lipopolysaccharide, Peptidoglykane, Lipoproteine) und Nukleinsäuren. NOD1 und NOD2 gelten als Homologe von R-Proteinen der Pflanzen, die dort für die Erkennung intrazellulärer Pathogene zuständig sind und daraufhin eine Form des programmierten Zelltods initiieren können. Dadurch stirbt die infizierte Zelle ab und die Infektion kann eingedämmt werden. Daneben ist die Existenz von NOD-Proteinen auch für Tiere, Pilze und Bakterien dokumentiert. Trotz der engen Verwandtschaft zu den R-Proteinen konnte eine proapoptotische Funktion von NOD2 nicht nachgewiesen werden (Inohara *et al.*, 2003).

NLRs sind auch unter den Begriffen NACHTs (NAIP, CITA, HET-E and TP1, *leucine rich repeats*) oder CATERPILLER (CARD, transcription enhancer, R(*purine*)-*binding*, pyrin, lots of *leucin rich repeats*) bekannt (Harton *et al.*, 2002; Ting und Davis, 2005). Alle NODs besitzen eine carboxyterminale Ligandenerkennungsdomäne (*ligand recognition domain*, LRD), z. B. *leucine rich repeats* (LRR), eine zentrale nukleotidbindende Oligomerisierungsdomäne (NOD/NACHT) und eine aminoternale Effektor-domäne, z. B. PYD (*pyrin domain*), CARD (*caspase recruitment domain*) oder BIR (*baculovirus inhibitor of apoptosis repeat*) (Fritz und Girardin, 2005). Je nach Effektor-domäne entsteht ein NOD (CARD), NALP (PYD) oder NAIP (BIR) (Inohara *et al.*, 2003). NOD2 besteht neben zwei aminoterminalen CARD-Domänen aus einer NOD/NACHT-Domäne, gefolgt von einer NACHT-Verbindungs-Domäne (*NACHT association domain*, NAD) und zehn carboxyterminalen LRR-Domänen. NACHT-Domänen verfügen vermutlich über eine Nukleosid Triphosphatase- (NTPase) Aktivität und sind in tierischen, pilzartigen und bakteriellen Proteinen nachweisbar (Koonin und Aravind, 2000). Man nimmt an, dass NACHT-Domänen über die Aktivierung von NF- κ B (*nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells*) und Caspase-1 an Entzündungsreaktionen beteiligt sind (Ferrero-Miliani *et al.*, 2007).

Mehr als 90 % der Mutationen in NOD2, die mit Morbus Crohn assoziiert sind, befinden sich in der LRR-Domäne (Dessein *et al.*, 2008). Von seiner zytosolischen Position aus ist das NOD2-Protein mittels seiner LRR-Domäne in der Lage, Muramyl-dipeptid (MDP, Mur-NAc-L-Ala-D-isoGln), eine Peptidoglykankomponente, die Bestandteil von sowohl grampositiven als auch gramnegativen Bakterienwänden ist, zu erkennen

und zu binden. Das NOD2-Protein ist somit ein intrazellulärer Sensor, der Bakterien einschließlich kommensaler Bakterien aufspüren kann und an MDP bindet. Die NOD2-Mutation Leu1007insC hat die Fähigkeit, MDP zu detektieren, vollständig verloren (Girardin *et al.*, 2003; Inohara *et al.*, 2003). Die Bindung des Agonisten MDP an die LRR-Domäne führt zu einer Konformationsänderung und Selbstoligomerisierung über die zentrale NOD-Domäne. Nachfolgende Effektormoleküle werden an die Effektor-domäne CARD gebunden.

Reguliert wird die Expression durch proinflammatorische Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor α (*tumor necrosis factor ligand superfamily member 2*, TNF- α) und Interferon γ (IFN- γ). Das NOD2-Protein induziert dann in Abhängigkeit der Inhibitor-Kinase des NF- κ B, I κ B-Kinase γ (IKK γ , NEMO), welche durch die Bindung der Serin-Threonin-Kinase RIP2 (RICK, CARDIAK) an NOD2 ubiquitinyliert wird, die Aktivierung des NF- κ B, welcher zuvor als Heterodimer aus einer p50- und einer p65-Untereinheit vorlag (Abbott *et al.*, 2004; Ogura *et al.*, 2001b). Dieser Prozess kann durch verschiedene Kinasen gestört werden. Die Rekrutierung nachgeschalteter Signalproteine erfolgt über RIP2. Dieses aktiviert mittels einer homophilen CARD-CARD-Interaktion den IKK-Komplex durch die IKK γ , welches wiederum die I κ B α phosphoryliert, wodurch der proinflammatorische Transkriptionsfaktor NF- κ B freigegeben und aktiviert wird. Nachfolgend transloziert das NF- κ B-p50/p65-Heterodimer in den Nukleus und bindet dort an die DNA in der Promoter- oder Enhancer-Region spezifischer Gene wie TNF- α , Interleukin-(IL) 1, IL-6 und IL-12, welche dadurch aktiviert werden (Abbott *et al.*, 2004; Schreiber *et al.*, 1998).

Interessanterweise wird NF- κ B durch Glukokortikoide und Sulfasalazin, zwei wichtige Medikamente in der Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen, inhibiert (Auphan *et al.*, 1995; Wahl *et al.*, 1998).

Das NOD2-Protein wird in dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen, Leukozyten, Endothelzellen sowie intestinalen epithelialen Zellen wie Paneth-Zellen und epithelialen Zellen des Kolons exprimiert (Berrebi *et al.*, 2003; Davey *et al.*, 2006; Hisamatsu *et al.*, 2003; Lala *et al.*, 2003; Ogura *et al.*, 2001b; Ogura *et al.*, 2003).

Durch die Mutation in der LRR-Domäne des NOD2 kommt es bei allen drei SNPs zu einer verminderten Induzierbarkeit von NF- κ B durch MDP über NOD2, da in NOD2 als bakteriellem Sensor ein Defekt vorliegt (Bonen *et al.*, 2003; Inohara *et al.*, 2003). Aufgrund dessen ist die Fähigkeit von RIP2, an NOD2 zu binden, herabgesetzt. Dadurch ist auch die Befähigung, die IKK γ zu ubiquitinylieren, reduziert (Abbott *et al.*, 2004). Generell liegt eine verstärkte NF- κ B-Aktivierung über einen bislang ungeklärten Mechanismus vor (Hampe *et al.*, 2001; Schreiber *et al.*, 1998).

Über die Bindung von NF- κ B kann sich die NOD2-Expression im Sinne einer autokrinen Signalverstärkung selbst hoch regulieren, da die NOD2-Expression durch TNF- α sowie IFN- γ induziert und NF- κ B durch eine TNF-vermittelte Entzündungsantwort aktiviert wird, es kommt zu einer Selbstoligomerisierung (Rosenstiel *et al.*, 2003).

Weiterhin werden SNPs in NOD2 mit einer Verminderung der α -Defensine im terminalen Ileum, mit einer Verminderung der MDP-induzierten Zytokine, z. B. TNF- α

und IL-10 sowie der Chemokine, beispielsweise IL-8 in peripheren Monozyten und dendritischen Zellen, einer Verminderung der MDP-induzierten Reifung von dendritischen Zellen sowie einer Erhöhung der Permeabilität der Darmmukosa assoziiert (Buhner *et al.*, 2006; Fries *et al.*, 2005).

Paneth-Zellen sind epitheliale Zellen und befinden sich am Boden der Lieberkühn'schen Krypten im terminalen Ileum. Auch im Kolon können unter bestimmten Voraussetzungen Paneth-Zellen nachgewiesen werden. Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen des Kolons gilt der Nachweis von Paneth-Zellen in Form einer Paneth-Zell-Metaplasie als ein Charakteristikum. Die Granula der Paneth-Zellen enthalten Lysozym, Phospholipase A2 Typ IIa sowie TNF- α . Weiterhin exprimieren sie das Genprodukt von NOD2 und die humanen α -Defensine HD5 und HD6.

Alle Defensine, α , β und ϑ , dienen der Abwehr mikrobieller Erreger. Wirksam sind sie insbesondere gegen Bakterien, einige auch gegen Viren, Protozoen und Pilze. Defensine sind kationische mit Disulfidbrücken ausgestattete antimikrobielle Peptide mit einem niedrigen Molekulargewicht (Boman, 1995), die ihr Ziel, beispielsweise ein Bakterium, töten, indem sie durch anionische Membranlipide an der Oberfläche des Zieles angezogen werden, teppichartig an diese andocken, auf der Membranoberfläche eine Spannung erzeugen, Poren in die Membran fräsen, diese durchwandern und sich im Zytoplasma fortbewegen oder die Membran zum Bersten bringen. Dieser Mechanismus wird als Shai-Matsuzaki-Huang-Mechanismus bezeichnet (Shai, 1999).

Durch das Aufspüren von MDP durch NOD2 wird die α -Defensinproduktion der Paneth-Zellen im Dünndarm stimuliert (Wehkamp *et al.*, 2004). Bei Morbus Crohn des terminalen Ileum ist die α -Defensin-Expression reduziert, mRNA und Protein von HD5 und HD6 liegen vermindert vor, wodurch auch die antimikrobielle Aktivität beeinträchtigt ist. Bei Vorliegen einer der NOD2-Mutationen ist die Expression der α -Defensine noch weiter herabgesetzt (Wehkamp *et al.*, 2004; Wehkamp *et al.*, 2005). Bei der Colitis ulcerosa konnte diese Beobachtung nicht gemacht werden, auch waren Patienten mit Morbus Crohn im Kolon nicht von der Veränderung der α -Defensin-Expression betroffen. Andere Paneth-Zell-Produkte lagen in unveränderter oder erhöhter Form vor (Wehkamp *et al.*, 2005). Orale Verabreichung von Azathioprin, Glukokortikoiden und 5-Aminosalizylaten scheint die Expression von α - und β -Defensinen nicht zu beeinflussen (Kübler *et al.*, 2009).

Das Blau-Syndrom, eine weitere Erkrankung, welche eine Mutation im NOD2-Gen als Ursache hat, ist mit vier verschiedenen SNPs in der zentralen NOD/NACHT-Domäne assoziiert (Duist *et al.*, 2005; Miceli-Richard *et al.*, 2001). Im Gegensatz zum Morbus Crohn, bei dem ein polygenetischer Erbgang vermutet wird, wird die Blau-Syndrom-Mutation autosomal dominant vererbt. Beiden gemeinsam ist die chronische Entzündung, die sich beim Blau-Syndrom vor allem in Arthralgien, Uveitis und Exanthemen manifestiert (Miceli-Richard *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002). Auch in dieser Erkrankung scheint NF- κ B eine zentrale Rolle inne zu haben, es kommt zu einer gesteigerten NF- κ B-Aktivierung durch die NOD2-Proteine (Chamaillard *et al.*, 2003).

Weitere Suszeptibilitätsgene Der Interleukin 23 Rezeptor- (IL-23R-) Polymorphismus ist ein weiterer Gendefekt, welcher mit Morbus Crohn verknüpft ist. Weiterhin wird er, wenn auch schwächer, mit Colitis ulcerosa, ankylosierender Spondylitis, Psoriasis und anderen inflammatorischen Barriereerkrankungen assoziiert (Burton *et al.*, 2007; Cargill *et al.*, 2007; Duerr *et al.*, 2006; Rueda *et al.*, 2008). IL-21 ist zusammen mit IL-23 für die Differenzierung von T_H17 -Zellen zuständig, vermutlich sind auch TGF- β und IL-6 involviert. T_H17 -Zellen sind eine kürzlich entdeckte Untergruppe von T-Helfer-Zellen, die sich von T_H1 - und T_H2 -Zellen durch ein eigenes Zytokin-Muster unterscheiden und eine wichtige Rolle in Entzündungsvorgängen und Autoimmunerkrankungen zu spielen scheinen. Im Morbus Crohn sind verschiedene von T_H17 -Zellen exprimierte Zytokine erhöht: IL-17F und IL-22, welche beide für die Barrierefunktion von Bedeutung sind, weiterhin IL-26 und CCL20 (Brand *et al.*, 2006a; Brand *et al.*, 2006b; Dambacher *et al.*, 2009; Seiderer *et al.*, 2008). Darüber hinaus exprimieren T_H17 -Zellen IL-23R. Dies scheint über die T_H17 -Achse eine Rolle in der Steuerung der adaptiven Immunität zu spielen.

Die beiden Krankheitsgene *ATG16L1* (*autophagy-related protein 16-like 1*) und *IRGM* (*immunity-related GTPase family type M*) kodieren für Bestandteile des Autophagosomenweges. Autophagie ist der wichtigste Weg, um zelluläre Bestandteile, beispielsweise Proteine, aber auch Bakterien oder Viren, über Lysosomen abzubauen. Möglicherweise spielen intrazellulär persistierende Bakterien, wie das *Mycobacterium paratuberculosis*, eine Rolle. Defekte beider Gene sind nur mit Morbus Crohn, nicht jedoch mit Colitis ulcerosa, assoziiert. Der Phänotyp der *IRGM*-Mutation wird mit perianalen Fisteln in Verbindung gebracht (Latiano *et al.*, 2009; Parkes *et al.*, 2007). Bei Patienten mit einem *ATG16L1*-Defekt wurden Abnormalitäten bezüglich der Granula in Paneth-Zellen festgestellt: Diese waren unorganisiert und lagen in verminderter Zahl vor (Cadwell *et al.*, 2008).

Umweltfaktoren Neben genetischen Einflüssen konnten auch Umweltfaktoren für die Ätiopathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen identifiziert werden. Aufgrund von demographischen Charakteristika, aus der Altersverteilung und der ansteigenden Inzidenz kann geschlossen werden, dass Umweltfaktoren in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen von Bedeutung sind. Als wichtigste Einflüsse gelten Nikotinkonsum und die Appendektomie. Zigarettenrauchen stellt einen Risikofaktoren für die Entstehung des Morbus Crohn dar und zeigt bei der Colitis ulcerosa eine inverse Assoziation (Harries *et al.*, 1982; Somerville *et al.*, 1984). In Studien an der israelitischen Bevölkerung konnte diese Erkenntnis jedoch nicht bestätigt werden (Reif *et al.*, 1995). Bei rauchenden Morbus Crohn-Patienten scheint signifikant häufiger das Ileum befallen zu sein (Lindberg *et al.*, 1992). Während einer Thiopurin-Therapie benötigt dieses Patientenkollektiv signifikant häufiger Steroide als rauchende Colitis ulcerosa- und nicht-rauchende Morbus Crohn-Patienten (Domènech *et al.*, 2010).

Für Colitis ulcerosa konnte die Appendektomie als protektiver Faktor ermittelt werden (Andersson *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu könnte sie für Morbus Crohn einen

Risikofaktor darstellen (Andersson *et al.*, 2003). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind unklar.

Als weitere potentielle Risikofaktoren mit schwächerer Assoziation werden orale Kontrazeption (Logan und Kay, 1989), vermehrte Aufnahme von raffinierten Kohlenhydraten (Martini und Brandes, 1976), fehlendes oder nicht ausreichendes Stillen (Koletzko *et al.*, 1989), perinatale oder Kindheitsinfektionen (Ekbohm *et al.*, 1990), häusliche Hygienegewohnheiten in der Kindheit (Gent *et al.*, 1994), Maserninfektion oder -impfung (Ekbohm *et al.*, 1994; Thompson *et al.*, 1995) sowie die Infektion mit dem *Mycobacterium paratuberculosis* (Chiodini *et al.*, 1984) diskutiert.

Intestinale Mikroflora Der menschliche Darm stellt mit einer Länge von 7–9 m und einer Oberfläche zwischen 200 und 400 m² die größte Kontaktfläche des menschlichen Körpers zur Außenwelt dar (Hounnou *et al.*, 2002; Stallmach und Zeitz, 1999). In einem gesunden Darm ermöglicht diese Kontaktfläche zugleich die Aufnahme von Nährstoffen und Flüssigkeit aus dem intestinalen Lumen und die Abwehr potentiell toxischer Mikroorganismen. Für diese diffizile Aufgabe verfügt das Mukosaepithel über eine hochselektive Barriere, welche die Immunzellen in der *Lamina propria* von den Antigenen im Darmlumen separiert und von einer apikalen Mukusschicht bedeckt ist. Diese enthält neben Glykoproteinen, Phospholipiden und Lipidmediatoren auch antibakterielle Substanzen wie IgA und Defensine, weiterhin beherbergt sie kommensale Bakterien. Das basolaterale Mukosaepithel besteht aus einer einzelnen Zellschicht, welche durch eine hohe Regenerationsfähigkeit gekennzeichnet ist. Es besteht ein Gleichgewicht zwischen der Erneuerung von Epithelzellen durch Proliferation und dem Verlust durch den natürlichen Zelltod, Apoptose oder durch mechanische Abschilferung. Eine komplette Erneuerung des Epithels findet alle 24 bis 96 Stunden statt (Potten *et al.*, 1992). Die Epithelzellen sind über Zell-Zell-Kontakte wie *Tight Junctions* und *Adherens Junctions* miteinander verbunden. Basal grenzt die *Lamina propria* an, in welcher vorwiegend reife Lymphozyten, dendritische Zellen, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Mastzellen siedeln.

Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und deren gesunde erstgradige Angehörige scheinen eine erhöhte Permeabilität der Darmwand zu besitzen (Buhner *et al.*, 2006; Fries *et al.*, 2005; Irvine und Marshall, 2000). Es konnten sowohl Defekte in der Zusammensetzung und Qualität des Mukus (Buisine *et al.*, 2001; Smithson *et al.*, 1997) als auch Defekte der *Tight Junctions* (Söderholm *et al.*, 2002) und eine vermehrte Zahl adhäsiver Bakterien nachgewiesen werden (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998; Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004).

Peyer'sche Plaques befinden sich in der *Lamina propria* und Submukosa des Ileums und bestehen aus einer Ansammlung von Lymphfollikeln. Zusammen mit mesenterialen Lymphknoten, Appendix, subepithelialen lymphatischen Follikeln, freien lymphatischen Zellen der *Lamina propria* und intraepithelialen Lymphozyten zählen sie zum Darm-assoziierten Immunsystem (GALT, *gut-associated lymphoid tissue*). Das Darm-assoziierte Immunsystem hat die Aufgabe, eine Immunantwort aufzubauen, mit deren

Hilfeschädliche Antigene neutralisiert und eliminiert werden können. Hierfür muss es zwischen harmlosen kommensalen Bakterien und pathogenen Keimen differenzieren können. Mehr als 500 kommensale, überwiegend obligat anaerobe Bakterienspezies siedeln im Darm eines Erwachsenen, wovon jedoch 30 bis 40 Spezies etwa 99 % der Bakterienpopulation darstellen (Hooper *et al.*, 2002). 10^{14} Bakterien bevölkern den Gastrointestinaltrakt mit einem Anstieg von 10^4 auf 10^8 Zellen/ml im terminalen Ileum und weiter auf 10^{11} /g im Kolon (Berg, 1996). Neben protektiven Kommensalen wie *Lactobacillus* und *Bifidobacterium* zählen auch aggressive obligat anaerobe Bakterien wie *Bacteroides*, *Eubacterium* und *Enterococcus* zu den permanenten Bewohnern der Kolonflora (Huijsdens *et al.*, 2002; Sartor, 2004). Im gesunden Darm besteht zwischen aggressiven und protektiven Spezies ein Gleichgewicht. Dieses scheint bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nicht immer vorhanden zu sein. So konnten Frank und Mitarbeiter demonstrieren, dass bei Erkrankten die Bakterienspezies *Firmicutes* und *Bacteroidetes* in verminderter Höhe vorliegt (Frank *et al.*, 2007). In einer anderen Studie konnte verdeutlicht werden, dass die Anzahl verschiedener, vor allem fäkaler Bakterienspezies insbesondere bei Morbus Crohn-Patienten erhöht ist (Swidsinski *et al.*, 2002), weiterhin konnte die Bakterienspezies *Escherichia coli* in intestinalen Epithelzellen und Makrophagen dokumentiert werden (Glasser *et al.*, 2001). Läsionen wurden vornehmlich in Regionen mit den höchsten Bakterienzahlen nachgewiesen (Sartor, 2004; Shanahan, 2002). Schon 1985 konnten Harper und Mitarbeiter Zusammenhänge zwischen Morbus Crohn und der Anwesenheit des Fäkalstroms aufzeigen. 1998 bestätigen D’Haens und Sartor diese Assoziation: „The enemy is within the fecal stream“ (D’Haens *et al.*, 1998; Harper *et al.*, 1985; Sartor, 1998). Veränderung der Darmflora durch Antibiotika und Probiotika können zumindest temporär von Nutzen sein und daher in der Therapie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen unter bestimmten Bedingungen eingesetzt werden (Resta-Lenert und Barrett, 2003; Sartor, 2004). Probiotika sind vorwiegend Milchsäurebakterien, die eine protektive Wirkung gegenüber der Autointoxikation proteolytischer Produkte aggressiver Bakterien bieten sollen. Große kontrollierte Studien über diese Wirkung fehlen allerdings bislang.

All diese Untersuchungen liefern Hinweise auf eine aus dem Gleichgewicht geratene intestinale Mikroflora und zugleich auf einen Defekt im intestinalen Immunsystem, welcher entweder eine Ursache oder Folge des erstgenannten darstellen könnte. Viele Fragen zum Gleichgewicht der intestinalen Mikroflora bleiben aktuell aufgrund der exorbitant hohen Anzahl an Bakterienspezies und der oft fehlenden Möglichkeit der Kultivierung noch offen.

Intestinales Immunsystem Luminale Antigene wie Kommensalen, Pathogene und Nahrungspartikel werden nach endozytotischer Aufnahme durch spezialisierte, zwischen den Epithelzellen liegende *Microfold*- (M-) Zellen transepithelial in die Peyer’schen Plaques befördert. Auch subepitheliale dendritische Zellen, welche bakterielle Bestandteile mit Hilfe von *Toll like*-Rezeptoren identifizieren, sind mit dieser Aufgabe betraut. Dendritische Zellen zählen zu den professionellen Antigen-präsentierenden

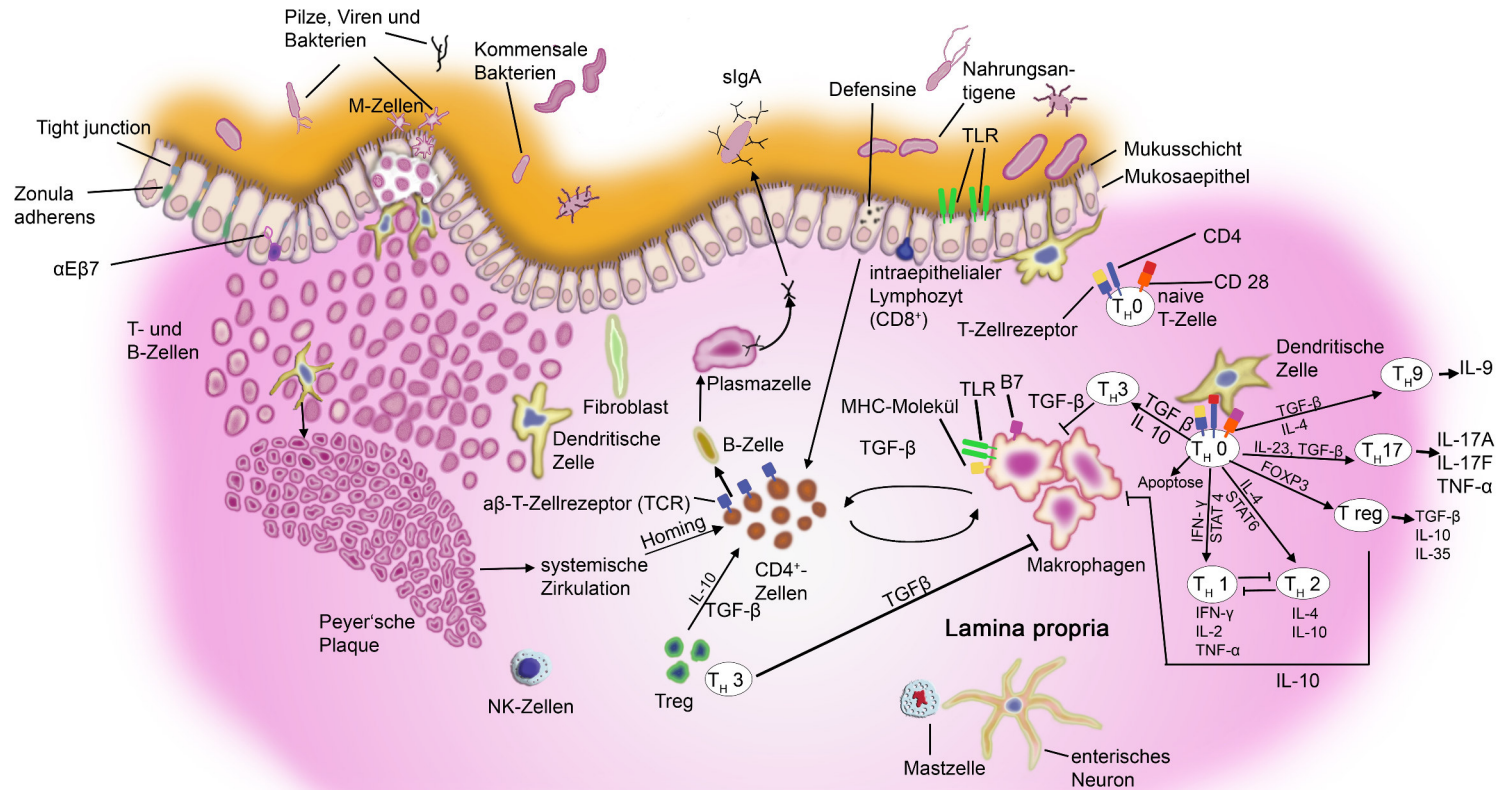
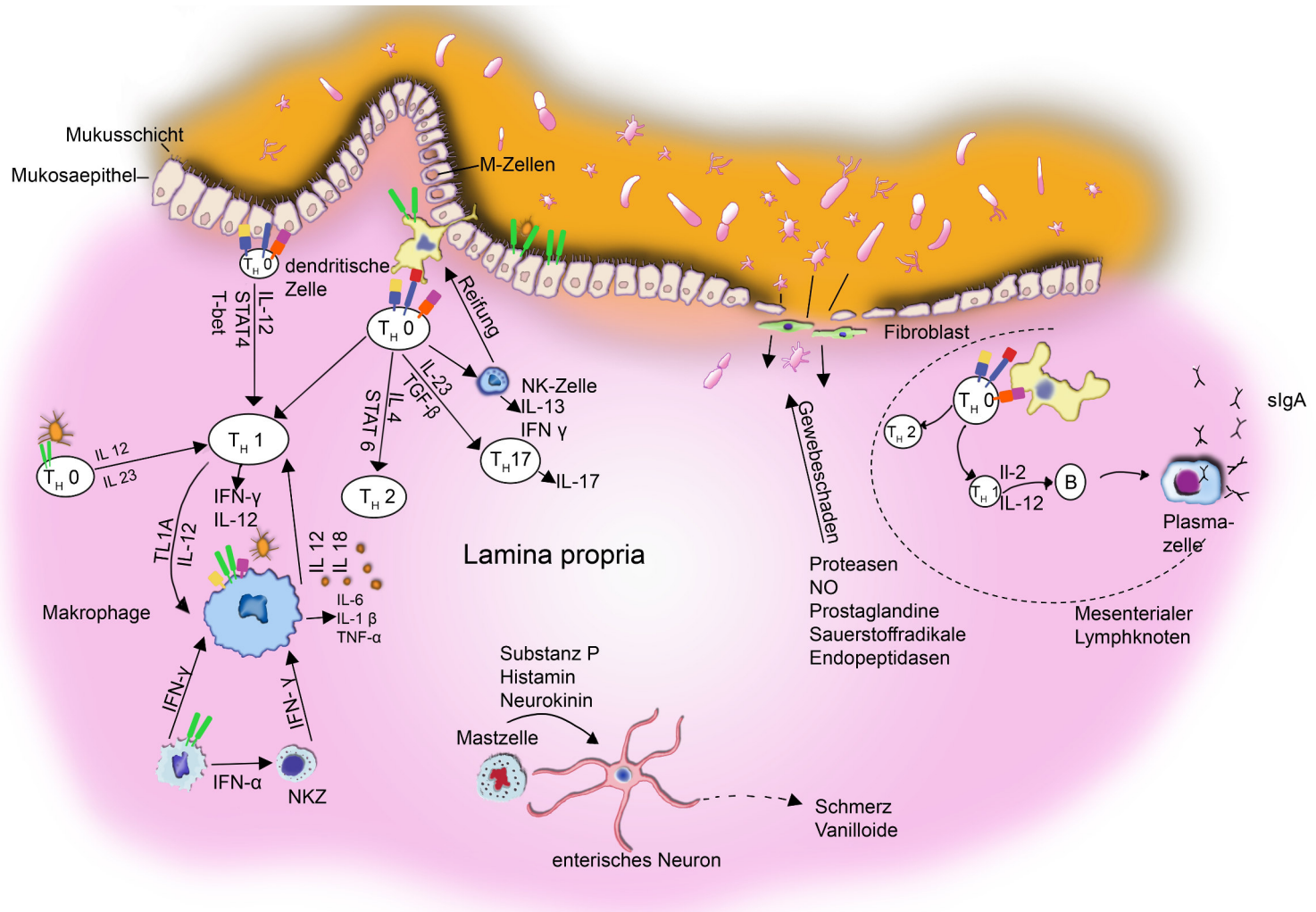


Abbildung 1.2: Intestinales Immunsystem

Das Mukosaepithel trennt die Immunzellen der Lamina propria von den luminalen Antigenen. Apikal ist es von einer Mukusschicht bedeckt. Die luminalen Antigene gelangen nach Aufnahme durch M-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen in die Peyer'schen Plaques, wo sie naiven CD4⁺-T-Zellen präsentiert werden. Plasmazellen sezernieren Ig, welches im Darmhumen an Antigene bindet und diese neutralisiert. Dendritische Zellen kontrollieren die Differenzierung von T_{H0}- in Effektor- und regulatorische T-Zellen (adaptiert nach Baumgart und Carding, 2007 und MacDonald und Monteleone, 2005).



18

Abbildung 1.3: Intestinales Immunsystem bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Durch eine geschwächte Barriere der intestinalen Epithelzellen dringen Pathogene in die Darmwand ein. Nach Kontakt zu Antigen-präsentierenden Zellen werden vermehrt Effektor-T-Zellen und NK-Zellen ausgebildet. Proinflammatorische Zytokine werden produziert und ausgeschüttet. Eine Beteiligung des enterischen Nervensystems kann nicht ausgeschlossen werden (adaptiert nach Baumgart und Carding, 2007).

Zellen und befinden sich zunächst, während sie mit der Prozessierung von Antigenen befasst sind, in einem unreifen Stadium. Zur Antigen-Präsentation wandern sie in T-Zell-Regionen der Peyer'schen Plaques und andere sekundäre lymphatische Organe, wo sie die Peptidfragmente von Antigenen naiven $CD4^+$ -T-Zellen (T_H0) präsentieren. Dort haben sie die Eigenschaften reifer dendritischer Zellen inne mit Oberflächenexpression diverser kostimulatorischer und Adhäsionsmoleküle (Hart *et al.*, 2005).

Neben den professionellen existieren auch nicht-professionelle Antigen-präsentierende Zellen wie intestinale epitheliale Zellen. Diese weisen entweder bereits die Fähigkeit zur Expression von MHC Klasse I- und Klasse II-Molekülen auf, oder diese kann induziert werden. Auch sind sie in der Lage, Zytokine zu sezernieren. Die Mehrheit der Epithelzellen besitzt kein B7, ein kostimulatorisches Molekül, welches in der T-Zell-Aktivierung bzw. -Suppression bedeutsam ist. Dies führt zur Anergie der T-Zellen durch intestinale epitheliale Zellen (Baumgart und Carding, 2007; Cruickshank *et al.*, 2004). Braat und Kollegen postulieren in ihrer „Gefahren-Theorie“, dass Antigen-präsentierende Zellen nicht nur durch Antigene, sondern auch durch geschädigte Zellen, welche bestimmte Signale aussenden, aktiviert werden und diese Kombination aus endogenen Gefahrensignalen und exogenen Fremdstoffen in einer Immunantwort resultiert (Braat *et al.*, 2006).

Dendritische Zellen kontrollieren die Differenzierung naiver T-Lymphozyten in Zellen der adaptiven Immunantwort, zum einen in regulatorische T-Zellen T_{reg} (Induktion durch die Zytokine TGF- β , IL-2; Produktion von TGF- β , IL-10, IL-35) und T_H3 (Induktion durch TGF- β , IL-2, IL-4, IL-10), zum anderen in Effektor-T-Zellen T_H1 (Induktion durch IL-12, IL-27, IFN- γ ; Produktion von IFN- γ), T_H2 (Induktion durch IL-4, IL-25; Produktion von IL-4, IL-5, IL-9, IL-13) und T_H17 (Induktion durch TGF- β , IL-1 β , IL-6, IL-21, IL-23; Produktion von IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-26, TNF- α , CCL20) (Brand, 2009). T_H1 und T_H17 werden mit Morbus Crohn assoziiert, wohingegen T_H2 eher mit Colitis ulcerosa in Verbindung gebracht wird. Im gesunden Dünn- und Dickdarm sind T_H1 -Zellen nachweisbar, jedoch keine oder nur wenige T_H2 -Zellen (Maynard und Weaver, 2009). Unlängst wurde mit T_H9 eine weitere Gruppe von Effektor- $CD4^+$ -Zellen identifiziert, die IL-9 produziert und durch die Behandlung von T_H2 -Zellen mit TGF- β oder durch Antigen-Stimulation naiver T-Zellen in Anwesenheit von TGF- β und IL-4 induziert werden kann (Dardalhon *et al.*, 2008; Veldhoen *et al.*, 2008).

Die adäquate Stimulation naiver T-Zellen ist abhängig von einer Antigen-spezifischen Peptid-Präsentation über MHC-Moleküle, weiterhin von der Kostimulation mit dem MHC-TCR-Komplex und zuletzt von einer passenden Zytokinumgebung. Die Kombination dieser drei Faktoren bestimmt die Art der Differenzierung der naiven T-Zelle (Braat *et al.*, 2006). In Abwesenheit von Entzündung besteht ein Gleichgewicht zwischen regulatorischen und Effektor-T-Zellen, welches durch ein engmaschiges Zytokinnetzwerk reguliert wird (Baumgart und Carding, 2007).

Von den in den Peyer'schen Plaques aktivierten T-Lymphozyten, welche das Integrin $\alpha\beta7$ exprimieren, migriert ein Teil über die mesenterialen Lymphknoten in die Zir-

kulation und kann von dort selektiv an mukosale Adressine binden und damit in die *Lamina propria*, den Ort der Effektorantwort, rezirkulieren. Dieser Vorgang wird *Hom-ing* genannt und über die Expression des Adressins und $\alpha 4\beta 7$ -Liganden MAdCAM-1 durch Darmendothelzellen vermittelt (Berlin *et al.*, 1993).

Lamina propria-T-Lymphozyten sind vornehmlich hochdifferenzierte, präaktivierte CD4⁺-Zellen, die den $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptor exprimieren und wichtige regulatorische oder effektorische Funktionen wahrnehmen können. Sie ähneln den Lymphozyten in der Zirkulation, liegen jedoch in aktivierterer Form als diese vor und sind in der Lage, große Zytokinmengen zu synthetisieren. Im Gegensatz dazu besitzen intraepitheliale Lymphozyten eine stark eingeschränkte Anzahl von Oberflächenmolekülen, exprimieren fast alle $\alpha E\beta 7$ und werden, abhängig von der anatomischen Lage, meist von CD8⁺-Zellen gebildet. Ihre Aufgabe besteht insbesondere in der Erstverteidigung und der Aufrechterhaltung der Integrität der intestinalen Barriere gegen luminale Antigene (Duchmann *et al.*, 1999; Wittig und Zeitz, 2003).

Aktiviert mukosale B-Zellen differenzieren unter dem Einfluss von Zytokinen wie TGF- β , IL-10, IL-4, IL-5 und IL-6 zu Plasmazellen und sezernieren IgA (Corthesy, 2007). Dieses gelangt über Transzytose ins Darmlumen, wo die Bindung und Neutralisierung von Antigenen erfolgt. Auch in der *Lamina propria* und in intraepithelialen Zellen kommt IgA zum Einsatz. Es verfügt im Vergleich zu IgG und IgM nur über schwache inflammatorische Eigenschaften und wirkt damit nicht gewebedestruktiv. Somit leistet IgA einen wichtigen Beitrag zur Wahrung der Immunhomöostase (Abraham und Cho, 2009).

Das Immunsystem des Darmes hat die Aufgabe, zwischen harmlosen Kommensalen oder Nahrungspartikeln und möglichen krankmachenden Antigenen zu unterscheiden. Auf der einen Seite muss das Eindringen der Pathogene in die Mukosa durch eine entsprechende Immunantwort unterbunden werden, auf der anderen Seite sollte diese Immunantwort gegenüber Nahrungsproteinen und Kommensalen ausbleiben, da andernfalls chronische Entzündungen die Folge wären. Voraussetzung für ein Gleichgewicht im Darm eines gesunden Menschen stellt daher ein Immunsystem mit einem eher niedrigen Aktivierungsgrad dar. Zur Vermittlung der sogenannten oralen Toleranz, dem Fehlen einer spezifischen peripheren Immunantwort, verfügt das intestinale Immunsystem über mehrere regulatorische Mechanismen. Eine lokale und systemische immunologische Toleranz kann durch klonale Deletion antigenspezifischer T-Zellen, durch klonale Anergie aufgrund des Fehlens kostimulatorischer Moleküle und durch die Präsenz regulatorischer T-Zellen, beispielsweise T_{H1} oder T_{H3} mittels antiinflammatorischer Zytokine wie IL-4, IL-10 oder TGF- β erfolgen (Garside und Mowat, 2001). Für diese Mechanismen besteht eine Dosisabhängigkeit. Niedrige Antigen-Dosen führen zur Antwort über regulatorische Zellen, höhere Antigen-Dosen bevorzugen den Weg über klonale Deletion oder Anergie (Burks *et al.*, 2008).

Intestinales Immunsystem und Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen Die genaue Bedeutung des intestinalen Immunsystems bei der Entstehung

chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ist nicht abschließend geklärt. Jedoch deuten die Erfolge der immunsuppressiven Therapie, die Art der extraintestinalen bzw. systemischen Komplikationen sowie die Pathologie der auftretenden intestinalen Läsionen darauf hin, dass es in der Pathogenese von Relevanz ist (Braat *et al.*, 2006). Die Heterogenität der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen lässt vermuten, dass eine Abhängigkeit besteht zwischen der mukosalen Integrität und einem Netzwerk an Interaktionen der intestinalen Flora, dem angeborenen und adaptiven Immunsystem, von Suszeptibilitätsgenen und dem enterischen Nervensystem. Eine Hypothese postuliert eine genetisch determinierte Überreaktion des GALT auf Kommensalen, welche in einer sekundären Schädigung der mukosalen Barriere und damit in einem Einstrom schädlicher luminaler Bestandteile resultiert. Dies potenziert den Kontakt des intestinalen Immunsystems mit mikrobiellen Komponenten zusätzlich (Baumgart und Carding, 2007). Shanahan erachtet drei Faktoren als notwendig für die Entstehung einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung: genetische Suszeptibilität, Abnormalitäten in der intestinalen Mikroflora sowie eine durch das intestinale Immunsystem vermittelte Barrierschädigung (Shanahan, 2002). So gehen also die meisten Arbeitsgruppen heutzutage von einer Überreaktion des intestinalen Immunsystems auf eine normale Darmflora aus (Burks *et al.*, 2008; Maynard und Weaver, 2009; Shanahan, 2002), obwohl es auch hier abweichende Stimmen gibt (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004). Das angeborene Immunsystem weist bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Abnormalitäten auf: Intestinale Epithelzellen exprimieren ein verändertes Muster an *Toll-like*-Rezeptoren (Cario und Podolsky, 2000). Die Antigen-Erkennung und -Prozessierung durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen zeigt sich ebenfalls beeinträchtigt. Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen weisen eine erhöhte Zahl reifer dendritischer Zellen und eine reduzierte Anzahl unreifer zirkulierender dendritischer Zellen auf (Baumgart *et al.*, 2005; Hart *et al.*, 2005). Intestinale epitheliale Zellen aktivieren als nicht-professionelle Antigen-präsentierende Zellen Effektor-T-Zellen (Mayer und Eisenhardt, 1990). Die Balance zwischen Effektor- und regulatorischen T-Zellen ist zu Gunsten der Effektor-Zellen verschoben (Baumgart und Carding, 2007). Psychosozialer Stress könnte eine Rolle spielen, indem er neuroimmunologische Interaktionen triggert (Neunlist *et al.*, 2003).

Brand sieht für Morbus Crohn in der Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen und einer T-Zellantwort als T_H1 und T_H17 die Folge einer genetischen Suszeptibilität mit Defekten in der Barriere und eines konsekutiven Bakterieneinstroms (Brand, 2009). Im Morbus Crohn liegt eine Betonung der Expression von T_H1 - und T_H17 -Zellen, jedoch eine Reduktion der Expression von T_{reg} vor (Brand, 2009). Im Fokus der Forschung stehen zunehmend T-Lymphozyten, die für den Verlust der oralen Toleranz des Immunsystems des Darms verantwortlich gemacht werden (Baumgart und Carding, 2007; Duchmann *et al.*, 1999; Maynard und Weaver, 2009).

Apoptoseresistenz der T-Lymphozyten Der Begriff Apoptose (griechisch: $\alpha\pi\omicron\pi\tau\omega\sigma\iota\zeta$ von apo „weg“ und ptosis „Fall“, wie das „Herabfallen“ der Blätter im

Herbst) wurde 1972 von Kerr, Wyllie und Currie geprägt und beschreibt eine Art des programmierten Zelltodes von Metazoen, welche im Vergleich zur Nekrose die häufigere Form des Zelltodes darstellt und in fast allen Geweben auftreten kann (Kerr *et al.*, 1972). Im Gegensatz zur Nekrose wird bei der Apoptose keine Entzündungsreaktion hervorgerufen. Für die Aufrechterhaltung der Homöostase im menschlichen Darm und für das GALT ist die Apoptose als Gegenpol zur Proliferation mit nachfolgender Differenzierung der Zellen unerlässlich. Die Apoptose präsentiert sich als einen engmaschig kontrollierten komplexen Mechanismus, durch den potentiell schädigende oder überflüssig gewordene Zellen eliminiert werden sollen. Defekte im Apoptose-Mechanismus sind an einer Vielzahl von Erkrankungen beteiligt: Unter anderem spielen sie eine Rolle in der Krebsentstehung, in neurodegenerativen Erkrankungen, viralen Infekten sowie Autoimmunerkrankungen (Thompson, 1995).

Die Einleitung der Apoptose resultiert in einer Schrumpfung der Zelle mit zunehmender Rundung, Schrumpfung von Zytoplasma, Nukleus und Chromatin, einer erhöhten mitochondrialen Permeabilität, Kollaps des Zytoskeletts, Fragmentierung der DNA und schließlich der Bildung sogenannter „apoptotischer Körperchen“ durch Abschnürung von Vesikeln aus der Plasma- und Kernmembran, dem „blebbing“. Diese werden von phagozytierenden Zellen aufgenommen und verdaut (Li und Yuan, 2008).

Die Initiationsphase der Apoptose kann durch verschiedene Stimuli ausgelöst werden. Die Einleitung des intrinsischen Weges der Apoptose erfolgt beispielsweise durch Schädigung der DNA durch Noxen oder durch den Entzug von Wachstumsfaktoren oder Zytokinen wie IL-2 (Hengartner, 2000). Hier kommt es zur Freisetzung von Cytochrom c und Smac/DIABLO aus den Mitochondrien in das Zytoplasma. Cytochrom c bindet an das Protein *apoptotic peptidase activating factor* (Apaf) 1, was über die Bildung des Apoptosoms zur Aktivierung der Caspase-9 führt. Diese aktiviert wiederum Caspase-3 und Caspase-7 und bewirkt schließlich die Apoptose (Li *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1996).

Die mitochondriale Membranpermeabilität wird von Mitgliedern der Bcl-2-Familie kontrolliert. Diese besteht aus anti-apoptotischen (Bcl-2, Bcl-x_L, Bfl1/A1) und pro-apoptotischen (Bid, Bak, Bad, Bax, Bim, Bcl-x_S, Bik) Proteinen. Die pro-apoptotischen Familienmitglieder tragen zur Entstehung von Poren in der Mitochondrienmembran mit nachfolgender Freisetzung von Cytochrom c bei (Gross *et al.*, 1999).

Neben dem intrinsischen Weg kann durch die Aktivierung von Todesrezeptoren der extrinsische Weg eingeleitet werden. Die Effektorphase ist die gemeinsame Endstrecke beider Wege. Zu den Mitgliedern der Familie der Todesrezeptoren gehören Fas (auch CD95, DR2, APO-1), der *tumor necrosis factor receptor 1* (TNFR-1; auch DR1, CD120a, p55 und p60), DR3 (auch APO-3, LARD, TRAMP, WSL1), der *TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1* (TRAILR1; auch DR4, APO-2), TRAILR2 (auch DR5, KILLER, TRICK2), DR6, *ectodysplasin A receptor* (EDAR) und *nerve growth factor receptor* (Ashkenazi und Dixit, 1998; French und Tschopp, 2003). Die Todesrezeptoren besitzen eine Todesdomäne (DD, *death domain*), mit der sie Adapterproteine wie TRADD (*Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein*)

und FADD (*Fas-associated protein with death domain*) rekrutieren, nachdem sie mit ihrem jeweiligen Liganden (z. B. Fas ligand, TNF oder TRAIL) interagiert haben und den *death-inducing signalling complex* (DISC) bilden. Über die Todeseffektordomäne DED (*death effector domain*) wird Caspase-8 gebunden und aktiviert. In Typ-I-Zellen wird daraufhin durch hohe Mengen Caspase-8 über Caspase-3 und Caspase-7 die Apoptose vollzogen. In Typ-II-Zellen muss das durch geringe Mengen Caspase-8 ausgelöste Signal durch mitochondriale Interaktionen des Bcl-2-Familienmitgliedes Bid verstärkt werden. Dieses wird durch Caspase-8 gespalten und transloziert zu den Mitochondrien, um dort nachgeschaltete Komponenten des mitochondrialen apoptotischen Weges zu aktivieren (Li *et al.*, 1998; Neurath *et al.*, 2001; Scaffidi *et al.*, 1998).

Eine essentielle Gruppe der apoptotischen Maschinerie stellt die Familie der aus Cysteinproteasen bestehenden Caspasen dar, zu der mindestens 11 Mitglieder zählen (Fuentes-Prior und Salvesen, 2004). Sie werden als inaktive Zymogene synthetisiert und enthalten eine Prodomäne, z. B. CARD oder DED, sowie eine große p20- und eine kleine p10-Untereinheit. Durch proteolytische Spaltung erfolgt die Entfernung der Prodomäne und die Aktivierung der Caspase (Fuentes-Prior und Salvesen, 2004).

Caspasen lassen sich in Initiator-Caspasen (Caspase-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -11, -12) und Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6, -7) einteilen. Initiator-Caspasen besitzen eine lange Prodomäne, entweder eine DED oder eine CARD und induzieren die Aktivierung von Adaptermolekülen. Effektor-Caspasen fungieren als den Initiator-Caspasen nachgeschaltete und von diesen aktivierte Proteine, die an der Ausführung der Apoptose beteiligt sind (Fuentes-Prior und Salvesen, 2004).

Fas ist ein 45 kDa-Typ I-Membranprotein, welches in verschiedenen Geweben, unter anderem auf *Lamina propria*-T-Lymphozyten, exprimiert wird (Itoh *et al.*, 1991). Es wird der TNF-Familie zugeordnet und führt über die Zusammenführung mit seinem Liganden *Fas ligand* (FasL) zur Apoptose (Dhein *et al.*, 1992). FasL, ein 40 kDa-Typ II-Membranprotein, zählt ebenfalls zur TNF-Familie und wird sehr viel eingeschränkter und vorwiegend auf zytotoxischen Lymphozyten exprimiert (Takahashi *et al.*, 1994). In der Apoptose der T-Lymphozyten spielt das Fas/FasL-System eine zentrale Rolle.

Nach Elimination eines Antigens durch eine spezifische T-Zell-Subpopulation ist es zur Wahrung der Homöostase und um Autoimmunität oder chronischer Entzündung vorzubeugen essentiell, diese Subpopulation wieder auszulöschen. Dies geschieht durch die Einleitung der Apoptose durch das intestinale Immunsystem (Hildeman *et al.*, 2007). Eine Expansion von T-Zell-Klonen wird so eingedämmt und eine inadäquate Immunantwort vermieden, autoreaktive Effektorzellen werden eliminiert (Plas *et al.*, 2002; Van Parijs und Abbas, 1998). Zur aktiven Limitierung der T-Zell-Antwort weisen Van den Brande *et al.* auf vier Mechanismen hin. T-Lymphozyten können über einen CTLA-4-vermittelten Weg inhibiert werden. Dieses bindet nach Aktivierung der T-Lymphozyten an B7 und überträgt Signale, die die Transkription von IL-2 hemmen. Es wird davon ausgegangen, dass CTLA-4 die Signalübertragung von CD28 blockiert. Weiterhin ist die Begrenzung der T-Zell-Antwort über den oben beschrie-

benen Death-Rezeptor-Mechanismus mit Fas/FasL möglich. Dieser Prozess wird von IL-2 potenziert. Eine weitere Option ist die Hemmung der T-Zellen über IL-2 selbst. In der frühen T-Zell-Antwort wirkt IL-2 als Wachstumsfaktor, bei Ausbleiben von diesem verkehrt sich der Effekt ins Gegenteil. Darüber hinaus üben inhibitorische Zytokine regulatorischer T-Lymphozyten wie TGF-1 oder IL-10 einen nicht zu unterschätzenden Einfluss auf die Limitierung zytotoxischer T-Lymphozyten aus (Van Den Brande *et al.*, 2002). Auch eine passive Begrenzung kann eine Immunantwort terminieren. Eine Aktivierung von T-Lymphozyten erfolgt erst nach Antigenerkennung und Kostimulation durch verschiedene Faktoren. Fällt eine dieser beiden Komponenten weg, bleibt die Immunantwort aus und es resultiert Anergie. Für die Aufrechterhaltung der Aktivierung sind Zytokine und Kostimulatoren notwendig. Fehlen diese, verliert die Zelle ihre anti-apoptischen Proteine, insbesondere der Bcl-2-Familie, der programmierte Zelltod wird initiiert (Van Den Brande *et al.*, 2002). In chronisch entzündlichen Darmerkrankungen spielen aktivierte T-Lymphozyten eine wichtige Rolle, was einerseits an einer erhöhten Proliferation, zum anderen an einer verminderten Apoptose liegen könnte (Lügering *et al.*, 2006). An mehreren Arbeiten konnte demonstriert werden, dass *Lamina propria*-T-Lymphozyten von Morbus Crohn-Patienten hochgradig resistent gegen die Einleitung der Apoptose zu sein scheinen und eine verlängerte Überlebenszeit aufweisen (Boirivant *et al.*, 1999; Ina *et al.*, 1999; Itoh *et al.*, 2001). Bei diesen Patienten konnte eine vermehrte IL-2-abhängige Proliferation und gleichzeitig eine Resistenz gegenüber der IL-2-vermittelten, der CD2-induzierten, der Stickstoffmonoxid-vermittelten und der Fas-übertragenen Apoptose festgestellt werden, somit sind sowohl der passive als auch aktive Apoptose-Pfad betroffen (Boirivant *et al.*, 1999). Die Art der Fas-Expression ist im Vergleich zu gesunden Probanden nicht beeinträchtigt (Neurath *et al.*, 2001). Eine erhöhte Zytokinproduktion wurde jedoch nachgewiesen (Sturm, 2008). Peppelenbosch und van Deventer vermuten den Defekt im intrinsischen Pfad auf Ebene der Mitochondrien (Peppelenbosch und van Deventer, 2004). Auffällig ist weiterhin ein veränderter Bax-Bcl-Quotient, welcher bei Colitis ulcerosa-Patienten nicht beobachtet wird (Ina *et al.*, 1999). An *Lamina propria*-T-Lymphozyten der Colitis ulcerosa-Patienten konnte in den Arbeiten von Sturm und Kollegen dargelegt werden, dass in diesen Zellen eine im Vergleich zu Kontrollgruppen erhöhte Apoptoserate vorlag (Sturm *et al.*, 2004). Übereinstimmend damit zeigten sich die Aktivitäten der Effektor-Caspase-3 und -6 erhöht, wohingegen sie bei Morbus Crohn-Patienten erniedrigt waren (Sturm *et al.*, 2004).

Mit *TNFSF15* und *TNFRSF6B* konnten zwei Apoptose-assoziierte Suszeptibilitäts-gene entschlüsselt werden, die für den *TNF-like factor* (TL1A) sowie für den *TNF decoy receptor* (DR3) kodieren (Kugathasan *et al.*, 2008; Yamazaki *et al.*, 2005). Erster induziert und zweiter inhibiert eine Apoptose. Beide sind miteinander assoziiert, da TL1A einer der Liganden von DR3 ist (Fiocchi, 2009). Inwieweit ein Zusammenhang mit der T-Zell-Apoptose-Resistenz besteht, muss geklärt werden.

Viele Medikamente, die in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eingesetzt werden, sind dafür bekannt, die Apoptose in Mono- oder Lymphozyten zu induzieren. Neben Glukokortikoiden (Schmidt *et al.*, 2001), Sulfasalazin (Doering *et al.*,

2004), Infliximab (Hove *et al.*, 2002), Methotrexat (Genestier *et al.*, 1998), Ciclosporin (Horigome *et al.*, 1997), Tacrolimus (Migita und Eguchi, 2001) und Thalidomid (Gockel *et al.*, 2004) zählen hierzu auch Azathioprin und 6-Mercaptopurin (Tiede *et al.*, 2003). Saruta *et al.* beschreiben eine verminderte Anzahl von FOXP3⁺CD4⁺T_R-Zellen nach der Gabe von Azathioprin oder 6-Mercaptopurin (Saruta *et al.*, 2007). Tiede und Kollegen konnten demonstrieren, dass ein Zusammenhang zwischen der Apoptoseinduktion von Azathioprin/6-Mercaptopurin und der Inhibition von CD28 durch den 6-Mercaptopurin-Metaboliten 6-Thioguanosin-5'-Triphosphat besteht (Tiede *et al.*, 2003). Da die Aktivierung des kostimulatorischen Moleküls CD28 T-Lymphozyten gegen Apoptose schützt, deutet dieses Erkenntnis darauf hin, dass Azathioprin in aktivierten T-Zellen Apoptose induziert. Eine vermehrte Apoptose an mononukleären *Lamina propria*- und Blut-T-Zellen kann beobachtet werden, wenn Azathioprin verabreicht wird (Tiede *et al.*, 2003).

1.1.4 Medikamentöse Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Eine kausale medikamentöse Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen existiert nicht. Daher besteht die vorrangige Intention einer medikamentösen Therapie darin, die Symptome zu reduzieren, die Entzündungsaktivität zu verringern, die Lebensqualität der Patienten zu erhöhen sowie den Verlust der Darmfunktion zu verhindern. Als primäres Ziel wird die Remissionsinduktion angestrebt, konsekutiv ist der Remissionserhalt langfristig von Bedeutung. Die Therapieregime chronisch entzündlicher Darmerkrankungen zollen der vermuteten unterschiedlichen Pathogenese und der Tatsache, dass zahlreiche heterogene Subpopulationen zu bestehen scheinen (Neurath und Finotto, 2009), bislang keinen Tribut. Zu weiten Teilen überlappen sich die zur Verfügung stehenden Pharmaka für Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Schwierigkeiten in der medikamentösen Therapie bereitet die objektive Beurteilung der Krankheitsaktivität. Als Erfolgsparameter dienen bislang Laborbefund, Symptomatik sowie endoskopische Mukosabeurteilung. Strittig bleibt die Frage bezüglich *Step-up- versus Top-down*-Prinzip. Die *Step-up*-Therapie stellt die klassische Therapievariante dar, bei der mit Glukokortikoiden begonnen wird und je nach Erfolg der *First line*-Therapie und Verlauf der Erkrankung die Therapie nach und nach auf Immunsuppressiva und Biologika ausgeweitet wird (Hanauer, 2003). In den letzten Jahren hat sich für eine Gruppe von Patienten mit schwerer Klinik und beispielsweise Befall des proximalen Gastrointestinaltraktes jedoch immer mehr das *Top-down*-Prinzip etabliert, bei dem diese Therapie bereits primär zum Einsatz kommt (D'Haens *et al.*, 2008).

Die Wirksamkeit für Glukokortikoide im akuten Erkrankungsschub konnte sowohl für Morbus Crohn als auch für Colitis ulcerosa belegt werden (Malchow *et al.*, 1984; Summers *et al.*, 1979; Truelove und Witts, 1955). Somit dienen sie der Remissionsinduktion, jedoch nicht dem Remissionserhalt (Steinhart *et al.*, 2003). Durch ihre potente antiphlogistische Wirkung konnten sie die Mortalität der chronisch entzünd-

lichen Darmerkrankungen nach Einführung in den frühen Fünfziger Jahren drastisch senken (Edwards und Truelove, 1963).

Sulfasalazin und 5-Aminosalizylsäure entfalten ihre antiinflammatorische Wirkung durch verschiedene galenische Zubereitungen vorwiegend im Kolon, teilweise auch im distalen Dünndarm. In der Therapie der Colitis ulcerosa besitzen sie einen höheren Stellenwert als in der Therapie des Morbus Crohn (Akobeng und Gardener, 2005; Sutherland und Macdonald, 2006). Unerwünschte Wirkungen wie Cephalgien, Übelkeit und abdominale Schmerzen von Sulfasalazin sind auf den Sulfonamidanteil zurückzuführen, schwerwiegende Nebenwirkungen sind seltener (Ransford und Langman, 2002).

Zu den Biologika zählen die Anti-TNF α -Antikörper Infliximab und Adalimumab. Infliximab, ein chimärer (75 % murin, 25 % human) monoklonaler IgG1-Anti-TNF- α -Antikörper, inhibiert TNF- α und bewirkt die Apoptose von mukosalen T-Lymphozyten (Hove *et al.*, 2002) und Monozyten (Lügering *et al.*, 2001). Er kommt in schweren bzw. therapierefraktären Fällen von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sowohl in der Remissionsinduktion als auch -erhaltung zur Anwendung (Rutgeerts *et al.*, 2005; Targan *et al.*, 1997) und wird intravenös und gewichtsadaptiert verabreicht. Auch für die fistulierende Form des Morbus Crohn zeigte die Behandlung mit Infliximab ein Benefit (Sands *et al.*, 2004). In einigen Studien erwies sich ein frühzeitiger Einsatz im Sinne einer *Top-down*-Strategie als vorteilhaft (D'Haens *et al.*, 2008). Durch die Bildung humaner antichimärer Antikörper können Nebenwirkungen wie Infusionsreaktionen auftreten. Adalimumab ist ein rein humaner rekombinanter monoklonaler Anti-TNF α -Antikörper. Er hemmt die Entzündungsprozesse von löslichem und membrangebundenem TNF- α und induziert die Apoptose in Monozyten (Shen *et al.*, 2005). Sein Anwendungsbereich ist der therapierefraktäre Morbus Crohn. Er kommt allerdings nur bei Infliximab-Unverträglichkeit oder -Unwirksamkeit zum Einsatz und wird subkutan appliziert.

Antibiotika dienen in erster Linie der Therapie infektiöser Komplikationen. Beim fistulierenden Verlauf des Morbus Crohn hat sich Metronidazol als wirksam erwiesen (Schneider *et al.*, 1985; Thia *et al.*, 2009).

Die intestinale Flora spielt in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen eine wichtige Rolle und so richtet sich der Fokus der Forschung zunehmend auf eine Therapie mit Probiotika. Aktuell steht *Escherichia coli* Stamm Nissle 1917 für den Remissionserhalt der Colitis ulcerosa zur Verfügung (Rembacken *et al.*, 1999).

Weitere erfolgversprechende Probiotika und Biologika befinden sich derzeit in der klinischen Testung. Certolizumab Pegol besteht aus einem Fab-Fragment eines rekombinanten, humanisierten monoklonalen Antikörpers, das an Polyethylenglykol konjugiert wurde. Es bindet an TNF und inhibiert dieses ohne eine Aktivierung der Komplementkaskade zu bewirken. Eine Apoptose wird nicht ausgelöst. In ersten klinischen Studien zeigte sich eine gute Verträglichkeit bei mäßigem Ansprechen (Sandborn *et al.*, 2007). Natalizumab ist ein weiterer humanisierter Antikörper, welcher die $\alpha 4$ -Untereinheit des Integrins $\alpha 4\beta 7$ erkennt und blockiert. Dadurch

wird die Leukozyten-Adhäsion und -Migration in die Mukosa verhindert und eine Entzündungsreaktion vermieden. Ein mäßiges Ansprechen muss gegen das Risiko des Auftretens schwerer unerwünschter Wirkungen wie der progressiven multifokalen Leukenzephalopathie abgewogen werden (Sandborn *et al.*, 2005). Weitere Therapieoptionen, die in Zukunft zur Verfügung stehen könnten, sind Abatacept, ein CTLA4-Ig-Fusionsprotein, Interferon- β , Antikörper gegen den IL-2- und IL-6-Rezeptor oder Antikörper gegen die p40-Untereinheit von IL-12 und IL-23.

Immunsuppressive Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen Zu den Immunsuppressiva zählen neben Azathioprin und 6-Mercaptopurin, auf die später eingegangen wird, Ciclosporin, Tacrolimus, Methotrexat und Mycophenolatmofetil. Ciclosporin hemmt die Funktion der T-Lymphozyten über die Bindung an das zytoplasmatische Cyclophilin, einem Immunophilin. Dieser Komplex lagert sich an die Phosphatase Calcineurin und inhibiert diese, wodurch die Dephosphorylierung des *nuclear factor of activated T cells* (NF-AT) ausbleibt. NF-AT aktiviert die Promotoren für die Transkription des DNA-Matrizenstranges im Bereich der Gene proinflammatorischer Zytokine, darunter auch das Gen von IL-2. Aufgrund der fehlenden Wirkung von IL-2 verharren die T-Lymphozyten trotz Aktivierung in der G0- oder G1-Phase des Zellzyklus (Crabtree, 2001). Ciclosporin wird in der Remissionsinduktion der schweren steroidrefraktären Colitis ulcerosa verabreicht, eignet sich aber nicht für eine Remissionserhaltung (D’Haens *et al.*, 2001). Tacrolimus (FK 506), ein Makrolid aus *Streptomyces tsukubaensis*, findet beim chronisch aktiven Morbus Crohn sowie der fulminanten oder chronisch aktiven Colitis ulcerosa Anwendung, ist jedoch kein Medikament der ersten Wahl und wird meist im Rahmen von Studien eingesetzt (Ierardi *et al.*, 2001). Es wirkt ähnlich wie Ciclosporin über Calcineurin-Inhibition, bindet aber an das *FK binding protein 12* (FKBP-12). Der Antimetabolit Methotrexat inhibiert über die Tetrahydrofolsäure die Synthese von Thymidin und Purinen. Als Folsäureantagonist wird er in zeitlichem Abstand gemeinsam mit Folsäure appliziert. Methotrexat hemmt die Zellteilung und kann bei Azathioprin-/6-Mercaptopurin-Unverträglichkeit beispielsweise bei Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa mit chronisch aktivem Verlauf oder zur Remissionserhaltung von Morbus Crohn gegeben werden (Feagan *et al.*, 2000). Mycophenolatmofetil blockiert die Inosinmonophosphat-Dehydrogenase und führt darüber zu einer Verminderung der gesamten Purinsynthese. Sowohl B- als auch T-Lymphozyten werden inhibiert, darüber hinaus konnte eine Apoptose der T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Es wird aktuell nur als Reservemedikament für Morbus Crohn angewandt (Tan und Lawrance, 2009).

1.2 Azathioprin

Azathioprin ist ein Imidazol-Derivat von 6-Mercaptopurin und zugleich dessen inaktive Vorläufersubstanz. Als Purinantimetabolit, einem chemischen Analogon der physiologischen Purinbasen, hemmt es die Purinsynthese. Zu den Antimetaboliten

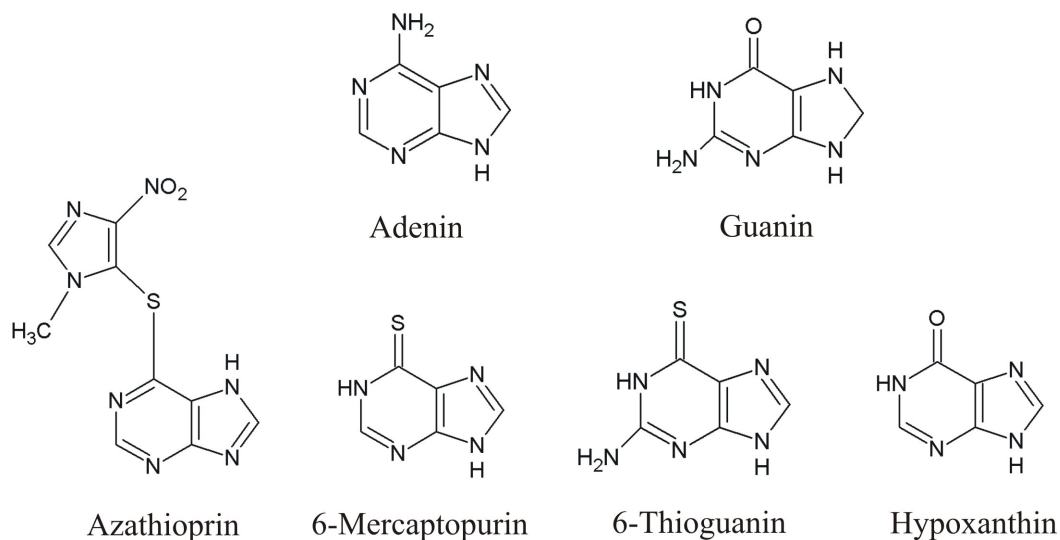


Abbildung 1.4: Strukturformeln von Adenin ($C_5H_5N_5$), Guanin ($C_5H_5N_5O$), Azathioprin ($C_9H_7N_7O_2S$), 6-Mercaptopurin ($C_5H_4N_4S$), 6-Thioguanin ($C_5H_5N_5S$) und Hypoxanthin ($C_5H_4N_4O$).

zählen neben den Thiopurinen Azathioprin, 6-Mercaptopurin und 6-Thioguanin auch die Zytostatika Fludarabin, Cladribin und Pentostasin.

1.2.1 Chemische Eigenschaften

Azathioprin¹ (Abbildungen 1.4 und 1.5) besitzt die Strukturformel $C_9H_7N_7O_2S$ und ein Molekulargewicht von 277,26 g/mol. Der IUPAC-Name lautet 6-[1-Methyl-4-nitro-5-imidazolylthio]purin (Elion *et al.*, 1963). Das Pharmakon liegt in festem Aggregatzustand vor, der Schmelzpunkt befindet sich bei 243,5° C. Azathioprin ist synthetischen Ursprungs, von blassgelber Farbe und liegt als geruchsneutraler Puder vor. Die Haltbarkeitsdauer für Azathioprin in Tablettenform beträgt 5 Jahre. Die Substanz ist wasserunlöslich und wenig löslich in Ethanol (Balali-Mood, 1995). Der Purinan-timetabolit besteht aus 6-Mercaptopurin sowie einem Imidazol-Derivat, welches am Schwefelatom in Position 6 anhaftet und als protektive Gruppe fungiert, um eine schnelle Oxidation und Methylierung von 6-Mercaptopurin zu inhibieren (Bertino, 1973; Cook und Bugg, 1975; Hoffmann *et al.*, 2001). Azathioprin ist in Tablettenform sowie als Pulver zur Herstellung einer Infusion erhältlich.

¹CAS-Nummer: 446-86-6, vgl. ChemIDplus (http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/ProxyServlet?objectHandle=DBMaint&actionHandle=default&nextPage=jsp/chemidheavy/ResultScreen.jsp&ROW_NUM=0&TXTSUPERLISTID=0000446866; abgerufen am 10.08.2010).

1.2.2 Pharmakodynamik

Die für Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung empfohlene Dosierung liegt bei 1,0–2,5 mg/kg Körpergewicht pro Tag (Stichtenoth, 2009), wobei für die Zieldosis ein Bereich von 2,0–2,5 mg/kg Körpergewicht veranschlagt werden sollte (Dignass *et al.*, 2004; Hoffmann *et al.*, 2008a; Travis *et al.*, 2006b). Ein Einschleichen der Therapie über 2–4 Wochen wird diskutiert, von den meisten Autoren jedoch nicht befürwortet, da hierdurch unerwünschte Wirkungen nicht verhindert werden und der Eintritt des Wirkungsbegins verzögert wird (Dignass *et al.*, 2004). Die Therapie sollte über mindestens 4–6 Monate fortgeführt werden, da frühestens zu diesem Zeitpunkt ein Therapieversagen bewertet werden kann (Dignass *et al.*, 2004). Eine Anpassung der Dosierung sollte bei schwerer Leber- oder Niereninsuffizienz vorgenommen werden (Stichtenoth, 2009).

Die orale LD₅₀-Dosis für eine einzelne Dosis Azathioprin für Ratten und Mäuse beträgt 535 mg/kg bzw. 1389 mg/kg (Lewis, 1996). Sehr hohe Dosen führen im Tierversuch zu Myelosuppression, Blutungen, Infektionen und Tod. Carney *et al.* beschreiben einen Fall eines nierentransplantierten Patienten, der nach Einnahme von 7500 mg Azathioprin außer Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe, milder Leukopenie und leichten Abnormalitäten der Leberfunktion keine weiteren Auffälligkeiten zeigte (Carney *et al.*, 1974). Ein Antidot existiert nicht.

1.2.3 Pharmakokinetik

88 % von Azathioprin werden unter Abspaltung des Methylnitroimidazolrestes und dessen Bindung an Glutathion in der Leber zu 6-Mercaptopurin konvertiert. Diese Biotransformation wird durch Glutathion-S-Transferasen katalysiert und beinhaltet einen nukleophilen Angriff der Thiogruppe des zentralen Cysteins von Glutathion auf das elektrophile Kohlenstoff-Atom in Position 5 der Methylnitroimidazolverbindung. Weniger als 1 % von Azathioprin wird mittels Glutathion nicht-enzymatisch verstoffwechselt (Eklund *et al.*, 2006; Kurtovic *et al.*, 2008).

Der Anteil von 6-Mercaptopurin an Azathioprin beträgt 55 % auf das Molekulargewicht bezogen. Die Absorption im Gastrointestinaltrakt wird für Azathioprin mit 16 bis 50 % angegeben (Nielsen *et al.*, 2001). Für die orale Bioverfügbarkeit von 6-Mercaptopurin nach Gabe von 50 mg Azathioprin wurden Werte zwischen 27 und 83 %, im Median von 47 % dokumentiert (Van Os *et al.*, 1996). Diese Zahlen gelten für gesunde Probanden. Für Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, bei denen die Absorption im Intestinaltrakt durch Inflammation und verringerte Passagezeit erniedrigt sein könnte, liegen keine Studien vor. Der Einfluss von Nahrung auf die Resorption von Azathioprin wurde ebenfalls nicht untersucht. Für 6-Thioguanin konnten zwei Arbeitsgruppen (Lancaster *et al.*, 2001; Deibert *et al.*, 2003) keine Unterschiede in der Pharmakokinetik mit oder ohne Nahrungsaufnahme aufzeigen.

Die Plasmahalbwertszeit für 6-Mercaptopurin nach oraler Azathiopringabe wurde mit 1,5–2,5 Stunden ermittelt (Chan *et al.*, 1990; Odland *et al.*, 1986), zwischen 15 und 240 Minuten nach der Einnahme kann Azathioprin im Plasma nachgewiesen werden. Die Halbwertszeit für die Metaboliten 6-Thioguanin-Nukleotide wird von Sandborn *et al.* und Cuffari *et al.* mit drei Tagen bis zwei Wochen angegeben (Cuffari *et al.*, 2000; Sandborn *et al.*, 1995). Azathioprin und 6-Mercaptopurin werden mit einer Affinität von bis zu 30 % an Plasmaproteine gebunden (Balali-Mood, 1995). Die Gewebedistribution wurde am Menschen nicht untersucht, jedoch konnten Kurowski und Iven an der Maus zeigen, dass sich die Azathioprin-Metaboliten gleichmäßig in allen Organen verteilen (Kurowski und Iven, 1991). Der Metabolit 6-TGN ist plazentagängig und wurde in geringen Spuren in Fötalblut detektiert (De Boer *et al.*, 2006). 6-Mercaptopurin wurde in Muttermilch (Christensen *et al.*, 2008) nachgewiesen.

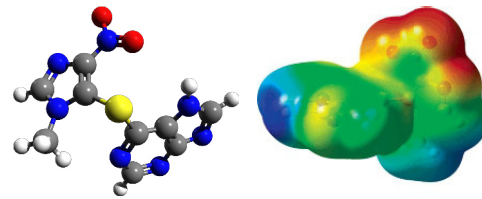


Abbildung 1.5: Dreidimensionales und elektrostatisches Modell von Azathioprin

Quelle: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b6/Azathioprine_3d_structure.png und Hoffmann *et al.* (2005).

Die Elimination von Azathioprin und seiner Metaboliten erfolgt vorwiegend über die Niere. Bis zu 50 % wird in Form verschiedener Metaboliten, insbesondere Thioharnsäure, im 24 Stunden-Urin ausgeschieden, ca. 2 % der Ausgangssubstanz gelangt unverändert in den Urin (Stichtenoth, 2009). Etwa 12 % des Medikaments kann im Stuhl quantifiziert werden (Balali-Mood, 1995). Azathioprin ist partiell dialysierbar.

1.2.4 Klinischer Einsatz in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Azathioprin ist eines der ältesten Immunsuppressiva mit breit gefächelter klinischer Anwendung und wird heute in der medikamentösen Therapie der rheumatoiden Arthritis, Autoimmunhepatitis, in der Behandlung verschiedener dermatologischer Krankheitsbilder wie Psoriasis, systemischer Lupus erythematoses, atopisches Ekzem, zur medikamentösen Therapie von malignen Erkrankungen wie akuten lymphatischen Leukämien im Kindesalter, nach Organtransplantationen sowie in der Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen eingesetzt (Sahasranaman *et al.*, 2008).

Auf den Konsensuskonferenzen der *Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten* und der *European Crohn's and Colitis Organisation* wurden die in Tabelle 1.1 ersichtlichen Indikationen für Azathioprin in der Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Therapie festgelegt.

In der Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ist Azathioprin insbe-

Tabelle 1.1: Indikationen für Azathioprin in der Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Morbus Crohn	Colitis ulcerosa
Steroideinsparung bei steroidrefraktärem Verlauf	Steroideinsparung bei steroidrefraktärem Verlauf
Steroideinsparung bei steroidabhängigem Verlauf	Remissionserhaltung bei chronisch aktivem Verlauf
Fistulierender Verlauf	Remissionserhaltung nach Ciclosporin- oder Tacrolimus-induzierter Remission
Stenosierender Verlauf	
Remissionserhaltung	
nach medikamentös induzierter Remission	
nach chirurgisch induzierter Remission	
schwerer Schub	
chronisch aktiver Verlauf ^{§,#}	
Frührezidiv der Colitis Crohn*	
ausgedehnter Dünndarmbefall	

[§]Aktive Erkrankung: Die Krankheitsaktivität beim Morbus Crohn wird allgemein in eine geringe, mäßige oder hohe eingruppiert. Die einzelnen Stufen sind dabei nicht genau definiert. Die meisten klinischen Studien legen fest, dass die Krankheitsaktivität nach Best (CDAI) > 220 liegen muss (Best *et al.*, 1976), bei Kindern und Jugendlichen entsprechend der pädiatrische Index (PCDAI) 30 Punkte oder mehr für eine mäßig bis hohe Erkrankungsaktivität. Angesichts der hohen Ansprechraten in Placebogruppen von kürzlich publizierten Studien wird in letzter Zeit zusätzlich ein CRP-Wert > 10 mg/l gefordert. Vgl. Hoffmann *et al.* (2008b).

[#]Chronisch-aktiver Verlauf: Der chronisch-aktive Verlauf ist gekennzeichnet durch eine Persistenz der klinischen Symptome trotz einer adäquaten medikamentösen Therapie, die zwar eine Besserung, jedoch keine vollständige und dauerhafte (< 2 Rezidive/Jahr) Remission bewirkt. Der Begriff der chronischen Aktivität kann entsprechend einer medikamentösen Stufentherapie auf verschiedene Therapieprinzipien bezogen werden. Vgl. Dignass *et al.* (2004).

*Frührezidiv: Ein Frührezidiv wird willkürlich definiert als ein Rezidiv innerhalb von drei Monaten nach erreichter Remission. Vgl. S3-Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn“ Ergebnisse einer Evidenz-basierten Konsensuskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten zusammen mit dem Kompetenznetz Chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Hoffmann *et al.* (2008c).

Quellen:

- European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management (Travis *et al.*, 2006b).
- S3-Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn“ Ergebnisse einer Evidenz-basierten Konsensuskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten zusammen mit dem Kompetenznetz Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Hoffmann *et al.*, 2008a).
- European evidence-based Consensus on the management of ulcerative colitis: Current management (Travis *et al.*, 2008).
- Diagnostik und Therapie der Colitis ulcerosa: Ergebnisse einer evidenzbasierten Konsensuskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten zusammen mit dem Kompetenznetz Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen (Hoffmann *et al.*, 2004).

sondere in der Remissionserhaltung^{2,3} und Steroideinsparung bedeutsam. Zum Remissionserhalt nach medikamentös oder chirurgisch induzierter Remission des Morbus Crohn stellt das Thiopurin die erste Wahl dar (Candy *et al.*, 1995; Fraser *et al.*, 2002b; Gonvers *et al.*, 2005; Pearson *et al.*, 1995; Peyrin-Biroulet *et al.*, 2009). Prefontaine und Mitarbeiter geben in ihrer Metaanalyse aus sieben randomisierten, Placebo-kontrollierten, doppelblinden Studien eine NNT (*number needed to treat*) von 6 und eine NNH (*number needed to harm*) von 20 an, wobei höhere Dosen das Ansprechen⁴ zu verbessern scheinen. Für Azathioprin wurden höhere *Response*-Raten ermittelt als für 6-Mercaptopurin (Prefontaine *et al.*, 2009b).

Im steroidrefraktären⁵ und steroidabhängigen⁶ Verlauf gilt der Immunmodulator mit einer NNT von 3 ebenfalls als Medikament der ersten Wahl (Gonvers *et al.*, 2007; McGovern und Travis, 2003; Prefontaine *et al.*, 2009a). Außerdem wird Azathioprin zur Behandlung des fistulierenden und stenosierenden Morbus Crohn eingesetzt (Taxonera *et al.*, 2009; Travis *et al.*, 2006b). Darüber hinaus dient es als wichtiges In-

²Remission des Morbus Crohn: Fehlende Symptome oder klinische Zeichen eines Morbus Crohn (Bauchschmerzen, Diarrhoe, Fisteln, andere intestinale und extraintestinale Symptome; CDAI < 150). Vgl. (Hoffmann, 2009a). Als Kriterium für eine Remission wird in klinischen Studien allgemein ein Abfall des CDAI auf unter 150 Punkte definiert, bei Kindern und Jugendlichen entsprechend der PCDAI kleiner oder gleich 10 Punkte. Diese Definition wird daher grundsätzlich für klinische Studien gefordert und dient als Richtwert für die klinische Praxis, wobei außerhalb von Studien wegen der fehlenden Praktikabilität der präzise CDAI nicht ermittelt werden muss. In Übereinstimmung mit der *International Organisation on Inflammatory Bowel disease* und der *European Crohn's and Colitis Organisation* wird für Studien zur Remissionserhaltung eine minimale Beobachtungsdauer von 12 Monaten gefordert. Vgl. Hoffmann *et al.* (2008b). In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich eine Beschwerdefreiheit von mindestens 3 Monaten in Verbindung mit fehlender Glukokortikoid- sowie Anti-TNF α -Medikation als Voraussetzung für das Vorliegen einer Remission definiert.

³Remission der Colitis ulcerosa: Nicht mehr als 3 Stühle/d, kein sichtbares Blut im Stuhl, keine intestinalen oder extraintestinalen Beschwerden. Vgl. Hoffmann (2009b). Die Remission einer Colitis ulcerosa wird anhand der klinischen Parameter (d. h. Verschwinden der initialen Krankheitssymptome) definiert. Hinweise zur Remissionsbeurteilung liefern Laborwerte (CRP, Hb, Leukozyten, BSG). Aufgrund fehlender Kenntnisse zur Ätiologie muss die Definition einer Remission der Erkrankung auf der Basis der klinischen Symptome erfolgen, die für die Definition des akuten Schubs verwendet wird. Vgl. Reissmann *et al.* (2004).

⁴Ansprechen: Ein Ansprechen oder eine *Response* auf eine Behandlung wird in Studien durch einen Abfall des CDAI von mindestens 100 Punkten definiert. Diese Definition wird daher grundsätzlich für klinische Studien gefordert und dient als Richtwert für die klinische Praxis, wobei außerhalb von Studien der präzise CDAI nicht ermittelt werden muss. Vgl. Hoffmann (2009a).

⁵Steroidrefraktärer Verlauf: Patienten mit aktiver Erkrankung trotz einer systemischen Steroidtherapie (mindestens 0,75 mg Prednisolonäquivalent/kg Körpergewicht/Tag) über mindestens vier Monate. Vgl. Hoffmann (2009a).

⁶Steroidabhängiger Verlauf: Patienten, die entweder die Steroiddosis innerhalb von vier Monaten nach Beginn der Steroidtherapie nicht vollständig ausschleichen können, ohne dass es zu einem Rezidiv kommt, oder die innerhalb von drei Monaten nach der Beendigung der Steroidmedikation ein Rezidiv bekommen. Beide Möglichkeiten setzen voraus, dass Komplikationen des Morbus Crohn nicht aufgetreten sind. Zu betonen ist, dass die Zielsetzung stets sein sollte, Steroide vollständig auszuschleichen. Vgl. Hoffmann (2009a).

strument der Remissionsinduktion (McGovern und Travis, 2003; Prefontaine *et al.*, 2009a). Weitere mögliche Indikationen des Immunmodulators stellen nach Definition der Konsensuskonferenz der *European Crohn's and Colitis Organisation* das schwere Rezidiv⁷, zwei oder mehr Steroidzyklen während eines Jahres, ein Rückfall unter 15 mg Prednisolon oder ein Rückfall nach drei Monaten ohne Prednisolon sowie die postoperative Prophylaxe eines fistulierenden oder ausgedehnten Befalls dar (Travis *et al.*, 2006a). Azathioprin als intravenöse Gabe zeigt keine schnellere *Response* als die Tablettenform (Sandborn *et al.*, 1999).

Für Colitis ulcerosa ist die Datenlage nicht so klar umrissen wie für den Morbus Crohn. Dennoch kann auch hier das Fazit gezogen werden, dass sich Azathioprin als effektiv für den Remissionserhalt (Fraser *et al.*, 2002b; Sood *et al.*, 2002; Timmer *et al.*, 2007) erweist und einen steroidsparenden Effekt besitzt (Ardizzone *et al.*, 2006; Mate-Jimenez *et al.*, 2000).

Weiterhin kommt Azathioprin eine Bedeutung im Remissionserhalt nach Ciclosporin-induzierter Remission in steroidrefraktären oder -intoleranten Patienten zu (Actis *et al.*, 2001; Domenech *et al.*, 2002). Ardizzone und Mitarbeiter untermauern die Wirksamkeit des Antimetaboliten zur Vermeidung der Kolektomie bei Colitis ulcerosa-Patienten (Ardizzone *et al.*, 1997). Auch hier gelten die in den Leitlinien der *European Crohn's and Colitis Organisation* festgelegten Grundsätze analog zum Morbus Crohn: Azathioprin soll zur Therapie des schweren Rezidivs, bei zwei oder mehr Steroidzyklen während eines Jahres, bei einem Rückfall unter 15 mg Prednisolon oder einem Rückfall nach drei Monaten ohne Prednisolon eingesetzt werden (Travis *et al.*, 2008).

Sein langsamer Wirkungseintritt nach drei bis sechs Monaten verbietet den Einsatz von Azathioprin als singuläre Medikation im akuten Schub⁸. In einer Studie von Present *et al.* an 83 Morbus Crohn-Patienten liegt die durchschnittliche Zeit bis zum Ansprechen auf 6-Mercaptopurin bei 3,1 Monaten (Present *et al.*, 1980). Prefontaine und Kollegen kommen in ihrer Metaanalyse, in die acht randomisierte, Plazebo-kontrollierte Studien eingeschlossen wurden, zu dem Ergebnis, dass eine Mindestbehandlungsdauer von Azathioprin mit > 17 Wochen gerechtfertigt sei (Prefontaine *et al.*, 2009a) und auch Candy und seine Arbeitsgruppe konstatieren, dass eine Therapiedauer von 12 Wochen nicht ausreichend ist, um Unterschiede bezüglich des Erreichens der Remission zwischen der Azathioprin- und der Plazebo-Gruppe auszumachen (Candy *et al.*, 1995).

⁷Rezidiv: Ein Rezidiv ist gekennzeichnet durch das Wiederauftreten von Symptomen bei einem Patienten mit bekanntem Morbus Crohn, bei dem eine Remission bestand. Vgl. Hoffmann (2009a).

⁸Der akute Schub eines Morbus Crohn wird ebenso wie die Indikation zur Therapie durch die klinische Symptomatik in Verbindung mit Laborwerten (BSG, CRP, Hb/Hkt, Thrombozyten) definiert. Weitere diagnostische Verfahren können symptombezogen zusätzlich erforderlich sein; die Möglichkeit einer infektiösen Ursache der Beschwerden sollte bedacht werden. Vgl. (Hoffmann *et al.*, 2008a). Der akute Schub einer Colitis ulcerosa ist durch die typischen klinischen Beschwerden, d. h. blutige Diarrhoe und ggf. Tenesmen charakterisiert. Verbindliche Definitionen des akuten Schubes einer Colitis ulcerosa liegen bislang nicht vor. Vgl. Reissmann *et al.* (2004).

Lémann und Mitarbeiter können in ihren Untersuchungen dokumentieren, dass das Fortsetzen der Therapie nach 3,5 Jahren Azathioprin-Einnahme im Rahmen eines Morbus Crohn nicht gleichwertig ist mit dem Absetzen des Medikaments. Die Rezidivquoten liegen 18 Monate nach Therapieende der mindestens 42-monatigen Azathioprin-Therapie bei 8 % für die Azathioprin- bzw. 21 % für die Plazebo-Gruppe. Aufgrund dessen wird eine Fortführung der Erhaltungstherapie über diesen Zeitraum hinaus empfohlen (Lémann *et al.*, 2005). Holtmann und Mitarbeiter gelangen in der größten retrospektiven Studie dieser Art an 1176 Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten zu dem Schluss, dass für Morbus Crohn-Patienten ein Absetzen der immunsuppressiven Medikation nach drei bis vier Jahren bei kompletter, stabiler Remission des Patienten in Betracht zu ziehen ist. Andernfalls sollte die Therapie weitergeführt werden. Für Colitis ulcerosa zeigte sich nach Absetzen der Therapie nach drei bis vier Jahren eine Reaktivierung der Erkrankung, so dass hier eine Fortführung über mehr als vier Jahre erwogen werden sollte (Holtmann *et al.*, 2006). Auch die Leitlinien der *Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten* raten für die Colitis ulcerosa zu einem Fortsetzen der Therapie für drei bis fünf Jahre (Dignass *et al.*, 2004).

1.2.5 Unerwünschte Wirkungen

Unerwünschte Arzneimittelwirkungen manifestieren sich in der Therapie mit Azathioprin bei bis zu 28 % der Patienten (Kirschner, 1998; Marinaki *et al.*, 2004). Am häufigsten tritt eine Unverträglichkeitsreaktion mit grippeähnlichen Symptomen, Myalgien, Nausea und Diarrhoen wenige Wochen nach Einnahmebeginn auf. Da bei diesen unspezifischen und nicht dosisabhängigen Symptomen meist 6-Mercaptopurin gut vertragen wird, liegt die Schlussfolgerung nahe, den Methylnitroimidazolrest für die Beschwerden verantwortlich zu machen (McGovern *et al.*, 2002). Die schwerste Nebenwirkung unter Azathioprin ist die Myelosuppression, die sich in Leukopenien, aber auch Thrombozytopenien und selten in Panzytopenien äußert. Je nach Definition tritt die Leukopenie bei 5 bis 15 % der Patienten in Erscheinung und kann sich sowohl zu Therapiebeginn als auch Jahre später manifestieren (Connell *et al.*, 1993; Dubinsky *et al.*, 2000; Sahasranaman *et al.*, 2008). Panzytopenien sind mit weniger als 1 % selten (Connell *et al.*, 1993). Etwa 11 % der Patienten weisen eine herabgesetzte Aktivität der Thiopurin-*S*-Methyltransferase (TPMT) mit heterozygotem Genotyp auf. Bei 0,3 % besteht eine stark erniedrigte TPMT-Aktivität mit homozygotem Genotyp und damit ein erhöhtes Risiko für die Entstehung schwerer hämatologischer Nebenwirkungen (Weinshilboum und Sladek, 1980). Eine Therapie mit Azathioprin ist durch einen Defekt des TPMT-Enzyms jedoch nicht ausgeschlossen, allerdings ist die vorsichtige Titrierung der Dosis vonnöten (Kaskas *et al.*, 2003). Eine TPMT-Defizienz liegt bei nur 27 % der Patienten mit Myelosuppression vor, somit lässt sich nur eine Minderheit durch diesen Defekt erklären. Colombel *et al.* vermuten als weitere Ursachen für die Entstehung einer Myelosuppression virale Infekte oder eine spezifische Komedikation (Colombel *et al.*, 2000).

Die Knochenmarkdepression ist wie die cholestatische Hepatitis, die bei etwa 0,3 % der Patienten diagnostiziert wird, dosisabhängig und ist in der niedriger dosierten immunsuppressiven Therapie weniger verbreitet als in der höher dosierten zytostatischen Therapie. Pankreatitiden sind mit einer Häufigkeit von etwa 3 % vertreten (Hoffmann *et al.*, 2008a). Selten, aber mit hoher Mortalität verknüpft, ist die akute Venenverschlusskrankheit der Leber (*veno-occlusive disease*), welche zwar auch mit Azathioprin assoziiert wird, jedoch häufiger für 6-Thioguanin dokumentiert wird (Holtmann *et al.*, 2003). Etwa 8 % der Patienten erleiden bakterielle oder virale (Varizella-Zoster-Virus, Cytomegalie-Virus) Infektionen (Kirschner, 1998). Einzelfallberichte liegen zur progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (Focharoen *et al.*, 2006), zur interstiellen Nephritis (McHenry *et al.*, 1993; Parnham *et al.*, 1996) sowie zur Pneumonitis (Nagy *et al.*, 2007) vor.

Azathioprin ist im Tierversuch karzinogen. Beim Menschen wurde für Patienten nach Nieren- oder Herztransplantation mit Kombinationstherapien bestehend aus Azathioprin plus Ciclosporin ein 1,5-fach erhöhtes Risiko für Non-Hodgkin-Lymphome konstatiert (Opelz und Henderson, 1993). Für Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen unter Azathioprin-Therapie ist die Datenlage nicht eindeutig. Während einige Autoren ein gering erhöhtes Krebsrisiko, insbesondere für Non-Hodgkin-Lymphome, verzeichneten (Armstrong *et al.*, 2010; Dayharsh *et al.*, 2002; Lewis *et al.*, 2001), postulieren Kandiel und Mitarbeiter in einer Metaanalyse ein bis zu vierfach erhöhtes Lymphom-Risiko (Kandiel *et al.*, 2005). Wieder andere Arbeitsgruppen konnten keine erhöhte Gefährdung im Vergleich zur Gesamtbevölkerung feststellen (Connell *et al.*, 1994b; Fraser *et al.*, 2002a; Loftus Jr. *et al.*, 2000).

Im Tierversuch sind hohe Dosen Azathioprin teratogen und verursachen in Kaninchen Skelett- und viszerale Abnormalitäten, in Mäusen wirken sie letal. Beim Menschen ist die Situation weniger klar; meist wird die Azathioprin-Therapie in der Praxis während einer Schwangerschaft fortgeführt, da sie als sicher gilt (Dignass *et al.*, 2009; Peyrin-Biroulet *et al.*, 2011). Allerdings wird Azathioprin von der *Food and Drug Administration* der Schwangerschaftskategorie D zugeordnet und zählt damit zu denjenigen Substanzen, für die ein Risiko für den Fötus gesichert wurde, die jedoch bei Überwiegen des Nutzen über das Risiko weiterhin angewendet werden sollen (Kwan und Mahadevan, 2010; Mottet *et al.*, 2007). Aus Studien in der Transplantationsmedizin geht hervor, dass durch Azathioprin keine erhöhten Inzidenzen bezüglich Früh- und Totgeburten, niedrigem Geburtsgewicht und Abnormalitäten hervorgerufen werden (Penn *et al.*, 1980). In einigen Studien mit niedriger Fallzahl an Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen unter Azathioprin-Therapie werden Frühgeburten oder ein niedriges Geburtsgewicht beobachtet, allerdings ist unklar, ob dies durch die Medikation oder die Grunderkrankung verursacht ist (Langagergaard *et al.*, 2007; Norgard *et al.*, 2007), da auch Rezidive das Risiko eines erniedrigten Geburtsgewichtes oder einer Frühgeburt bergen (Reddy *et al.*, 2008). Francella *et al.* (2003) analysierten 325 Geburten und dokumentierten weder für 6-Mercaptopurin-behandelte Mütter noch für Väter ein erhöhtes Risiko für Abnormalitäten beim Neugeborenen.

Azathioprin ist im *Ames*-Test an *Salmonella typhimurium* mutagen (Speck und Ro-

senkranz, 1976) und auch beim Menschen wurden reversible chromosomale Aberrationen identifiziert (Voogd, 1981). In einer Untersuchung von Nguyen und Mitarbeitern wurden auch Veränderungen in Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nachgewiesen (Nguyen *et al.*, 2009). Weitere Untersuchungen bezüglich der klinischen Bedeutsamkeit bleiben abzuwarten.

1.2.6 Arzneimittelinteraktionen

Die Komedikation kann die Pharmakokinetik von Azathioprin verändern und hierüber zu unerwünschten Wirkungen führen, wenn keine engmaschige Kontrolle der Therapie erfolgt. Allopurinol hemmt über das Enzym Xanthinoxidase den *First pass*-Metabolismus von 6-Mercaptopurin und induziert dadurch einen Anstieg des Metaboliten 6-TGN und einen Abfall von 6-MMP. Vor dem Hinzufügen von Allopurinol zu einer bestehenden Azathioprin-Therapie sollte dieses auf 25 % der Ausgangsdosis reduziert werden und eine regelmäßige Überwachung des Blutbildes sichergestellt werden. Rahhal und Bishop (2008) und Gardiner und Kollegen (Gardiner *et al.*, 2011) postulieren die Verwendung von Allopurinol für Patienten mit schwachem Ansprechen auf die Azathioprin-Therapie. Sulfasalazin und Mesalazin bewirken eine Hemmung der TPMT *in vitro* (Szumlanski und Weinshilboum, 1995; Xin *et al.*, 2005a) und möglicherweise auch *in vivo*, resultierend in erhöhten 6-TGN-Spiegeln und einem erhöhten Risiko für Leukopenien (Gilissen *et al.*, 2005; Lowry *et al.*, 2001a). Einen ähnlichen Effekt beobachteten Roblin und Mitarbeiter ein bis drei Wochen nach Gabe von Infliximab an Morbus Crohn-Patienten unter bestehender Azathioprin-Therapie. Ein Anstieg von 6-TGN und MCV sowie ein Abfall der Leukozyten konnten demonstriert werden, wobei die Ausgangswerte nach drei Monaten wieder erreicht waren. 6-TGN-Spiegel über $400 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ (*red blood cells*) waren mit einem guten Ansprechen und guter Verträglichkeit von Infliximab assoziiert (Roblin *et al.*, 2003). Azathioprin vermindert die Wirksamkeit von Warfarin über einen Mechanismus, bei dem vermutlich die Induktion hepatischer Enzyme eine Rolle spielt (Singleton und Conyers, 1992). Auch für Furosemid wird in *Ex-vivo*- und *In-vitro*-Studien eine Inhibition der TPMT beschrieben (Lysaa *et al.*, 1996; Xin *et al.*, 2005b), allerdings konnte die klinische Relevanz bis jetzt nicht in klinischen Studien bestätigt werden.

1.2.7 Metabolismus von Azathioprin

Im Vergleich zum Metabolismus anderer Medikamente ist der Azathioprin-Metabolismus komplex. Nach der enzymatischen Konversion von Azathioprin zu 6-Mercaptopurin durch die Glutathion-S-Transferasen erfolgt die Aufnahme in die Zelle über den hENT2- (*human concentrative nucleoside transporter*) und hCNT3- (*human equilibrative nucleoside transporter*) Transporter (Fotoohi *et al.*, 2006b; Nagai *et al.*, 2007; Peng *et al.*, 2008) und die weitere intrazelluläre Metabolisierung über vier mögliche Enzymwege (Abbildung 1.6 und Abbildung 5.1 auf Seite 136).

84 % der Ausgangssubstanz 6-Mercaptopurin werden durch die katabole Xanthinoxidase (EC⁹ 1.17.3.2) zur inaktiven und wenig toxischen Thioharnsäure oxidiert. Dieses Enzym scheint in hämatopoetischem Gewebe eine untergeordnete Bedeutung inne zu haben. Daneben katalysiert auch die Aldehydoxidase (EC 1.2.3.1) die Oxidation von 6-Mercaptopurin zu den inaktiven 8-Hydroxy-Analoga 8-Hydroxy-Mercaptopurin (8-OHMP) für 6-Mercaptopurin und 8-Hydroxy-Thioguanin (8-OHTG) für 6-Thioguanin. Durch das Enzym Thiopurin-S-Methyltransferase (TPMT, EC 2.1.1.67) werden 15 % der Ausgangssubstanz durch S-Methylierung zu 6-Methyl-Mercaptopurin (6-MMP) verstoffwechselt. Nur etwa 1 % wird durch die anabole Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT, EC 2.4.2.8) unter Beteiligung von Phosphoribosyl-Pyrophosphat (PRPP) zum aktiven Metaboliten 6-Thioinosin-5'-Monophosphat (TIMP) konvertiert. TIMP stellt das zentrale Enzym im Azathioprin-Metabolismus dar, da von TIMP ausgehend vier weitere Verstoffwechslungsmöglichkeiten bestehen. Im wichtigsten Weg wird TIMP in einem Zwei-Schritt-Mechanismus über die Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH, EC 1.1.1.205) 1 zu Thioxanthin-Monophosphat (TXMP) und über die Guanosin-Monophosphat-Synthetase (GMPS, EC 6.3.4.1) zu 6-Thioguanosin-5'-Monophosphat (TGMP) metabolisiert. In zwei weiteren Schritten wird durch die Nucleosid-Monophosphat-Kinase (NMPK, EC 2.7.4.4) und die Nucleosid-Diphosphat-Kinase (NDPK, EC 2.7.4.6) A und B über TGMP die Entstehung von 6-Thioguanosin-5'-Diphosphat (TGDP) und 6-Thioguanosin-5'-Triphosphat (TGTP) katalysiert (Karner *et al.*, 2010; Bakker *et al.*, 2007). Über die Ribonucleosid-Diphosphat-Reduktase (RNR, EC 1.17.4.1) (Fotoohi *et al.*, 2010) ist aus TGDP die Bildung von 2'-deoxy-6-Thioguanosin-Diphosphat (dTGDP) und über eine weitere Kinase die Synthese von 2'-deoxy-6-Thioguanosin-Triphosphat (dTGTP) möglich. Die Thioguanin-Nucleotide (TGN) und Deoxy-Thioguanin-Nucleotide gelten als aktive Metaboliten für den Einbau in DNA und RNA (Abreu *et al.*, 1995; Bökkerink *et al.*, 1993; Maybaum und Mandel, 1983; Pan und Nelson, 1990). TPMT methyliert die drei TGN TGMP, TGDP und TGTP zu den 6-Methyl-Thioguanin-Nucleotiden (MTGN) 6-Methyl-Thioguanosin-Monophosphat (meTGMP), 6-Methyl-Thioguanosin-Diphosphat (meTGDP) und 6-Methyl-Thioguanosin-Triphosphat (meTGTP).

TIMP kann jedoch ebenso durch die TPMT zu Methyl-Thioinosin-Monophosphat (meTIMP) methyliert werden, einem starken Hemmstoff der *De Novo*-Purin-Nucleotid-Synthese (DNPS) (Fotoohi *et al.*, 2010), und dieses dann über die NMPK und NDPK zu 6-Methyl-Thioinosin-Diphosphat (meTIDP) und 6-Methyl-Thioinosin-Triphosphat (meTITP) verstoffwechselt werden. Weiterhin kann TIMP auch über die NMPK und NDPK zu Thioinosin-Diphosphat (TIDP) und Thioinosin-Triphosphat (TITP) phosphoryliert und über die Inosin-Triphosphat-Pyrophosphatase (ITPase, EC 3.6.1.19) wieder zu TIMP dephosphoryliert werden. TITP kann statt durch die ITPase auch durch die TPMT zu 6-Methyl-Thioinosin-Triphosphat (meTITP) methyliert werden. Die vierte Möglichkeit für die Verstoffwechslung von TIMP besteht

⁹Enzyme Commission Number, Quelle: Brenda Enzyme Database, <http://www.brenda-enzymes.org/> (abgerufen am 09.04.2010).

in der Rückumwandlung zu 6-Mercaptopurin durch die Purin-5'-Nukleotidase (5'-NT, EC 3.1.3.5) (Bakker *et al.*, 2007; Fotoohi *et al.*, 2010). Der oben erwähnte Metabolit 6-MMP kann durch die HGPRT unter Mitwirkung von PRPP zu meTIMP umgewandelt werden.

Überexpression der *multidrug resistance-associated proteins* (MRP) 4 und 5 scheinen mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Azathioprin assoziiert zu sein. So konnten Wielinga und Kollegen (2002) demonstrieren, dass die Metaboliten TIMP, TXMP, TGMP und meTIMP durch MRP4 und MRP5 vermehrt aus der Zelle transportiert werden.

6-Thioguanin wird zunächst ebenfalls durch hENT2- und hCNT3-Transporter in die Zelle aufgenommen (Fotoohi *et al.*, 2006a; Nagai *et al.*, 2007) und dort in nur einem Schritt über die HGPRT in TGMP konvertiert. Weitere Stoffwechselwege werden durch die TPMT mit meTG bzw. meTGMP als Endprodukt katalysiert. Die nachfolgende Verstoffwechslung von TGMP entspricht dem Azathioprin-/6-Mercaptopurin-Metabolismus.

1.2.8 Wirkmechanismus von Azathioprin

Neben dem oben erwähnten Einbau der aktiven Metaboliten in DNA und RNA und daraus resultierender Zytotoxizität durch Arretierung des Zellzyklus und Apoptose besteht eine Hemmung der DNPS durch die Inhibition der Phosphoribosyl-Pyrophosphat-Amidotransferase (PPAT, EC 2.4.2.14) durch meTIMP mit nachfolgender Depletion der Adenosin-Speicher (Quéméneur *et al.*, 2003; Stet *et al.*, 1993; Tay *et al.*, 1969). Das *Mismatch Repair*-System (MMR) erkennt den Einbau von dTGTP in DNA. Defekte im MMR sind mit einer Resistenz gegenüber Thiopurinen assoziiert (Karran, 2001; Swann *et al.*, 1996).

Jüngst konnte gezeigt werden, dass der Metabolit TGTP, der anstelle von GTP an die zur rho-Familie zählende kleine GTPase *ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* (Rac1), nicht aber an *rat sarcoma* (Ras) bindet, eine Inhibition der CD28-Kostimulation von T-Lymphozyten, insbesondere CD45RO-Effektor-T-Zellen, bewirkt. Das Ausbleiben des CD28-Signals führt in den betroffenen Zellen zu Anergie, zum aktivierungs-induzierten Zelltod (*activation induced cell death*, AICD) oder zur Apoptose. CD28 vermittelt über Vav eine Aktivierung von Rac1 und konsekutiv über die Aktivierung von *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) und *mitogen-activated kinase kinase kinase* (MEKK1) über NF- κ B die Hochregulation von *B-cell lymphoma extra long*-(bcl-x_L) mRNA und -Protein. Durch Bindung von TGTP statt GTP erfolgt eine Inhibition von bcl-x_L mit Wegfall des antiapoptotischen Signals, es kommt zur Apoptose mononukleärer Zellen *in vivo* (Tiede *et al.*, 2003). Die Akkumulation von TGTP-gebundenem Rac1 führt über eine Inhibition von Vav zu einer Blockade der Ezrin-Radixin-Moesin-Dephosphorylierung in T-Lymphozyten. Dies hat eine Hemmung der T-Zell-APC-Konjugation zur Folge (Poppe *et al.*, 2006).

2 Zielsetzung der Arbeit

Die Ätiopathogenese der beiden chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa ist bislang nicht vollständig geklärt. Man geht heute von einer multifaktoriellen Genese unter Beteiligung genetischer, immunologischer, mikrobiologischer und ökologischer Faktoren aus. Eine kausale Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen existiert nicht. Ziel der Therapie ist somit die Linderung der Symptomatik mit Reduktion der intestinalen Entzündungsaktivität und Elevation der Lebensqualität. Es wird zwischen Remissionsinduktion und Remissionserhaltung differenziert. Zum Einsatz kommen Glukokortikoide, 5-Aminosalizylate, Biologika sowie klassische Immunsuppressiva. Azathioprin wird, trotz der unterschiedlichen Ätiopathogenese beider Krankheitsentitäten, seit einigen Jahrzehnten erfolgreich in der Therapie von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa eingesetzt. Für den Remissionserhalt des Morbus Crohn sowie den steroidrefraktären und -abhängigen Verlauf stellt das Thiopurin mit seinem steroideinsparenden Effekt die erste Wahl dar. Der molekulare Wirkmechanismus von Azathioprin, einem der ältesten Immunsuppressiva, konnte bis heute nicht vollständig aufgeklärt werden. Der Anteil der Patienten mit unerwünschten Wirkungen unter Azathioprin-Therapie liegt bei bis zu 28 %. Ein Ansprechen auf die Therapie kann aufgrund des verzögerten Wirkungseintritts des Medikamentes frühestens nach drei bis sechs Monaten beurteilt werden. Somit könnte eine Entschlüsselung des molekularen Wirkmechanismus der Weiterentwicklung des Pharmakons dienen und zur Optimierung der pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften genutzt werden.

Azathioprin wird unter Beteiligung von Glutathion-S-Transferasen und Glutathion zu 6-Mercaptopurin und einem Methylnitroimidazol-Rest aufgespalten und über hENT2- und hCNT3-Transporter in die Zelle aufgenommen. Etwa 1 % der Ausgangssubstanz wird durch HGPRT über IMPDH1 und GMPS in die Thioguanin-Nukleotide TGMP, TGDP und TGTP metabolisiert, welche als aktive Metaboliten gelten und durch Einbau in sich replizierende DNA und RNA zytotoxisch wirken. Das *Mismatch Repair*-System erkennt den Einbau falscher Nukleotidbasen in die DNA und scheint eine entscheidende Rolle im Wirkmechanismus der Thiopurine zu spielen. Der Metabolit meTIMP hemmt die Phosphoribosyl-Pyrophosphat-Amidotransferase und damit die *De Novo*-Purin-Nukleotid-Synthese. Diese Modelle liefern jedoch keine Erklärung für das spezifische Nebenwirkungsprofil und den langsamen Wirkungseintritt von Azathioprin.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die kleine GTPase Rac1 an den Azathioprin-Metaboliten TGTP bindet und über das Ausbleiben der Hochregulation von bcl-x_L

über MEKK1, NF- κ B und STAT3 und den Wegfall des antiapoptotischen Signals von $\text{bel-}\alpha_{\text{L}}$ eine Inhibition der CD28-Kostimulation von CD4^+ -Lymphozyten bewirkt und damit zur Apoptose in mononukleären Zellen führt. Darüber hinaus kommt es über eine Blockade der ERM-Dephosphorylierung zu einer Inhibition der T-Zell-APC-Konjugation. *In vivo* konnte eine Azathioprin-Therapie-vermittelte vermehrte Apoptoserate unter Lamina propria-T-Lymphozyten nachgewiesen werden.

In der nachfolgenden Arbeit soll anhand einer prospektiven Studie untersucht werden, inwieweit es möglich ist, mittels des Metaboliten TGTP bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zwischen Ansprechen bzw. Remission und aktiver Erkrankung zu differenzieren. Durch ein verbessertes und spezifischeres Monitoring könnten Therapieversager frühzeitig identifiziert und ihre Therapie optimiert werden. Die Messung des bis dato nicht messbaren Metaboliten TGTP soll mit einer neuartigen, spezifischen und hoch sensitiven HPLC-Methode erfolgen.

Spezifische Fragestellungen:

1. Korreliert der Metabolit TGTP mit anderen messbaren Metaboliten (6-TGN, TGMP, TGDP, 6-MMP, MTGN) oder Enzymen (TPMT-Aktivität)?
2. Gibt es Unterschiede in den TGTP-Spiegeln von Patienten mit aktiver Erkrankung *versus* Patienten in Remission?
3. (a) Eignet sich TGTP für ein Monitoring der Azathioprin-Therapie in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, d. h. werden Therapieversager zuverlässig identifiziert?
(b) Und als Konsequenz daraus: Kann TGTP als Instrument für die Prädiktion eines Ansprechens auf die Azathioprin-Therapie eingesetzt werden?
4. Ist die Höhe des Metaboliten TGTP mit der absoluten Azathioprin-Dosierung oder der Dosierung pro Kilogramm Körpergewicht assoziiert?
5. Bestehen krankheits- oder geschlechtsabhängige Auffälligkeiten oder Abweichungen, die durch die Komedikation bedingt sein könnten bezüglich der Höhe der TGTP-Spiegel?

3 Material und Methoden

3.1 Material

Die per Venenpunktion gewonnenen Proben aus EDTA-Blut der Patienten wurden zunächst im Labor der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz bis zu vier Stunden nach Entnahme bei 4° C gelagert und anschließend verarbeitet. Gepackte Erythrozyten wurden hergestellt und unverzüglich bei -80° C eingefroren. Jeweils 10–20 Proben wurden gesammelt per Übernacht-Versand auf Trockeneis an das Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie in Stuttgart gesandt und dort ohne zwischenzeitliches Auftauen weiterverarbeitet. Die meisten der nachfolgend beschriebenen Materialien und sämtliche später beschriebenen Puffer, Medien und Lösungen wurden daher am Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut verwendet. Ebenso fand die gesamte Durchführung der Messungen dort statt. Aufgrund der anonymisierten Weiterleitung der EDTA-Proben war das Laborpersonal bezüglich der persönlichen Daten der Patienten verblindet.

286 Proben von 172 Testpersonen wurden in einem Zeitraum von Oktober 2003 bis Oktober 2007 ausgewertet. Zusätzlich wurden von 12 gesunden Probanden ohne Medikamenteneinnahme Blutproben für die Gewinnung von Blank-Erythrozyten entnommen (siehe Kapitel 3.2.1 und 3.2.2).

Aus den 286 abgenommenen EDTA-Proben wurden die in den Erythrozyten als Nukleotide vorliegenden drei Mercaptopurin-Basen 6-Thioguanin (6-TG), 6-Methyl-Mercaptopurin (6-MMP) und 6-Methyl-Thioguanin (6-MTG) detektiert. Die Basen wurden durch saure Hydrolyse aus den Erythrozyten-Nukleotiden 6-Thioguanin-Nukleotide (6-TGN), 6-Mercaptopurin-Nukleotide (6-MMPN) und 6-Methylthioguanosin-Nukleotide (6-MTGN) freigesetzt. Die drei Nukleotide von 6-Thioguanin wurden separat nach einer modifizierten Methode von Rabel *et al.* (1995) isoliert, extrahiert und oxidiert und durch einen neuen HPLC-Assay gemessen: 6-Thioguanosin-5'-Monophosphat (TGMP), 6-Thioguanosin-5'-Diphosphat (TGDP) sowie 6-Thioguanosin-5'-Triphosphat (TGTP). Die Gesamt-TGN-Spiegel wurden unabhängig von TGMP, TGDP und TGTP durch einen validierten HPLC-Assay bestimmt (Herrlinger *et al.*, 2004). Des Weiteren wurde die Aktivität der Thiopurin-*S*-Methyltransferase (TPMT) nach einer Methode von Kröplin *et al.* (1998) und Schäffeler und Mitarbeitern (2001) analysiert. Sämtliche Proben wurden als Duplikate analysiert. Im einzelnen wurden folgende Substanzen quantifiziert:

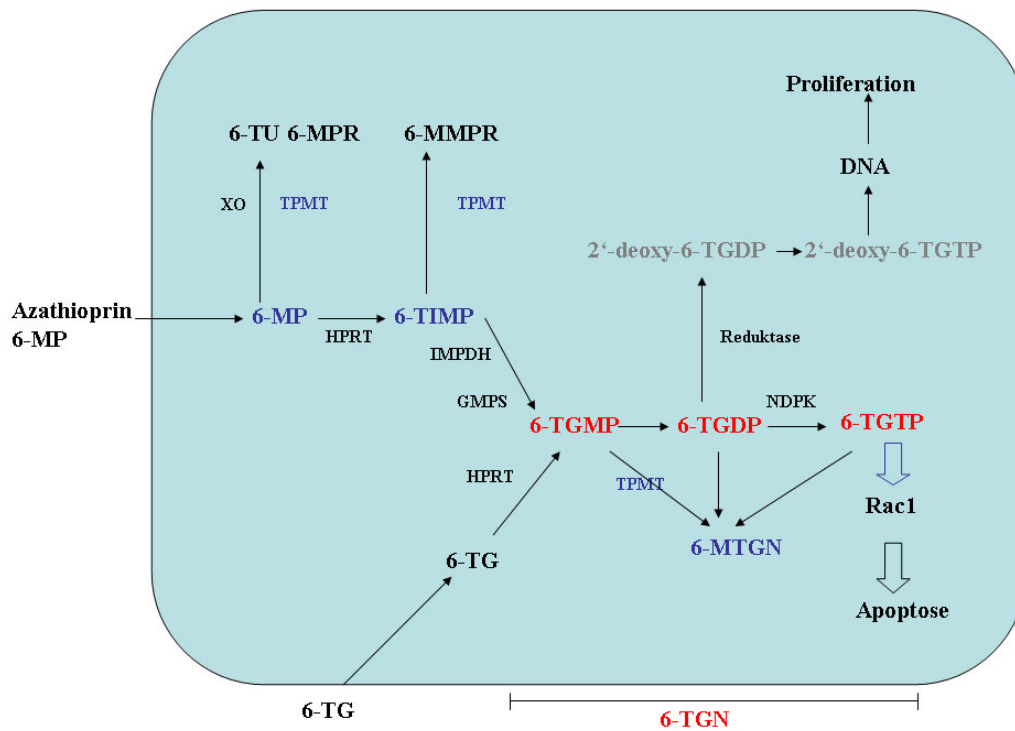


Abbildung 3.1: Metabolismus von Azathioprin, 6-Mercaptopurin und 6-Thioguanin

Vereinfachte schematische Darstellung des Azathioprin-Metabolismus. Azathioprin und 6-Mercaptopurin werden über die Enzyme HGPRT, IMPDH1 und GMPS in die Thioguanin-Nukleotide TGMP, TGDP und TGTP metabolisiert. 6-Thioguanin wird über die HGPRT in die Thioguanin-Nukleotide konvertiert. Der Metabolit TGTP löst über die Inhibition von Rac1 Apoptose aus. Modifiziert nach Karner *et al.* (2010) und Neurath *et al.* (2005).

- 6-Thioguanin-Nukleotid-Spiegel (6-TGN) und deren Nukleotide (gemessen als Mercaptopurin-Basen)
 - 6-Thioguanosin-5'-Monophosphat (TGMP)
 - 6-Thioguanosin-5'-Diphosphat (TGDP)
 - 6-Thioguanosin-5'-Triphosphat (TGTP)
- 6-Methylthioguanosin-Nukleotide (6-MTGN)
- 6-Mercaptopurin-Nukleotide (6-MMPN)
- Thiopurin-*S*-Methyltransferase-Aktivität (TPMT-Aktivität)

Abbildung 3.1 zeigt den vereinfachten Metabolismus von Azathioprin bzw. 6-Mercaptopurin (6-MP). 6-Mercaptopurin und sein Prodrug Azathioprin werden über ver-

schiedene Zwischenschritte in die im Rahmen der Studie gemessenen Metaboliten 6-Thioguanosin-5'-Monophosphat (TGMP), -Diphosphat (TGDP) und -Triphosphat (TGTP) metabolisiert, wobei an der direkten Umwandlung von 6-MP zu TGMP drei Enzyme beteiligt sind: die HGPRT, die IMPDH1 sowie die GMPS. Die NMPK katalysiert die Verstoffwechslung von TGMP zu TGDP. Dieses wird durch die NDPK A und B zu TGTP konvertiert (Karner *et al.*, 2010). Durch die TPMT erfolgt über eine S-Methylierung die Entstehung von 6-Methyl-Mercaptopurin (6-MMP) sowie Methyl-Thioinosin-Monophosphat (meTIMP) und 6-Methylthio-guanosin-Nukleotide (MTGN).

3.1.1 Materialien, Chemikalien und Geräte

Tabelle 3.1: *Verwendete Materialien an der Universitätsklinik Mainz*

Nachfolgende Materialien, Chemikalien und Geräte wurden im Labor der I. Medizinischen Klinik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz verwendet.

Gerät/Material	Name	Firma	Ort
NaCl	NaCl	Firma Roth	Karlsruhe
Aqua dest.		Firma Braun	Melsungen
Zentrifuge	Rotana 460 RS	Firma Hettich	Tuttlingen
Eppendorf-Röhrchen		Firma Eppendorf	Hamburg
Hämatologie-Analysator	Coulter LH 750	Beckmann Coulter GmbH	Krefeld
Pipetten		Eppendorf	Hamburg
Pipettenspitzen		Star Lab	Ahrensburg
Gefrierschrank	Nunc	Nunc GmbH	Wiesbaden
Monovetten	S-Monovette	Sarstedt	Nümbrecht

Tabelle 3.2: Verwendete Materialien am Institut für klinische Pharmakologie Stuttgart

Nachfolgend aufgeführt Materialien, die am Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie in Stuttgart verwendet wurden.

Gerät/Material	Name	Firma	Ort
Vortex	Heidolph Reax Top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG	Schwabach
Zentrifuge für Blutproben	Heraeus Labofuge GL	Heraeus Holding GmbH	Hanau
Zentrifuge für Eppendorf-Plastikgefäße	Heraeus Biofuge Pico	Heraeus Holding GmbH	Hanau
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 1.0R	Heraeus Holding GmbH	Hanau
pH-Meter	Orion Modell 420 A	Fisher Scientific	Schwerte
Laborwaage	Mettler P163	Mettler-Toledo GmbH	Gießen
Analysenwaage	Mettler HK60	Mettler-Toledo GmbH	Gießen
Analysenwaage	Mettler XS105	Mettler-Toledo GmbH	Gießen
Wasserbad mit Motor	GFL	GFL – Gesellschaft für Labortechnik mbH	Burgwedel
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex Super RK510	Bandelin electronic GmbH & Co. KG	Berlin
Heiz-Modul	Pierce Reacti-Therm III	Thermo Fisher Scientific Inc./Pierce Technology/Perbio Science Deutschland GmbH	Bonn
UV-Detektor	Shimadzu SPD-6A	Shimadzu Deutschland GmbH	Duisburg
Autosampler	Shimadzu SIL-9A mit 50 µl Injektionsschleife	Shimadzu Deutschland GmbH	Duisburg
HPLC-Pumpe	Shimadzu LC-9A	Shimadzu Deutschland GmbH	Duisburg
HPLC-Pumpe	Rainin Dynamax SD-200	Varian	Darmstadt
HPLC-Pumpe	Shimadzu LC-10AT	Shimadzu Deutschland GmbH	Duisburg
Detektor	Shimadzu RF535 Fluoreszenzmonitor	Shimadzu Deutschland GmbH	Duisburg
Fluoreszenzdetektor	Shimadzu RF-10AXL	Shimadzu Deutschland GmbH	Duisburg
Fluoreszenzdetektor	Jasco FP-920	Jasco GmbH Deutschland	Groß-Umstadt

(Fortsetzung)

Tabelle 3.2: Verwendete Materialien am IKP Stuttgart (Fortsetzung)

Gerät/Material	Name	Firma	Ort
Fluoreszenzdetektor	Shimadzu RF-551	Shimadzu Deutschland GmbH	Duisburg
Automatische Injektion	Shimadzu SIL-9A, 50 µl Injektionsschleife	Shimadzu Deutschland GmbH	Duisburg
Autosampler	Injektionsvolumen 15 µl		
Säule	Nucleosil 100-5-C18, 250 x 4,6 mm ID	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	Düren
HPLC-Säule	Prontosil C18 AQ 3 µm, 150 x 3 mm, Pumpenfluss 0,5 ml/min, Säulenthermostat 35° C	Bischoff Analystechnik und -geräte GmbH	Leonberg
Autosampler	Injektionsvolumen 20 µl		
HPLC-Säule	Nucleosil 100-5-C18, 250 x 4,6 mm ID (Säule A) oder Nucleosil 100-3-C18, 150 x 3 mm ID (Säule B)	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	Düren
Vorsäule	Kartusche Hypersil ODS, 5 µm oder Prontosil C18, 5 µm	Bischoff Analystechnik und -geräte GmbH	Leonberg
Säulenthermostat	Thermostat Jetstream 2, 30° C	Bischoff Analystechnik und -geräte GmbH	Leonberg
Hardware	Star 800 MIB (Varian) Galaxie-System Varian mit Star 800 MIB-System, Date range: 5 Pt/sec, Voltage range: 1,0 Volt, Start on trigger: Contact closure	Varian Deutschland GmbH	Darmstadt
Signalaufzeichnung		Varian Deutschland GmbH	Darmstadt
Millipore-Wasser	Milli Q-Anlage	Millipore GmbH	Schwalbach
Methanol	Roth, Art P717.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Acetonitril	Rotisolv HPLC Art. 7330	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
K ₂ HPO ₄	K ₂ HPO ₄ p. A., Nr. 60356 (MW 174 g/mol)	Merck KGaA	Darmstadt
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Fluka p.A., Nr. 60356 (MW 174,176 g/mol)	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen
K ₂ HPO ₄			
KH ₂ PO ₄	KH ₂ PO ₄ p. A., Nr. 4873 (MW 136 g/mol)	Merck KGaA	Darmstadt
Natriumcarbonat, NaCO ₃	Nr. 6392 (MW 106 g/mol)	Merck KGaA	Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat, NaHCO ₃	Nr. 6329 (MW 84 g/mol)	Merck KGaA	Darmstadt
Dichlormethan	DCM Nr. 7334	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
EDTA	E5134 Sigma Lot29H00171, disodium salt, dihydrate, f. wt. 372	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen
H ₂ O ₂	Nr. 8597, 245K19756697, 30 %, DAB	Merck KGaA	Darmstadt
Kaliumpermanganat, KMnO ₄	Nr. 5082, 438K4276182, f. wt. 162	Merck KGaA	Darmstadt

(Fortsetzung)

Tabelle 3.2: Verwendete Materialien am IKP Stuttgart (Fortsetzung)

Gerät/Material	Name	Firma	Ort
Tetra butylammonium- hydrogensulfat, TBAHS	Fluka 86868, Ch.N. 34141/1495, f. wt. 339,5	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen
Natriumchlorid	p. A. Nr. 6404 (MW 40 g/mol)	Merck KGaA	Darmstadt
TGTP/6-Thioguanosin-5'- Triphosphat	Katalog-Nr. NU-1106S, lyophilisiert (als Pulver), 10 mM-Lösung	Jena Bioscience GmbH	Jena
TGMP/6-Thioguanosin-5'- Monophosphat	Natriumsalz, keine Katalognummer, als 10 mM-Lösung in Wasser	Jena Bioscience GmbH	Jena
TGDP/6-Thioguanosin-5'- Diphosphat	Lot Nr. TWE 109, als Pulver	Jena Bioscience GmbH	Jena
6-TG/6-Thioguanin	2-Amino-6-thiopurin, Sigma A-4882; Lot 67H1639 (98,4 % rein), (MW 167,2 g/mol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen
6-Mercaptoguanosin	Tgua, 2-Amino-6-Mercaptopurin-Ribosid, 9 β -D-Ribofuranosyl-2-Amino-6-Mercaptopurin; Sigma M-6625 (MW 299,3 g/mol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen
6-Methylthioguanin (MTG, 2-Amino-6- Methylmercaptopurin)	Sigma Nr. A-9546 (MW 181,2 g/mol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen
6-Mercaptopurin (MMP)	Sigma Nr. M-3877 (MW 166,2 g/mol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen
6-Methylmercaptopurin- Ribosid (MMPRib, 9 β -D-Ribofuranosyl-2-Amino- 6-Methyl-Mercaptopurin)	Sigma Nr. M-4002 (MW 298,3 g/mol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen
Tetrahydrofuran (THF)	Merck Lichrosolv, No. 1.08101	Merck KGaA	Darmstadt
D/L-Dithiothreitol (DTT)	Sigma, No. D-0632, (MW 154 g/mol) (hygroskopisch, Lagerung bei +4° C im Kühlschrank)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen
S-Adenosyl-L-Methionin (SAM)	Sigma, No. A-7007, Lot26H7100 (MW 435 g/mol, instabile Verbindung, Lagerung bei -20° C, Gehalt an SAM 70 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka, No. 41640	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen
Natriumhydroxid	Fluka Biochem., No. 72079	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen
Salzsäure konz. (37 %)	Fluka Biochem., No. 84434	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen

(Fortsetzung)

Tabelle 3.2: Verwendete Materialien am IKP Stuttgart (Fortsetzung)

Gerät/Material	Name	Firma	Ort
Perchlorsäure 70 %	Merck p.A., Nr. 1.00514	Merck KGaA	Darmstadt
Thioguanin (6-TG)	aus Thioguanin-Tabletten (Thioguanin-Wellcome, 40 mg 6-TG je Tablette)	GlaxoSmithKline S.p.A.	Verona, Italien
Eppendorfgefäße	1,5 ml	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH	Wesseling- Berzdorf
Autosampler-Gläser	4 ml mit Schraubdeckel	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	Düren
Glaseinsätze für HPLC-Injektion	Step Vial Insert mit Wide Mouth Öffnung, 6 x 40 mm, Borosilika-Glas, Nr. 702972	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	Düren
Teflon-Dichtungsscheiben	mit Metallfeder und 300 µl-Inserts	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	Düren

3.1.2 Puffer, Medien und Lösungen für die Bestimmung von TGMP, TGDP und TGTP

Im Folgenden werden die Lösungen für die Probenaufarbeitung und HPLC-Messung beschrieben.

0,9 % Natriumchlorid-Lösung

4,5 g NaCl/500 ml Wasser

50 mM EDTA, pH 10,5

Einwaage von Gramm-Mengen im entsprechenden Volumen. In Wasser gelöst (z. B. 1,67 g in 90 ml Wasser), mit 5 N NaOH auf pH 10,5 eingestellt.

DTT 30 mg/ml in 50 mM EDTA

Einwaage von etwa 50 mg, in 50 mM EDTA gelöst, ein einmaliges Einfrieren der Lösung war möglich.

0,24 % Kaliumpermanganat

240 mg KMnO₄/100 ml Wasser

Natriumcarbonatpuffer 1 M, pH 10,1

1 M Natriumdicarbonat (10,6 g/100 ml) mit 1 M Natriumhydrogencarbonat (8,4 g/100 ml) auf pH 10,1 eingestellt.

Dikaliumhydrogenphosphat 20 mM

3,484 g K₂HPO₄/1 Wasser

Kaliumdihydrogenphosphat 20 mM

1,36 g KH₂PO₄/500 ml Wasser

Mobile Phase für die HPLC

1,7 g TBAHS wurden in 1 Liter Dikaliumhydrogenphosphat (20 mM) gelöst, die Endkonzentration betrug 5 mM und wurde mit Kaliumdihydrogenphosphat (20 mM) auf pH 6,8 eingestellt. Es wurden etwa 500 ml benötigt. Die wässrige Phase wurde mit Acetonitril im Verhältnis 84:16 v/v gemischt.

Eich- und Referenzsubstanzen

TGMP, TGDP und TGTP wurden von der Firma Jena Bioscience gekauft und entweder als 10 mM-Lösungen in Wasser geliefert oder als Pulver (lyophilisiert). Die Stammlösungen wurden bei -20° C gelagert. Ihre Stabilität wurde bei dieser Lagerung vom Hersteller Jena Bioscience für 12 Monate garantiert. Die Strukturformel und das Datenblatt für TGTP der Firma Jena Bioscience befinden sich im Anhang.

- 6-Thioguanosin-5'-Monophosphat (TGMP), Jena Bioscience Nr. NU-1121
- 6-Thioguanosin-5'-Diphosphat (TGDP), Jena Bioscience Nr. NU-1120
- 6-Thioguanosin-5'-Triphosphat (TGTP), Jena Bioscience Nr. NU-1106

Jede Charge TGMP, TGDP und TGTP musste auf den tatsächlichen Gehalt geprüft werden. Die Prüfung umfasste die HPLC-Messung zur Bestimmung der Reinheit sowie eine Konzentrationsbestimmung nach Hydrolyse zu 6-Thioguanin (siehe Kapitel 3.1.2 auf der nächsten Seite, „Bestimmung von Reinheit und Gehalt der Stammlösungen“).

6-Thioguanin (6-TG)

2-Amino-6-Thiopurin; Sigma A-4882, 167,2 g/mol

6-Mercaptoguanosin (Tgua)

2-Amino-6-Mercaptopurin-Ribosid, 9 β -D-Ribofuranosyl-2-Amino-6-Mercaptopurin; Sigma M-6625, 299,3 g/mol

6-TG-Sulfonat

Referenzsubstanz Mer1 aus der Synthese des Instituts für Klinische Pharmakologie Stuttgart; 254 g/mol

Stammlösungen der Eich- und Referenzsubstanzen

Bei der Konzentrationsberechnung der Lösungen musste der tatsächliche Gehalt berücksichtigt werden (siehe Kapitel 3.1.2 auf der nächsten Seite, „Bestimmung von Reinheit und Gehalt der Stammlösungen“).

- TGMP-Stammlösung (10 mM)
- TGDP-Stammlösung (10 mM)
- TGTP-Stammlösung (10 mM)

Alle drei Stammlösungen wurden auf die gleiche Weise hergestellt: Bei Lieferung als 10 mM-Lösung in Wasser wurde die gelieferte Lösung direkt verwendet. Bei Lieferung in lyophilisierter Form wurde zu 50 Units 50 μ l 50 mM EDTA, pH 10,5 zugegeben. Endkonzentration der Stammlösung war jeweils 10 mM (10 nmol/ μ l).

Nach Herstellung der Stammlösungen wurde der tatsächliche Gehalt ermittelt (siehe Kapitel 3.1.2 auf der nächsten Seite, „Bestimmung von Reinheit und Gehalt der Stammlösungen“). Dieser korrigierte Gehalt wurde auf dem Gefäß mit angegeben und bei der weiteren Verdünnung der Stammlösungen berücksichtigt.

Arbeitslösungen der Eich- und Referenzsubstanzen

Die Arbeitslösungen der Eich- und Referenzsubstanzen wurden bei -20° C gelagert.

Verdünnungen der Konzentration 10 pmol/µl

Aus den Stammlösungen (10 nmol/µl) wurden durch 1:1000-Verdünnungen die Arbeitslösungen 10 pmol/µl in 50 mM EDTA hergestellt. War der Gehalt der Stammlösung kleiner als 10 nmol/µl, wurde aus der Stammlösung ein Volumen entsprechend 10 nmol Substanz eingesetzt und mit 50 mM EDTA auf 1 ml verdünnt.

Verdünnungen der Konzentration 1 pmol/µl

Alle drei Arbeitslösungen mit einer Konzentration von 1 pmol/µl wurden aus den 10 pmol/µl-Lösungen durch 1:10-Verdünnung mit 50 mM EDTA hergestellt, 100 µl der Arbeitslösung der Konzentration 10 pmol/µl wurden mit 900 µl EDTA-Lösung (50 mM) gemischt.

Bestimmung von Reinheit und Gehalt der Stammlösungen

Bei jeder neuen Lieferung an TGMP, TGDP und TGTP musste auf Reinheit geprüft und der Gehalt bestimmt werden. Dafür wurde aus der Stammlösung eine Verdünnung von 10 pmol/µl hergestellt (siehe „Arbeitslösungen der Eich- und Referenzsubstanzen“).

Für die Reinheitsprüfung wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Es wurden 600 pmol des jeweiligen Nukleotides eingesetzt und mit 10 µl DTT-Lösung und EDTA-Lösung auf ein Endvolumen von 250 µl verdünnt. Erythrozyten wurden nicht zugesetzt. Aufarbeitung und HPLC-Messung erfolgten wie unter „Aufarbeitung der Proben“ (Kapitel 3.2.1 auf Seite 62) und „HPLC-Messung“ (Kapitel 3.2.1 auf Seite 62) beschrieben. Die Chromatogramme wurden wie in Kapitel 3.2.4 auf Seite 66 beschrieben ausgewertet, die relativen Peakflächen von TGMP, TGDP und TGTP in Prozent bezogen auf die Summe aller drei Nukleotide wurden berechnet. Die Reinheit sollte mindestens 95 % betragen.

Der Gehalt von Thionukleotiden wurde nach saurer Hydrolyse zu 6-TG bestimmt. Dazu wurden ebenfalls 600 pmol als Dreifachbestimmung eingesetzt. Die Durchführung der Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.2.2 auf Seite 63 beschrieben. Der so ermittelte Gehalt wurde bei der weiteren Verwendung der Lösungen berücksichtigt und auf den Gefäßen als korrigierter Gehalt angegeben.

Kalibrierproben (Eichpunkte)

In 1 ml-Eppendorfgefäßen wurde 10 µl DTT-Lösung (30 mg/ml) pipettiert und die berechnete Menge an 50 mM EDTA pH 10,5 hinzugegeben, um das Endvolumen von 250 µl zu erhalten. Anschließend erfolgte die Zugabe der Arbeitslösungen und von 100 µl der Blank-Erythrozyten (siehe Kapitel 3.2.2 auf Seite 63, „Herstellung von Blank-Erythrozyten für die Kalibrierproben und Qualitätskontrollen“). Nach Zugabe

der Erythrozyten musste jede Probe sofort per Vortex gemischt werden. Da kein interner Standard vorhanden ist, mussten die Volumina exakt eingehalten werden.

Tabelle 3.3: Pipettierschema – Kalibrierproben für die Bestimmung von TGMP, TGDP und TGTP

Kalibrierproben für die Bestimmung von TGMP, TGDP sowie TGTP. Abkürzungen: EP = Eichpunkt. Arbeitslösungen: a) 10 pmol/μl; b) 1 pmol/μl

	DTT	EDTA	TGMP		TGDP		TGTP		RBC
Eichpunkt	μl	μl	soll pm	Arbeitslösung μl	soll pm	Arbeitslösung μl	soll pm	Arbeitslösung μl	μl
Blank	10	140							100
EP1	10	130	10	10 b)					100
EP2	10	113,5	25	25 b)	15	1,5			100
EP3	10	137,5			25	2,5			100
EP4	10	137,5					25	2,5	100
EP5	10	130					100	10	100
EP6	10	111	40	4 a)			250	25	100
EP7	10	115	50	5 a)	50	5	150	15	100
EP8	10	95	100	10 a)	50	5	300	30	100
EP9	10	112,5			75	7,5	200	20	100
EP10	10	90			100	10	400	40	100

Qualitätskontrollen

Wegen des Abbaus von TGTP und TGDP wurden keine Qualitätsproben auf Vorrat hergestellt. Die Qualitätskontrollproben wurden wie die Eichpunkte frisch angesetzt.

Tabelle 3.4: Pipettierschema – Qualitätskontrollen für die Bestimmung von TGMP, TGDP und TGTP

Pipettierschema zum Ansetzen der Qualitätskontrollen für die Bestimmung von TGMP, TGDP und TGTP. Abkürzungen: QK = Qualitätskontrollprobe, RBC = red blood cells.

	DTT	EDTA	TGMP		TGDP		TGTP		RBC
Eichpunkt	μl	μl	soll pm	Arbeitslösung μl	soll pm	Arbeitslösung μl	soll pm	Arbeitslösung μl	μl
QK1	10	110	25	25	25	2,5	25	2,5	100
QK2	10	115	50	5	50	5	150	15	100
QK3	10	102,5	75	7,5	100	10	200	20	100

3.1.3 Puffer, Medien und Lösungen für die Bestimmung von MMPN, MTGN und 6-TGN

Lösungen für die Probenaufarbeitung und HPLC-Messung

0,9 % Natriumchlorid-Lösung

4,5 g NaCl/500 ml Wasser

Puffer für die Erythrozytenverdünnung zur Messung von MMPN und MTGN

0,02 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,4: Einwaage von 2,72 g KH_2PO_4 /1 Millipore-Wasser

Puffer für die Erythrozytenverdünnung zur Messung von 6-TGN

0,02 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 mit 15 mg/ml DTT: Einwaage von DTT im 100 mg-Bereich und Zugabe des entsprechenden Volumens an 0,02 M Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung.

Mobile Phase (6-TGN)

0,02 M Kaliumdihydrogenphosphat/Methanol/Acetonitril 96:1,5:2,5 (v/v/v)

Mobile Phase (MMPN und MTGN)

Mischung von 440 ml 0,02 M Kaliumdihydrogenphosphat, 440 ml 0,02 M Dikaliumhydrogenphosphat, 40 ml Tetrahydrofuran, 80 ml Acetonitril. Die Mischung wurde anschließend 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

Eichsubstanzen

Alle Eichsubstanzen wurden bei 4° C gelagert.

- 6-Thioguanin (6-TG, 2-Amino-6-Thiopurin, 2-Amino-6-Purinthiol) Sigma Nr. A-4882 (98,4 % rein mit 1,2 % Guanin als Hauptverunreinigung, MW 167,2 g/mol)
- 6-Mercaptoguanosin (Tgua, 2-Amino-6-Mercaptopurin-Ribosid, 9 β -D-Ribofuranosyl-2-Amino-6-Mercaptopurin, 6-Thioguanosin), Sigma Nr. M-6625 (MW 299,3 g/mol)
- 6-Methylthioguanin (MTG, 2-Amino-6-Methyl-Mercaptopurin), Sigma Nr. A-9546 (MW 181,2 g/mol)
- 6-Mercaptopurin (MMP) Sigma Nr. M-3877 (MW 166,2 g/mol)
- 6-Methyl-Mercaptopurin-Ribosid (MMPRib, 9 β -D-Ribofuranosyl-2-Amino-6-Methyl-Mercaptopurin) Sigma Nr. M-4002 (MW 298,3 g/mol)

Eichlösungen

Stammlösungen

Alle Stammlösungen enthielten DTT (0,1 mg/ml). Sie wurden bei -20° C gelagert und waren ca. sechs Monate stabil bei sofortigem Einfrieren nach Herstellung.

6-TG-Stammlösung (600 pmol/µl, 100 ng/µl)

Einwaage von ca. 2–3 mg und Lösen in 0,1 N NaOH: Das NaOH-Volumen in ml entspricht der Einwaage in mg dividiert durch 2,5. Es wurde eine entsprechende Menge der DTT-Lösung (15 mg/ml) zugegeben, um eine Endkonzentration von 0,1 mg DTT/ml zu erreichen. Anschließend wurde das zum Erreichen der Endkonzentration benötigte Volumen Wasser zupipettiert.

6-Thioguanosid-Stammlösung (600 pmol/µl, 180 ng/µl)

Einwaage von ca. 2–3 mg und Lösen in 0,1 N NaOH: Das NaOH-Volumen in ml entspricht der Einwaage in mg dividiert durch 10. Es wurde eine entsprechende Menge der DTT-Lösung (15 mg/ml) zugegeben, um eine Endkonzentration von 0,1 mg DTT/ml zu erreichen. Anschließend wurde das zum Erreichen der Endkonzentration benötigte Volumen Wasser zupipettiert.

6-Methylmercaptopurinribosid-Stammlösung (10 nmol/µl, 2,98 µg/µl)

Einwaage von ca. 3–5 mg und Lösen in 0,1 N NaOH: Das NaOH-Volumen in ml entspricht der Einwaage in mg dividiert durch 100. Es wurde eine entsprechende Menge der DTT-Lösung (15 mg/ml) zugegeben, um eine Endkonzentration von 0,1 mg DTT/ml zu erreichen. Anschließend wurde das zum Erreichen der Endkonzentration benötigte Volumen Wasser zupipettiert.

MTG-Stammlösung (550 pmol/µl, 100 ng/µl)

Einwaage von ca. 2–3 mg und Lösen in 0,1 N NaOH: Das NaOH-Volumen in ml entspricht der Einwaage in mg dividiert durch 2,5. Es wurde eine entsprechende Menge der DTT-Lösung (15 mg/ml) zugegeben, um eine Endkonzentration von 0,1 mg DTT/ml zu erreichen. Anschließend wurde das zum Erreichen der Endkonzentration benötigte Volumen Wasser zupipettiert.

MMP-Stammlösung (600 pmol/µl, 100 ng/µl)

Einwaage von ca. 2–3 mg und Lösen in 0,1 N NaOH: Das NaOH-Volumen in ml entspricht der Einwaage in mg dividiert durch 2,5. Es wurde eine entsprechende Menge der DTT-Lösung (15 mg/ml) zugegeben, um eine Endkonzentration von 0,1 mg DTT/ml zu erreichen. Anschließend wurde das zum Erreichen der Endkonzentration benötigte Volumen Wasser zupipettiert.

Arbeitslösungen

Die Arbeitslösungen entsprechen teilweise den Stammlösungen bzw. wurden jedes Mal unmittelbar vor Gebrauch frisch durch Verdünnung der Stammlösungen hergestellt.

6-TG-Arbeitslösung

Konzentration: 10 ng/µl (60 pmol/µl)

Herstellung: 1:10-Verdünnung aus der Stammlösung (600 pmol/µl) mit Wasser

6-Thioguanosin-Arbeitslösung

Konzentration: 18 ng/µl (60 pmol/µl)

Herstellung: 1:10-Verdünnung aus der Stammlösung (600 pmol/µl) mit Wasser

MMP-Arbeitslösung

Konzentration: 100 ng/µl (600 pmol/µl)

Herstellung: entspricht der Stammlösung

MMP-Ribosid-Arbeitslösung

Konzentration: 180 ng/µl (600 pmol/µl)

Herstellung: 1:16,7-Verdünnung aus der Stammlösung (10 nmol/µl) mit Wasser

MTG-Arbeitslösung

Konzentration: 10 ng/µl (55 pmol/µl)

Herstellung: 1:10-Verdünnung aus der Stammlösung (550 pmol/µl) mit Wasser

Kalibrierproben (Eichpunkte)

Es wurden zwei getrennte Reihen an Kalibrierproben hergestellt: entweder für 6-TG (mit 6-TG bzw. 6-Thioguanosin) oder für die methylierten Metaboliten (MMP zusammen mit MTG bzw. MMPRibosid zusammen mit MTG). Für die Kalibrierproben (Eichpunkte) wurden 1:3-verdünnte Blank-Erythrozyten eingesetzt (siehe Kapitel 3.2.2 auf Seite 63) Für jeden Eichpunkt wurden die im Pipettierschema angegebenen Lösungen in ein Eppendorf-Gefäß (1,5 ml) pipettiert. Die verdünnten Blank-Erythrozyten wurden vorgelegt, anschließend wurden die Lösungen der Eichsubstanzen wie in Tabelle 3.5 und 3.6 angegeben zupipettiert und per Vortex gut durchmischt. Da kein interner Standard verwendet wurde, musste das Gesamtvolumen von 300 µl genau eingehalten werden.

Tabelle 3.5: Pipettierschema – Kalibrierproben für die Bestimmung von 6-TGN

Nachfolgend das Pipettierschema zum Ansetzen der Kalibrierproben für die Bestimmung von 6-TGN. Abkürzungen: EP = Eichpunkt.

Probe	1:3 verdünnte Erythrozyten + DTT	6-TG 60 pmol/μl	Tgua 60 pmol/μl
	μl	μl	μl
Blank	300		
EP1 (60 pmol)	299	1	
EP2 (120 pmol)	298	2	
EP3 (600 pmol)	290	10	
EP4 (180 pmol)	297		3
EP5 (300 pmol)	295		5
EP6 (1200 pmol)	280		20

Tabelle 3.6: Pipettierschema – Kalibrierproben für die Bestimmung von MMPN und MTGN

Kalibrierproben für die Bestimmung von MMPN und MTGN. Abkürzungen: EP = Eichpunkt.

Probe	MMP Soll- wert	MTG Soll- wert	1:3 verdünnte Erythrozy- ten	MMP 600 pmol/μl	MMP-Rib 600 pmol/μl	MTG 55 pmol/μl
	pmol	pmol	μl	μl	μl	μl
Blank			300			
EP1	600	55	298	1		1
EP2	2400	220	292	4		4
EP3	6000	550	280	10		10
EP4	1200	110	296		2	2
EP5	3000	275	290		5	5
EP6	12000	1100	260		20	20

Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie für die Proben beschrieben (siehe Kapitel 3.2.2).

Qualitätskontrollen

Es wurden zwei getrennte Sätze von Qualitätskontrollen hergestellt: entweder für 6-TG (mit 6-TG bzw. 6-Thioguanosin) oder für die methylierten Metaboliten (MMP zusammen mit MTG bzw. MMPRibosid zusammen mit MTG). Die Qualitätskontrollen wurden als 300 μl-Aliquots eingefroren. Da keine internen Standards verwendet wurden, musste das Volumen von 300 μl exakt eingehalten werden. Nach dem Auftauen wurden die Proben kurz zentrifugiert.

Qualitätskontrollen für MMP und MTG

In einem 10 ml-Messkolben wurden nach „Herstellung von Blank-Erythrozyten für die Kalibrierproben und die Qualitätskontrollen“ (siehe Kapitel 3.2.2 auf Seite 63) verdünnte Blank-Erythrozyten vorgelegt. Davon wurde dasselbe Volumen entnommen, welches hinterher an Eichlösungen wieder zupipettiert wurde. Im Pipettierschema (Tabelle 3.7) waren die Sollkonzentrationen in 300 µl Erythrozyten sowie die pipettierten µl-Mengen der Stammlösungen für einen 10 ml-Ansatz angegeben. Nach sorgfältigem Durchmischen der 10 ml-Messkolben wurden 300 µl-Aliquots in Eppendorf-Gefäße abgefüllt und bei -20° C bis zum Gebrauch gelagert.

Tabelle 3.7: Pipettierschema für MMP- und MTG-Qualitätskontrollen

Pipettierschema für MMP- und MTG-Qualitätskontrollen. Abkürzungen: QK = Qualitätskontrolle.

	MMP Soll- wert	MMP 600 pmol/µl	MMP-Rib Sollwert	MMP-Rib 600 pmol/µl	MTG Soll- wert	MTG 550 pmol/µl
	pmol/300 µl	µl	pmol/300 µl	µl	pmol/300 µl	µl
QK1	600	33,3			55	3,33
QK2	3600	200			220	13,3
QK3			1200	66,7	110	6,67
QK4			6000	333	550	33,3

Qualitätskontrollen für 6-TG

In einen 10 ml-Messkolben wurden nach Kapitel 3.2.2 verdünnte Blank-Erythrozyten vorgelegt. Davon wurde dasselbe Volumen entnommen, welches hinterher an Eichlösungen wieder zupipettiert wurde. Im Pipettierschema waren die Sollkonzentrationen sowie die pipettierten µl-Mengen für einen 10 ml-Ansatz angegeben. Nach sorgfältigem Durchmischen wurden 300 µl-Aliquots in Eppendorf-Gefäße abgefüllt und bei -20° C bis zum Gebrauch gelagert.

Tabelle 3.8: Pipettierschema für TG-Qualitätskontrollen

Nachfolgend das Pipettierschema für 6-TG-Qualitätskontrollen (10 ml-Ansatz). Abkürzungen: QK = Qualitätskontrolle.

	6-TG Sollwert	6-TG Stammlösung 600 pmol/µl	Tgua Sollwert	Tgua Stammlösung 600 pmol/µl
	pmol/300 µl	µl	pmol/300 µl	µl
QK1	60	3,33		
QK2	180	10		
QK3	600	33,3		
QK4			60	3,33
QK5			120	6,67
QK6			300	16,7

3.1.4 Puffer, Medien und Lösungen für die TPMT-Bestimmung

Lösungen für die Probenaufarbeitung und HPLC-Messung

0,9 % Natriumchlorid-Lösung

4,5 g Natriumchlorid
500 ml Wasser

Puffer für Inkubationen und Eichkurve

0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,4:
0,1 M KH_2PO_4 (13,6 g/l) mit
0,1 M K_2HPO_4 (17,4 g/l) auf pH 7,4 titriert.

Puffer für Erythrozytenlysats-Herstellung

0,02 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,4:
Verdünnung von einem Teil 0,1 M Puffer pH 7,4 mit 4 Teilen Wasser.

Mobile Phase

3600 ml 0,05 M KH_2PO_4 (6,80 g/l)
720 ml 0,05 M K_2HPO_4 (8,7 g/l) oder 0,05 M $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ (11,4 g/l)
210 ml Acetonitril
120 ml Tetrahydrofuran
wurden gemischt und 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

6-TG-Lösung (15 $\mu\text{mol/ml}$, 2,5 mg/ml)

Diese Lösung wurde für jede Inkubation frisch angesetzt. Je Probe wurden 10 μl verwendet. Die Tabletten enthalten 17,7 Gew.-% 6-TG, d. h. für 15 $\mu\text{mol/ml}$ (2,5 mg/ml) wurden 14,12 mg Tablette/ml benötigt. Die eingewogene Menge der gemörserten Tablette wurde in Dimethylsulfoxid gelöst (10 Minuten Ultraschallbad).

DTT (25 $\mu\text{mol/ml}$, 3,85 mg/ml)

Diese Lösung wurde für jede Inkubation neu eingewogen. Je Probe wurden 10 μl pro 250 μl Inkubationsansatz verwendet. Vor Einwaage wurde der Behälter auf Raumtemperatur gebracht. Die Einwaage (mg-Mengen) wurde in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 gelöst.

S-Adenosyl-L-Methionin-Stocklösung

Einwaage von 50,8 mg, in 20 ml Millipore-Wasser gelöst (5 Minuten Ultraschall-Bad). Eine Konzentration von 2,54 mg/ml H_2O entspricht (korrigiert auf den Gehalt von 70 %)

$0,7 \cdot 5,84 \mu\text{mol/ml} = 4,088 \text{ nmol/ml}$.

S-Adenosyl-L-Methionin-Verdünnung für Inkubationen (0,644 nmol/ml)

Verdünnung aus Stocklösung mit Wasser 1:6,35 (1 Teil + 5,35 Teile Wasser). Aliquots von 1000 µl wurden bei -20° C eingefroren und für jede Inkubation neu aufgetaut.

Spülflüssigkeit für den Autosampler

Wasser/Acetonitril 50:50 v/v

Eichsubstanz

6-Methylthioguanin (6-MTG, 2-Amino-6-Methylmercaptapurin) 99 %, Sigma A-9546 (MW 181,2 g/mol).

Eichlösungen

6-MTG-Stammlösung (1,5 nmol/µl)

Die Eichsubstanz wurde in mg-Mengen eingewogen, in 0,1 N NaOH angelöst und mit Wasser aufgefüllt. Das NaOH-Volumen in ml entspricht der Einwaage in mg dividiert durch 2,5; es wurde mit Wasser auf Endvolumen aufgefüllt, die Endkonzentration lag bei 1,5 nmol/µl (272 µg/ml). Die Lösung ist bei Lagerung im Kühlschrank (4° C) ca. 6 Wochen stabil.

Verdünnte Eichlösungen (Lösung A und B)

Eichlösung A (30 pmol/µl): 1:50-Verdünnung aus Stammlösung mit 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4, Lagerung bei 4° C. Eichlösung B (1,5 pmol/µl): 1:20-Verdünnung aus Verdünnung A mit 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4. Eichlösung B wurde jeweils vor der Inkubation frisch angesetzt.

Kalibrierproben (Eichpunkte)

Die Eichpunkte durchliefen die gesamte Inkubations- und Extraktionsprozedur. Für jeden Eichpunkt wurden die im folgenden Pipettierschema angegebenen Lösungen in ein Eppendorf-Gefäß (1,5 ml) pipettiert: Das Endvolumen betrug 250 µl. Puffer wurde vorgelegt, anschließend 6-MTG, DTT und Blank-Erythrozytenlysat (1:5 verdünnt, siehe Kapitel 3.2.3) pipettiert.

Tabelle 3.9: Pipettierschema für Eichpunkte

Das Pipettierschema für Eichpunkte ist nachfolgend dargestellt. Abkürzungen: EP = Eichpunkt.

Probe	6-MTG	6-MTG	DTT	Blank-Erythrozyten	Puffer*
	µl Lösung A	µl Lösung B	µl	µl	µl
EP1 (7,5 pmol)		5	10	50	185
EP2 (15 pmol)		10	10	50	180
EP3 (30 pmol)		20	10	50	170
EP4 (60 pmol)		40	10	50	150
EP5 (150 pmol)	5		10	50	185
EP6 (300 pmol)	10		10	50	180

*mit 0,1 M Phosphatpuffer auf 250 µl ergänzen

Die weitere Inkubation und Aufarbeitung erfolgte wie für die Proben beschrieben (siehe Kapitel 3.2.3).

Qualitätskontrollen

Analytische Qualitätskontrollen

Qualitätskontroll-Proben wurden in denselben Endkonzentrationen wie die Kalibrierproben EP2, EP3 und EP5 hergestellt (siehe Tabelle 3.10).

Für die Herstellung der Qualitätskontrollen wurde die im folgenden Pipettierschema angegebene Lösung pipettiert und anschließend mit Blank-Erythrozytenlysat (1:5 verdünnt) auf 4 ml Endvolumen aufgefüllt.

Tabelle 3.10: Pipettierschema für Qualitätskontrollen

In dieser Tabelle sind die Konzentrationen und das Pipettierschema der Qualitätskontrollen veranschaulicht. Abkürzungen: QK = Qualitätskontrolle.

Probe	Konzentration 6-MTG	6-MTG
	pmol/50 µl	µl Lösung A
QK1	15	40
QK2	30	80
QK3	150	400

Die Qualitätskontrollen wurden in Aliquots zu je 50 µl bei -80° C gelagert und bei jeder Inkubation doppelt mitgeführt.

Biologische Qualitätskontrolle

Die biologische Qualitätskontrolle soll optimale bzw. konstante Inkubationsbedingungen garantieren. Ausgiebige Experimente zeigten, dass die enzymatische *In-vitro*-Methylierung stark von unbekanntem Verunreinigungen in den jeweiligen 6-TG-Chargen

von verschiedenen 6-TG-Lieferanten als auch von der Qualität (Gehalt) von S-Adenosyl-L-Methionin abhängt (Kröplin *et al.*, 1999). Als Konsequenz musste bei jeder neuen 6-TG- und S-Adenosyl-L-Methionin-Lieferung die TPMT-Aktivität einer bekannten Probe, der so genannten biologischen Qualitätskontrolle, bestimmt werden. Die Abweichung durfte maximal 15-% vom Mittelwert betragen, andernfalls musste das Volumen der S-Adenosyl-L-Methionin-Lösung (je nach Gehalt) bzw. die 6-TG-Einwaage entsprechend verändert und die Aktivität nochmals kontrolliert werden.

Herstellung der biologischen Qualitätskontrolle

Erythrozytenlysate (siehe Kapitel 3.2.3) wurde hergestellt und 500 µl Aliquots abgefüllt. Das Erythrozytenlysate wurde ausschließlich von Personen gewonnen, die mindestens zwei Wochen keine Medikamente zu sich genommen hatten. Die Aliquots wurden bei -80° C gelagert und bei jeder Inkubation mitgeführt. Wenn eine neue biologische Qualitätskontrolle verwendet wurde, wurde der Sollwert (Mittelwert) durch eine 6-fach-Bestimmung an drei verschiedenen Tagen bestimmt.

3.2 Methodik

3.2.1 Durchführung der Bestimmung von TGMP, TGDP und TGTP

Herstellung von Erythrozyten und Erythrozytenverdünnungen

Herstellung von gepackten Erythrozyten (RBC)

EDTA-Blut wurde nach der Blutentnahme auf Eis oder im Kühlschrank bei 4° C für maximal 4 Stunden gelagert. Die Blutröhrchen wurden für 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert und das Plasma abpipettiert und verworfen. Die verbliebenen Erythrozyten wurden einmal mit gleichem Volumen an 0,9 prozentiger Natriumchlorid-Lösung gewaschen und erneut für 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, im Röhrchen verblieben gepackte Erythrozyten. Davon wurde ein Aliquot entsprechend „Verdünnung der Erythrozyten zur Bestimmung von Hämoglobin und der Zellzahl“ entnommen. Die Originalröhrchen mit den verbliebenen gepackten Erythrozyten wurden bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80° C gelagert.

Verdünnung der Erythrozyten zur Bestimmung von Hämoglobin und Zellzahl

Ein Aliquot von 100 µl RBC (*red blood cells*) wurde mit 200 µl 0,9 prozentiger NaCl-Lösung gemischt und im Zentrallabor des Robert-Bosch-Krankenhauses in Stuttgart am Sysmex ein kleines Blutbild mit Hb-Wert (Hämoglobin) und Zellzahl gemessen.

Herstellung von Blank-Erythrozyten für die Kalibrierproben und Qualitätskontrollen

Um Messfehler auszuschließen und die Messgenauigkeit zu erhöhen, wurden Blank-Erythrozyten unter Verwendung von EDTA-Blut hergestellt, welches einer Person

ohne Medikamenteneinnahme abgenommen wurde. Die gewaschenen RBC wurden bei 20° C gelagert.

Aufarbeitung der Proben

Patientenproben

Für die Patientenproben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Pro Probe wurden in 1 ml-Eppendorf-Gefäßen 10 µl DTT-Lösung und 140 µl EDTA-Lösung vorgelegt, nach Zugabe von 100 µl RBC wurde die Mischung sofort per Vortex kräftig gemischt. Durch Zugabe von EDTA erfolgte die Lyse der Erythrozyten und Freisetzung der Thionukleotide.

Proteinfällung und Extraktion der Metaboliten

Alle Proben (Patientenproben, Kalibrierproben und Qualitätskontrollen) durchliefen die gleichen Aufarbeitungsschritte. Zu jeder Probe wurden 100 µl Methanol zugegeben und direkt nach Zugabe kräftig gemischt, um eine vollständige Proteinfällung zu erreichen. Danach wurde zu allen Proben 250 µl Wasser zugefügt. Anschließend wurde jede Probe mit 500 µl Dichlormethan versetzt und sofort kräftig per Vortex gemischt. Nach Zentrifugieren für 10 Minuten bei 13 000 U/min ergab sich oben eine wässrige Schicht, die in neue Eppendorf-Gefäße überführt wurde. Die wässrige Phase wurde vor dem Oxidationsschritt nochmals für 10 Minuten zentrifugiert, um jegliche Zellreste abzutrennen.

Oxidation mit Permanganat zu den entsprechenden 6-Sulfonaten

Vom Überstand der zweiten Zentrifugation wurden exakt 150 µl in neue Eppendorfgefäße, die bereits 10 µl 1 M Natriumcarbonatpuffer pH 10,1 enthielten, pipettiert. Anschließend wurde zu jeder Probe 100 µl 0,24 % Kaliumpermanganat zugegeben und sofort gemischt. Die Proben wurden für 10 Minuten beiseite gestellt. Danach wurde jede Probe mit 10 µl H₂O₂ versetzt und gemischt. Die Proben entfärbten sich bei gleichzeitiger Sauerstoffentwicklung. Nach Beendigung der Blasenentwicklung erfolgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 13 000 U/min. Vom Überstand wurden 20 µl in ein Autosamplergläschen pipettiert und mit 40 µl Wasser gemischt.

Kalibrierung und Validierung

Für jede Messserie (etwa 20–30 Blutproben) wurden die Kalibrierproben frisch angesetzt und mitgemessen. Zusätzlich wurden die Qualitätskontrollen jeweils in Doppelbestimmung angesetzt und mitgemessen.

HPLC-Messung

Das HPLC-System bestand aus einer LC-9A-Pumpe, einem Autoinjektor sowie einem Fluoreszenzdetektor. Die Proben wurden durch eine isokratische Elution bei 30° C auf einer Nukleosil 100-5-C₁₈-Säule mit einer Präsäule oder Prontosil C₁₈ 5 µm separiert. Die mobile Phase bestand aus Potassium-Phosphat-Puffer (20 mmol/l, pH 6,8 mit

5 mmol/l Tetrabutylammonium-Hydrogensulfat/Acetonitril 84:16 [v:v]). Die typische Flussrate war 0,8 ml/min mit einer Laufzeit von 45 Minuten. Von jeder Probe wurden 20 µl injiziert. Die HPLC-Bedingungen befinden sich im Anhang. Thioguanosin-Deoxynukleotide konnten durch diesen HPLC-Assay nicht von Ribonukleotiden separiert werden.

3.2.2 Durchführung der Bestimmung von MMPN, MTGN und 6-TGN

Herstellung der Erythrozytenverdünnungen

EDTA-Blut wurde für 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Das Plasma wurde abpipettiert, verworfen und die verbliebenen Erythrozyten einmal mit gleichem Volumen an 0,9 prozentiger Natriumchlorid-Lösung gewaschen und erneut für 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert: im Röhrchen verblieben gepackte Erythrozyten. Für die Bestimmung der TGN bzw. der methylierten Metaboliten (MMPN, MTGN) wurden unterschiedliche Erythrozytenverdünnungen hergestellt. Die weitere Probenaufarbeitung (Eiweißfällung und Säurehydrolyse) wurde identisch durchgeführt. Für die HPLC-Messungen wurde dann entweder HPLC-System 1 für die methylierten Metaboliten bzw. HPLC-System 2 für 6-TG verwendet (siehe Anhang).

Verdünnung der Erythrozyten für die Bestimmung von 6-TG

Ein Teil der gepackten Erythrozyten wurde mit 2 Teilen 0,02 M Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung, die 15 mg DTT/ml enthält, verdünnt (entspricht einer 1:3-Verdünnung). Pro Patient wurden zwei (bzw. je nach erhaltener Menge an Blut auch mehr) Aliquots von 900 µl in Eppendorf-Gefäßen bis zur Bestimmung der Metaboliten bei -20° C gelagert.

Verdünnung der Erythrozyten für die Bestimmung von MMPN und MTGN

Ein weiteres Volumen von gepackten Erythrozyten wurde mit 2 Teilen 0,02 M KH_2PO_4 verdünnt (entspricht einer 1:3-Verdünnung). Pro Patient wurden zwei (bzw. je nach erhaltener Menge an Blut auch mehr) Aliquots von 900 µl in Eppendorf-Gefäßen bis zur Bestimmung der Metaboliten bei -20° C gelagert.

Herstellung von Blank-Erythrozyten für die Kalibrierproben und die Qualitätskontrollen

Blank-Erythrozyten für die Kalibrierproben und die Qualitätskontrollen wurden wie oben beschrieben unter Verwendung von EDTA-Blut hergestellt, das von einer Person ohne Medikamenteneinnahme abgenommen wurde. Die Verdünnungen (Erythrozytenlysat) wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20° C gelagert.

Probenaufarbeitung

Für die Patientenproben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Eiweißfällung und Säurehydrolyse

Alle Proben (Patientenproben, Kalibrierproben und Qualitätskontrollen sowohl für die Bestimmung von 6-TGN als auch für die Bestimmung der methylierten Metaboliten) durchliefen die gleiche Prozedur. Dafür wurden zu den 300 µl-Aliquots (Erythrozyten 1:3 verdünnt), die sich in Eppendorf-Gefäßen befanden, 35 µl Perchlorsäure (70 %) zugegeben und die Proben nach jeder Zugabe sofort durchmischt, damit die Eiweißfällung homogen erfolgte. Anschließend wurden die Gefäße für 10 Minuten auf Eis gestellt. Nach 10 Minuten Zentrifugation mit 13 000 U/min wurde der Überstand (ca. 250 µl) mit einer Pasteurpipette in neue Eppendorf-Gefäße überführt. Diese wurden für 15 Minuten im Heizblock auf 95° C erhitzt und anschließend zum Abkühlen auf Eis gestellt. Vor der HPLC-Messung wurden die Proben für 2 Minuten mit 13 000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurden 40 µl mobile Phase und 40 µl des Überstandes in die Gläser für die automatische Injektion pipettiert. Der Rest der Probe wurde bei -20° C aufbewahrt.

Kalibrierung und Validierung

Für jede Messserie (etwa 40 Blutproben) wurden die Kalibrierproben frisch angesetzt und mitgemessen. Zusätzlich wurden die entsprechenden Qualitätskontrollen aufgearbeitet und mitgemessen.

HPLC-Messung

Von jeder Probe wurden 50 µl injiziert. 6-TG eluierte bei ca. 5–6 Minuten. MMP eluierte bei ca. 11–12 Minuten. MTG eluierte bei ca. 8,5–9,5 Minuten. Die HPLC-Bedingungen befinden sich im Anhang.

3.2.3 Durchführung der TPMT-Bestimmung

Herstellung von Erythrozytenlysat

EDTA-Blut wurde 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 R). Plasma wurde abgenommen (die Zellmembranen entfernt) und verworfen. Die Erythrozyten wurden mit 0,9 prozentiger Natriumchlorid-Lösung gewaschen (gleiches Volumen wie Erythrozyten), 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die gepackten Erythrozyten wurden mit 4-fachem Volumen 0,02 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 verdünnt, beispielsweise 400 µl gepackte Erythrozyten und 1600 µl Puffer (entspricht einer 1:5-Verdünnung). 2 Aliquots mit jeweils 1000 µl in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen wurden bei -80° C bis zur Inkubation gelagert. Vor Durchführung der Inkubation wurde Erythrozytenlysat zur Abtrennung von Zellmembranen nach dem Auftauen 1 Minute bei 13 000 U/min zentrifugiert (Heraeus Biofuge pico).

Inkubation von Erythrozytenlysat mit 6-TG

Je Blutprobe wurden 3 Inkubationsproben in Eppendorfgefäßen angesetzt:
Probe 1 – Blank (ohne *S*-Adenosyl-L-Methionin)

Proben 2 und 3 – Doppelbestimmung TPMT-Aktivität

Je Messreihe wurden außerdem zwei Blankproben angesetzt: ein Erythrozytenblank (ohne 6-TG und *S*-Adenosyl-L-Methionin) und ein Reagenzblank (ohne Erythrozyten).

Tabelle 3.11: Pipettierschema

Es wurde in der Reihenfolge Puffer, DTT, SAM, 6-TG, Erythrozytenlysat nach folgendem Pipettierschema pipettiert. Abkürzungen: SAM = S-Adenosyl-L-Methionin.

Probe	Puffer	DTT	SAM	6-TG	Erythrozyten-Lysat
	µl	µl	µl	µl	µl
Inkubationsproben					
1 (= blank ohne SAM)	180	10		10	50
2	168	10	12,5	10	50
3	168	10	12,5	10	50
Blank-Proben					
Erythrozyten-Blank	190	10			50
Reagenz-Blank	218	10	12,5	10	

Die Proben wurden 1 Stunde bei 37° C im Wasserbad unter Schütteln inkubiert. Die Reaktion wurde mit 25 µl 70 % Perchlorsäure gestoppt, auf Vortex gemischt und 10 Minuten bei 13 000 U/min zentrifugiert (Heraeus Biofuge pico). 50 µl wurden in Autosampler-Vials überführt.

Kalibrierung und Validierung

Für jede Messserie wurden die sechs Kalibrierproben frisch angesetzt und mitgemessen. Außerdem wurden alle drei analytischen Qualitätskontrollen doppelt mitgemessen. Die biologische Qualitätskontrolle wurde wie eine unbekannte Probe behandelt.

HPLC-Analyse

Von jeder Probe wurden 15 µl injiziert. Die HPLC-Bedingungen befinden sich im Anhang. Das 6-MTG eluierte bei ca. 7–8 Minuten.

Hämoglobin (Hb)-Bestimmung

Vom Rest des Erythrozytenlysats wurde im Zentrallabor des Robert-Bosch-Krankenhauses in Stuttgart am Sysmex ein kleines Blutbild gemessen. Der Hb-Gehalt wurde zur Berechnung der TPMT-Aktivität benötigt. Die Werte wurden in g/dl (g/100 ml) angegeben. Sie lagen üblicherweise zwischen 4 und 7 g/dl.

3.2.4 Software und Auswertung

Auswertung der Chromatogramme und Berechnung der Werte

Die gesamte Auswertung der Chromatogramme mit Auswertung der Kalibriergeraden und Berechnung der Werte wurde im Programm Galaxie durchgeführt. Für die Berechnung der MTG-Werte wurden die Peakhöhen verwendet. Ebenso wurde die Auswertung der Chromatogramme für TGMP, TGDP und TGTP mit Integration und Berechnung der Peakflächen im Programm Galaxie durchgeführt. Die Peakflächen wurden als Summary-Report in einen Excel-File exportiert.

Die Berechnung unbekannter Konzentrationen erfolgte mit dem Mittelwert der Response-Faktoren. Zur Berechnung der MMP-Eichkurve wurden die MMP-Eichproben und die MMP-Ribosid-Eichproben verwendet. Die Abweichung zwischen den Werten aus MMP-Proben und aus MMP-Ribosid-Proben durfte maximal 15 % betragen. Zur Berechnung der 6-TG-Eichkurve wurden die 6-TG-Eichproben und die 6-Thioguanosin-Eichproben verwendet. Die Abweichung zwischen den Werten aus 6-TG-Proben und aus 6-Thioguanosin-Proben durfte maximal 15 % betragen.

Die Doppelbestimmungen wurden gemittelt und das Ergebnis mit 10 multipliziert, um den Endwert in pmol/ml zu erhalten (es wurden 100 µl gepackte Erythrozyten eingesetzt).

Berechnung der Kalibriergeraden und Berechnung der Werte

Die Peakflächen wurden in einem Excel-File bearbeitet. Es wurden zwei Kalibriergeraden berechnet: eine für TGMP und eine für die Summe aus TGDP und TGTP, dazu wurden die Peakflächen von TGDP und TGTP aufsummiert. Die Berechnung der Kalibriergeraden erfolgte durch lineare Regression. Unbekannte Proben wurden über die Regressionsgerade berechnet. Das Ergebnis wurde in pmol/100 µl Erythrozyten erhalten. Die Doppelbestimmungen wurden gemittelt und das Ergebnis mit 10 multipliziert, um den Endwert in pmol/ml zu erhalten. Zusätzlich wurde der Prozentanteil von TGDP bezogen auf die Summe von TGDP und TGTP aus den Peakflächen berechnet und mit angegeben. Die Messung durch Fluoreszenzdetektion konnte in den Bereichen 5–50 pmol/100 ml RBC für TGMP, 10–100 pmol/100 ml RBC für TGDP und 25–400 pmol/100 ml RBC für TGTP durchgeführt werden. Die Kalibriergeraden deckten für TGMP einen Bereich von 100–500 pmol/ml, für TGDP von 100–1000 pmol/ml und für TGTP von 200–4000 pmol/ml ab. Die Bestimmungsgrenzen lagen für TGMP und TGDP bei 100 pmol/ml, für TGTP bei 200 pmol/ml. Die Nachweisgrenzen lagen für alle Analyte bei 20 pmol/ml. Die Messungenauigkeit des HPLC-Assay wurde für alle drei 6-TGNs zu niedrigen, mittleren und hohen Konzentrationen untersucht. Die Intra- und Inter-Tages-Koeffizienten (jeweils $n = 5$) lagen zwischen 0,6 und 9,6 %.

Berechnung der TPMT-Aktivität

Die Doppelbestimmungen wurden gemittelt, anschließend der jeweilige Blank abgezogen und in Units [nmol/h/g Hämoglobin] umgerechnet. Ein Excel-Formblatt wur-

de zur Auswertung der TPMT-Aktivität verwendet. Die Summary-Liste aus Galaxie wurde in das Formblatt kopiert und die Hb-Werte eingegeben. Die TPMT-Aktivitäten wurden automatisch in Units berechnet.

Bestimmung des TPMT-Phänotyps

Nach Berechnung der TPMT-Aktivität wurden die Blutproben nach Kröplin *et al.* (1998) wie folgt eingeteilt:

- niedere Aktivität < 2 U „*very low*“
- mittlere Aktivität $>2 - 24$ U „*intermediate*“
- normale/hohe Aktivität $24 - 68$ U „*high*“

Dokumentation der Ergebnisse

Sämtliche Daten wie Chromatogramme, Rohdaten, Eichkurven und berechnete Ergebnisse wurden als DIN A4-Ausdrucke archiviert. Die gesamten elektronischen Daten wurden auf CD-ROM gespeichert.

3.3 Datenerhebung

3.3.1 Interview

Die Interviews erfolgten persönlich oder telefonisch anhand eines standardisierten Erhebungsbogens jeweils für Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa in einem zeitlichen Rahmen von etwa 10 bis 15 Minuten. Sie beinhalteten Fragen zu allgemeinen Daten wie Alter, Gewicht und Körpergröße sowie zur Dosierung von Azathioprin und Komedikation zum Zeitpunkt der Blutentnahme, insbesondere zur Einnahme von Glukokortikoiden oder Anti-TNF α (Infliximab). Des Weiteren wurden Schubfrequenz, aktuelles Befinden sowie Lebensgewohnheiten wie Nikotinkonsum erfragt. Darüber hinaus wurden die für die Berechnung von CDAI und CAI notwendigen Parameter erhoben. Die separat für Morbus Crohn und Colitis ulcerosa entwickelten standardisierten Erhebungsbögen befinden sich im Anhang.

3.3.2 Fragebogen

Der Fragebogen besteht aus 15 Seiten und umfasst neben einer kurzen Erklärung zur Studie und der Einverständniserklärung Fragen zu allgemeinen Patientendaten wie Geschlecht, Alter, Gewicht, Körpergröße, Dauer der Erkrankung und der Azathioprin-Einnahme, aktuelle Höhe der Azathioprin-Dosierung, aktuelle Komedikation sowie Art der Beschwerden. Darüber hinaus beinhaltet er Fragen zur Berechnung von CDAI, CAI und IBDQ sowie einen Vergleich der Schubfrequenz vor und nach Beginn der Azathioprin-Therapie. Die aktuellen Laborparameter sowie Befunde von Koloskopien und radiologischen Untersuchungen wurden der jeweiligen Patientenakte entnommen.

3.3.3 CDAI (Crohn's Disease Activity Index nach Best)

Der *Crohn's Disease Activity Index* nach Best (Best *et al.*, 1976) gilt als wichtigstes Instrument zur Quantifizierung der Krankheitsaktivität für Morbus Crohn (Jørgensen *et al.*, 2005), welches im Rahmen der *National Cooperative Crohn's Disease Study* in Illinois entwickelt wurde (Best *et al.*, 1976). Seit mehr als 20 Jahren dient er als Messinstrument, mit welchem mittels acht Variablen die aktuelle Krankheitsaktivität in Form eines numerischen Index bestimmt wird. Somit erfolgt eine Quantifizierung der Symptome, wobei ein Wert unter 150 einer klinischen Remission, über 150 einem aktiven Krankheitsverlauf und über 450 einer sehr schweren Krankheitsaktivität entsprechen. Typischerweise liegt der Wert zwischen 0 und 600, obwohl auch negative und höhere Werte möglich sind. Er eignet sich insbesondere, um die Krankheitsaktivität über einen längeren Zeitraum zu messen und dabei den Therapieerfolg zu überwachen. Für Kinder ist er ungeeignet (Best *et al.*, 1976). Zu den Variablen zählen die Anzahl der ungeformten Stühle pro Tag, Allgemeinbefinden, Stärke der Bauchschmerzen, extraintestinale Manifestationen der Erkrankung, die Einnahme von Loperamid oder Opiaten, palpable abdominale Resistenzen, Hämatokrit sowie das Standardkörpergewicht. Somit fließen sowohl objektive als auch subjektive Parameter in die Berechnung ein. Durch Multiplikation mit einem bestimmten Faktor erhalten die Variablen eine unterschiedliche Gewichtung. Ein Abfall zwischen 70 und 100 Punkten wird als Ansprechen auf die Therapie gewertet (Best *et al.*, 1976; Hoffmann, 2009a).

3.3.4 CAI (Clinical Activity Index)

Der *Clinical Activity Index* ist Bestandteil des Rachmilewitz-Scoring Systems, zu dem weiterhin noch ein *Endoscopic Index* zählt (Rachmilewitz, 1989). Der klinische Index wird durch die Parameter Anzahl der Stühle/Woche, Menge des Blutes im Stuhl, Allgemeinbefinden, Stärke der Bauchschmerzen, Temperatur, extraintestinale Manifestationen und die Laborparameter Blutsenkungsgeschwindigkeit und Hämoglobin gebildet. Der endoskopische Index, welcher für die vorliegende Arbeit nicht erhoben wurde, umfasst die Parameter Schleimhautgranulation, Gefäßzeichnung sowie Verletzbarkeit der Mukosa und Schleimhautbeläge. Oft korreliert er nicht mit dem klinischen Index, was beispielsweise mit der Anwendung topischer Glukokortikoide im Rektum begründet sein kann (Adler *et al.*, 1997).

3.3.5 IBDQ (Inflammatory Bowel Disease Questionnaire)

Das *Inflammatory Bowel Disease Questionnaire* dient der Erfassung der gesundheitsbezogenen Lebensqualität (*Health Related Quality of Life*, HRQoL). Es kann sowohl für Morbus Crohn- als auch Colitis ulcerosa-Patienten erhoben werden. Die 32 Fragen entstammen den Bereichen intestinale Symptome (10 Fragen), systemische Symptome (5 Fragen), soziale Funktion (5 Fragen) und emotionale Funktion (12 Fragen). Jede Frage ist auf einer Sieben-Punkte-Likert-Skala angeordnet und kann somit, je

nach Schweregrad der Ausprägung des Symptoms, zwischen einem und sieben Punkten ergeben. Sieben Punkte bedeuten keine Änderung oder keine Symptomatik, ein Punkt steht für schwerste Symptomatik. Die erreichbaren Punkte liegen zwischen 32 (schwere Symptomatik) und 224 (asymptomatisch) (Guyatt *et al.*, 1989). Der IBDQ besitzt den Vorteil, dass er vom Patienten selbständig und ohne Anleitung des Arztes ausgefüllt werden kann. Aufgrund seines Umfangs wird er weniger in der klinischen Praxis, sondern vorwiegend im Rahmen klinischer Studien eingesetzt. Der IBDQ korreliert signifikant mit CDAI und CAI (eigene Daten; Irvine *et al.*, 1994; Zahn *et al.*, 2006).

3.4 Statistische Auswertung

Für die Auswertung der Daten wurde das statistische Softwarepaket SPSS 15.0.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*, Inc., Chicago, Illinois, USA) verwendet. Für interindividuelle Vergleiche wurden der unverbundene T-Test für stetige normal verteilte sowie der unverbundene Wilcoxon-/Mann-Whitney-Test für stetige nicht normal verteilte Daten eingesetzt. Der Levene-Test wurde für stetige unverbundene Daten für den Vergleich der Standardabweichungen gebraucht. Der Fisher-Exact- und χ^2 -Test wurden für den Vergleich zweier Häufigkeiten zweier unverbundener Stichproben angewandt. Der Korrelations-Koeffizient r_P nach Pearson wurde für die Stärke einer Assoziation stetiger, normal verteilter Daten und der Rangkorrelationskoeffizient r_S nach Spearman für nicht normal verteilte Daten genutzt. Die Datenverteilung wurde nach der Methode von Kolmogorow-Smirnow ausgewertet. P-Werte kleiner 0,05 galten als statistisch signifikant, p-Werte kleiner 0,01 als statistisch hoch signifikant. Die Einteilung der Korrelationsstärken erfolgte nach (Bortz, 1999). Danach ergab sich für einen r-Wert ab 0,5 eine hohe Korrelation, für einen Wert zwischen 0,3 und 0,49 eine mäßige Korrelation und für einen Wert von 0,1 bis 0,29 eine schwache Korrelation.

4 Ergebnisse

4.1 Patientenkollektiv

Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa der Gastro-Crohn-Ambulanz der 1. Medizinischen Klinik und Poliklinik des Klinikums der Johannes Gutenberg-Universität Mainz wurden in die prospektive Studie eingeschlossen. Die Rekrutierung der Patienten erfolgte entweder telefonisch, postalisch oder im Rahmen der ärztlichen Behandlung in der Gastro-Crohn-Ambulanz. Die Teilnahme der Patienten erfolgte ausschließlich freiwillig nach eingehender mündlicher und schriftlicher Information sowie schriftlicher Einwilligung. Nach Aufnahme in die Studie wurde allen Probanden eine EDTA-Blutprobe entnommen und unverzüglich bei 4° Celsius gelagert und innerhalb von vier Stunden weiterverarbeitet. Die Datenerfassung (CDAI, CAI, IBDQ und weitere Fragen zur aktuellen Lebenssituation des Patienten) erfolgte mittels eines selbst entwickelten Fragebogens als persönliches oder telefonisches Interview. Der Fragebogen befindet sich im Anhang (siehe Kapitel 8). Alle Fragebögen sowie die entnommenen Proben wurden vor der Auswertung bzw. weiteren Verarbeitung anonymisiert. Das Studienprotokoll und die Aufklärungsbögen wurden von der Ethikkommission der zuständigen Ärztekammer genehmigt.

4.1.1 Einschlusskriterien

Als Einschlusskriterien mussten folgende Punkte erfüllt werden:

- endoskopische, bildgebende sowie histopathologische Evidenz für einen aktiven Morbus Crohn im Dün- oder Dickdarm bzw. eine aktive Colitis ulcerosa vor Beginn der Azathioprin-Therapie
- stabile Langzeittherapie mit Azathioprin für mindestens 6 Monate (Fischbach, 1996; Melle *et al.*, 2008)
- Dosierung von Azathioprin p. o. zwischen 0,4 und 3,0 mg pro Kilogramm Körpergewicht pro Tag
- Vorliegen der ausgefüllten Einverständniserklärung
- Einverständnis der Eltern bei Patienten unter 18 Jahren

4.1.2 Ausschlusskriterien

Folgende Ausschlusskriterien wurden angelegt:

- *Non-Compliance* (Höhe der Metaboliten TGDP, TGTP sowie 6-MMP im nicht messbaren Bereich)(Gearry und Barclay, 2005)
- Komedikation mit Ciclosporin, Tacrolimus, Mycophenolatmofetil, Leflunomid oder Methotrexat (De Beaumais *et al.*, 2010)
- Azathioprin-Gabe i. v. (Sandborn *et al.*, 1999)
- Patienten mit Colitis indeterminata
- Patienten mit primär sklerosierender Cholangitis
- Patienten mit Autoimmun-Hepatitis
- Schwangerschaft oder Stillen

4.1.3 Beschreibung der Stichproben

Tabelle 4.1: Deskriptive Statistik der Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Stichprobe

94 Morbus Crohn- und 39 Colitis ulcerosa-Patienten wurden für die Studie rekrutiert. Ein medianes Alter von 41 Jahren zum Zeitpunkt der Teilnahme an der Studie wurde berechnet. Mit 52 % dominierte das weibliche Geschlecht. Die mediane Erkrankungsdauer bezifferte sich auf 13 Jahre bei einer medianen Azathioprin-Therapiedauer von 2,0 Jahren und einer medianen Azathioprin-Dosierung von 1,7 mg/kg KG/d. 15 Patienten mit fistulierendem und 29 Patienten mit stenosierendem Verlauf konnten in die Studie eingeschlossen werden. 14 Patienten wurden mit Anti-TNF α therapiert. Eine mediane IBDQ-Punktzahl von 185 wurde erzielt. Etwa ein Drittel der Patienten erhielt Glukokortikoide und 5-Aminosalizylate. In Remission befand sich etwa ein Viertel der Patienten, 74 % litten an einem chronisch aktiven oder einem schubhaften Krankheitsverlauf.

	N	%	Mittelwert	Median	Min	Max
Morbus Crohn	94	71				
Colitis ulcerosa	39	29				
Alter			42	41	17	73
Geschlecht						
männlich	69	48				
weiblich	64	52				
Erkrankungsdauer (Jahre)			13	13	0	50
Fisteln	15	11				
Stenosen	29	22				
Anti-TNF α	14	11				
Dauer Azathioprin-Therapie (Jahre)			3,5	2	0	30
Dosierung von Azathioprin (mg)			123	112,5	25	250
Dosis (mg)/ Körpergewicht (kg)			1,8	1,7	0,4	2,9
IBDQ (Punkte)			176	185	97	224
Glukokortikoide	47	35				
5-Aminosalizylate	38	29				
Remission	32	26				
keine Remission	90	74				

245 Proben von 133 Testpersonen wurden in einem Zeitraum von Oktober 2003 bis Oktober 2007 ausgewertet. 94 Morbus Crohn- und 39 Colitis ulcerosa-Patienten konnten für die Studie rekrutiert werden. Trotz einer langjährigen Azathioprin-Therapie von im Median 2 Jahren bei einer medianen Erkrankungsdauer von 13 Jahren lag die verabreichte mediane Azathioprin-Dosis lediglich bei 1,7 mg pro Kilogramm Körpergewicht pro Tag (mg/kg KG/d).

Tabelle 4.2: Deskriptive Statistik der Morbus Crohn-Stichprobe

Mit 59 % überwog das weibliche Geschlecht im Morbus Crohn-Kollektiv. Die mediane Erkrankungsdauer lag bei 14 Jahren. Bei einer medianen Dauer der Azathioprin-Therapie von 3,0 Jahren wurde eine mediane Dosierung von 1,8 mg/kg KG/d verabreicht. 15 Patienten mit fistulierendem, 29 Patienten mit stenosierendem Verlauf und 14 Patienten mit Anti-TNF α -Therapie konnten in die Studie eingeschlossen werden. Die medianen erzielten Punktzahlen für CDAI und IBDQ bezifferten sich auf 47 bzw. 183. Knapp ein Drittel der Patienten erhielt Glukokortikoide, 20 % Aminosalizylate und ein Viertel der Patienten befand sich in Remission.

	N	%	Mittelwert	Median	Min	Max
Alter			42	40	17	73
Geschlecht						
männlich	39	41				
weiblich	55	59				
Erkrankungsdauer (Jahre)			15	14	0	50
Fisteln	15	16				
Stenosen	29	31				
Anti-TNF α	14	15				
Dauer Azathioprin-Therapie (Jahre)			3,9	3	0	30
Dosierung von Azathioprin (mg)			124	125	25	250
Dosis (mg)/ Körpergewicht (kg)			1,8	1,8	0,4	2,9
CDAI (Punkte)			69	47	0	251
IBDQ (Punkte)			171	183	97	220
Glukokortikoide	30	32				
5-Aminosalizylate	19	20				
Remission	21	25				
keine Remission	63	75				

Unter den 94 Morbus Crohn-Probanden befanden sich 29 Patienten mit stenosierender und 15 Patienten mit fistulierender Erkrankung. Somit konnte für knapp die Hälfte des Kollektivs ein schwerer Verlauf der Erkrankung diagnostiziert werden. Darüber hinaus wurden 14 Morbus Crohn-Probanden innerhalb von sechs Monaten vor der Metaboliten-Bestimmung mit Anti-TNF α therapiert. Im Einklang mit diesen Daten wurden nur 26 % der Patienten einer Remission¹⁰ zugeordnet, hingegen litten 74 % der Stichprobe entweder an einem schubhaften¹¹ oder chronisch aktiven Krankheitsverlauf¹².

Mit 59 % dominierte das weibliche Geschlecht in der Morbus Crohn-Stichprobe. Die Erkrankungsdauer aller Morbus Crohn-Patienten bezifferte sich im Median auf 14 Jahre bei einer medianen Azathioprin-Therapie-Dauer von 3 Jahren und einer medianen Dosierung von 1,8 mg/kg KG/d. Etwa ein Drittel der Stichprobe erhielt zum Zeitpunkt der Metaboliten-Bestimmung Glukokortikoide oder 5-Aminosalizylate. Le-

¹⁰Definition der Remission von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa: Vgl. Kapitel 1.2.4.

¹¹Definition des schubhaften Verlaufs von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa: Vgl. Kapitel 1.2.4.

¹²Definition des chronisch aktiven Krankheitsverlaufs von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa: Vgl. Kapitel 1.2.4.

Tabelle 4.3: Deskriptive Statistik der Colitis ulcerosa-Stichprobe

Unter den Colitis ulcerosa-Probanden war mit 64 % das männliche Geschlecht vorherrschend. Die Erkrankungsdauer betrug im Median 7 Jahre. Während einer medianen Azathioprin-Therapiedauer von 1 Jahr wurde eine mediane Azathioprin-Dosierung von 1,7 mg/kg KG/d verabreicht. Es wurden im Median 4,0 CAI-Punkte und 193 IBDQ-Punkte erzielt. 44 % der Patienten erhielt Glukokortikoide, knapp die Hälfte Aminosalizylate und knapp ein Drittel befand sich in Remission.

	N	%	Mittelwert	Median	Min	Max
Alter			41	42	20	71
Geschlecht						
männlich	25	64				
weiblich	14	36				
Erkrankungsdauer (Jahre)			10	7	0	24
Dauer Azathioprin-Therapie (Jahre)			2,5	1	0	12
Dosierung von Azathioprin (mg)			121	100	50	200
Dosis (mg)/ Körpergewicht (kg)			1,7	1,7	0,6	2,8
CAI (Punkte)			5,7	4	0	19
IBDQ (Punkte)			188	193	124	224
Glukokortikoide	17	44				
5-Aminosalizylate	19	49				
Remission	11	29				
keine Remission	27	71				

diglich 25 % der Morbus Crohn-Patienten konnten einer Remission zugeordnet werden, somit betrug die Zahl der Testpersonen mit schubhaftem oder chronisch aktivem Krankheitsverlauf auf 75 %. Dessen ungeachtet wurde ein medianer CDAI von 47 Punkten berechnet und lag damit im unteren Bereich der Skala.

Das männliche Geschlecht überwog mit 64 % im Colitis ulcerosa-Kollektiv. Bei einer medianen Erkrankungsdauer von 7 Jahren wurde eine mediane Azathioprin-Einnahmedauer von einem Jahr ermittelt. Die Dosierung pro Kilogramm Körpergewicht wurde mit im Median 1,7 mg kalkuliert und lag somit etwas niedriger als bei Morbus Crohn-Patienten (1,8 mg/kg KG). Der CAI bezifferte sich auf im Median 4,0 Punkte. Die Komedikation spielte auch im Colitis ulcerosa-Patientenkollektiv eine bedeutsame Rolle: Rund der Hälfte der Colitis ulcerosa-Patienten wurden Steroide verabreicht, 60 % erhielt 5-Aminosalizylate. Somit betrug der Anteil der Colitis ulcerosa-Probanden mit Komedikation höher als im Morbus Crohn-Kollektiv. Insgesamt unterschied sich jedoch der schwere Krankheitsverlauf kaum von dem der Morbus Crohn-Stichprobe: Für 29 % der Testpersonen erfolgte eine Klassifizierung in eine Remission, 71 % litten an einem chronisch aktiven oder schubhaften Krankheitsverlauf.

Die Tabellen 4.1, 4.2 und 4.3 geben einen Überblick über die deskriptive Statistik des gesamten Patientenkollektivs sowie der Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Stichprobe.

4.2 Deskriptive Statistik der Metaboliten-Messung und allgemeine Korrelationen

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der Azathioprin-Metabolit TGTP anstelle von GTP an die kleine GTPase Rac1 bindet und diese inhibiert, was die intrazelluläre Signaltransduktion der CD28-vermittelten Kostimulation von T-Lymphozyten blockiert und zur Apoptose mononukleärer Zellen führt (Tiede *et al.*, 2003). Somit war die Untersuchung der Azathioprin-Metaboliten-Spiegel und insbesondere der TGTP-Spiegel von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in dieser Arbeit von besonderem Interesse.

Aus den 286 abgenommenen Proben von 172 Patienten mit EDTA-Blut wurden die drei Mercaptopurin-Basen 6-Thioguanin (6-TG), 6-Methyl-Mercaptopurin (6-MMP) und 6-Methyl-Thioguanin (6-MTG) detektiert. Die drei Nukleotide von 6-Thioguanin, 6-Thioguanosin-5'-Monophosphat (TGMP), 6-Thioguanosin-5'-Diphosphat (TGDP) sowie 6-Thioguanosin-5'-Triphosphat (TGTP) wurden separat gemessen. Des Weiteren wurde die Aktivität der Thiopurin-*S*-Methyltransferase (TPMT) analysiert.

41 Proben wurden aufgrund nicht bestimmbarer TGDP- und TGTP-Spiegel in Verbindung mit nicht detektierbaren 6-MMP-Spiegeln (Gearry und Barclay, 2005) von der Studie ausgeschlossen. Nicht messbare 6-TGN-Spiegel lassen, insbesondere in Verbindung mit nicht bestimmbarer 6-MMP-Spiegel wie es in der vorliegenden Arbeit der Fall war, eine mangelnde *Compliance* der Patienten vermuten (Coulthard und Hogarth, 2005; Gearry und Barclay, 2005; Goldenberg *et al.*, 2004). Bei den verbleibenden 245 Proben konnten 6-Thioguanin und dessen Nukleotide bestimmt werden, somit wurden 133 von 172 Patienten in die Studie eingeschlossen. 59 Patienten wurden mehrfach zu Blutentnahme und Interview einbestellt. Von dieser Patientengruppe wurden insgesamt 171 Blutproben analysiert.

4.2.1 Deskriptive Statistik der Metaboliten

Nach Messung der Azathioprin-Metaboliten wurden zunächst die jeweiligen Parameter für die Häufigkeiten berechnet. Der Median von 6-TGN lag bei $94 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ (Interquartilsbreite $65\text{--}142 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$, Abbildung 4.1), der Median von TGDP bezifferte sich auf $14 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ (Interquartilsbreite $9\text{--}23 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$). Ein TGDP-Anteil von 15 % an den 6-TGN wurde errechnet (Standardabweichung 7 %), Abbildung 4.2.

TGTP konnte, wie 6-TGN und TGDP, bei allen 133 Patienten detektiert werden. Ein Median von $72 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ wurde ermittelt (Interquartilsbreite $50\text{--}118 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$, Abbildung 4.1), damit lag der Anteil von TGTP an 6-TGN im Median bei 81 % (Standardabweichung 21 %, Abbildung 4.2). Abbildung 4.2 veranschaulicht den prozentualen Anteil der drei gemessenen 6-TGN (TGMP, TGDP und TGTP) an den Gesamt-TGN. Mit 81 % stellte TGTP den Hauptmetaboliten dar. Der Anteil von TGDP wurde mit 15 % kalkuliert und die verbleibenden

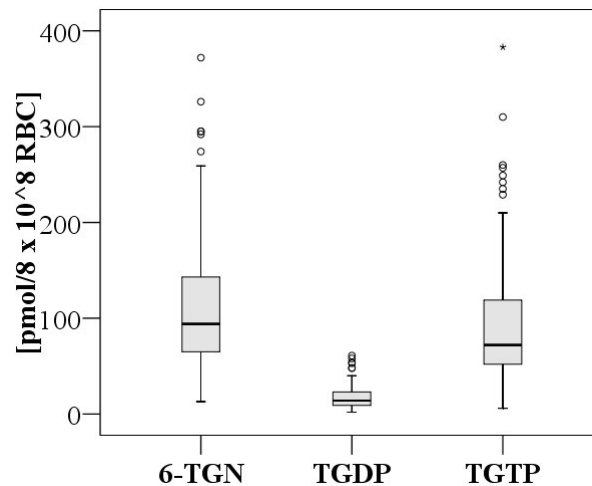


Abbildung 4.1: Box-Whisker-Plots von 6-TGN, TGDP und TGTP

Der Median lag für 6-TGN bei $94 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$, für TGDP bei 14 und für TGTP bei $72 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ ($n = 133$).

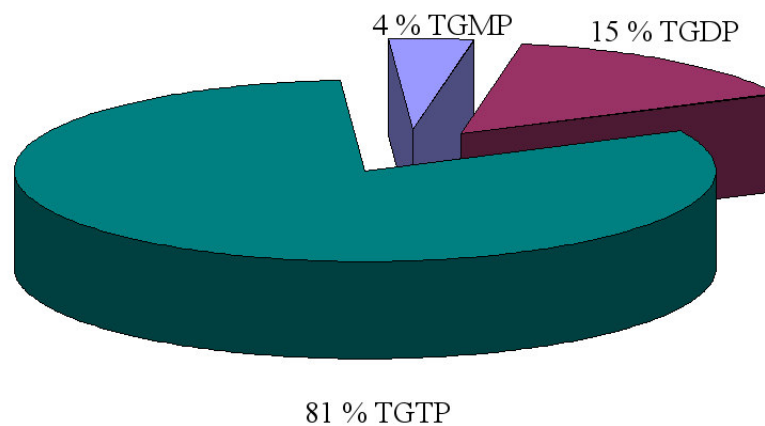


Abbildung 4.2: Verteilung der Thioguanin-Nukleotide

Graphische Darstellung der Anteile von TGTP (81 %) und TGDP (15 %) an 6-TGN ($n = 133$). Die verbleibenden 4 % entfallen mutmaßlich auf TGMP, einen Metaboliten, der in den abgenommenen Proben nur in Spuren von bis zu $1,6 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ vorhanden war und damit nicht mehr exakt detektierbar war. Denkbar ist allerdings auch, dass in diesen 4 % weitere noch unidentifizierte Azathioprin-Metaboliten enthalten waren. Festzuhalten ist, dass TGTP mit einem Anteil von 81 % den Hauptmetaboliten von Azathioprin darstellte.

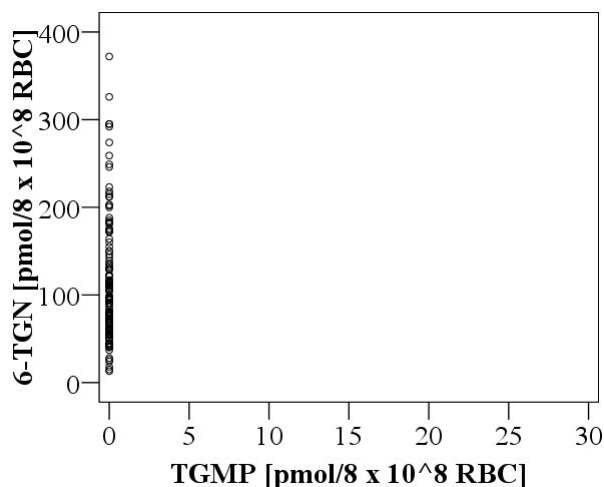


Abbildung 4.3: Korrelation von 6-TGN mit TGMP

TGMP lag bei allen 133 Patienten unter $1,6 \text{ pmol/8 x } 10^8 \text{ RBC}$ und war damit nicht mehr genau detektierbar. Von den drei Azathioprin-Metaboliten hat TGMP mit 4 % den geringsten Anteil.

Tabelle 4.4: Deskriptive Statistik der gemessenen Metaboliten

Darstellung der deskriptiven Statistik (Minimum, Maximum, Median, Mittelwert, Interquartilsbreite sowie Standardabweichung) der gemessenen Metaboliten. Abkürzungen: Min = Minimum, Max = Maximum, MW = Mittelwert, IS = Interquartilsbreite, SD = Standardabweichung.

	n	Min	Max	Median	MW	IS	SD
6-TGN [pmol/8 x 10^8 RBC]	133	13	372	94	113	64–145	69
TGDP [pmol/8 x 10^8 RBC]	133	2	61	14	18	9–13	12
TGTP [pmol/8 x 10^8 RBC]	133	6	383	72	94	51–120	64
Q [§] [pmol/8x 10^8 RBC]	133	57	94	84	84	81–87	6
S [#] [pmol/8x 10^8 RBC]	133	10	441	89	111	60–148	74
6-MMP [pmol/8 x 10^8 RBC]	131	28	15110	379	1111	166–1228	2067
6-MMP/6-TGN [pmol/8 x 10^8 RBC]	131	0,3	153,3	4,3	11,3	1,6–12,0	22,4
TPMT-Aktivität [U]	133	26	89	50	52	44–58	11
MTGN [pmol/8 x 10^8 RBC]	125	12	155	46	55	33–71	31
Dosis [mg/kg KG]	115	0,4	2,9	1,7	1,8	1,4–2,2	0,6
Dosis [mg]	118	25	250	113	123	100–150	45

§Q = TGTP/(TGDP+TGTP)

#S = TGDP+TGTP

4 % entfallen mutmaßlich auf den Metaboliten TGMP. Für diesen wurde bei allen 133 Patienten ein Bereich von unter $1,6 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ determiniert (Abbildung 4.3). Werte in diesem Bereich sind nicht mehr exakt detektierbar.

Tabelle 4.4 stellt eine Übersicht der gemessenen Metaboliten und der Azathioprin-Dosierung sowie deren Häufigkeiten mit Minimum, Maximum, Median, Mittelwert, Interquartilspanne sowie Standardabweichung dar.

4.2.2 Korrelation der Metaboliten – Der Metabolit TGTP korreliert mit 6-TGN, TGDP und MTGN

Im nächsten Arbeitsgang wurden die Zusammenhänge der einzelnen gemessenen Azathioprin-Metaboliten zueinander analysiert. Sämtliche Korrelationen erfolgten mit Hilfe des Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten r_s . Gemeinsam war allen durchgeführten Untersuchungen der Metaboliten (6-TGN, TGDP, TGTP, MTGN) die hohe¹³ ($r_s > 0,80$) und hochsignifikante ($p < 0,0001$) Korrelation. Dies verdeutlicht Abbildung 4.4a mit der Darstellung von 6-TGN und TGDP ($r_s = 0,83$, $p < 0,0001$). Ähnlich hoch miteinander korrelierten TGDP und TGTP: $r_s = 0,82$, $p < 0,0001$ (Abbildung 4.5a). Der höchste beobachtete Zusammenhang zweier gemessener Metaboliten wurde zwischen TGTP und 6-TGN errechnet ($r_s = 0,91$, $p < 0,0001$, Abbildung 4.4b). Die MTGN- und 6-TGN-Spiegel stehen ebenfalls in engem Bezug zueinander: $r_s = 0,85$, $p < 0,0001$, Abbildung 4.5b. MTGN ist ein Endprodukt der drei Metaboliten TGMP, TGDP und TGTP, welches durch S-Methylierung der TPMT entsteht. Die Korrelation mit 6-TGN deutet auf den gleichmäßigen Abbau der 6-TGN zu MTGN durch ein funktionsfähiges TPMT-Enzym hin. Patienten mit TPMT-Defizienz verfügen über stark erniedrigte oder fehlende methylierte Metaboliten, somit auch über erniedrigte oder fehlende MTGN-Spiegel (Hindorf *et al.*, 2004b).

Eine enge Beziehung aufgrund einer sehr hohen Korrelation konnte zwischen 6-TGN und der Summe S, bestehend aus den beiden Metaboliten TGDP und TGTP, konstatiert werden ($r_s = 0,93$, $p < 0,0001$, Abbildung 4.6). Damit korrelierten TGDP und TGTP gemeinsam besser mit 6-TGN als der singuläre TGTP-Metabolit.

Es kann somit dokumentiert werden, dass der Metabolit TGMP lediglich in Spuren nachweisbar ist und eine sehr hohe Korrelation von 6-TGN mit der Summe aus den beiden Metaboliten TGDP und TGTP besteht, so dass man daraus in Übereinstimmung mit Abbildung 4.2 folgern kann, dass diese beiden Substanzen quantitativ die wichtigsten Nukleotide an den Gesamt-TGN darstellen. Die Korrelation von 6-TGN mit TGTP verdeutlicht noch einmal, dass die Gesamtsumme der 6-TGN zum größten Teil durch den Metaboliten TGTP geformt wird. Auffällig ist in den Abbildungen 4.4, 4.5 und 4.6 eine zweifache Aufteilung der Punktwolke mit sehr enger Korrelation bis ca. $100 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ 6-TGN bzw. $20 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ TGDP und

¹³Hohe Korrelation: $r > 0,5$; mäßige Korrelation: $r = 0,3-0,49$; schwache Korrelation: $r = 0,1-0,29$; $r < 0,1$ keine Korrelation (Bortz, 1999).

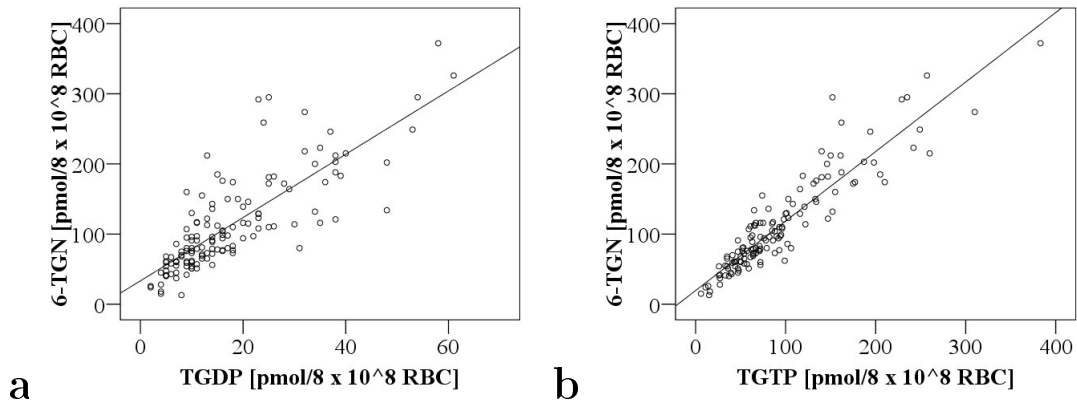


Abbildung 4.4: Korrelation von 6-TGN mit TGDP und von 6-TGN mit TGTP

a) Es bestand eine hohe und hochsignifikante Korrelation von 6-TGN mit dem Metaboliten TGDP: $r_s = 0,83$, $p < 0,0001$ ($n = 133$). b) 6-TGN und TGTP korrelierten sehr hoch und hochsignifikant: $r_s = 0,91$, $p < 0,0001$ ($n = 133$).

100 pmol/8 x 10⁸ RBC TGTP und größerer Streuung oberhalb dieser Werte. Auf den Korrelationskoeffizienten r_s hatte diese Verteilung jedoch keinen Einfluss.

Tabelle 4.5 bietet einen Überblick über die Korrelationen sämtlicher Metaboliten, der TPMT, der gebildeten Kennzahlen sowie der Dosierung von Azathioprin. Auch diese Korrelationen wurden mittels Spearman-Rangkorrelationskoeffizient ausgeführt. Es konnte, wie oben dargestellt, eine hochsignifikante Korrelation der Metaboliten 6-TGN, TGDP, TGTP und MTGN sowie der Summe $S_{TGDP+TGTP}$ aufgezeigt werden. Diese Kennzahl wurde berechnet, nachdem deutlich wurde, dass von den drei Nukleotiden der 6-TGN TGMP nur in Spuren vorliegt und somit TGDP und TGTP die beiden quantitativ wichtigsten Metaboliten von 6-TGN repräsentieren. Für den durch die TPMT methylierten Metaboliten 6-MMP wurde ein mäßiger und hochsignifikanter Zusammenhang mit den oben genannten Metaboliten kalkuliert ($r_s = 0,32$ bis $0,37$; p jeweils $< 0,0001$). Die Azathioprin-Dosierung in Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht stand ebenfalls in einem mäßigen und hochsignifikanten Bezug zu 6-MMP, 6-MMP/6-TGN und MTGN ($r_s = 0,33$ bis $0,45$; p jeweils $< 0,0001$). Die TPMT-Aktivität korrelierte mäßig und signifikant mit der Dosierung von Azathioprin sowie mit MTGN ($r_s = 0,21$ bis $0,28$; $p = 0,002$ bis $0,018$). Eine mäßige und signifikante Assoziation bestand darüber hinaus zwischen Azathioprin-Dosierung und 6-TGN, TGDP, TGTP sowie $S_{TGDP+TGTP}$ ($r_s = 0,23$ bis $0,26$; $p = 0,004$ bis $0,013$).

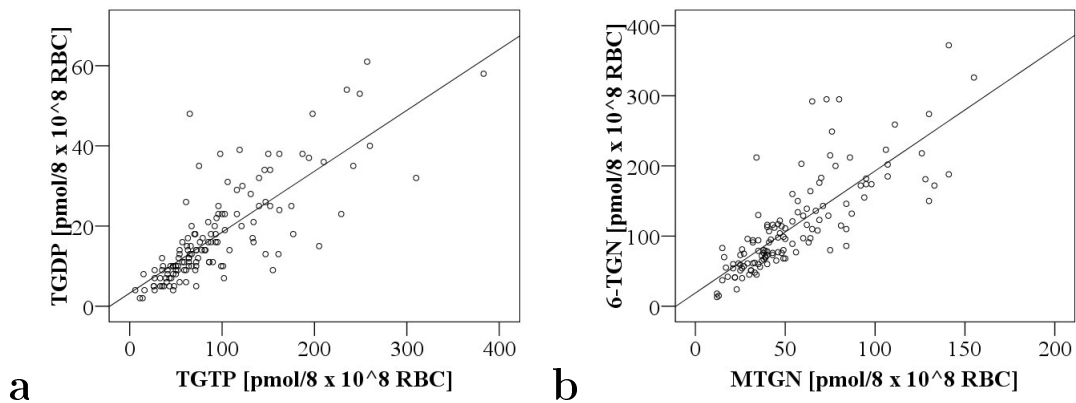


Abbildung 4.5: Korrelation von TGDP mit TGTP und von 6-TGN mit MTGN

a) Diese Abbildung veranschaulicht den engen Zusammenhang der Azathioprin-Metaboliten TGDP und TGTP: $r_S = 0,82$, $p < 0,0001$ ($n = 133$). b) 6-TGN und MTGN korrelierten ebenfalls hoch und hochsignifikant: $r_S = 0,85$, $p < 0,0001$ ($n = 125$).

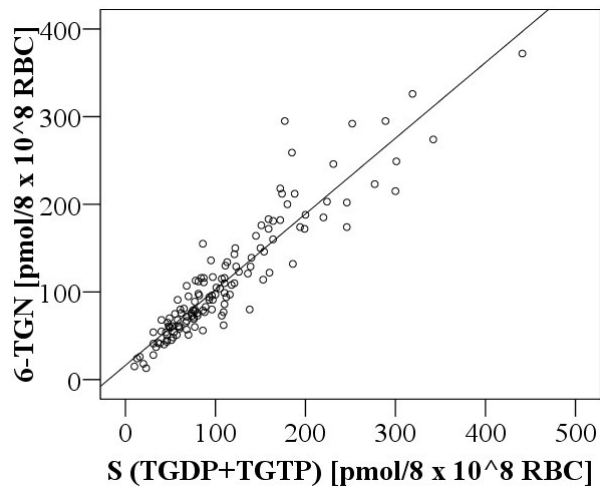


Abbildung 4.6: Korrelation von 6-TGN mit der Summe $S_{TGDP+TGTP}$ aus TGDP und TGTP

Es bestand eine sehr hohe Korrelation zwischen 6-TGN und $S_{TGDP+TGTP}$: $r_S = 0,93$, $p < 0,0001$ ($n = 133$). Dies deutet darauf hin, dass TGDP und TGTP quantitativ die beiden wichtigsten Azathioprin-Metaboliten darstellen.

Tabelle 4.5: Übersicht über die Korrelationen sämtlicher Metaboliten, der TPMT, der gebildeten Kennzahlen sowie der Dosierung von Azathioprin

In der oberen Zeile befindet sich jeweils der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient r_S , darunter der p-Wert und in der untersten Zeile die Fallzahl. Signifikanzen sind farblich hervorgehoben. Diese Tabelle demonstriert, dass eine ausgezeichnete Korrelation der Metaboliten 6-TGN, TGDP, TGTP und MTGN untereinander besteht. Weiterhin konnte eine moderate Korrelation dieser vier Metaboliten mit 6-MMP sowie mit der Dosierung (in mg/kg KG) errechnet werden. Diese korrelierte wiederum gering mit der TPMT-Aktivität.

Spearman Korrelations- koeffizient	6-TGN	TGDP	TGTP	Q [§]	S [#]	6-MMP	6-MMP/ 6-TGN	TPMT- Aktivität	MTGN	Azathioprin- Dosis (mg)/ KG (kg)	Azathioprin- Dosierung (mg)
6-TGN	1										
TGDP	0,83 0,0001	1									
TGTP	133 0,91 0,0001	0,82 0,0001	1								
Q [§]	133 0,07 0,4	133 -0,34 0,0001	133 0,18 0,041	1							
S [#]	133 0,93 0,0001	133 0,87 0,0001	133 0,99 0,0001	0,09 0,32	1						
6-MMP	133 0,33 0,0001	133 0,33 0,0001	133 0,32 0,0001	0,02 0,82	0,34 0,0001	1					
6-MMP/ 6-TGN	131 -0,12 0,17	131 -0,04 0,63	131 -0,1 0,28	131 -0,06 0,49	131 -0,09 0,32	0,87 0,0001	1				
TPMT-Aktivität	131 0,09 0,29	131 0,1 0,24	131 0,11 0,2	131 0,09 0,32	131 0,11 0,2	131 0,17 0,06	0,12 0,17	1			
MTGN	133 0,85 0,0001	133 0,75 0,0001	133 0,83 0,0001	133 0,12 0,19	133 0,84 0,0001	131 0,37 0,0001	131 0 0,97	0,21 0,18	1		
Azathioprin- Dosis (mg)/ KG (kg)	125 0,32 0,001	125 0,31 0,001	125 0,27 0,003	125 -0,08 0,38	125 0,28 0,002	125 0,44 0,0001	125 0,35 0,0001	125 0,23 0,16	0,45 0,0001	1	
Azathioprin- Dosierung (mg)	115 0,26 0,004	115 0,26 0,004	115 0,23 0,013	115 -0,04 0,64	115 0,24 0,009	114 0,49 0,0001	114 0,39 0,0001	115 0,28 0,002	108 0,35 0,0001	0,74 0,0001	1
	118	118	118	118	118	117	117	118	111	115	

rot=Korrelation ist signifikant für 0,0001 (2-seitig); blau=Korrelation ist signifikant für 0,01 (2-seitig); grün=Korrelation ist signifikant für 0,05 (2-seitig)

§Q=TGTP/(TGDP+TGTP)

#S=TGDP+TGTP

Neben der oben genannten Feststellung, dass die Metaboliten selbst ausgezeichnet miteinander korrelieren, bleibt also festzuhalten, dass die Höhe der Metaboliten-Spiegel und der Enzymaktivität der TPMT offenbar durch die Dosierung von Azathioprin beeinflusst wird. Am deutlichsten scheint sich dieser Effekt auf die TPMT-abhängigen Metaboliten 6-MMP und MTGN auszuwirken.

4.2.3 Korrelation der Metaboliten im Morbus Crohn-Kollektiv

Als nächstes wurde untersucht, inwieweit die oben aufgeführten Korrelationen der Azathioprin-Metaboliten bei den in die Studie eingeschlossenen 94 Morbus Crohn-Patienten existierten. Ein großer Teil dieses Kollektivs zeichnete sich durch einen schweren Krankheitsverlauf aus: 15 Probanden litten zum Zeitpunkt der Untersuchung an Fisteln, 29 Teilnehmer wiesen einen stenosierenden Verlauf auf. 14 Patienten erhielten Anti-TNF α (Remicade[®]) in den letzten 6 Monaten vor der Blutentnahme. Die Korrelation sämtlicher Metaboliten mittels Spearman-Rangkorrelationskoeffizient erbrachte folgende Resultate: Für 6-TGN und TGDP ($r_S = 0,84$, $p < 0,0001$) und TGTP ($r_S = 0,92$, $p < 0,0001$) sowie den Metaboliten MTGN ($r_S = 0,85$, $p < 0,0001$) und $S_{TGDP+TGTP}$ ($r_S = 0,93$, $p < 0,0001$) konnte eine sehr hohe und hochsignifikante, für 6-MMP eine mäßige und hochsignifikante Korrelation ($r_S = 0,43$, $p < 0,0001$) errechnet werden. 6-MMP und 6-MMP/6-TGN wiesen einen mäßigen aber hochsignifikanten Zusammenhang mit der Dosierung von Azathioprin auf ($r_S = 0,39$ bis $0,51$; p jeweils $< 0,0001$). Ebenso bestand zwischen MTGN ein mäßiger und hochsignifikanter Bezug mit der Azathioprin-Dosierung ($r_S = 0,42$ und $0,5$; p jeweils $< 0,0001$). Im Gegensatz zum Gesamtkollektiv korrelierte die TPMT-Aktivität in der Morbus Crohn-Stichprobe mäßig und signifikant mit den Spiegeln sämtlicher Metaboliten (6-TGN, TGDP, TGTP, MTGN sowie $S_{TGDP+TGTP}$; $r_S = 0,20$ bis $0,29$; $p = 0,006$ bis $0,05$). Erstaunlicherweise lag keine Assoziation mit 6-MMP vor ($r_S = 0,11$, $p = 0,3$). Erneut zeigte sich eine schwache Beziehung zwischen TPMT-Aktivität und der Dosierung von Azathioprin ($r_S = 0,24$ und $r_S = 0,27$; $p = 0,032$ und $p = 0,013$) (Tabelle 4.6).

Die Ergebnisse der Korrelationen der Morbus Crohn-Gruppe waren damit ähnlich signifikant wie die des gesamten Patientengutes. Auch hier korrelierte 6-TGN ausgezeichnet mit der Summe der beiden Hauptmetaboliten TGDP und TGTP, gefolgt von der Korrelation zwischen 6-TGN und TGTP. Im Gegensatz zum Gesamtkollektiv ließ sich in dieser Gruppe die Beobachtung machen, dass neben der Dosierung von Azathioprin auch die TPMT-Aktivität einen Einfluss auf die Höhe der Metaboliten-Spiegel zu haben schien. Möglicherweise war aber auch dieser Effekt in erster Linie durch den Einfluss der Azathioprin-Dosierung auf die TPMT-Aktivität entstanden.

Tabelle 4.6: Übersicht über die Korrelationen der Metaboliten, der TPMT, der gebildeten Kennzahlen sowie der Dosierung von Azathioprin bei Morbus Crohn-Patienten

In der oberen Zeile befindet sich jeweils der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient r_s , darunter der p -Wert und in der untersten Zeile die Fallzahl. Signifikanzen sind farbig hervorgehoben. Wie in der gesamten Patientenpopulation zeigte sich auch im Morbus Crohn-Patientenkollektiv eine ausgezeichnete Korrelation der wichtigsten Metaboliten 6-TGN, TGDP, TGTP und MTGN sowie der Kennzahl $S_{TGDP+TGTP}$. Die Azathioprin-Dosierung und die TPMT-Aktivität korrelierten mäßig mit allen Metaboliten. Es bestand jedoch keine Korrelation zwischen TPMT-Aktivität und 6-MMP.

Spearman Korrelationskoeffizient	6-TGN	TGDP	TGTP	Q [§]	S [#]	6-MMP	6-MMP/ 6-TGN	TPMT- Aktivität	MTGN	Azathioprin- Dosis (mg)/ KG (kg)	Azathioprin- Dosierung (mg)
6-TGN	1										
TGDP	0,84 0,0001 94	1									
TGTP	0,92 0,0001 94	0,84 0,0001 94	1								
Q [§]	0,09 0,38 94	-0,32 0,002 94	0,19 0,07 94	1							
S [#]	0,93 0,0001 94	0,89 0,0001 94	0,99 0,0001 94	0,1 0,35 94	1						
6-MMP	0,43 0,0001 92	0,4 0,0001 92	0,44 0,0001 92	0,06 0,55 92	0,44 0,0001 92	1					
6-MMP/6-TGN	-0,05 0,62 92	-0,001 1 92	-0,007 0,95 92	-0,03 0,77 92	-0,007 0,94 92	0,86 0,0001 92	1				
TPMT-Aktivität	0,2 0,05 94	0,22 0,034 94	0,26 0,011 94	0,08 0,43 94	0,25 0,014 94	0,11 0,3 92	0,04 0,72 92	1			
MTGN	0,85 0,0001 87	0,79 0,0001 87	0,82 0,0001 87	0,1 0,36 87	0,83 0,0001 87	0,49 0,0001 87	0,11 0,32 87	0,29 0,006 87	1		
Azathioprin- Dosis (mg)/ KG (kg)	0,29 0,008 81	0,29 0,008 81	0,28 0,012 81	-0,03 0,81 81	0,26 0,01 81	0,46 0,0001 80	0,39 0,0001 80	0,24 0,032 81	0,5 0,0001 75	1	
Azathioprin- Dosierung (mg)	0,27 0,012 83	0,29 0,008 83	0,25 0,026 83	-0,02 0,86 83	0,25 0,022 83	0,51 0,0001 82	0,43 0,0001 82	0,27 0,013 83	0,42 0,0001 77	0,7 0,0001 81	1

rot=Korrelation ist signifikant für 0,0001 (2-seitig); blau=Korrelation ist signifikant für 0,01 (2-seitig); grün=Korrelation ist signifikant für 0,05 (2-seitig)

§Q=TGTP/(TGDP+TGTP)

#S=TGDP+TGTP

Tabelle 4.7: Überblick über die Korrelationen der Metaboliten, der TPMT, der gebildeten Kennzahlen sowie der Dosierung von Azathioprin bei Colitis ulcerosa-Patienten

In der oberen Zeile befindet sich jeweils der Korrelationskoeffizient r_S , darunter der p-Wert und in der untersten Zeile die Fallzahl. Signifikanzen sind farbig hervorgehoben. Ebenso wie im Gesamt- und Morbus Crohn-Kollektiv war auch hier eine hohe und hochsignifikante Korrelation der Metaboliten 6-TGN, TGDP, TGTP, MTGN und der Kennzahl $S_{TGDP+TGTP}$ nachweisbar. Daneben schien die Höhe der Azathioprin-Dosierung einen schwachen Effekt auf 6-MMP, 6-TGN und MTGN auszuüben. Der „Dosis-Effekt“ war jedoch weniger prägnant als im Morbus Crohn-Kollektiv.

Spearman Korrelations- koeffizient	6-TGN	TGDP	TGTP	Q [§]	S [#]	6-MMP	6-MMP/ 6-TGN	TPMT- Aktivität	MTGN	Azathioprin- Dosis (mg)/ KG (kg)	Azathioprin- Dosierung (mg)
6-TGN	1										
TGDP	0,78 0,0001 39	1									
TGTP	0,89 0,0001 39	0,76 0,0001 39	1								
Q [§]	0,02 0,92 39	-0,42 0,008 39	0,14 0,38 39	1							
S [#]	0,91 0,0001 39	0,82 0,0001 39	0,99 0,0001 39	0,05 0,75 39	1						
6-MMP	0,13 0,43 39	0,21 0,2 39	0,06 0,73 39	-0,1 0,55 39	0,09 0,59 39	1					
6-MMP/6-TGN	-0,28 0,08 39	-0,12 0,46 39	-0,31 0,05 39	-0,13 0,42 39	-0,29 0,07 39	0,89 0,0001 39	1				
TPMT-Aktivität	-0,17 0,31 39	-0,17 0,3 39	-0,21 0,19 39	0,1 0,53 39	-0,22 0,19 39	0,3 0,07 39	0,33 0,043 39	1			
MTGN	0,83 0,0001 38	0,65 0,0001 38	0,85 0,0001 38	0,16 0,33 38	0,85 0,0001 38	0,08 0,63 38	0,24 0,15 38	0,01 0,95 38	1		
Azathioprin- Dosis (mg)/ KG (kg)	0,41 0,016 34	0,32 0,06 34	0,29 0,1 34	-0,15 0,4 34	0,3 0,08 34	0,38 0,029 34	0,21 0,23 34	0,16 0,37 34	0,037 0,035 33	1	
Azathioprin- Dosierung (mg)	0,25 0,15 35	0,19 0,28 35	0,17 0,32 35	-0,08 0,65 35	0,19 0,28 35	0,45 0,007 35	0,32 0,06 35	0,29 0,1 35	0,21 0,24 34	0,83 0,0001 34	1

rot=Korrelation ist signifikant für 0,0001 (2-seitig); blau=Korrelation ist signifikant für 0,01 (2-seitig); grün=Korrelation ist signifikant für 0,05 (2-seitig)

§Q=TGTP/(TGDP+TGTP)

#S=TGDP+TGTP

4.2.4 Korrelation der Metaboliten im Colitis ulcerosa-Kollektiv

Final wurde überprüft, inwieweit die Azathioprin-Metaboliten in der Gruppe der 39 Colitis ulcerosa-Patienten zusammenhängen. Die statistische Auswertung der Metaboliten erbrachte folgende Ergebnisse: Eine sehr enge Assoziation bestand zwischen 6-TGN und TGDP ($r_s = 0,78$, $p < 0,0001$), TGTP ($r_s = 0,89$, $p < 0,0001$) sowie MTGN ($r_s = 0,83$, $p < 0,0001$) und $S_{TGDP+TGTP}$ ($r_s = 0,91$, $p < 0,0001$). Auch hier wies die Dosierung von Azathioprin pro Kilogramm Körpergewicht einen mäßigen und signifikanten Zusammenhang mit 6-TGN ($r_s = 0,41$; $p = 0,016$), MTGN ($r_s = 0,37$; $p = 0,035$) sowie 6-MMP auf ($r_s = 0,38$; $p = 0,029$) (Tabelle 4.7).

Im Vergleich mit der Analyse der Morbus Crohn-Patienten (Tabelle 4.6) konnten insgesamt weniger und nur halb so viele hochsignifikante Korrelationen ermittelt werden. Die Korrelationskoeffizienten lagen generell etwas niedriger. Die hochsignifikanten Korrelationen bestanden zwischen den Metaboliten von Azathioprin, so dass hiermit bestätigt werden konnte, dass nicht nur die Gesamtgruppe hochsignifikante Metaboliten-Korrelationen aufwies, sondern diese jeweils auch im Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Kollektiv vorhanden waren. Sämtliche unter den Colitis ulcerosa-Patienten errechneten Zusammenhänge konnten ebenso für Morbus Crohn-Patienten nachgewiesen werden. So konnte der in der Morbus-Crohn-Gruppe analysierte Dosierungs-Effekt in der Colitis ulcerosa-Stichprobe lediglich in schwächerer Ausprägung demonstriert werden. Die Korrelationen der TPMT-Aktivität mit den Metaboliten konnte an diesem Kollektiv nicht bestätigt werden. Allerdings sollte man die kleinere Fallzahl von 39 Patienten dieser Stichprobe berücksichtigen.

4.2.5 Korrelationen im Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Kollektiv mit 6-TGN $>$ und $<$ $100 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ sowie Q $>$ und $<$ $85 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$

In einem weiteren Untersuchungsgang wurde getestet, wie sich Unterschiede in den 6-TGN-Spiegeln und im Quotienten Q ($TGTP/(TGDP+TGTP)$) auf die übrigen Metaboliten und klinische Parameter wie Ansprechen und Anzahl der Schübe auswirken. Hierfür wurden die Morbus Crohn-Patienten zunächst in die beiden Gruppen 6-TGN $>$ und $<$ $100 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ eingeteilt. Hier wurde deutlich, dass Patienten mit erhöhtem 6-TGN auch signifikant häufiger über erhöhte TGDP- und TGTP-Spiegel verfügen. Weiterhin sprechen diese Patienten auch signifikant besser auf die Azathioprin-Therapie an ($p = 0,023$, Tabelle 4.8).

Ähnliche Resultate konnten auch im Colitis ulcerosa-Kollektiv beobachtet werden. Auch hier verfügen Patienten mit erhöhten 6-TGN-Spiegeln über signifikant höhere TGDP- und TGTP-Spiegel und sprechen besser auf eine Therapie an ($p = 0,05$, Tabelle 4.9).

Im nächsten Schritt wurden die 94 Morbus Crohn-Patienten zunächst in vier Gruppen mit hohen und niedrigen 6-TGN- und Quotienten-Spiegeln aufgeteilt. Der Cut-off-Wert lag für 6-TGN bei 100, für den Quotienten Q bei $85 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$.

Die Fallzahl lag zwischen 19 und 31 Patienten pro Gruppe. Hier wurde deutlich, dass Patienten mit sowohl erhöhtem 6-TGN als auch erhöhtem Quotienten von allen vier Gruppen am besten ansprachen und am wenigsten Schübe zu verzeichnen hatten (Tabelle 4.10, Zeile 4). Die TPMT-Aktivität dieser Gruppe war im Vergleich allen drei anderen Gruppen signifikant erhöht ($p = 0,001$, $p = 0,026$, $p = 0,005$). Vergleicht man die beiden Gruppen mit erhöhtem 6-TGN untereinander, fallen erniedrigte TGDP-Spiegel in der Gruppe mit hohem Quotienten auf. Die Höhe unterscheidet sich signifikant von der Gruppe mit niedrigem Quotienten ($p = 0,016$). Gleichzeitig liegt in der Gruppe mit hohem Quotienten eine Tendenz zu hohen TGTP-Spiegeln (157 ± 63 versus 122 ± 57 pmol/ 8×10^8 RBC) und zu einem besseren Ansprechen ($0,47 \pm 0,51$ versus $0,29 \pm 0,46$ Punkte) vor.

39 Colitis ulcerosa-Patienten wurden analog in vier Gruppen wie oben angegeben aufgeteilt. Die Fallzahl lag zwischen 8 und 13 Patienten pro Gruppe. Auch hier zeigte sich ein Trend zu einem guten Ansprechen und weniger Schüben in der Gruppe der Patienten mit hohem 6-TGN und hohem Quotienten. Die TGDP-Spiegel waren auch hier signifikant erniedrigt ($p = 0,037$, Tabelle 4.11) im Vergleich zur Gruppe mit hohem 6-TGN und niedrigem Quotienten. TGTP war dagegen erhöht (172 ± 103 versus 144 ± 47 pmol/ 8×10^8 RBC).

Hieraus wird deutlich, dass Patienten mit hohem Quotienten Q ein besseres Ansprechen auf die Therapie aufzuweisen scheinen, als Patienten mit niedrigem Quotienten bei gleichzeitig erhöhtem 6-TGN. Hohe 6-TGN-Spiegel scheinen alleine noch nicht ausreichend zu sein, um einen Patienten vor einem schubhaften Verlauf zu bewahren. Möglicherweise sind hohe TGTP-Spiegel in Verbindung mit niedrigen TGDP-Spiegeln ein weiterer positiver Prädiktor für ein rasches Ansprechen auf eine Therapie. Diese Beobachtungen liessen sich sowohl im Morbus Crohn- als auch im Colitis ulcerosa-Kollektiv machen, wobei die Fallzahl in letzterem sehr gering war.

Tabelle 4.8: Verteilung der Patienten mit Morbus Crohn, deren 6-TGN über und unter 100 pmol/8 x 10⁸ RBC liegt

Die 94 Morbus Crohn-Patienten wurden in die beiden Gruppen 6-TGN > 100 und < 100 pmol/8 x 10⁸ RBC aufgeteilt. Patienten mit erhöhtem 6-TGN verfügen signifikant häufiger auch über erhöhtes TGDP und TGTP. Das Ansprechen unterscheidet sich in beiden Gruppen ebenfalls signifikant; Patienten mit höheren 6-TGN-Spiegeln sprechen häufiger an ($p = 0,023$). Einheiten: 6-TGN, TGDP, TGTP, Q: pmol/8 x 10⁸ RBC; TPMT: U; Schübe: Anzahl.

	n	6-TGN	TGDP	TGTP	Q [§]	Ansprechen	Schübe	Anti-TNF α	TPMT
6-TGN > 100	42	167+/-59	26+/-12	138+/-61	84+/-6	0,37+/-0,49	0,99+/-1,52	0,20+/-0,41	54+/-13
6-TGN < 100	52	64+/-21	10+/-6	55+/-24	83+/-6	0,15+/-0,36	2,2+/-5,0	0,15+/-0,36	50+/-10
		$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p = 0,76$	$p = 0,023$	$p = 0,26$	$p = 0,58$	$p = 0,06$

rot=Korrelation ist signifikant für 0,0001 (2-seitig); blau=Korrelation ist signifikant für 0,01 (2-seitig); grün=Korrelation ist signifikant für 0,05 (2-seitig)

[§]Q=TGTP/(TGDP+TGTP)

Ansprechen: 0 = kein Ansprechen, 1 = Ansprechen Anti-TNF α : 0 = nein, 1 = ja

Tabelle 4.9: Verteilung der Patienten mit Colitis ulcerosa, deren 6-TGN über und unter 100 pmol/8 x 10⁸ RBC liegt

Auch die Colitis ulcerosa-Patienten wurden in die beiden Gruppen 6-TGN > und < 100 pmol/8 x 10⁸ RBC aufgeteilt. Hier sind ähnliche Effekte wie in der Morbus Crohn-Gruppe zu beobachten: Patienten mit erhöhten 6-TGN-Spiegeln verfügen eher über hohe TGDP- und TGTP-Spiegel. Darüber hinaus sprechen diese auch signifikant besser an ($p = 0,05$). Einheiten: 6-TGN, TGDP, TGTP, Q: pmol/8 x 10⁸ RBC; TPMT: U; Schübe: Anzahl.

	n	6-TGN	TGDP	TGTP	Q [§]	Ansprechen	Schübe	TPMT
6-TGN > 100	16	187+/-71	29+/-14	158+/-79	84+/-8	0,47+/-0,52	0,18+/-0,40	47+/-9
6-TGN < 100	23	72+/-23	10+/-4	58+/-21	85+/-4	0,17+/-0,39	2,2+/-5,1	52+/-11
		$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p = 0,66$	$p = 0,05$	$p = 0,21$	$p = 0,15$

rot=Korrelation ist signifikant für 0,0001 (2-seitig); blau=Korrelation ist signifikant für 0,01 (2-seitig); grün=Korrelation ist signifikant für 0,05 (2-seitig)

[§]Q=TGTP/(TGDP+TGTP)

Ansprechen: 0 = kein Ansprechen, 1 = Ansprechen

Tabelle 4.10: Aufteilung der Patienten mit Morbus Crohn nach 6-TGN und Quotient

Die 94 Morbus Crohn-Patienten wurden in vier Gruppen mit 6-TGN $>$ und $<$ 100 pmol/8 x 10⁸ RBC und Quotientenhöhe $>$ und $<$ 85 pmol/8 x 10⁸ RBC aufgeteilt. Patienten mit erhöhtem 6-TGN und Quotienten sprechen von allen vier Gruppen am besten an und haben die wenigsten Schübe (Zeile 4). Die TPMT-Aktivität ist signifikant erhöht. TGDP liegt in dieser Gruppe signifikant erniedrigt vor im Vergleich zur Gruppe mit hohem 6-TGN und niedrigem Quotienten ($p = 0,016$). Zugleich liegt in dieser Gruppe ein Trend zu erhöhten TGTP-Spiegeln vor (157+/-63 versus 122+/-57). Einheiten: 6-TGN, TGDP, TGTP, Q: pmol/8 x 10⁸ RBC; TPMT: U; Schübe: Anzahl.

	n	6-TGN	TGDP	TGTP	Q [§]	Ansprechen	Schübe	Anti-TNF α	TPMT
6-TGN $<$ 100, Q $<$ 85	31	64+/-22	12+/-6	53+/-25	80+/-6	0,23+/-0,43	1,0+/-1,6	0,10+/-0,31	49+/-8
6-TGN $<$ 100, Q $>$ 85	21	64+/-21	8+/-3	57+/-22	88+/-2	0,0+/-0,0	4,6+/-8,1	0,25+/-0,45	51+/-12
6-TGN $>$ 100, Q $<$ 85	23	155+/-62	30+/-13	122+/-57	80+/-4	0,29+/-0,46	1,0+/-1,7	0,21+/-0,42	49+/-11
6-TGN $>$ 100, Q $>$ 85	19	181+/-52	21+/-9	157+/-63	88+/-2	0,47+/-0,51	0,9+/-1,3	0,19+/-0,40	60+/-14
1 + 2		p = 0,97	p = 0,002	p = 0,59	p < 0,0001	p = 0,036	p = 0,06	p = 0,19	p = 0,49
1 + 3		p < 0,0001	p > 0,0001	p > 0,0001	p = 0,90	p = 0,68	p = 0,97	p = 0,29	p = 0,95
1 + 4		p < 0,0001	p < 0,0001	p < 0,0001	p < 0,0001	p = 0,10	p = 0,88	p = 0,41	p = 0,001
2 + 3		p < 0,0001	p < 0,0001	p < 0,0001	p < 0,0001	p = 0,019	p = 0,13	p = 0,79	p = 0,60
2 + 4		p < 0,0001	p < 0,0001	p < 0,0001	p = 0,79	p = 0,001	p = 0,20	p = 0,68	p = 0,026
3 + 4		p = 0,15	p = 0,016	p = 0,06	p < 0,0001	p = 0,25	p = 0,92	p = 0,87	p = 0,005

rot=Korrelation ist signifikant für 0,0001 (2-seitig); blau=Korrelation ist signifikant für 0,01 (2-seitig); grün=Korrelation ist signifikant für 0,05 (2-seitig);

§Q=TGTP/(TGDP+TGTP)

Ansprechen: 0 = kein Ansprechen, 1 = Ansprechen Anti-TNF α : 0 = nein, 1 = ja

Tabelle 4.11: Aufteilung der Patienten mit Colitis ulcerosa nach 6-TGN und Quotient

Die 39 Colitis ulcerosa-Patienten wurden in vier Gruppen mit 6-TGN $>$ und $<$ 100 pmol/8 x 10⁸ RBC und Quotientenhöhe $>$ und $<$ 85 pmol/8 x 10⁸ RBC aufgeteilt. Ähnlich wie in der Morbus Crohn-Gruppe wird auch hier deutlich, dass Patienten mit erhöhtem 6-TGN und Quotienten ein gutes Ansprechen auf die Azathioprin-Therapie aufweisen und weniger Schübe als die anderen Gruppen zeigen. TGDP ist auch in dieser Gruppe signifikant erniedrigt im Vergleich zur Gruppe mit hohem 6-TGN und niedrigem Quotienten ($p = 0,037$) bei höheren TGTP-Spiegeln (172+/-103 versus 144+/-47). Einheiten: 6-TGN, TGDP, TGTP, Q: pmol/8 x 10⁸ RBC; TPMT: U; Schübe: Anzahl.

	n	6-TGN	TGDP	TGTP	Q [§]	Ansprechen	Schübe	TPMT
6-TGN < 100, Q < 85	13	70+/-25	12+/-4	53+/-17	82+/-2	0,23+/-0,44	1,8+/-4,2	51+/-10
6-TGN < 100, Q > 85	10	74+/-19	9+/-4	64+/-25	88+/-3	0,10+/-0,32	2,9+/-6,5	53+/-12
6-TGN > 100, Q < 85	8	180+/-49	36+/-9	144+/-47	79+/-9	0,57+/-0,53	0,20+/-0,45	45+/-8
6-TGN > 100, Q > 85	8	195+/-92	21+/-16	172+/-103	89+/-4	0,38+/-0,52	0,17+/-0,41	50+/-10
1 + 2		p = 0,64	p = 0,07	p = 0,25	p < 0,0001	p = 0,44	p = 0,64	p = 0,75
1 + 3		p < 0,0001	p > 0,0001	p > 0,0001	p = 0,20	p = 0,14	p = 0,43	p = 0,14
1 + 4		p < 0,0001	p < 0,047	p = 0,001	p < 0,0001	p = 0,50	p = 0,38	p = 0,71
2 + 3		p < 0,0001	p < 0,0001	p < 0,0001	p = 0,006	p = 0,037	p = 0,39	p = 0,11
2 + 4		p = 0,001	p = 0,028	p = 0,005	p = 0,62	p = 0,18	p = 0,33	p = 0,54
3 + 4		p = 0,69	p = 0,037	p = 0,50	p = 0,009	p = 0,48	p = 0,90	p = 0,28

rot=Korrelation ist signifikant für 0,0001 (2-seitig); blau=Korrelation ist signifikant für 0,01 (2-seitig); grün=Korrelation ist signifikant für 0,05 (2-seitig);

§Q=TGTP/(TGDP+TGTP)

Ansprechen: 0 = kein Ansprechen, 1 = Ansprechen

4.3 Inter- und Intra-Patienten-Variabilität

4.3.1 Serielle Messung im Morbus Crohn-Kollektiv

Tabelle 4.12: Deskriptive und explorative Statistik im Morbus Crohn-Kollektiv

Darstellung der deskriptiven Statistik und Auswertung der interindividuellen Variabilitäten mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests. Hier konnten signifikante interindividuelle Unterschiede zwischen den 37 Probanden für die Metaboliten 6-TGN, TGDP und TGTP demonstriert werden. $n = 37$, Anzahl der Messungen = 106; Abkürzungen: MW = Mittelwert; Min = Minimum; Max = Maximum; IS = Interquartilspanne; SD = interindividuelle Standardabweichung; SD_{max} = maximale interindividuelle Standardabweichung.

	n	Median	MW	Min	Max	IS	SD	SD_{max}	p
6-TGN [pmol/8 x 10 ⁸ RBC]	106	104,5	128,7	25	715	75-158	91	194	< 0,0001
TGDP [pmol/8 x 10 ⁸ RBC]	106	15,5	21,3	3	160	10-25	20	49	< 0,0001
TGTP [pmol/8 x 10 ⁸ RBC]	106	88	105,7	15	492	62-133	68	123	< 0,0001

Die Gruppe der Morbus Crohn-Patienten sollte im nächsten Schritt genauer bezüglich longitudinaler Schwankungen der Azathioprin-Metaboliten analysiert werden. Hierzu wurden 37 Morbus Crohn-Patienten zur Gewinnung von Paneldaten zwischen zwei und sechs Mal im Abstand von einigen Monaten zur Messung der Azathioprin-Metaboliten und Befragung einbestellt. Die Höhe der Metaboliten-Spiegel aus 106 Messungen wurde miteinander verglichen. In Abbildung 4.7 und 4.8 sind die Metaboliten-Spiegel für 6-TGN, TGDP und TGTP dargestellt, wobei ein Boxplot den Messergebnissen eines Patienten entspricht. Auffällig sind die interindividuellen Variabilitäten zwischen den Probanden für alle drei Metaboliten. Auch geringe intraindividuelle Schwankungen waren zu verzeichnen. Am stärksten traten diese beim Metaboliten TGDP zu Tage. Die maximalen Standardabweichungen für 6-TGN, TGDP und TGTP wurden mit 194, 49 bzw. 123 pmol/8 x 10⁸ RBC berechnet (Tabelle 4.12). Die interindividuellen Standardabweichungen bezifferten sich für 6-TGN auf 91 pmol/8 x 10⁸ RBC, für TGDP auf 20 pmol/8 x 10⁸ RBC und für TGTP auf 68 pmol/8 x 10⁸ RBC. Um neben den interindividuellen Variabilitäten auch mögliche intraindividuelle Schwankungen zu erfassen, wurde für jeden Patienten und Metaboliten (6-TGN, TGDP und TGTP) die Abweichung vom Ausgangswert in Prozent kalkuliert. Hier wurde noch einmal bestätigt, dass für den Metaboliten TGDP die höchsten intraindividuellen Variabilitäten demonstriert werden konnten. Die maximale Abweichung betrug 422 % (6-TGN: 211 %; TGTP: 239 %, Abbildung 4.9).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Höhe der Metaboliten-Spiegel somit nicht nur von externen Faktoren wie der Azathioprin-Dosierung determiniert zu werden scheint, sondern auch von intraindividuellen Gegebenheiten abhängt. Für alle drei

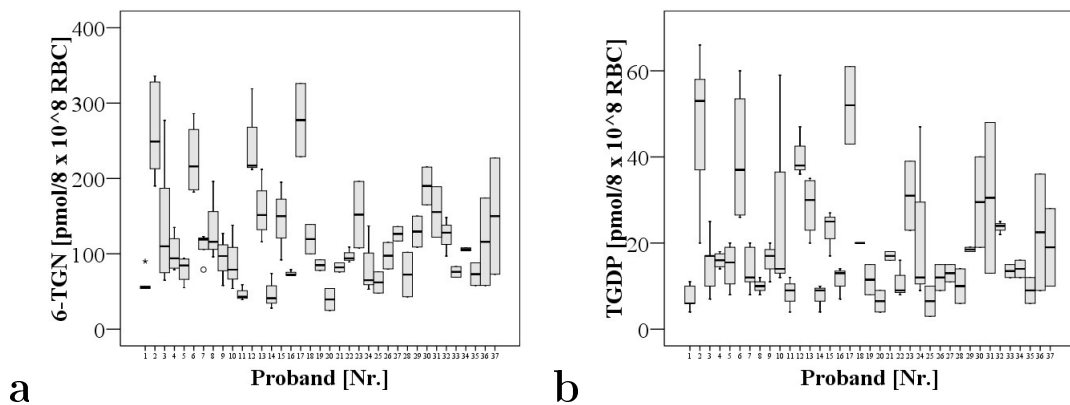


Abbildung 4.7: 6-TGN- und TGDP-Spiegel des Morbus Crohn-Kollektivs der Panelstudie

Ein Boxplot stellt einen Morbus Crohn-Patienten dar, pro Patient erfolgten zwischen zwei und sechs Messungen im Abstand von wenigen Monaten. a) Diese Abbildung zeigt die interindividuellen Variabilitäten bezüglich der 6-TGN-Spiegel. Die intraindividuellen Unterschiede sind in dieser Abbildung weniger deutlich als bei den TGDP-Spiegeln in Abbildung b). Die Standardabweichung für 6-TGN wurde mit $71 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$, die maximale Standardabweichung mit $194 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ kalkuliert. b) Die Standardabweichung für TGDP wurde mit $14 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$, die maximale Standardabweichung mit $49 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ kalkuliert. Anzahl der Messungen = 106, $n = 37$.

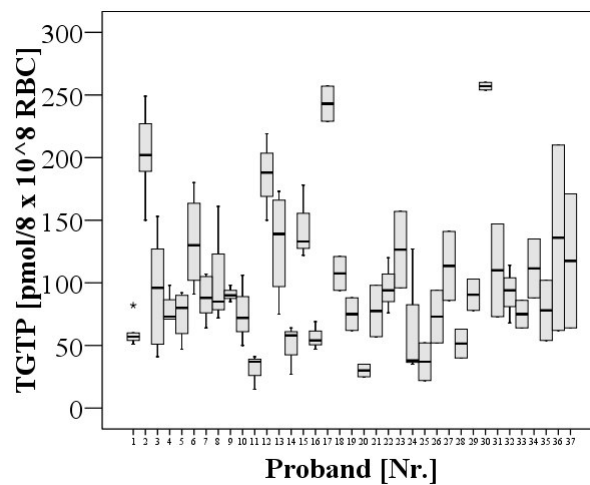


Abbildung 4.8: TGTP-Spiegel der 37 Morbus Crohn-Patienten der Panelstudie

Diese Abbildung demonstriert die interindividuellen und zu einem geringeren Anteil intraindividuellen Differenzen der TGTP-Spiegel. Ein Box-Whisker-Plot steht für einen Probanden der Panelstudie. Die Standardabweichung lag bei $57 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$, die maximale Standardabweichung betrug $123 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$. Anzahl der Messungen = 106, $n = 37$.

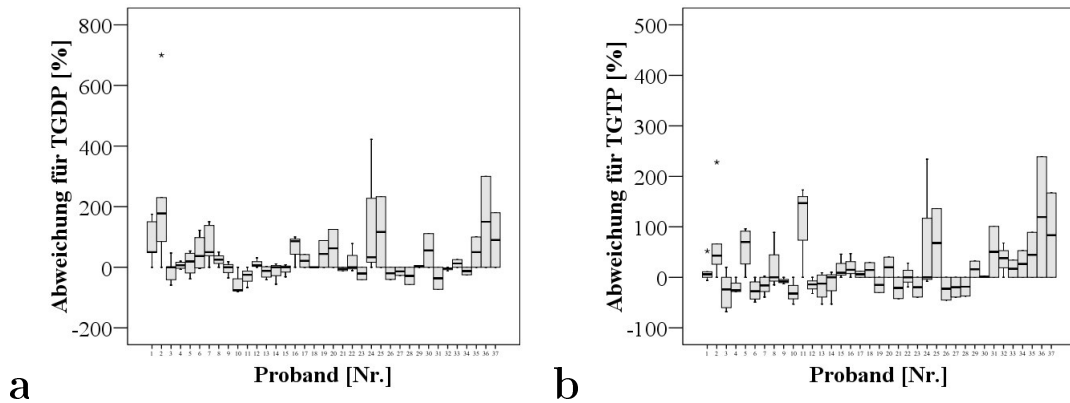


Abbildung 4.9: Intraindividuelle Variabilität von TGDP und TGTP in Prozent

Dargestellt sind die Abweichungen innerhalb eines Morbus Crohn-Probanden in Prozent. Ein Boxplot stellt einen Probanden dar und umfasst zwei bis sechs Messungen. Die maximale Abweichung für TGDP (a) wurde mit 700 %, für TGTP (b) mit 239 % errechnet. Anzahl der Messungen = 106, $n = 37$.

6-TGN-Metaboliten existieren interindividuelle Unterschiede, für TGDP konnten auch intraindividuelle Variabilitäten nachgewiesen werden.

4.3.2 Serielle Messung im Colitis ulcerosa-Kollektiv

Tabelle 4.13: Deskriptive und explorative Statistik im Colitis ulcerosa-Kollektiv

Auch für die Colitis ulcerosa-Stichprobe ergab die Auswertung mittels Kruskal-Wallis-Test signifikante interindividuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Probanden. Darüber hinaus errechnete sich für die beiden Patienten-Kollektive Morbus Crohn und Colitis ulcerosa eine fast identische interindividuelle Standardabweichung. $n = 19$, Anzahl der Messungen = 59. Abkürzungen: MW = Mittelwert; Min = Minimum; Max = Maximum; IS = Interquartils-spanne; SD = interindividuelle Standardabweichung; SD_{max} = maximale interindividuelle Standardabweichung.

	n	Median	MW	Min	Max	IS	SD	SD_{max}	p
6-TGN									
[pmol/8 x 10 ⁸ RBC]	59	104	120,1	18	345	65-179	70	105	0,001
TGDP									
[pmol/8 x 10 ⁸ RBC]	59	14	15,9	3	48	9-21	10	21	0,042
TGTP									
[pmol/8 x 10 ⁸ RBC]	59	86	99,2	16	252	52-140	58	103	0,003

Auch die Colitis ulcerosa-Stichprobe sollte zur Messung der Azathioprin-Metaboliten im zeitlichen Verlauf genauer untersucht werden. Hierfür konnten 59 Proben von 19 Colitis ulcerosa-Patienten gewonnen werden. Die Probanden wurden zwischen zwei

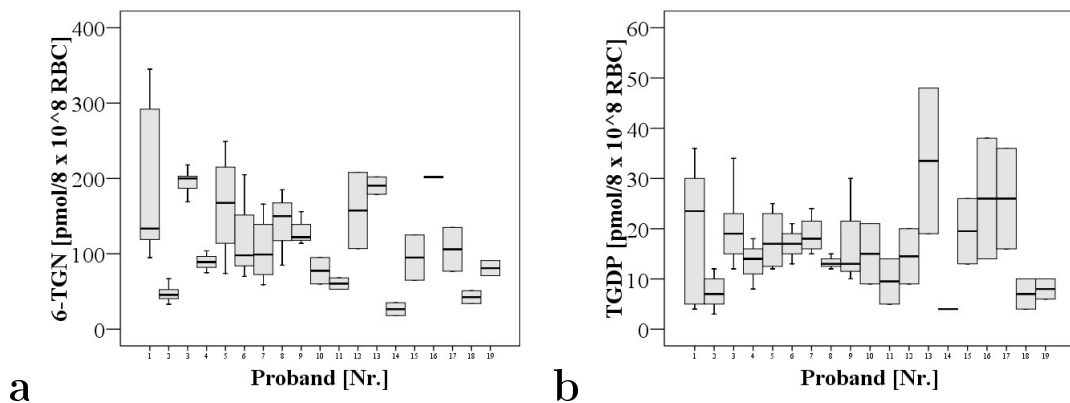


Abbildung 4.10: 6-TGN- und TGDP-Spiegel des Colitis ulcerosa-Kollektivs der Panelstudie

a) Auch die 6-TGN-Spiegel weisen vorwiegend interindividuelle Unterschiede neben geringeren intraindividuellen Differenzen auf (Standardabweichung $70 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$, maximale Standardabweichung $105 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$). b) Diese Abbildung verdeutlicht noch einmal die interindividuellen Variabilitäten für diesen Metaboliten, wobei diese in geringerer Ausprägung als im Morbus Crohn-Kollektiv vorliegen (Standardabweichung $10 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$, maximale Standardabweichung $21 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$). Anzahl der Messungen = 59, $n = 19$.

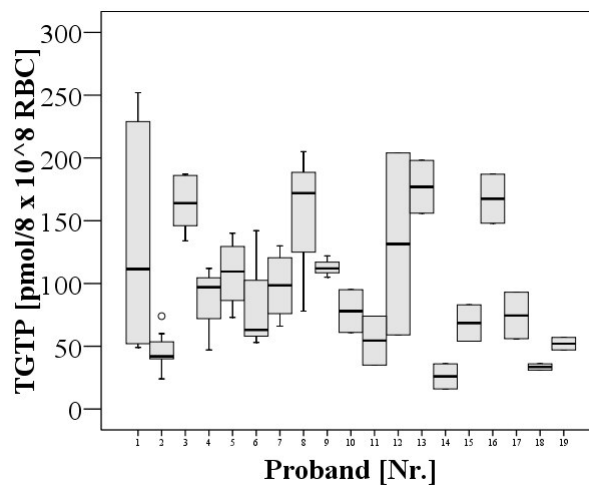


Abbildung 4.11: TGTP-Spiegel der 19 Colitis ulcerosa-Patienten der Panelstudie

Ähnlich wie in der Morbus Crohn-Stichprobe werden in dieser Abbildung die interindividuellen Variabilitäten betont. Bei einigen Probanden erkennt man zudem deutliche intraindividuelle Unterschiede. Die Standardabweichung belief sich auf $58 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$, die maximale Standardabweichung betrug $103 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$. Anzahl der Messungen = 59, $n = 19$.

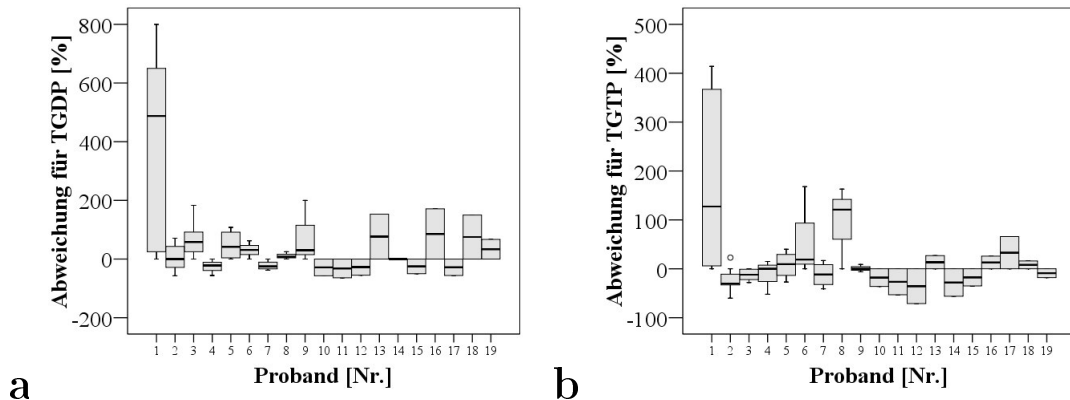


Abbildung 4.12: Intraindividuelle Variabilität von TGDP und TGTP in Prozent

Die Abbildung verdeutlicht die intraindividuellen Variabilitäten im Colitis ulcerosa-Kollektiv. Ein Boxplot entspricht einem Probanden und umfasst zwei bis acht Messungen. Wie im Morbus Crohn-Kollektiv konnten auch hier die größten Abweichungen für den Metaboliten TGDP berechnet werden. Maximale Abweichung für TGDP 800 % (a), TGTP 414 % (b). Anzahl der Messungen = 59, $n = 19$.

und acht Mal im Abstand von mehreren Monaten zu Blutentnahme und Interview einbestellt. Die Höhe der Spiegel von 6-TGN, TGDP und TGTP wurde miteinander verglichen. Die statistische Auswertung ergab ähnliche Resultate wie in der Morbus Crohn-Stichprobe: In den Abbildungen 4.10 und 4.11 wird demonstriert, dass vornehmlich interindividuelle Variabilitäten zu verzeichnen waren. Die interindividuellen Standardabweichung wurde für 6-TGN mit $70 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$, für TGDP mit $10 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ und für TGTP $58 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ gemessen. Die maximalen Standardabweichungen lagen – bei geringerer Fallzahl – niedriger als im Morbus Crohn-Kollektiv: $105 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ für 6-TGN, $21 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ für TGDP und $103 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ für TGTP (Tabelle 4.13). Die maximalen Abweichungen in Prozent wurden mit 263 % für 6-TGN, 800 % für TGDP und 414 % für TGTP ermittelt.

Auch in dieser Stichprobe konnten also für den Metaboliten TGDP die größten Abweichungen vom Ausgangswert innerhalb eines Individuums dokumentiert werden (Abbildung 4.12).

4.4 Ergebnisse der Aktivitätsmessung von TPMT

4.4.1 Bedeutung von TPMT für die Azathioprin-Metaboliten – TPMT korreliert mit dem Metaboliten 6-MMP

Da aufgezeigt werden konnte, dass die Aktivität des Enzyms TPMT im Morbus Crohn-Patientenkollektiv mit den Azathioprin-Metaboliten 6-TGN, TGDP, TGTP,

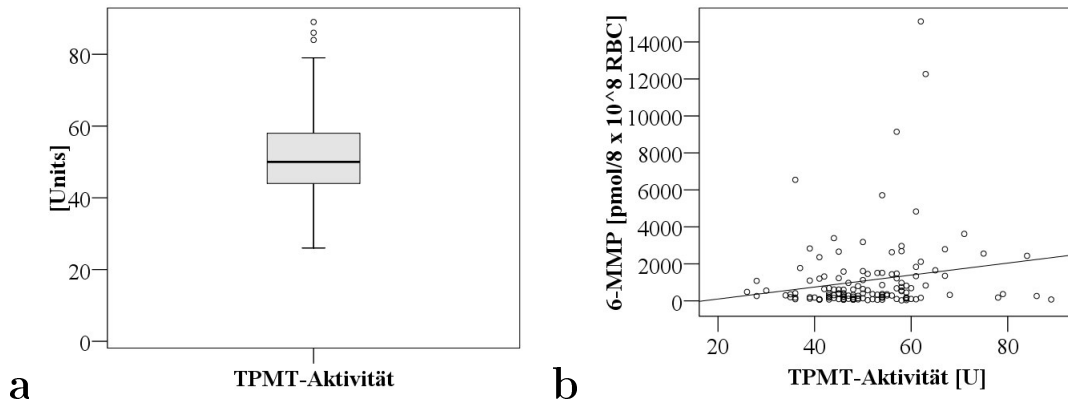


Abbildung 4.13: Box-Whisker-Plot der TPMT-Aktivität sowie Korrelation der TPMT-Aktivität mit 6-MMP

a) Die TPMT-Aktivität lag zwischen 26 und 89 U, der Median der TPMT-Aktivität betrug 50 U, der Mittelwert 52 U ($n = 133$). Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten differierten bezüglich ihrer TPMT-Aktivität nicht signifikant. b) Die Berechnung der Korrelation erfolgte mit dem Korrelationskoeffizienten nach Pearson: $r_P = 0,18$, $p = 0,046$ ($n = 131$). Im Streudiagramm imponiert eine Gruppe von Ausreißern mit besonders hohen 6-MMP-Werten. Unerwünschte Wirkungen im untersuchten Patientenkollektiv ließen sich jedoch nicht dokumentieren.

MTGN, mit der Kennzahl $S_{TGDP+TGTP}$ sowie der Azathioprin-Dosierung korrelierte (Tabelle 4.6), folgten hier weitere Auswertungen. Die TPMT-Aktivität des gesamten Patientenkollektivs lag zwischen 26 und 89 Units (U), der Median wurde mit 50 U ermittelt und lag somit im oberen Bereich (Abbildung 4.13a). Patienten mit TPMT-Defizienz waren demnach nicht im Patientengut. Signifikante Unterschiede zwischen Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Stichprobe konnten nicht verzeichnet werden ($p = 0,46$). In Abbildung 4.13b wird eine mäßige und signifikante Korrelation von TPMT mit 6-MMP dargestellt ($p = 0,046$, $r_P = 0,18$). 6-MMP wird durch die TPMT methyliert und wurde in einigen Studien mit einem erhöhten Risiko für Hepatotoxizität assoziiert (Dubinsky *et al.*, 2000). Im beschriebenen Patientenkollektiv ist diese Nebenwirkung jedoch nicht aufgetreten.

4.4.2 Morbus Crohn-Patienten mit fistulierendem Verlauf weisen eine erhöhte TPMT-Aktivität auf

Bei der genaueren Untersuchung der TPMT-Aktivität des Morbus Crohn-Patientenkollektivs wurden die beiden Gruppen mit stenosierendem und fistulierendem Verlauf betrachtet. In der Stenose-Gruppe waren keine Auffälligkeiten bezüglich TPMT-Aktivität zu verzeichnen. Die TPMT-Aktivität der 15 Patienten mit fistulierendem Verlauf lag signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($p = 0,031$, Median 58,0 *versus* 49,0 U, n (Kontrollgruppe) = 69; Abbildung 4.14).

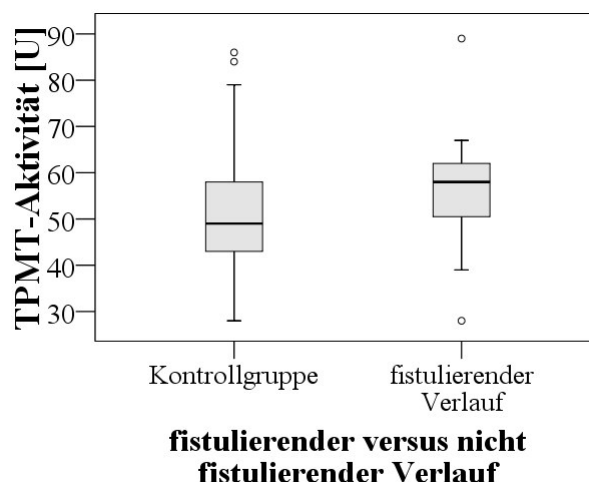


Abbildung 4.14: TPMT-Aktivität der Morbus Crohn-Patienten mit fistulierendem versus nicht fistulierendem Verlauf

Der Median in der Kontrollgruppe betrug 49,0 U ($n = 69$), in der Gruppe mit fistulierendem Verlauf 58,0 U ($n = 15$). Der mittels Mann-Whitney-Test berechnete p -Wert lag bei 0,031, somit wurde eine signifikant höhere TPMT-Aktivität für Patienten mit fistulierendem Verlauf kalkuliert.

Tabelle 4.14: Azathioprin-Metaboliten, Kennzahlen, Dosierung und TPMT-Aktivität im Patientenkollektiv mit fistulierendem versus nicht fistulierendem Verlauf

Dargestellt ist der Median für Morbus Crohn-Patienten mit fistulierendem Verlauf und der Kontrollgruppe mit nicht fistulierendem Verlauf. Die Auswertungen erfolgten mittels Mann-Whitney-Test. Die TPMT-Aktivität lag bei Patienten mit fistulierendem Verlauf mit 58 U signifikant höher als in der Kontrollgruppe (49 U; $p = 0,031$; markiert durch einen Stern). Weitere Divergenzen wurden nicht beobachtet, jedoch zeichnete sich für die Azathioprin-Dosierung, die Metaboliten 6-TGN und TGTP sowie die Kennzahl $S_{TGDP+TGTP}$ ein Trend zu höheren Wirkspiegeln ab. Fistulierender Verlauf: $n = 15$; Kontrollgruppe: $n = 69$.

	Fistel	n	keine Fistel	n	p (Mann-Whitney)
6-TGN	94,0	15	91,0	69	0,95
TGDP	14,0	15	16,0	69	0,86
TGTP	96,0	15	75,0	69	0,49
Q[§]	86,1	15	83,2	69	0,12
S[#]	109,0	15	93,0	69	0,62
6-MMP	288,0	15	385,0	68	0,92
6-MMP/6-TGN	4,3	15	4,3	68	0,98
TPMT-Aktivität	58,0	15	49,0	69	0,031*
MTGN	43,0	14	46,0	65	0,77
Dosis [mg/kg KG]	2,00	15	1,74	69	0,10
Dosis [mg]	150,0	15	100,0	69	0,12

[§]Q = TGTP/(TGDP+TGTP)

[#]S = TGDP+TGTP

Um diesen Effekt genauer zu analysieren, wurden die Azathioprin-Metaboliten-Spiegel und die Dosierungen der beiden Stichproben miteinander verglichen (Tabelle 4.14). Signifikante Unterschiede in den Azathioprin-Metaboliten-Spiegeln konnten an diesem sehr kleinen Patientenkollektiv nicht dargestellt werden, jedoch ließ sich eine Tendenz zu einer höheren Azathioprin-Dosierung in der Stichprobe mit fistulierendem Krankheitsverlauf nachweisen.

Festzuhalten bleibt hier, dass Patienten mit fistulierendem Verlauf über eine erhöhte TPMT-Aktivität verfügen. In der Gesamtgruppe sowie im Morbus Crohn-Kollektiv konnten signifikante Korrelationen zwischen TPMT-Aktivität und Azathioprin-Dosierung demonstriert werden (Tabelle 4.5 und 4.6). Möglicherweise könnte dieser Effekt auch hier bedeutsam sein, obgleich Patienten mit fistulierendem Verlauf nicht signifikant mehr Azathioprin erhielten.

4.5 Messung von Ansprechen *versus* Therapieversagen

4.5.1 CDAI, CAI und IBDQ – Ansprechen ist mit erniedrigtem CDAI und CAI sowie erhöhtem IBDQ assoziiert

Als nächstes wurden die Parameter zur Messung von Ansprechen bzw. Therapieversagen genauer betrachtet. Für Morbus Crohn-Patienten wurde der CDAI erhoben, für Colitis ulcerosa-Patienten der CAI. Im gesamten Patientengut wurde der IBDQ bestimmt. Die Korrelationen zwischen CDAI, CAI und IBDQ mit den jeweiligen Metaboliten von Azathioprin erwiesen sich als nicht signifikant. Eine signifikante inverse Korrelation wurde jedoch zwischen IBDQ und CDAI ($p < 0,0001$, $r_s = -0,67$) sowie CAI ($p < 0,0001$, $r_s = -0,82$) errechnet, Abbildung 4.15. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Spearman'schen Rangkorrelationskoeffizienten, die Fallzahl betrug 49 für Morbus Crohn- bzw. 18 für Colitis ulcerosa-Patienten.

Nun sollte überprüft werden, ob signifikante Unterschiede zwischen Aktivitätsindizes bzw. IBDQ und Patienten verzeichnet werden konnten, die sich in Remission befanden *versus* Patienten, bei denen eine aktive Erkrankung bestand. Hierzu wurden die Patienten anhand der Ergebnisse der Befragung, der Laborergebnisse sowie der endoskopischen, bildgebenden und histopathologischen Diagnostik in die Gruppen „Remission“ und „keine Remission“ eingeteilt. Das Auftreten eines Schubes während der letzten drei Monate vor Blutentnahme, der fortwährende Gebrauch von Glukokortikoiden sowie die Verabreichung von Anti-TNF α wurde als fehlendes Ansprechen auf die Azathioprin-Therapie gewertet. In den Abbildungen 4.16 und 4.17 sind die Unterschiede graphisch dargestellt. CDAI und CAI wurden für Patienten, die sich in Remission befanden signifikant niedriger ermittelt ($p = 0,001$, $n = 65$ für CDAI; $p = 0,003$, $n = 30$ für CAI), wohingegen der IBDQ bei diesen erhöht war ($p < 0,0001$, $n = 68$). Die Nicht-Remissions-Gruppe erzielte dagegen im Median höhere CDAI- und CAI-Punktzahlen und niedrigere IBDQ-Punktzahlen, allerdings war das Ergebnis heterogener als für die Remissions-Gruppe (Interquartilspanne für den CAI: keine Re-

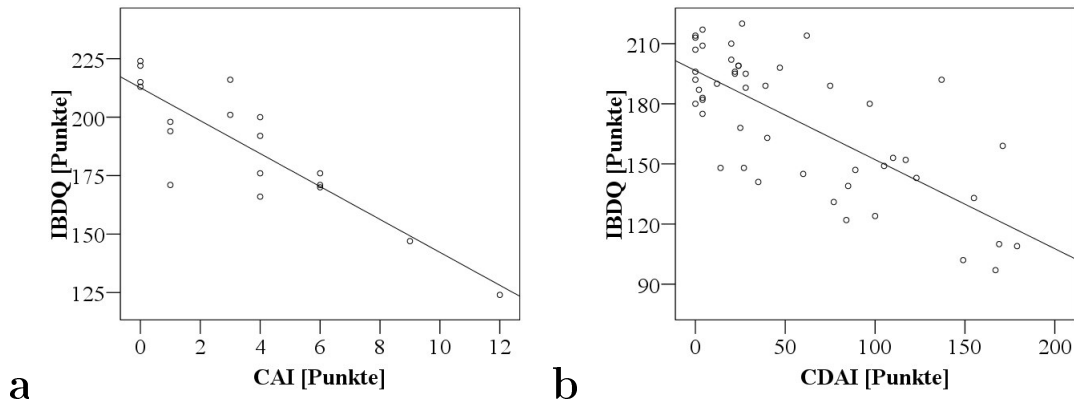


Abbildung 4.15: Inverse Korrelation von CAI bzw. CDAI mit IBDQ

a) Trotz einer geringen Fallzahl veranschaulicht diese Auswertung eine inverse Korrelation zwischen CAI und IBDQ ($r_s = -0,82$; $p < 0,0001$; $n = 18$). b) Auch der CDAI wies einen diametralen Zusammenhang mit dem IBDQ auf ($r_s = -0,67$; $p < 0,0001$; $n = 49$).

mission 3,0–10,0 *versus* Remission 0–3,75 Punkte; Interquartilsparne für den CDAI: keine Remission 25–127 Punkte *versus* Remission 0–41 Punkte; Interquartilsparne für den IBDQ: keine Remission 143–191 Punkte *versus* Remission 194–213 Punkte).

Festzuhalten bleibt somit, dass die Aktivitätsindizes CDAI und CAI mit dem Lebensqualitäts-Messparameter IBDQ korrelieren. Somit ist im untersuchten Patientenkollektiv eine erhöhte Krankheitsaktivität mit einer geringeren Lebensqualität assoziiert. Patienten in Remission erzielen eine niedrigere CDAI-/CAI-Punktzahl sowie eine höhere IBDQ-Punktzahl als Patienten mit aktiver Erkrankung.

4.5.2 Ansprechen und Dosierung von Azathioprin – Patienten mit höheren Azathioprin-Dosen sprechen nicht besser an

Im nächsten Schritt wurde untersucht, welche Zusammenhänge zwischen Ansprechen und Azathioprin-Dosierung bestehen. In Kapitel 4.2.2 konnte demonstriert werden, dass die Höhe der Dosierung einen mäßigen Einfluss auf die Metaboliten-Level ausübt und auch die TPMT-Enzymaktivität von ihr beeinflusst zu werden scheint. Für diese Untersuchung wurden die Patienten in Gruppen eingeteilt, die der Höhe ihrer Dosierung in mg/kg KG entsprachen und die Anzahl der Patienten in Remission *versus* der Patienten mit aktivem Krankheitsverlauf betrachtet. Abbildung 4.18 veranschaulicht eine symmetrische Aufteilung der beiden Patientengruppen auf die Dosierungsgruppen. Ein eindeutiger Dosierungs-Trend konnte weder für Patienten mit Ansprechen noch für Therapieversager nachgewiesen werden.

Es bestand somit keine Assoziation zwischen einem Ansprechen oder einer Remission und der Azathioprin-Dosierung. Trotz einer mäßigen Korrelation zwischen Dosierung und Metaboliten-Spiegeln resultiert eine Dosissteigerung auf $> 2,0$ mg/kg KG nicht

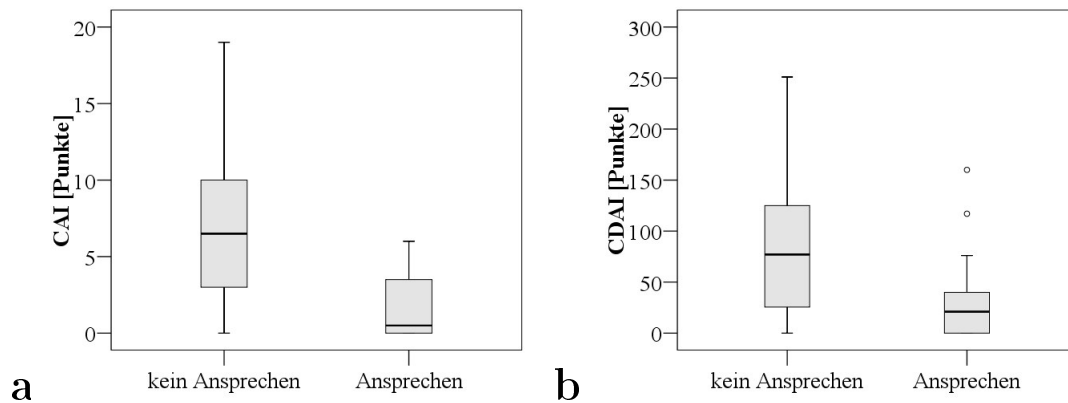


Abbildung 4.16: „Remission“ und „keine Remission“ in Bezug auf CAI und CDAI

a) Ein signifikanter Unterschied in der Höhe der erreichten CAI-Punktzahl wurde mittels Mann-Whitney-Test nachgewiesen. Colitis ulcerosa-Patienten, welche sich in Remission befanden, erreichten eine geringere CAI-Punktzahl ($p = 0,003$, $n = 30$). b) Ein signifikant erhöhter CDAI wurde für die Patientengruppe der Morbus Crohn-Patienten ermittelt, die nicht oder schlecht auf die Azathioprin-Therapie ansprach ($p = 0,001$, $n = 65$). Für beide Aktivitätsindizes fällt auf, dass die erreichten Punktzahlen in der Nicht-Remissions-Gruppe heterogener erscheinen, was durch die Werte der in diesen Gruppen breiteren Interquartilsparnen bestätigt wird (Interquartilsparnen für den CAI: keine Remission 3,0-10,0 versus Remission 0-3,75 Punkte; Interquartilsparnen für den CDAI: keine Remission 25-127 Punkte versus Remission 0-41 Punkte).

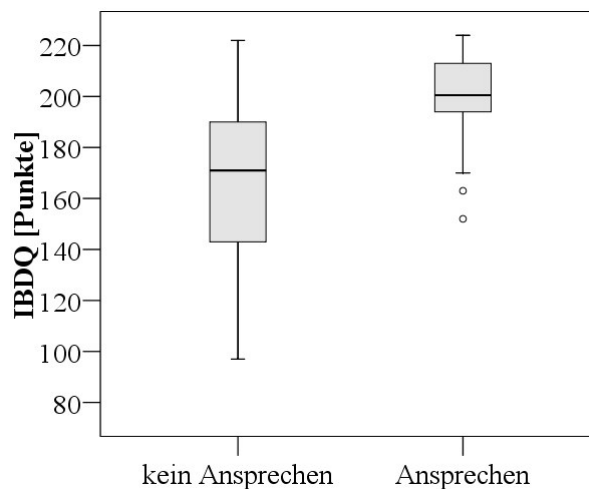


Abbildung 4.17: „Remission“ und „keine Remission“ in Bezug auf den IBDQ

Patienten, die sich in Remission befanden, erzielten im IBDQ signifikant höhere Punktzahlen ($p < 0,0001$, $n = 68$, Mann-Whitney-Test). Auch hier ist eine Gegenüberstellung der Interquartilsparnen beider Gruppen interessant: keine Remission 143-191 Punkte versus Remission 194-213 Punkte.

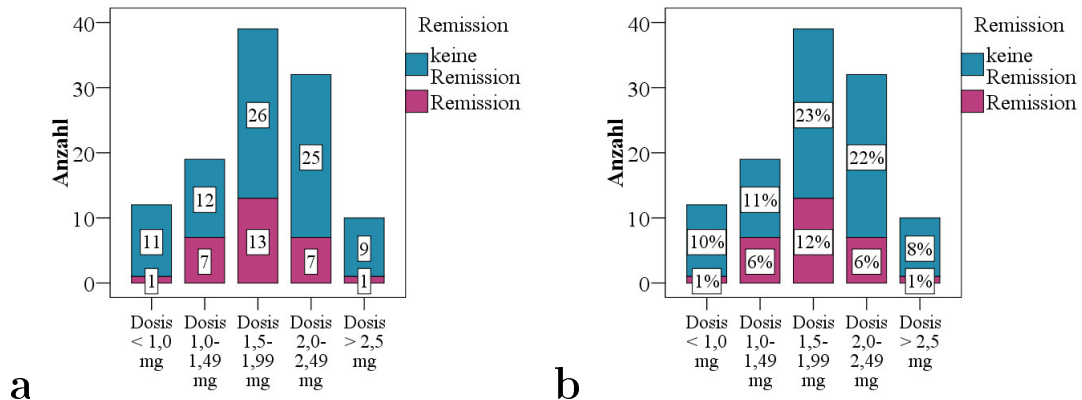


Abbildung 4.18: Einteilung der Patienten nach Höhe der Dosierung und Darstellung von Anzahl, Prozentzahl und Ansprechen

Die Patienten wurden anhand der Höhe ihrer aktuellen Azathioprin-Dosierung (in mg/kg KG) auf fünf Gruppen aufgeteilt (< 1,0 mg, 1,0 bis 1,49 mg, 1,5 bis 1,99 mg, 2,0 bis 2,49 mg und > 2,5 mg; $n = 112$). In dieser Abbildung ist eine nahezu symmetrische Verteilung der Patienten auf die Dosierung dargestellt. Ein klarer Zusammenhang zwischen Ansprechen und Höhe der Dosierung lässt sich hier nicht festmachen.

notwendigerweise in einer Remission.

Die Patientengruppe mit einer hohen Azathioprin-Dosierung wurde noch einmal genauer hinsichtlich der Höhe des Enzyms TPMT untersucht. Der *Cut off*-Wert für die Dosierung wurde bei 1,7 mg/kg KG gewählt, da die empfohlene Dosierung im Bereich 1,0–2,5 mg/kg KG liegt und somit eine gleichmäßige Aufteilung auf beide Gruppen erreicht werden konnte. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (Azathioprin-Dosierung < 1,7 mg/kg KG; $n = 56$) lag die TPMT-Aktivität in der Gruppe mit der hohen Dosierung (Azathioprin-Dosierung > 1,7 mg/kg KG; $n = 59$) signifikant höher (54,3 U versus 48,6 U; $p = 0,003$; $n_{\text{Gesamt}} = 115$).

Dies ist erneut ein Indiz für die Hypothese, dass Patienten mit erhöhter TPMT-Aktivität schlechter auf eine Azathioprin-Therapie ansprechen (vgl. Kapitel 4.4.2): Möglicherweise wurde aufgrund eines fortbestehenden aktiven Krankheitsverlaufs in dieser Patientengruppe eine Dosissteigerung vorgenommen.

In einem nachfolgenden Schritt wurden die Patienten in zwei Gruppen aufgeteilt. Die eine Gruppe bestand aus Probanden, die sich zum Zeitpunkt der Untersuchung in stabiler Remission befanden ($n = 52$). Die andere Gruppe bildeten Patienten, die sich entweder durch einen schubhaften oder chronisch aktiven Krankheitsverlauf auszeichneten ($n = 55$). Beide Gruppen wurden mittels Mann-Whitney-Test hinsichtlich der Dosierung (in mg) von Azathioprin pro Kilogramm Körpergewicht verglichen. Abbildung 4.19 belegt, dass diejenigen Testpersonen, welche sich außerhalb einer Remission befanden, signifikant höhere Mengen Azathioprin erhielten, als Probanden in Remission ($p = 0,005$). Der Median lag in der ersten Gruppe bei 1,92 mg/kg KG, in der Remissionsgruppe bei 1,64 mg/kg KG.

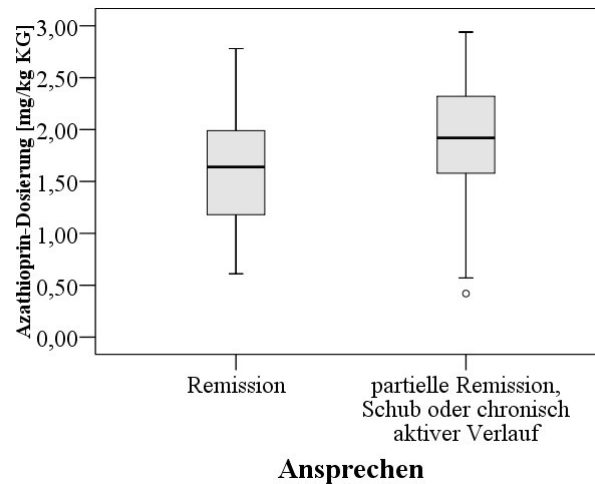


Abbildung 4.19: Vergleich der Azathioprin-Dosierung bei Patienten in Remission versus Patienten in partieller Remission, im Schub oder mit chronisch aktivem Verlauf

Die Gruppe der Patienten, welche sich nicht in Remission befand ($n = 55$), erhielt signifikant höhere Azathioprin-Dosen (Median 1,92 versus 1,64 mg/kg KG, $p = 0,005$) als die Kontrollgruppe ($n = 52$). Eine höhere Azathioprin-Dosierung scheint somit nicht zwingend mit einem Ansprechen assoziiert zu sein.

Diese Auswertungen veranschaulichen noch einmal, dass sich eine Remission durch eine Dosis-Steigerung nicht in jedem Fall erzwingen lässt. Niedrige Azathioprin-Dosierung ist mit einem fehlenden Ansprechen assoziiert. Allerdings besteht kein Zusammenhang zwischen hohen Azathioprin-Dosen und einer Remission. Individuen mit hoher Azathioprin-Dosierung verfügen über eine erhöhte TPMT-Aktivität.

4.6 Ergebnisse der Metaboliten-Messung von TGTP

4.6.1 Anti-TNF α , Glukokortikoide und 5-Aminosalizylate – Einfluss der Komedikation auf die Höhe der TGTP-Spiegel

Tabelle 4.15: Morbus Crohn-Patienten mit versus ohne Anti-TNF α -Therapie

Dargestellt sind die beiden Stichproben der Morbus Crohn-Patienten mit versus ohne Anti-TNF α -Therapie während eines Zeitraumes von 6 Monaten vor Blutentnahme. Ausgewertet wurde mittels Levene-Test, Signifikanzen sind mit einem Stern markiert. Neben dem p-Wert ist für beide Gruppen jeweils auch der Median für jeden Parameter aufgeführt. Die Metaboliten TGDP und TGTP sowie die Kennzahl $S_{TGDP+TGTP}$ fielen für die Anti-TNF α -Gruppe signifikant erhöht aus. Auch unter den übrigen Metaboliten 6-TGN, 6-MMP und MTGN konnte in dieser Gruppe ein Trend zu höheren Spiegeln aufgezeigt werden. Erwähnenswert sind weiterhin die erhöhte CDAI-Punktzahl sowie eine erhöhte Azathioprin-Dosierung in der Anti-TNF α -Stichprobe, welche zur Erhöhung der Metaboliten beigetragen haben könnte.

	Anti-TNF α	n	kein Anti-TNF α	n	p (Levene)
6-TGN	122,50	14	106,20	67	0,44
TGDP	21,20	14	16,80	67	0,024*
TGTP	113,40	14	87,90	67	0,039*
Q[§]	83,80	14	83,00	67	0,77
S[#]	134,50	14	104,70	67	0,040*
6-MMP	1178,40	14	895,70	66	1,00
6-MMP/6-TGN	9,10	14	10,60	66	0,93
TPMT-Aktivität	53,40	14	52,10	67	0,96
MTGN	60,00	13	53,80	62	0,95
Dosis [mg/kg KG]	2,01	14	1,76	66	0,99
Dosis [mg]	132,10	14	122,40	67	0,46
CDAI	77,10	9	68,20	55	0,60

[§]Q = TGTP/(TGDP+TGTP)

[#]S = TGDP+TGTP

Die nachfolgenden Auswertungen hatten den Azathioprin-Metaboliten TGTP zum Inhalt. Hier sollte zunächst geklärt werden, ob die Komedikation der Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten einen Einfluss auf die Höhe der TGTP-Spiegel ausübt. Untersucht wurde zunächst ein Patienten-Kollektiv aus Morbus Crohn-Patienten, welches Anti-TNF α (Remicade[®]) während eines Zeitraums von bis zu sechs Monaten vor der Blutentnahme erhielt. Dies wurde mit Morbus Crohn-Patienten ohne Anti-TNF α -Therapie in Bezug gesetzt. Hier wurde mittels Levene-Test demonstriert, dass Anti-TNF α die Höhe der TGDP- und TGTP-Spiegel beeinflusste (Tabelle 4.15): Diese wurden für die Anti-TNF α -Gruppe signifikant höher quantifiziert als für die Kontrollgruppe, bestehend aus 67 Morbus Crohn-Patienten. Auch die übrigen Metaboliten 6-TGN, MTGN und 6-MMP wiesen einen Trend zu höheren Spiegeln auf (Abbildung 4.20). Die erhöhte Azathioprin-Dosierung der Anti-TNF α -Gruppe könnte zu diesem Effekt beigetragen haben. Diese stellte sich allerdings im Vergleich zur

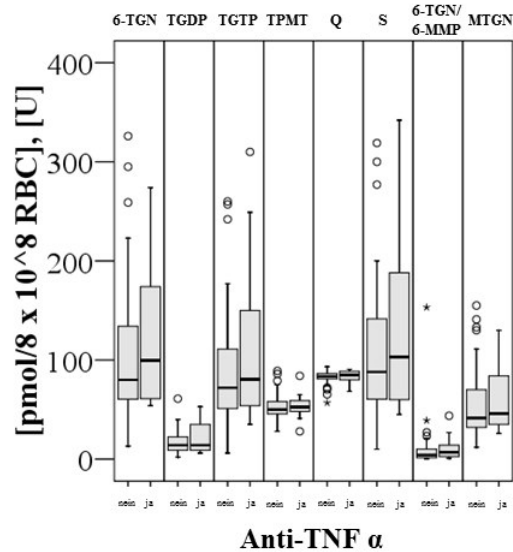


Abbildung 4.20: Metaboliten-Spiegel der Anti-TNF α -Stichprobe versus der Stichprobe ohne Anti-TNF α

Signifikante Unterschiede manifestierten sich in den Spiegeln der Metaboliten TGDP ($p = 0,024$) und TGTP ($p = 0,039$) und der Kennzahl $S_{TGDP+TGTP}$ ($p = 0,040$). Ferner imponiert eine Erhöhung des Medians der weiteren Metaboliten 6-TGN, MTGN, der TPMT-Aktivität und der Kennzahl Q. Bei einem Stichprobenumfang von nur 14 Patienten in der Anti-TNF α -Gruppe wurden allerdings keine weiteren Signifikanzen beobachtet (Gruppe ohne Anti-TNF α : $n = 67$).

Kontrollgruppe nicht signifikant erhöht dar. Die Fallzahl fiel mit nur 14 Patienten sehr gering aus.

Weiterhin wurden 38 Patienten (davon 50 % Colitis ulcerosa-Patienten) mit 5-Aminosalizylaten bezüglich der Höhe der TGTP-Spiegel untersucht: Hier konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede verzeichnet werden.

In der Glukokortikoid-Gruppe ($n = 47$, Anteil der Morbus Crohn-Patienten 64 %) wurden ebenfalls keine Unterschiede bezüglich der TGTP-Spiegel dokumentiert. Jedoch wiesen die Patienten mit Glukokortikoid-Einnahme eine höhere TPMT-Aktivität auf (54,3 U, $n = 47$ versus 49,5 U, $n = 70$; $p = 0,034$).

Festzuhalten bleibt, dass Anti-TNF α eine Erhöhung der Metaboliten-Spiegel bewirkt, während für 5-Aminosalizylate keine Unterschiede festgestellt werden konnten. Eine Glukokortikoid-Einnahme ist mit einer erhöhten TPMT-Aktivität assoziiert.

Tabelle 4.16: Azathioprin-Metaboliten-Spiegel der Morbus Crohn-Patienten mit stenosierendem versus nicht stenosierendem Verlauf

Die Metaboliten TGTP, 6-TGN, MTGN und die Kennzahlen Q und $S_{TGDP+TGTP}$ lagen bei Patienten mit stenosierendem Verlauf signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe (Morbus Crohn-Patienten mit nicht stenosierendem Verlauf). Bei den übrigen Metaboliten und Kennzahlen war diese Erhöhung als Trend erkennbar. TPMT-Aktivität und Dosierung differierten in beiden Gruppen nicht wesentlich. Ausgewertet wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests, Signifikanzen sind mit einem Stern markiert. Für beide Gruppen ist jeweils der Median angegeben.

	Stenose	n	keine Stenose	n	p (Mann-Whitney)
6-TGN	110,0	29	79,0	33	0,014*
TGDP	17,0	29	13,0	33	0,14
TGTP	92,0	29	70,0	33	0,02*
Q[§]	84,2	29	81,8	33	0,028*
S[#]	110,0	29	87,0	33	0,041*
6-MMP	883,0	28	365,0	33	0,23
6-MMP/6-TGN	5,7	28	4,4	33	0,68
TPMT-Aktivität	54,0	29	54,0	33	0,80
MTGN	57,0	27	40,0	31	0,012*
Dosis [mg/kg KG]	1,77	28	1,82	33	0,85
Dosis [mg]	112,5	28	125,0	33	0,84
CDAI	39,0	21	26,0	28	0,53

[§]Q = TGTP/(TGDP+TGTP)

[#]S = TGDP+TGTP

4.6.2 Morbus Crohn-Patienten mit stenosierendem Verlauf verfügen über hohe TGTP-Spiegel

In einer weiteren Untersuchung wurden die Morbus Crohn-Patienten mit stenosierendem Krankheitsverlauf bezüglich ihrer Metaboliten-Spiegel analysiert. 29 Probanden wurden in diese Untersuchung eingeschlossen. Die TGTP-Spiegel präsentierten sich in dieser Patientengruppe signifikant erhöht gegenüber der Kontrollgruppe (n = 33, p = 0,02). Auch die Spiegel von 6-TGN (p = 0,014), MTGN (p = 0,012) und den Kennzahlen $S_{TGDP+TGTP}$ (p = 0,041) und Q (% TGTP/TGDP + TGTP) stellten sich signifikant erhöht dar (p = 0,028, Tabelle 4.16). Für die Metaboliten TGDP, 6-MMP, der Kennzahl 6-MMP/6-TGN und der TPMT-Aktivität war diese Verschiebung als Trend erkennbar, es bestanden jedoch keine signifikanten Differenzen. Bezüglich der Azathioprin-Dosierung bzw. Dosis pro Kilogramm Körpergewicht hingegen waren keine Unterschiede zwischen der Stenose-Gruppe und der stenosefreien Patientengruppe zu dokumentieren (Abbildung 4.21).

Die Thiopurin-Metaboliten-Spiegel zeigten sich in dieser Untergruppe somit erhöht, obgleich Azathioprin nicht in erhöhter Dosierung verabreicht wurde. Auch die TPMT-Aktivität lag im Mittel nur leicht erhöht vor (54,8 U versus 52,5 U; Median in beiden Gruppen identisch bei 54,0 U) und kann folglich als singuläre Ursache ausgeschlossen werden. Die Fallzahl lag zwar mit 29 Patienten in der Stenose-Stichprobe nicht hoch,

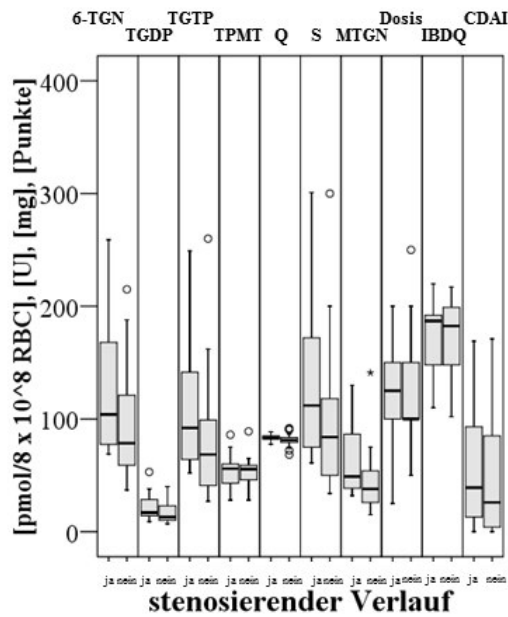


Abbildung 4.21: Azathioprin-Metaboliten bei Patienten mit stenosierendem versus nicht stenosierendem Verlauf

Patienten mit stenosierendem Verlauf wiesen signifikant erhöhte TGTP-, 6-TGN- und MTGN-Spiegel auf. Für die Kennzahlen $S_{TGDP+TGTP}$ und Q verdeutlicht diese Abbildung ebenfalls eine signifikante Erhöhung. Bei den übrigen Metaboliten war dies als Trend erkennbar. TPMT-Aktivität und Dosierung unterschieden sich in beiden Gruppen nicht wesentlich.

jedoch waren die Unterschiede für drei Metaboliten signifikant und bei den beiden verbleibenden sowie der TPMT-Aktivität als Trend erkennbar.

Diese Daten belegen eine signifikante Erhöhung von TGTP und weiterer Azathioprin-Metaboliten in Patienten mit stenosierendem Verlauf, obwohl diese Patientengruppe nicht signifikant höhere Azathioprin-Dosen erhielt.

4.6.3 Korrelationen der Metaboliten mit der Dosierung von Azathioprin – Der Metabolit TGTP korreliert mit der Azathioprin-Dosierung

Wie in Kapitel 4.2.2 bereits demonstriert wurde, bestand eine mäßig ausgeprägte Korrelation aller Metaboliten mit der Dosierung von Azathioprin pro Kilogramm Körpergewicht. Am deutlichsten zeigte sich diese Assoziation für MTGN als dem durch die TPMT methylierten Endprodukt der drei Nukleotide TGMP, TGDP und TGTP ($r_s = 0,45$, $p < 0,0001$, Abbildung 4.22a).

TGDP korrelierte ebenfalls mit der Dosierung von Azathioprin ($r_s = 0,31$, $p = 0,001$,

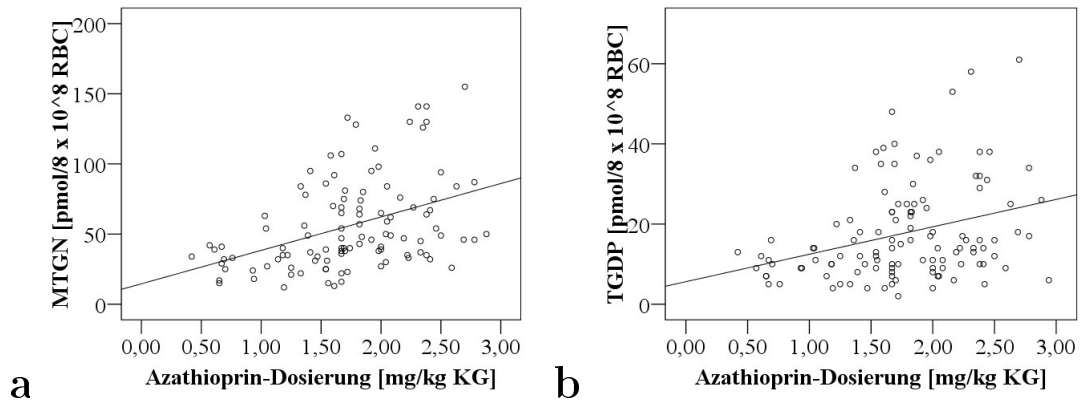


Abbildung 4.22: Korrelation von MTGN bzw. TGDP mit der Dosierung von Azathioprin pro Kilogramm Körpergewicht

a) Es bestand eine mäßige und hochsignifikante Korrelation von MTGN mit der Azathioprin-Dosis pro Kilogramm Körpergewicht ($r_S = 0,45$, $p < 0,0001$, $n = 108$). b) TGDP korrelierte ebenso mäßig und hochsignifikant mit der Azathioprin-Dosis (mg/kg KG): $r_S = 0,31$, $p = 0,001$ ($n = 115$).

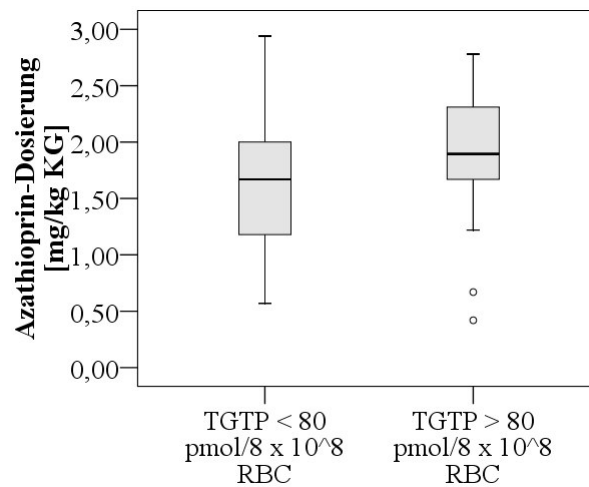


Abbildung 4.23: TGTP < 80 und TGTP > 80 pmol/8 x 10⁸ RBC bezogen auf die Azathioprin-Dosierung in Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht

Diese Abbildung demonstriert eine signifikant erhöhte Azathioprin-Dosierung der Patientengruppe mit TGTP-Spiegeln über 80 pmol/8 x 10⁸ RBC ($n = 54$) versus der Patientengruppe mit TGTP-Spiegeln unter 80 pmol/8 x 10⁸ RBC ($p = 0,003$, $n = 61$). Der Median wurde mit 1,67 bzw. 1,89 mg/kg KG berechnet.

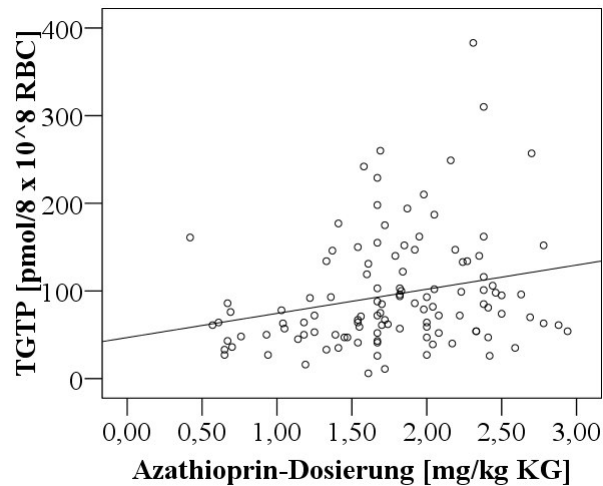


Abbildung 4.24: Korrelation von TGTP mit der Dosierung von Azathioprin pro Kilogramm Körpergewicht

TGTP korrelierte mäßig und hochsignifikant mit der Azathioprin-Dosierung pro Kilogramm KG ($r_s = 0,27$, $p = 0,003$). Je höher die eingenommene Azathioprin-Dosis, desto höhere TGTP-Spiegel resultierten für Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten. Auffällig ist in dieser Abbildung insbesondere, dass Patienten mit einer geringen Azathioprin-Dosierung mit wenigen Ausnahmen lediglich geringe TGTP-Spiegel erzielten. Jedoch erreichten Patienten mit hoher Azathioprin-Dosierung nicht ausschließlich hohe TGTP-Spiegel. Es gab eine recht große Untergruppe von Patienten, die trotz hoher Dosierung von mindestens 1,8 mg/kg KG nicht in der Lage war, hohe TGTP-Spiegel zu erzielen ($n = 115$).

Abbildung 4.22b). Dies lässt den Schluss zu, dass eine höhere Azathioprin-Dosierung pro Kilogramm Körpergewicht höhere TGDP-Spiegel induziert. Auch TGTP ist mit der Dosierung assoziiert: Teilte man die Stichprobe in diejenigen Patienten, bei denen TGTP unter $80 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ vorliegt und in diejenigen mit mehr als $80 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$, so ergab sich auf die Dosierung bezogen eine signifikante Differenz ($r_s = 0,27$, $p = 0,003$ sowie $p = 0,004$, Abbildungen 4.23 und 4.24). Dies lässt vermuten, dass Patienten, die Azathioprin in einer höheren Dosierung erhielten, sowohl über höhere TGDP- als auch TGTP-Spiegel verfügten als Patienten mit niedrigerer Azathioprin-Dosierung.

Trotz einer Vielzahl an Zwischenschritten und beteiligten Enzymen scheint somit ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen der Höhe der Dosierung von Azathioprin und der Höhe der Spiegel der gemessenen Metaboliten zu bestehen.

In Abbildung 4.24 fällt auf, dass eine recht große Gruppe von Patienten, die eine Azathioprin-Dosierung von mehr als 1,8 mg/kg KG erhielt, dennoch nicht in der Lage war, hohe TGTP-Spiegel zu erzielen. Diese Untergruppe, bestehend aus 25 Patienten, sollte im folgenden intensiver analysiert werden. Es sollte insbesondere untersucht werden, ob die Untergruppe mit niedrigen TGTP-Spiegeln unter einem schweren Krankheitsverlauf litt und weiterhin, ob die Metaboliten- oder Enzym-Spiegel in veränderter

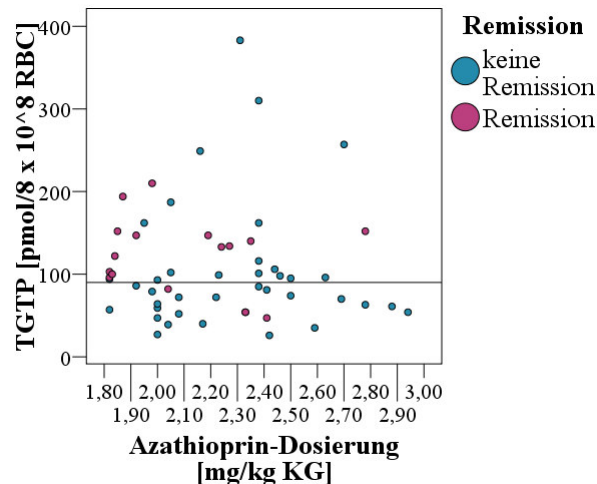


Abbildung 4.25: Streudiagramm der Untergruppe von Patienten mit Azathioprin-Dosierung $> 1,8$ mg/kg KG

Graphisch dargestellt ist hier die Untergruppe von Patienten aus Abbildung 4.24 mit einer Azathioprin-Dosierung von $> 1,8$ mg/kg KG ($n = 55$). Die Farbkategorien entsprechen den Gruppen „Remission“ und „keine Remission“. Die Untergruppe wurde zur Analyse der Höhe der TGTP-Spiegel in zwei Gruppen mit TGTP-Spiegeln über und unter 90 pmol/8 $\times 10^8$ RBC aufgeteilt (dargestellt durch eine Gerade). Hier wird demonstriert, dass Patienten, die sich nicht in Remission befanden, nahezu gleichmäßig auf beide Gruppen aufgeteilt waren: 17 Patienten (44 %) befanden sich oberhalb der Marke, 22 Patienten (56 %) lagen darunter. Patienten, die sich in Remission befanden, konnten überwiegend in der Gruppe mit TGTP-Spiegeln > 90 pmol/8 $\times 10^8$ RBC nachgewiesen werden: Von 16 Patienten verfügten 13 (81 %) über hohe TGTP-Spiegel. Die Auswertung mittels exakten Fisher-Tests ergab $p = 0,011$. Hohe TGTP-Spiegel schienen somit eine notwendige Voraussetzung für eine Remission darzustellen, konnten jedoch von einigen Patienten trotz hoher bis sehr hoher Azathioprin-Dosierung nicht erzielt werden.

Höhe vorlagen, was einen Hinweis auf einen gegenüber der Kontrollgruppe veränderten Metabolisierungsweg darstellen könnte. Als Kontrollgruppe fungierte eine Patientengruppe mit einer Dosierung in gleicher Höhe und TGTP-Spiegeln im Zielbereich ($n = 30$). Als *Cut off*-Wert diente hier ein TGTP-Wert von 90 pmol/8 $\times 10^8$ RBC. In Abbildung 4.25 sind beide Gruppen noch einmal separat dargestellt. Der *Cut off*-Wert von 90 pmol/8 $\times 10^8$ RBC wurde durch eine Gerade markiert. Insgesamt befanden sich 16 Patienten in Remission (29 %) und 39 Patienten außerhalb einer Remission. Von den 16 Patienten, die einer Remission zugeordnet wurden, verfügten 13 (81 %) über TGTP-Spiegel von > 90 pmol/8 $\times 10^8$ RBC. Die 39-köpfige Gruppe der Patienten, die sich nicht in Remission befanden, verteilte sich heterogen über die Bereiche ober- und unterhalb der *Cut off*-Marke von 90 pmol/8 $\times 10^8$ RBC: 22 Patienten (56 %) lagen unterhalb der Marke, 17 Patienten (44 %) befanden sich darüber. Der exakte Fisher-Test ergab einen p-Wert von 0,011.

Tabelle 4.17: Patienten mit Azathioprin-Dosierung von $> 1,8$ mg/kg KG in Remission versus nicht in Remission

Verglichen wurden innerhalb der Patientenstichprobe mit Azathioprin-Dosierung von $> 1,8$ mg/kg KG die Gruppen „Remission“ und „keine Remission“. Hier sollte analysiert werden, ob Patienten mit hoher Dosierung und schlechtem Ansprechen anders metabolisieren und ob ein Vergleich der Azathioprin-Metaboliten hierfür Hinweise liefert. Die Tabelle verdeutlicht, dass TGTP, 6-TGN und die Kennzahl $S_{TGDP+TGTP}$ in der Remissionsgruppe signifikant erhöht waren. Die TPMT-Aktivität und die 6-MMP-Spiegel unterschieden sich jedoch nicht signifikant. Interessanterweise erhielten Remissionspatienten eine niedrigere Dosierung als Non-Responder. Ausgewertet wurde mittels Mann-Whitney-Test. Signifikanzen sind mit einem Stern markiert, für beide Gruppen ist der Median dargestellt.

	Remission	n	keine Remission	n	p (Mann-Whitney)
6-TGN	141,0	16	99,0	39	0,024*
TGDP	23,0	16	16,0	39	0,09
TGTP	133,5	16	81,0	39	0,015*
Q[§]	84,1	16	84,2	39	0,91
S[#]	152,0	16	96,0	39	0,013*
6-MMP	793,0	16	687,0	39	0,75
6-MMP/6-TGN	4,9	16	5,8	39	0,52
TPMT-Aktivität	51,5	16	54,0	39	0,79
MTGN	69,0	15	52,0	34	0,15
Dosis [mg/kg KG]	2,01	16	2,31	39	0,020*
Dosis [mg]	137,5	16	150,0	39	0,29
CDAI	23,0	8	87,0	24	0,008*
CAI	0,0	5	6,0	7	0,005*
IBDQ	201,0	12	148,5	24	< 0,0001*

[§]Q = TGTP/(TGDP+TGTP)

[#]S = TGDP+TGTP

Eine Mindesthöhe der TGTP-Spiegel scheint somit eine Prämisse für eine Remission zu darzustellen. Diese Mindesthöhe lässt sich jedoch offenbar durch eine Dosissteigerung nicht in jedem Fall erzwingen. In Abbildung 4.25 erkennt man, dass sich Patienten mit sehr hohen Azathioprin-Dosierungen zwischen 2,5 und 3,0 mg/kg KG zum großen Teil weder in Remission befanden, noch adäquate TGTP-Spiegel aufweisen konnten. Selbst hohe TGTP-Spiegel scheinen eine Remission nicht zu garantieren, wie in Abbildung 4.25 an einer Untergruppe von Patienten mit TGTP-Spiegeln > 200 pmol/8 x 10⁸ RBC ersichtlich ist.

Tabelle 4.17 demonstriert, bezüglich welcher Parameter die Patienten in Remission versus außerhalb einer Remission divergieren. Die Metaboliten-Spiegel von TGTP und 6-TGN, der Kennzahl $S_{TGDP+TGTP}$, des CDAI, CAI und IBDQ und der Dosierung mg/kg KG beider Gruppen differierten signifikant. Sämtliche Metaboliten und IBDQ wurden in der Remissionsgruppe als erhöht, CDAI und CAI dagegen als erniedrigt dokumentiert. Die Azathioprin-Dosierung wurde in der Remissionsgruppe interessanterweise als niedriger quantifiziert als in der Nicht-Remissionsgruppe, was sich mit der Beobachtung deckt, dass sich Patienten mit sehr hohen Dosen in Abbil-

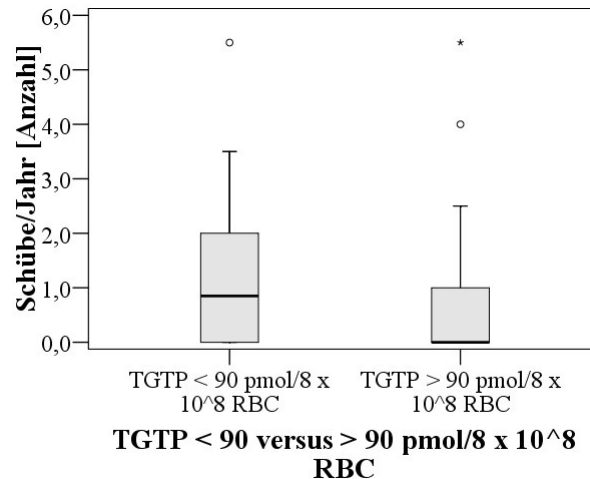


Abbildung 4.26: Vergleich der beiden Gruppen TGTP < 90 versus TGTP > 90 pmol/8 x 10⁸ RBC bezogen auf die Anzahl der Schübe pro Jahr

Das Gros der Patienten mit sehr hohen Schubzahlen pro Jahr befand sich in der Gruppe mit TGTP-Spiegeln < 90 pmol/8 x 10⁸ RBC. Der Median in dieser Gruppe lag mit 0,85 Schüben pro Jahr (n = 50) im Vergleich zum Median der anderen Gruppe (0,00 Schübe/Jahr, n = 34) signifikant erhöht (p = 0,026).

dung 4.25 nicht in Remission befanden. Man könnte vermuten, dass diese das Medikament anders metabolisieren. Signifikante Unterschiede bezüglich TPMT-Aktivität oder 6-MMP-Spiegel haben sich hier jedoch nicht dargestellt (siehe Tabelle 4.17).

4.6.4 Ansprechen und Azathioprin-Metaboliten – Hohe TGTP-Spiegel sind mit einem Ansprechen auf die Therapie assoziiert

In einem letzten Schritt sollte nun die Höhe der TGTP-Spiegel mit dem Ansprechen auf die Azathioprin-Therapie korreliert werden. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Höhe der Azathioprin-Metaboliten und der *Response* näher zu untersuchen, wurden die Patienten zunächst in zwei Gruppen mit TGTP-Spiegeln über (n = 34) und unter 90 pmol/8 x 10⁸ RBC (n = 50) aufgeteilt und die Anzahl der Schübe innerhalb eines Jahres betrachtet¹⁴. In Abbildung 4.26 ist ersichtlich, dass bei-

¹⁴Litt ein Patient an weniger als einem Schub/Jahr (also beispielsweise ein Schub alle zwei Jahre), so wurde die Schubzahl entsprechend auf ein Jahr umgerechnet (z. B. 0,5/Jahr). Der besseren Vergleichbarkeit wegen wurden selbst Patienten mit 5 Schüben/Jahr und mehr, bei denen man ebenso von einem chronisch aktiven Verlauf sprechen könnte, in diese Klassifizierung mit einbezogen. Eine einheitliche Definition von akut rezidivierendem (schubhaftem) und chronisch aktivem Verlauf existiert allerdings nicht, eine Differenzierung ist damit nicht möglich (Hoffmann *et al.*, 2008a; Langholz *et al.*, 1994; Reissmann *et al.*, 2004). In dieser Arbeit wurde ein Schub definiert als Phase erhöhter entzündlicher Aktivität, verbunden mit der typischen Klinik, bestehend aus abdominellen Schmerzen sowie wässrigen und ggf. blutigen Diarrhoen.

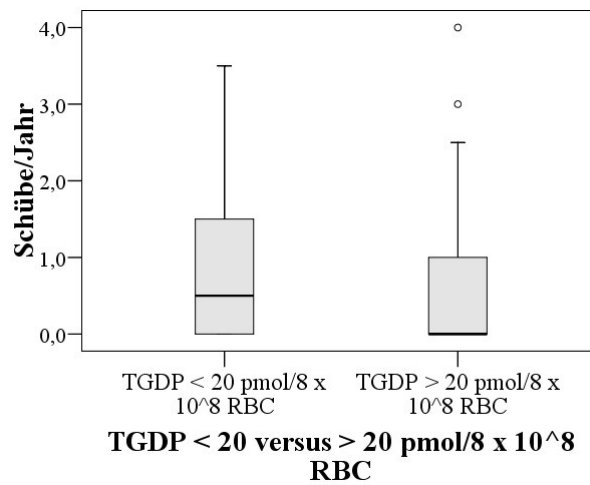


Abbildung 4.27: Vergleich der beiden Gruppen TGDP < 20 versus TGDP > 20 pmol/8 x 10⁸ RBC bezogen auf die Anzahl der Schübe pro Jahr

Für TGDP < 20 pmol/8 x 10⁸ RBC (n = 58) wurde eine Median von 0,50 ermittelt. Im Vergleich mit dem Median für TGDP > 20 pmol/8 x 10⁸ RBC (n = 26) mit 0,0 konnten mit einem p-Wert von 0,23 keine signifikanten Unterschiede errechnet werden.

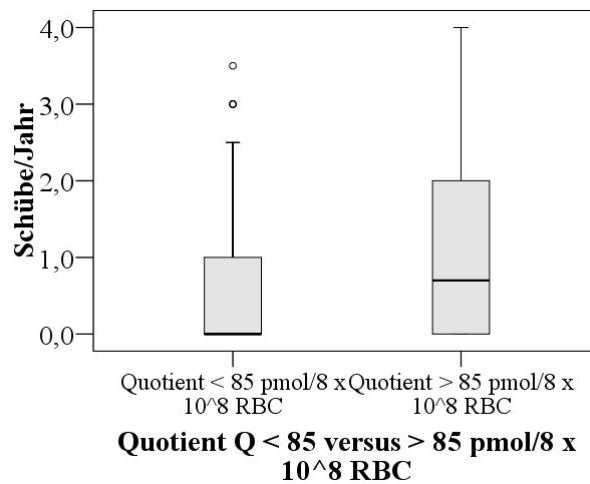


Abbildung 4.28: Vergleich der beiden Gruppen Q < 85 versus Q > 85 pmol/8 x 10⁸ RBC bezogen auf die Anzahl der Schübe pro Jahr

Der p-Wert lag für den Vergleich der beiden Gruppen Q < 85 (n = 50, Median = 0) versus Q > 85 pmol/8 x 10⁸ RBC (n = 34, Median = 0,7) bei 0,17 und war damit ebenfalls nicht signifikant.

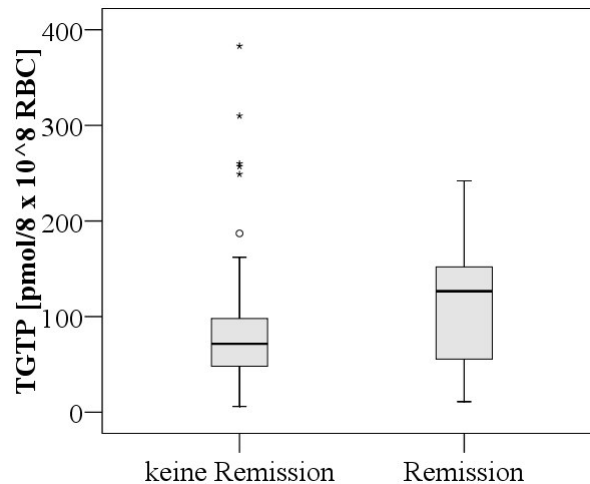


Abbildung 4.29: TGTP-Spiegel für Patienten in Remission versus nicht in Remission

Dargestellt wurden die TGTP-Spiegel der beiden Patienten-Kollektive „Remission“ ($n = 32$) versus „keine Remission“ ($n = 90$), $p = 0,011$. Die Höhe der TGTP-Spiegel differierte in beiden Gruppen signifikant (Median Remissionsgruppe 126,5 versus Nicht-Remissionsgruppe 71,5 pmol/8 x 10^8 RBC) und lag damit in der Remissionsgruppe höher. Bei genauer Betrachtung der Box-Whisker-Plots fällt auf, dass die Interquartilspanne des Remissions-Boxplots größer ist als die des Nicht-Remissions-Boxplots (Remissionsgruppe 47,8–98,3 versus Nicht-Remissionsgruppe 54,8–152,0 pmol/8 x 10^8 RBC). Remissions-Patienten verfügten somit zwar über höhere TGTP-Spiegel, allerdings wird anhand dieser Abbildung deutlich, dass auch eine größere Untergruppe an Probanden existierte, bei denen dies nicht der Fall war und welche sich dennoch in Remission befanden. Im Vergleich dazu wiesen Patienten mit aktivem Krankheitsverlauf niedrige TGTP-Spiegel mit geringer Interquartilspanne auf. Man könnte hieraus schließen, dass hohe TGTP-Spiegel einen Prädiktor für das Ansprechen auf eine Azathioprin-Therapie darstellen. Jedoch scheinen sie für eine stabile Langzeitremission nicht unabdingbar zu sein. Für diese reichen möglicherweise TGTP-Spiegel auch in geringerer Höhe aus.

de Gruppen bezüglich der Anzahl ihrer Schübe differieren. Die Gruppe mit niedrigen TGTP-Spiegeln litt signifikant häufiger unter einem Krankheitsverlauf mit höherer Zahl an Schüben ($p = 0,026$). Für den Metaboliten TGDP und de Kennzahl Q konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Schubfrequenz pro Jahr ermittelt werden (TGDP: *cut off* bei 20 pmol/8 x 10^8 RBC, $p = 0,23$; $n = 58$ versus $n = 26$; Abbildung 4.27; Q: *cut off* bei 85 pmol/8 x 10^8 RBC, $p = 0,17$; $n = 50$ versus $n = 34$; Abbildung 4.28).

In einer abschließenden Untersuchung wurden die Patienten anhand der klinischen Daten, der Laborwerte und der Parameter für das Ansprechen in zwei weitere Gruppen eingeteilt. Die eine Gruppe bestand aus Probanden, die sich zum Zeitpunkt der Untersuchung in stabiler Remission befanden ($n = 32$). Die andere Gruppe bildeten Patienten, bei denen entweder zum Untersuchungszeitpunkt ein schubhafter oder

chronisch aktiver Krankheitsverlauf diagnostiziert wurde ($n = 90$). Die Analyse ergab für die Remissions-Gruppe signifikant höhere TGTP-Spiegel (Median 126,5 *versus* 71,5 pmol/ 8×10^8 RBC, $p = 0,011$, Abbildung 4.29).

Auffällig war die unterschiedlich breite Interquartilspanne der beiden Box-Whisker-Plots (Remissionsgruppe 47,8–98,3 *versus* Nicht-Remissionsgruppe 54,8–152,0 pmol/ 8×10^8 RBC). Hohe TGTP-Spiegel scheinen somit einen Prädiktor für das Ansprechen auf die Azathioprin-Therapie darzustellen, während niedrige TGTP-Spiegel das Risiko eines Therapieversagens erhöhen. Hohe TGTP-Spiegel garantieren gleichwohl eher den Erfolg einer Remission. Allerdings lässt sich aus der breiten Interquartilspanne in Abbildung 4.29 ableiten, dass hohe TGTP-Spiegel für die Aufrechterhaltung einer Remission nicht generell erforderlich zu sein scheinen: Befindet sich der Patient in einer stabilen Langzeitremission, genügen möglicherweise auch geringere TGTP-Spiegel. Anzunehmen ist, dass bei Patienten, welche sich seit Jahren in stabiler Remission befinden, eine Anpassung der Azathioprin-Dosis erfolgte und die Remission durch diese geringere Dosis mit daraus resultierenden geringeren Wirkspiegeln dennoch aufrecht erhalten werden konnte.

5 Diskussion

5.1 Ausgangsfragestellung

Azathioprin wurde ursprünglich für die Therapie der akuten Leukämie im Kindesalter entwickelt. Bald stellte sich jedoch heraus, dass es auch in der Unterdrückung der Transplantatabstoßungsreaktion nach Nierentransplantation sehr gute Dienste erwies (Calne *et al.*, 1962). In den nachfolgenden Jahren etablierte sich das Medikament nach und nach in der Therapie von Erkrankungen, die mit einer Störung des Immunsystems einhergehen. Seit dieser Zeit kommt es auch in der Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen zum Einsatz (Bowen *et al.*, 1966; Brooke *et al.*, 1969).

In den letzten 50 Jahren nahm das Immunsuppressivum Azathioprin einen festen Platz in den Therapieregime der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa ein. Hier stellt es in der Remissionserhaltung von Morbus Crohn das Medikament der ersten Wahl dar. Ebenso ist es in der Steroideinsparung, bei steroidrefraktärem und steroidabhängigem Verlauf, in der Remissionsinduktion des Morbus Crohn und im Remissionserhalt der Colitis ulcerosa bedeutsam.

Unerwünschte Wirkungen treten jedoch bei bis zu 28 % der Patienten auf und ein Ansprechen auf die Therapie lässt sich frühestens nach drei Monaten beurteilen (Kirschner, 1998; Marinaki *et al.*, 2004; Prefontaine *et al.*, 2009a; Present *et al.*, 1980). Ein klinisches Monitoring existiert bislang für den Azathioprin-Metaboliten 6-TGN. Er gilt als aktiver Metabolit und hohe Wirkspiegel sind mit Zytotoxizität und Ansprechen assoziiert (Cuffari *et al.*, 1996; Cuffari *et al.*, 2001; Dubinsky *et al.*, 2000; Hanai *et al.*, 2010; Hindorf *et al.*, 2004a; Kwan *et al.*, 2008; Ooi *et al.*, 2007; Osterman *et al.*, 2006; Roblin *et al.*, 2005; Wright *et al.*, 2004; Wusk *et al.*, 2004). Jedoch konnten diese Erkenntnisse in anderen Arbeiten nicht reproduziert werden (Belaiche *et al.*, 2001; Goldenberg *et al.*, 2004; Herrlinger *et al.*, 2004; Lowry *et al.*, 2001b; Reuther *et al.*, 2003; Schedel *et al.*, 2006).

Der molekulare Wirkmechanismus von Azathioprin konnte bis heute nicht vollständig geklärt werden. Einige Autoren gehen davon aus, dass eine Wirkung auf mehreren Ebenen stattfindet (Elgemeie, 2003). Neben einer Inkorporation der aktiven Thiopurin-Metaboliten in DNA und RNA und konsekutiver Zytotoxizität durch Arrestierung des Zellzyklus mit Inhibition der chromosomalen Replikation, der DNA-Reparaturmechanismen sowie der Proteinbiosynthese (Maybaum und Mandel, 1983; Pan und Nelson, 1990) wird auch eine Hemmung der *De novo*-Purin-Nukleotid-Synthese mit daraus resultierender Depletion der Adenosin-Speicher diskutiert (Dayton

etal., 1992; Tay *etal.*, 1969). Das *Mismatch Repair*-System ist an der Erkennung von dTGTP in DNA beteiligt. Defizienz wird mit einer Resistenz gegen Thiopurine assoziiert (Karran, 2001; Swann *etal.*, 1996).

Unlängst konnte in einem wichtigen Schritt in Richtung der Entschlüsselung des Wirkmechanismus gezeigt werden, dass dem Metaboliten 6-Thioguanosin-5'-Triphosphat (TGTP) eine entscheidende Bedeutung für den immunsuppressiven Effekt von Azathioprin zukommt. Dieser bindet anstelle von GTP an die kleine GTPase Rac1, was eine Inhibition der CD28-Kostimulation bewirkt. Über Rac1 kommt es durch Inhibition von STAT3, MEKK1 und NF- κ B zum Ausbleiben des antiapoptotischen Signals von bcl-x_L und somit zur Apoptose, Anergie oder zum aktivierungs-induzierten Zelltod (*activation induced cell death*, AICD) in pathogenen Gedächtnis-T-Zellen (Tiede *etal.*, 2003). Eine Inhibition der Ezrin-Radixin-Moesin-Dephosphorylierung resultiert in einer Blockade der T-Zell-APC-Konjugation (Poppe *etal.*, 2006).

Wir führten eine prospektive Studie an 133 Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, davon 94 mit Morbus Crohn und 39 mit Colitis ulcerosa, im Zeitraum Oktober 2003 bis Oktober 2007 durch. Hierbei wurde der bis dato nicht messbare Azathioprin-Metabolit TGTP in Erythrozyten aus EDTA-Blut von Patienten unter dauerhafter Azathioprin-Therapie mittels einer neuartigen *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)-Methode bestimmt. Ziel der Studie war es, durch Bestimmung von TGTP zu beurteilen, ob ein Ansprechen auf die Azathioprin-Therapie prognostiziert werden kann. Therapieversager könnten somit frühzeitig identifiziert und die Therapierregime individuell angepasst oder eine Dosisanpassung vorgenommen werden. Unerwünschte Wirkungen könnten vermieden werden. TGTP könnte routinemäßig gemessen und das Monitoring der Azathioprin-Therapie damit optimiert und individualisiert werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen auf, dass der Metabolit TGTP in der Lage ist, ein Ansprechen auf die Azathioprin-Therapie vorherzusagen. Patienten in Remission weisen signifikant höhere TGTP-Spiegel auf als Patienten mit aktiver Erkrankung. Während hohe TGTP-Spiegel mit einem Ansprechen auf die Azathioprin-Therapie assoziiert sind, liegen bei Patienten, die schlecht auf die Therapie ansprechen, niedrige TGTP-Spiegel vor. Hohe TGTP-Spiegel scheinen jedoch keine Bedingung für eine stabile Langzeitremission darzustellen, da eine Untergruppe von Langzeit-Remissionspatienten in dieser Studie über niedrige TGTP-Spiegel verfügte.

5.2 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv bestand aus Morbus Crohn- sowie Colitis ulcerosa-Patienten, welche über die Gastro-Crohn-Ambulanz der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikum Mainz rekrutiert wurden. Ein Großteil der Patienten wurde regelmäßig vom Ärzteteam der Gastro-Crohn-Ambulanz betreut. Die Tabellen 4.1, 4.2 und 4.3 in Kapitel 4.1.3 demonstrieren, dass für diese Studie ein Patientengut

mobilisiert wurde, welches sich durch eine erhöhte Krankheitsaktivität bei langer Krankheitsdauer mit langjähriger Azathioprin-Einnahme auszeichnet. Die Raten für das Ansprechen auf die Azathioprin-Therapie lagen für Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten mit 26 % weit unter denjenigen, die in anderen Studien festgestellt wurden (Cuffari *et al.*, 1996: 72 % Remissionsrate; Cuffari *et al.*, 2001: 68 % Remissionsrate; Dubinsky *et al.*, 2002: 40 % Therapieversager; Haines *et al.*, 2010: 52 % Therapieversager; Kwan *et al.*, 2008: 44 % Ansprechen; Prefontaine *et al.*, 2009a: 54 % Ansprechen; Prefontaine *et al.*, 2009b: 71 % Remissionsrate; Reinshagen *et al.*, 2007: 44 % Remissionsrate nach 16 Wochen; Roblin *et al.*, 2005: 72 % und 59 % Remissionsrate) und unter den Teilnehmern der Studie befanden sich auch Patienten mit fistulierendem, stenosierendem und steroidrefraktärem Verlauf. Ein kleiner Teil der Probanden erhielt Anti-TNF α . Somit wurde hier ein Patientengut rekrutiert, welches aufgrund eines zum großen Teil besonders schweren Verlaufs der Erkrankung nicht dem CED-Klientel einer gastroenterologischen Praxis gleichgestellt werden kann.

Trotz der Schwere des Krankheitsverlaufs lag die Dosierung von Azathioprin unter derjenigen in vergleichbaren Studien (Haglund *et al.*, 2008: 2,06 mg/kg KG Azathioprin; Roblin *et al.*, 2005: 2,25 mg/kg KG). Im Mittel wurden lediglich 1,8 mg/kg Körpergewicht bzw. 123 mg/d verabreicht. 28 % der Patienten erhielten weniger als 1,5 mg Azathioprin pro Kilogramm Körpergewicht. Auch dies könnte eine Ursache für die niedrige Ansprech-Rate der für diese Studie rekrutierten Patienten darstellen.

Bei der Betrachtung des Patientenkollektives fällt weiterhin auf, dass sämtliche Patienten über eine normale bis hohe TPMT-Aktivität verfügen. Sieben Patienten (5 %) besitzen eine sehr hohe TPMT-Aktivität über 68 U (Kröplin *et al.*, 1998). In einigen Studien wurde eine hohe TPMT-Aktivität mit einem schlechteren Ansprechen auf die Thiopurin-Therapie und mit einer bevorzugten Metabolisierung methylierter Metaboliten verknüpft (Azhary *et al.*, 2009; Chocair *et al.*, 1992; Cuffari *et al.*, 2004b; Hindorf *et al.*, 2010; Kwan *et al.*, 2008; Lennard und Lilleyman, 1996; Lennard, 1998; McLeod *et al.*, 1995). Möglicherweise ist dies ein weiterer Faktor, der zum schlechten Ansprechen der Patienten auf die Azathioprin-Therapie beitrug.

5.3 Messung der Azathioprin-Metaboliten und TPMT-Aktivität in Erythrozyten durch die HPLC-Methode

Die Messung der Aktivität der TPMT wurde nach der Methode von Kröplin und Kollegen (1998) und Schäffeler *et al.* (2001) durchgeführt. Die Messung des Azathioprin-Metaboliten 6-TGN erfolgte wie durch Herrlinger und Mitarbeiter (2004) beschrieben. TGMP, TGDP und TGTP wurden simultan nach einem Verfahren von Rabel *et al.* (1995) bestimmt, das für diese Arbeit modifiziert wurde.

Tabelle 5.1: Dokumentation der Thiopurin-Lagerung und -Analyse in aktuellen klinischen Studien

Nachfolgend eine Auflistung relevanter klinischer Studien der letzten Jahre zum Thema „Therapeutic Drug Monitoring“ in Erythrozyten bei Patienten verschiedener Erkrankungen unter Azathioprin-, 6-Mercaptopurin- oder 6-Thioguanin-Therapie. Allen Untersuchungen gemeinsam war die Messung des Metaboliten 6-TGN; in einigen Studien wurden weitere Metaboliten oder die TPMT-Aktivität bestimmt. Die Angaben zu Lagerung, Transport und Analyse der Proben wurden dem Abschnitt „Material and Methods“ der jeweiligen Arbeit entnommen. Von insgesamt 55 untersuchten Veröffentlichungen gaben 33 die exakten Lagerungsbedingungen nach der Probenentnahme nicht an. Auch der zeitliche Ablauf wurde nur in wenigen Untersuchungen dokumentiert. Erstaunlich ist, dass in immerhin acht Studien (15 %) keine Angaben zur Analyse-Methode von 6-TGN gemacht wurden. Ob ein Transport der Proben an ein auswärtiges Labor erfolgte, konnte nur sieben Arbeiten entnommen werden. Mit TPMT ist jeweils die TPMT-Aktivität gemeint.

Erstautor	Jahr	Angaben zu Lagerung/ Transport	Angaben zur Analyse-Methode	Analyse-Methode	Angaben zu auswärtigem Labor	gemessene Metaboliten
Andoh <i>et al.</i>	2008	nein	nein			6-TGN
Ansari <i>et al.</i>	2008	nein	ja	Rabel <i>et al.</i>		6-TGN, TPMT
Ansari <i>et al.</i>	2010	nein	teilweise	Dervieux-Bouliou <i>et al.</i>		6-TGN, 6-MMP, TPMT
Bell <i>et al.</i>	2004	nein	ja	Erdmann <i>et al.</i>		6-TGN, 6-MMPN
Bergan <i>et al.</i>	1994	ja	ja	Lennard-Singleton <i>et al.</i>		6-TGN, 6-MP
Bergan <i>et al.</i>	1997	ja	ja	Lennard-Singleton <i>et al.</i>		6-TGN, TPMT
Berkovitch <i>et al.</i>	1996	ja	ja	Lennard-Singleton <i>et al.</i>		6-TGN, TPMT
Bloomfeld <i>et al.</i>	2003	nein	nein		ja	6-TGN, 6-MMP
Bokemeyer <i>et al.</i>	2007	nein	ja	Iven <i>et al.</i>		6-TGN, 6-MMPR, 6-MTGN, TPMT
Bouliou <i>et al.</i>	1997	nein	ja	Bouliou <i>et al.</i>		6-TGN, 6-MPN, 6-TXN
Chan <i>et al.</i>	1990	ja	ja	Erdmann <i>et al.</i>		6-MP, 6-TU, 6-TGN
Chrzanowska <i>et al.</i>	1999	teilweise	ja	Lennard-Singleton <i>et al.</i>		6-TGN, 6-MMP
Cuffari <i>et al.</i>	1996	teilweise	ja	Lennard-Singleton <i>et al.</i>		6-TG, 6-MMP
Cuffari <i>et al.</i>	2001	nein	ja	Lennard-Singleton <i>et al.</i>		6-TG, 6-MMP
Daperno <i>et al.</i>	2009	ja	ja	Dervieux-Bouliou <i>et al.</i>		6-TGN, 6-MMP, TPMT
de Beaumais <i>et al.</i>	2010	nein	ja	Dervieux-Bouliou <i>et al.</i>		6-TGN, 6-MMPN
De Boer <i>et al.</i>	2007a	ja	ja	Keuzenkamp-Jansen <i>et al.</i> , Lennard-Singleton <i>et al.</i>		6-TGN, TGMP, TGDP, TGTP, TPMT, 6-Thioguanin
De Boer <i>et al.</i>	2007b	teilweise	ja	Lennard-Singleton <i>et al.</i>		6-TGN, 6-MMPR
Decaux <i>et al.</i>	2000	nein	ja	Lennard-Singleton <i>et al.</i>		6-TGN

(Fortsetzung)

Tabelle 5.1: Dokumentation der Thiopurin-Lagerung und -Analyse in aktuellen klinischen Studien

Erstautor	Jahr	Angaben zu Lagerung/Transport	Angaben zur Analyse-Methode	Analyse-Methode	Angaben zu auswärtigem Labor	gemessene Metaboliten
Deibert <i>et al.</i>	2003	ja	ja	keine Angabe		6-Thioguanin im Plasma, TPMT
Derijks <i>et al.</i>	2003	teilweise	ja	Lennard-Singleton <i>et al.</i>		6-TG, 6-MMP
Derijks <i>et al.</i>	2004	teilweise	ja	Lennard-Singleton <i>et al.</i>	teilweise (Multi-Center-Studie)	6-TGN, 6-MMPR
D'Halluin <i>et al.</i>	2005	nein	ja	Lennard-Singleton <i>et al.</i>		6-TGN
Dubinsky <i>et al.</i>	2001	nein	ja	Lennard-Singleton <i>et al.</i>	ja	6-TGN, 6-MMPR, TPMT
Dubinsky <i>et al.</i>	2000	nein	ja	Lennard-Singleton <i>et al.</i>		6-TG, 6-MMP
el-Azhary <i>et al.</i>	2009	nein	ja	Dervieux-Boulieu <i>et al.</i>		6-TGN, 6-MMP, TPMT
Erb <i>et al.</i>	1998	ja	ja	Boulieu <i>et al.</i> , Erdman <i>et al.</i>		6-TGN, meTIN, MTGN
Goldenberg <i>et al.</i>	2004	nein	nein			6-TGN, 6-MMP
Gupta <i>et al.</i>	2001	nein	nein		ja	6-TG, 6-MMP
Halonen <i>et al.</i>	2006	nein	ja	Bruunshuus <i>et al.</i>		6-TGN
Harms <i>et al.</i>	2003	nein	nein			6-TGN
Herrlinger <i>et al.</i>	2004	nein	ja	Iven <i>et al.</i>		6-TGN, MTGN, TPMT, 6-MMPR
Hindorf <i>et al.</i>	2006	teilweise	ja	Pettersson <i>et al.</i>		6-TGN, meTIMP, TPMT
Innocenti <i>et al.</i>	2000	teilweise	ja	Lennard-Singleton <i>et al.</i>		6-TGN, 6-MPN
Karner <i>et al.</i>	2010	ja	ja	Rabel <i>et al.</i>		6-TGN, TGMP, TGDP, TGTP, 6-MMP, MTGN, TPMT
Lancaster <i>et al.</i>	1998	nein	ja	Lennard-Singleton <i>et al.</i>		6-TGN
Lancaster <i>et al.</i>	2001	ja	ja	Lennard-Singleton <i>et al.</i>		6-TGN, 6-Thioguanin im Plasma
Lennard <i>et al.</i>	1996	nein	ja	Lennard-Singleton <i>et al.</i>		6-TGN
Lennard <i>et al.</i>	2004	nein	ja	Lennard und Maddocks <i>et al.</i>		6-TGN
Neurath <i>et al.</i>	1995	ja	ja	Rabel <i>et al.</i>		6-TGN, TGMP, TGDP, TGTP, 6-MMP, MTGN, TPMT
Palle <i>et al.</i>	2009	ja	ja	Lennard-Singleton <i>et al.</i>		6-TGN

(Fortsetzung)

Tabelle 5.1: Dokumentation der Thiopurin-Lagerung und -Analyse in aktuellen klinischen Studien

Erstautor	Jahr	Angaben zu Lagerung/Transport	Angaben zur Analyse-Methode	Analyse-Methode	Angaben zu auswärtigem Labor	gemessene Metaboliten
Reinshagen <i>et al.</i>	2007	nein	ja	Lennard-Singleton <i>et al.</i> (Dervieux-Boulieu <i>et al.</i> für 6-MMP)		6-TGN, 6-MMP, TPMT
Relling <i>et al.</i>	1999	nein	ja	Lennard-Singleton <i>et al.</i>		6-TGN, TIMP, meTIMP, TPMT
Roblin <i>et al.</i>	2005	nein	teilweise	Lennard und Maddocks <i>et al.</i>		6-TGN
Roblin <i>et al.</i>	2008	nein	teilweise	Dervieux-Boulieu <i>et al.</i>		6-TGN, TPMT, 6-MMP/6-MMPR
Rumbo <i>et al.</i>	2002	nein	nein		ja	6-TG, 6-MMP, TPMT
Schedel <i>et al.</i>	2006	nein	ja	Lennard-Singleton <i>et al.</i>	ja	6-TGN, TPMT
Schütz <i>et al.</i>	1996	teilweise	teilweise	Lennard-Singleton <i>et al.</i>		6-TGN, TPMT
Sparrow <i>et al.</i>	2005	nein	nein		ja	6-TGN, 6-MMP, TPMT
Stevens <i>et al.</i>	2004	nein	nein			6-TGN, 6-MMP
Thomas <i>et al.</i>	2003	nein	ja	Erdmann <i>et al.</i>		6-TGN, TPMT
Traore <i>et al.</i>	2006	teilweise	ja	Dervieux-Boulieu <i>et al.</i>		6-TGN, 6-MMP
Vikingsson <i>et al.</i>	2009	ja	ja	Rabel <i>et al.</i>		6-TGN, TGMP, TGDP, TGTP, meTIMP
Wright <i>et al.</i>	2004	nein	ja	Lennard-Singleton <i>et al.</i>		6-TGN, MMPN
Wusk <i>et al.</i>	2004	ja	ja	keine Angabe		6-TGN, MMPN

In der vorliegenden Arbeit wurden die Proben unmittelbar nach der Blutentnahme bei 4° C gelagert und innerhalb von 4 Stunden weiterverarbeitet. Nach der Herstellung gepackter Erythrozyten wurden diese bis zur weiteren Analyse im Margarete Fischer-Bosch-Institut in Stuttgart zunächst bei -80° C tiefgefroren. Der Transport in das Labor erfolgte per Übernachtversand auf Trockeneis. Nach Ankunft wurden die Proben bis zur endgültigen Verarbeitung weiterhin bei -80° C gelagert. Ein Auftauen der gepackten Erythrozyten fand somit erst unmittelbar vor der finalen Verarbeitung der Proben statt.

Bislang untersuchten nur einige wenige Arbeitsgruppen die Stabilität der Thiopurine bei verschiedenen Temperaturen und kamen dabei zu recht unterschiedlichen Resultaten. De Graaf und Mitarbeiter beschrieben einen Abfall von 6-TGN bei Raumtemperatur von bis zu 50 % in sieben Tagen (De Graaf *et al.*, 2008; De Graaf *et al.*, 2010b). Bei Kühlschranktemperatur lag dieser Verlust laut De Graaf bei 10 % für den gleichen Zeitraum. Bei -80° C schienen die 6-TGN-Spiegel stabil zu sein, 6-MMP fiel jedoch signifikant. Pike und Mitarbeiter (2001) berichteten über einen 12 prozentigen Verlust von 6-TGN selbst bei Temperaturen von -80° C nach 24 Wochen. Für 6-MMP konnten sie hingegen keine signifikanten Schwankungen dokumentieren. Lavi und Holcenberg (1985) postulierten ähnliche Ergebnisse für TGTP bei Raumtemperatur. Für Kühlschrank- und Tiefkühltemperatur zeigte sich TGTP jedoch sehr stabil über längere Zeiträume bis zu fünf Monaten. Eine weitere Arbeit stellte eine Verringerung von 6-TGN und 6-MPN auf 75 % der Ausgangswerte nach vier Tagen bei Zimmertemperatur fest (Sauviat *et al.*, 2005). Bei 4° C sank es nach sieben Tagen auf 35 %. Die TPMT-Aktivität war bei 4° C für drei Tage stabil, bei Zimmertemperatur fiel sie nach nur 24 Stunden signifikant ab. Jüngst untersuchten Karner *et al.* (2010) die Stabilität von TGMP, TGDP und TGTP bei Zimmertemperatur und stellten einen Verlust des Hauptmetaboliten TGTP von 16 % nach nur einem Tag und 71 % nach fünf Tagen fest. TGMP hingegen stieg im gleichen Zeitraum um 68 %, niedrige TGMP-Spiegel deuten somit auf eine rasche Verarbeitung der Proben hin. In der vorliegenden Arbeit lagen die TGMP-Spiegel aller Proben unter $1,6 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$. Die Höhe von TGDP veränderte sich in der Arbeit von Karner *et al.* nicht signifikant. Die Schwankungen für TGMP und TGTP führte die Arbeitsgruppe auf Phosphorylierungs- und Transphosphorylierungsprozesse innerhalb der Erythrozyten zurück. Die Stabilität der Proben bei Kühlschrank- oder Tiefkühl-Temperatur wurde nicht untersucht. Ein mehrfaches Auftauen der Proben schien die Höhe der Metaboliten TGDP und TGTP ebenfalls zu beeinträchtigen, wobei eine Dephosphorylierung von TGTP zu TGDP ursächlich an den veränderten Metaboliten-Höhen beteiligt zu sein schien.

Wenngleich sich die Zahlen teilweise sehr unterschieden, so war doch allen Studien gemeinsam, dass ein Absinken von 6-TGN bzw. dem Metaboliten TGTP im zeitlichen Verlauf bei unsachgemäßer bzw. zu warmer Lagerung beobachtet werden konnte. Möglicherweise kamen die Studien aufgrund ihrer unterschiedlichen analytischen Verfahren zu abweichenden Ergebnissen. De Graaf und Mitarbeiter analysierten nach der Methode von Shipkova *et al.* (2003) bzw. Dervieux-Boulieu (1998). Pike und Mitar-

beiter verwendeten eine Technik nach Erdmann *et al.* (1990), Sauviat *et al.* machte hierzu keine Angaben.

Eine Auswertung von 55 Studien, in denen der Thiopurin-Metabolit 6-TGN in Patienten unter Azathioprin-, 6-Mercaptopurin- oder 6-Thioguanin-Therapie gemessen wurde, ergab, dass in 33 Arbeiten (60 %) keine Angaben zu den exakten Lagerungsbedingungen gemacht wurden. Auch der zeitliche Ablauf wurde nicht dokumentiert. In acht Studien (15 %) blieb offen, welche Analyse-Methode zur Bestimmung von 6-TGN angewandt wurde. Obwohl in den meisten Studien die Bestimmung der Metaboliten vermutlich nicht vor Ort durchgeführt wurde, fehlten Angaben über ein auswärtiges Labor sowie die Transportbedingungen.

Die beiden meist verwendeten Analyse-Verfahren sind die Methode von Lennard und Singleton (1992) und das System nach Dervieux und Boulieu (1998), wobei die Lennard-Singleton-Prozedur verbreiteter zu sein scheint und auch der therapeutische Bereich von 230–260 pmol/8 x 10⁸ RBC auf dieser Arbeitsweise basiert (Cuffari *et al.*, 2000; Dubinsky *et al.*, 2000). Einige HPLC-Verfahren ermöglichen die Messung von Mono-, Di- und Tri-Phosphaten (Keuzenkamp-Jansen *et al.*, 1995; Lavi und Holcenberg, 1985; Rabel *et al.*, 1995). Von den 55 untersuchten Arbeiten setzten 26 (47 %) das Lennard-Singleton-Konzept und 9 (16 %) die Dervieux-Boulieu-Technik ein. In 8 Studien wurden andere Vorgehensweisen angewandt (Bruunshuus und Schmiegelow, 1989; Iven, 1996; Lennard und Maddocks, 1983; Pettersson *et al.*, 2002) (Tabelle 5.1). Durch die Applikation mehrerer Praktiken und weitere Modifikationen dieser wird die Vergleichbarkeit der Messwerte erschwert. 6-TGN nach der Dervieux-Boulieu-Methode liegt etwa 2,6-fach höher als das der Lennard-Singleton-Prozedur. Einen großen Einfluss auf die Höhe von 6-TGN hat das adhibierte Nukleotid-Hydrolyse-Verfahren, welches 6-TGN zu 6-TG konvertiert. Ursprünglich wurde in der Lennard-Singleton-Technik Schwefelsäure hierzu verwendet. Dies wurde jedoch aufgrund eines besseren Hydrolyse-Ergebnisses von Shipkova *et al.* (2003) durch Perchlorsäure ersetzt und führte damit lediglich zu 1,4-fach höheren 6-TGN-Spiegeln in der Dervieux-Boulieu-Analyse. Die für den Hydrolyse-Vorgang angesetzte Zeit beeinflusste die Messergebnisse, indem bei einer zu geringen Zeit die Hydrolyse von 6-TGN zu 6-TG nicht komplett ablaufen konnte. Eine Modifikation durch Veränderung des pH im Extraktionsschritt der Lennard-Singleton-Prozedur erlaubte die simultane Bestimmung von 6-TGN, 6-MMP und Thioinosinsäure. In der Methode nach Dervieux-Boulieu können 6-TGN und 6-MMPN simultan gemessen werden, ohne dass ein Extraktionsschritt erforderlich ist. Weitere Einflüsse entstehen durch unterschiedliche Vorbereitung und Gewinnung der Proben (Messung in Vollblut *versus* gepackten Erythrozyten), Extraktionsprozeduren, chromatographische Bedingungen und die Verwendung verschiedener Matrizen (Shipkova *et al.*, 2003).

Es bleibt festzuhalten, dass Thiopurin-Metaboliten nur begrenzt stabil sind und eine rasche Weiterverarbeitung oder, falls dies nicht möglich ist, eine Lagerung bei -80° C ohne Unterbrechungen gewährleistet sein muss. Nur in einigen Studien werden die exakten Lagerungsbedingungen erwähnt, in vielen Arbeiten sind diese nicht dokumentiert. Eine Vergleichbarkeit der Arbeiten für das *Therapeutic Drug Monitoring*

der Azathioprin-Therapie ist somit erschwert.

5.4 Therapeutisches Drug Monitoring chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Therapeutisches Drug Monitoring (*Therapeutic Drug Monitoring*, TDM) bezeichnet die Überwachung von Wirkstoffkonzentrationen eines Medikamentes im Blut und wird vornehmlich für Substanzen mit geringer therapeutischer Breite eingesetzt.

TDM ist ein Verfahren, welches den Therapieerfolg eines Pharmakons kontrolliert und unterstützt. Es dient der Erfassung von Therapieversagern, so dass die Therapie bei ausbleibendem Ansprechen optimiert werden kann. Weiterhin fördert das TDM die Sicherheit einer Behandlung, indem unerwünschte Wirkungen vermieden werden können. Insbesondere für Medikamente mit schlechter Dosis-Wirkungs-Korrelation und hoher Variabilität der Bioverfügbarkeit, wie sie Azathioprin und 6-Mercaptopurin darstellen, ist ein TDM empfehlenswert. Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und nach chirurgischen Eingriffen am Intestinum absorbieren möglicherweise geringere Mengen des Wirkstoffs. Auch hier ist ein TDM zur Vermeidung einer Unterdosierung sinnvoll. Ebenso lässt ein TDM Rückschlüsse auf die Patienten-*Compliance* zu.

Als Indikation für ein Thiopurin-Monitoring (6-TGN und 6-MMP) wird von den meisten Autoren an vorderster Stelle die Überprüfung der *Compliance* angegeben (Bokemeyer *et al.*, 2007; Lichtenstein, 2004; Louis und Belaiche, 2003; Ooi *et al.*, 2007; Reuther *et al.*, 2003; Rumbo *et al.*, 2002; Stocco *et al.*, 2010; Teml *et al.*, 2007; Wright *et al.*, 2004; Wusk *et al.*, 2004). Ein wichtiges Motiv stellt für einige Studien auch eine Dosisanpassung dar (Cunliffe und Scott, 2002; Gupta *et al.*, 2001; Haines *et al.*, 2010; Louis und Belaiche, 2003; Ooi *et al.*, 2007; Rumbo *et al.*, 2002). Ebenso wird das Vermeiden einer unerwünschten Wirkung postuliert (Bruns und Stallmach, 2009; Haines *et al.*, 2010; Hanai *et al.*, 2010; Ooi *et al.*, 2007; Rumbo *et al.*, 2002). Bruns und Mitarbeiter (2009) regen an, aufgrund der schlechten Vorhersagbarkeit der *Response* bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine Metaboliten-Bestimmung durchzuführen. Weiterhin sollten die Thiopurin-Spiegel drei bis vier Monate nach Therapiebeginn bei ausbleibendem Ansprechen überprüft werden. Gilissen und Kollegen (2004) schlagen vor, sämtliche Patienten mit aktiver Erkrankung einem Monitoring zu unterziehen. Darüber hinaus werden eine bestimmte Komedikation und eine erniedrigte TPMT-Aktivität als Indikation empfohlen (Sandborn, 2004). Lichtenstein (2004) weist auf Kurzdarmsyndrom und Malabsorption als Indikatoren für ein Monitoring hin.

Konsens besteht in der Überwachung des Differentialblutbildes und der Leberenzyme nach Initiation der Thiopurin-Therapie zur frühzeitigen Identifikation einer Myelosuppression oder Hepatotoxizität, zunächst in wöchentlichen Abständen für zwei bis acht Wochen und danach alle zwei bis vier Wochen (Dignass *et al.*, 2004; Hoffmann

et al., 2008a; Travis *et al.*, 2006b). Nach drei Monaten erscheint eine Messung alle zwölf Wochen ausreichend. Die Inzidenz der Myelosuppression liegt in den ersten acht Wochen nach Therapiebeginn am höchsten (Gisbert und Gomollón, 2008; Lewis *et al.*, 2009).

Aufgrund von Unterschieden im Purin-Metabolismus monieren Duley und Florin (2005) die Messung der Thiopurin-Metaboliten in Erythrozyten anstelle von Leukozyten, welche zusammen mit dem Knochenmark als Zielgewebe für Azathioprin fungieren. Einen Grund hierfür stellt das Enzym IMPDH dar, welches als limitierender Faktor bei der Bildung von 6-TGN angesehen wird (Jackson *et al.*, 1975) und in Erythrozyten in geringerer Aktivität vorliegt als in peripheren mononukleären Zellen ($85 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ Protein h}^{-1}$ versus $13\ 100 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ Protein h}^{-1}$) (Haglund *et al.*, 2008; Montero *et al.*, 1995). Diese Messungen erfolgten allerdings in gesunden Probanden. Haglund *et al.* analysierten das Enzym genauer und stellten fest, dass die Enzymhöhe nicht mit der gebildeten 6-TGN-Höhe assoziiert ist (Haglund *et al.*, 2008). Dies könnte zum einen bedeuten, dass die IMPDH trotz einer geringen Aktivität in ausreichender Höhe vorhanden ist und keinerlei limitierenden Charakter auf die 6-TGN-Produktion ausübt. Zum anderen verglichen Haglund und Mitarbeiter die monozytäre IMPDH-Aktivität mit erythrozytären 6-TGN-Spiegeln, so dass die fehlende Korrelation durch einen methodischen Fehler bedingt sein könnte (Haglund *et al.*, 2008). Wünschenswert wäre eine Untersuchung von Enzym-Aktivität und Metaboliten-Höhe im gleichen Kompartiment, vorzugsweise im Zielgewebe. Montero und Kollegen (1995) untersuchten die Enzymhöhe zudem nur in gesunden Probanden, wohingegen Haglund *et al.* die Bestimmung auch in CED-Patienten unter mindestens 3,5-monatiger Azathioprin- oder 6-Mercaptopurin-Therapie vornahm, wo sich eine im Vergleich zu den gesunden Probanden erhöhte IMPDH-Aktivität in Erythrozyten zeigte ($14\ 000 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ Protein h}^{-1}$). Jedoch fehlt bislang ein Vergleich der IMPDH-Enzymaktivitäten in Erythrozyten und Monozyten unter bestehender Azathioprin-/6-Mercaptopurin-Medikation.

Eine Studie analysierte die Aktivität der Nukleosid-Diphosphat-Kinase (NDPK) in Erythrozyten von 37 Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und kam zu dem Ergebnis, dass interindividuelle Unterschiede in der NDPK-Höhe bestehen, aber die Aktivität des Enzyms nicht mit der Höhe der Thiopurin-Metaboliten der Erythrozyten korreliert (Karner *et al.*, 2010).

Ebenso wie die IMPDH scheint also auch die NDPK die Entstehung von 6-TGN, genauer TGTP, nicht zu limitieren.

Wie Duley und Florin (2005) in ihrer Arbeit vermuten und auch Schwab *et al.* (unveröffentlichte Daten; 2005) konstatieren, sind deoxygenierte Thioguanin-Nukleotide wie dTGTP in Erythrozyten von Patienten mit Morbus Crohn unter Azathioprin-Therapie nicht detektierbar. Eine Theorie besteht darin, dass Azathioprin-Metaboliten als 6-Thioguanin in hepatischen und/oder nicht-hepatischen Geweben vorgeformt (Kurowski und Iven, 1991) und konsekutiv von zirkulierenden Erythrozyten absorbiert und intrazellulär in 6-TGN konvertiert werden (Duley und Florin, 2005). So

konnte beispielsweise im Zytosol humaner Leberzellen nach Inkubation mit 6-Mercaptopurin eine dosisabhängige Akkumulation von 6-TG festgestellt werden (Rowland *et al.*, 1999). Eine fehlende Ribonukleosid-Diphosphat-Reduktase im Erythrozyten-Metabolismus würde die nicht detektierbaren deoxygenierten Thioguanin-Nukleotide bei vorhandenen 6-TGN erklären, jedoch existieren hierzu bislang keine Untersuchungen.

Mehrere Arbeiten befassen sich mit dem Vergleich der Thiopurin-Metaboliten-Messung in Erythrozyten und Leukozyten. Eine Korrelation von erythrozytären mit leukozytären 6-TGN-Spiegeln konnte belegt werden (Cuffari *et al.*, 2004a; Hedeland *et al.*, 2010). Jedoch wurden sowohl für Patienten mit ALL als auch mit CED in Leukozyten höhere Spiegel als in Erythrozyten detektiert (Lancaster *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2005). Interessanterweise konnten methylierte Metaboliten wie 6-MMP in Leukozyten nicht nachgewiesen werden (Bergan *et al.*, 1997a). Bergan *et al.* bestimmten 6-TGN in Erythrozyten, neutrophilen Granulozyten, CD4⁺-Lymphozyten und Retikulozyten und stellten fest, dass die 6-TGN-Spiegel in Neutrophilen 31-fach über den Spiegeln in Erythrozyten lagen (Bergan *et al.*, 1997a). In Retikulozyten wurden niedrigere Spiegel als in Erythrozyten quantifiziert und in CD4⁺-Lymphozyten waren 6-TGN und 6-MMP nicht detektierbar. Bergan und Mitarbeiter schlagen als Konsequenz die fortbestehende Verwendung von Erythrozyten als Surrogatmessort für das Zielgewebe von Azathioprin vor.

Der Einsatz von peripheren Leukozyten als Messort hätte den Vorteil, dass direkt Nukleotide und nicht Basen oder Nukleoside gemessen würden, wie dies bisher der Fall ist. Andererseits erschwert eine zeit- und arbeitsintensive Purifikation der Leukozyten die Metaboliten-Bestimmung. Leukozyten sind fragil und zerfallen schnell. Ein größeres Blutvolumen wäre somit notwendig. Erythrozyten hingegen haben den Nachteil, dass sie durch Leukozyten kontaminiert sein können, welche dann das Messergebnis verfälschen (Duley und Florin, 2005).

Daraus geht hervor, dass beide Messorte ihre Vor- und Nachteile besitzen und somit aktuell keine Methode existiert, die zeitnah ein kostengünstiges, einfaches, schnell verfügbares und reproduzierbares Monitoring ermöglicht.

5.4.1 Monitoring mittels 6-TGN – wertvolle Hilfe oder entbehrlich?

Der Metabolit 6-TGN benötigt etwa zwei bis drei Wochen, bis ein *steady state* im Erythrozyten gemessen werden kann (Sandborn *et al.*, 1999). Durch intravenöse Gabe von Azathioprin konnte dieser Zustand nicht antizipiert werden. Auch eine vorübergehende Dosissteigerung von einigen Tagen wirkt sich nicht auf die Höhe der 6-TGN-Spiegel aus (Bergan *et al.*, 1997b). Dennoch beträgt die Zeit bis zum tatsächlichen Wirkungseintritt in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen mindestens drei Monate. 6-TGN als Surrogatparameter in Erythrozyten liefert zu diesem frühen Zeitpunkt keinerlei Hinweis auf ein Ansprechen des Patienten auf die Azathioprin-Therapie. Fraglich ist daher, ob das bestehende Modell, das den Wirkmechanismus

der Zytotoxizität von Azathioprin über einen Einbau von 6-TGN in DNA und RNA erklärt, mit dem späten Wirkbeginn in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen vereinbar ist. Die Tatsache, dass Thiopurine auch in weiteren Erkrankungen und Situationen angewendet werden, in denen ein drei- bis sechsmonatiger Wirkungseintritt nicht denkbar wäre (Therapie der akuten lymphatischen Leukämie und Immunsuppression nach Organtransplantation), lässt den Rückschluss zu, dass eine Wirkung auf mehreren Ebenen stattfindet und somit mehr als ein Modell zur Erklärung des Wirkmechanismus existieren könnte.

Hohe 6-TGN-Spiegel sind zwar in zahlreichen Studien mit einem Ansprechen auf die Thiopurin-Therapie assoziiert, jedoch besteht eine ausgedehnte Überlappung von Effizienz und Toxizität der gemessenen 6-TGN-Spiegel (Bruns und Stallmach, 2009). Die Sensitivität und Spezifität liegen mit 62 % und 72 % nicht hoch (Waljee *et al.*, 2010).

Ein Monitoring der Thiopurin-Therapie mittels 6-TGN scheint weder zu Therapiebeginn geeignet, um ein Ansprechen zu prognostizieren, noch kann 6-TGN zuverlässig und fehlerfrei zwischen Patienten mit und ohne Ansprechen differenzieren. Eine nicht unerhebliche (körperliche, psychische, aber auch ökonomische) Belastung stellt die Tatsache dar, dass frühestens drei Monate nach Therapiebeginn beurteilt werden kann, ob ein Ansprechen erfolgt und die Therapie fortgeführt werden kann oder umgestellt werden muss. Ein Monitoring, welches ein Ansprechen bereits kurz nach Therapiebeginn prognostizieren könnte, würde einen deutlichen Fortschritt in der Gestaltung der Therapieregime darstellen.

5.4.2 TPMT – Reziproke Assoziation mit Ansprechen und Korrelation mit 6-MMP

Im rekrutierten Patientenkollektiv konnte die in zahlreichen Studien (Cuffari *et al.*, 2004a; Hanai *et al.*, 2010; Lennard *et al.*, 1990; Lennard *et al.*, 1997; Lichtenstein, 2004) beschriebene inverse Korrelation zwischen der TPMT-Aktivität und 6-TGN-Spiegeln nicht reproduziert werden. Im Morbus Crohn-Patientenkollektiv wurde zwar ein Zusammenhang von TPMT mit 6-TGN und TGTP berechnet, jedoch war dieser nur schwach ausgeprägt ($r_s = 0,20$ und $r_s = 0,26$; $p = 0,05$ und $p = 0,011$) und nicht invers.

Auffällig war jedoch eine inverse Korrelation der TPMT-Aktivität mit dem Ansprechen in einigen Untergruppen (Kapitel 4.4.2, 4.5.2 und 4.6.1). Auch diese Erkenntnis wurde in mehreren Studien herausgestellt (Azhary *et al.*, 2009; Chocair *et al.*, 1992; Cuffari *et al.*, 2004b; Dervieux *et al.*, 2000; Hindorf *et al.*, 2010; Kwan *et al.*, 2008; Lennard *et al.*, 1990; Lennard und Lilleyman, 1996; Lennard, 1998; McLeod *et al.*, 1995). In einigen Arbeiten wurde eine hohe TPMT-Aktivität mit niedrigen 6-TGN-Spiegeln assoziiert. Allerdings konnte diese Beobachtung im vorliegenden Patientengut nicht bestätigt werden. Im untersuchten Patientenkollektiv befanden sich ausschließlich Patienten mit normaler bis hoher TPMT-Aktivität und sieben Patienten (5 %) mit

sehr hoher Aktivität. Viele Patienten litten unter einem schweren und komplikationsreichen Krankheitsverlauf mit Stenosierung, Fistulierung oder Steroidabhängigkeit. Vierzehn Patienten (11 %) erhielten eine Anti-TNF α -Therapie. Intermediäre, niedrige oder fehlende TPMT-Aktivität wurden bei keinem Patienten detektiert.

Die Höhe der TPMT-Aktivität kann einen Anhaltspunkt darstellen, um ein Ansprechen auf die Azathioprin-Therapie vorherzusagen. Patienten mit hoher TPMT-Aktivität gehören eher einer Risikogruppe (fistulierender oder steroidabhängiger Krankheitsverlauf, hohe Dosierungen) an. Patienten mit intermediärer oder niedrig-normaler Aktivität scheinen besser anzusprechen. Neben einer Metaboliten-Bestimmung könnte also auch eine TPMT-Enzymmessung einen Anhaltspunkt für das Ansprechen eines Patienten auf eine Thiopurin-Therapie liefern.

Im Morbus Crohn-Patientenkollektiv konnte eine schwache Korrelation der TPMT-Aktivität mit der Azathioprin-Dosierung ermittelt werden ($p = 0,24$). Auch dieses Resultat konnte in einer weiteren Studie bestätigt werden (Daperno *et al.*, 2009).

Die TPMT stellt eines der wichtigsten Enzyme des Thiopurin-Metabolismus dar und wirkt an zahlreichen Stellen über eine *S*-Methylierung der Metaboliten. In einer Untersuchung an 14 500 spanischen Patienten zeigte sich eine leichte TPMT-Erhöhung durch eine Therapie mit Azathioprin, die jedoch klinisch vermutlich nicht relevant sein dürfte (Gisbert *et al.*, 2007). Eine Erhöhung der TPMT-Aktivität führte in der vorliegenden Arbeit in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten (Coulthard *et al.*, 2002) auch zur Erhöhung des Metaboliten 6-MMP. Dieser korrelierte allerdings in dieser und auch in den oben genannten Studien nicht mit einem schlechten Ansprechen. Dies könnte darin begründet sein, dass 6-MMP nicht der einzige durch die TPMT gebildete Metabolit ist. Neben 6-MMP werden durch die TPMT noch zahlreiche weitere methylierte Metaboliten gebildet, welche allerdings in dieser Arbeit nur zum Teil gemessen wurden: meTGMP, meTGDP und meTGTP (gemessen als MTGN), meTIMP (und daraus meTIDP und meTITP), 6-MMPR und meTITP über einen alternativen Weg (Abbildung 5.1). Der Metabolit meTIMP wird über eine PPAT-vermittelte Inhibition für die Hemmung der *De novo*-Purin-Nukleotid-Synthese verantwortlich gemacht.

Wusk und Kollegen (2004) beschreiben in Untersuchungen an 182 Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen einen Anstieg des Metaboliten MMPN mit zunehmender Therapiedauer. Allerdings wurden für diese Studie auch Patienten mit gerade initiiertem Thiopurin-Therapie rekrutiert. Zu Beginn der Therapie waren die MMPN-Spiegel partiell nicht detektierbar oder sehr niedrig. In der hier vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Patienten mit mindestens sechsmonatiger Azathioprin-Therapie inkludiert, daher kann diese Beobachtung hier nicht nachvollzogen werden.

Eine präferentielle Bildung methylierter Metaboliten wurde in einer Arbeit an 9187 CED-Patienten bei sechs Prozent der Patienten festgestellt. Gewertet wurden Patienten mit TG-Spiegeln > 230 und MMP-Spiegeln > 5700 pmol/ 8×10^8 RBC (Bloomfeld und Onken, 2003). In der vorliegenden Studie wiesen lediglich fünf Patienten (4 %) 6-MMP-Spiegel in dieser Höhe auf.

Es ist festzuhalten, dass für das Enzym TPMT zahlreiche Möglichkeiten bestehen, einen Einfluss auf die Metaboliten-Spiegel auszuüben. Ob hier ein einzelner Metabolit eine höhere Gewichtung hat oder die Summe der entstandenen methylierten Metaboliten ausschlaggebend ist, sollte in weiteren Studien geklärt werden.

5.4.3 Monitoring und Erfassung der Krankheitsaktivität

In der vorliegenden Arbeit wurden die Patienten in Zusammenschau aller Befunde wie Ergebnisse endoskopischer und bildgebender Untersuchungen, CDAI, CAI, IBDQ, dem Vorliegen eines steroidabhängigen oder steroidrefraktären Verlaufs, dem Vorliegen eines fistulierenden oder stenosierenden Verlaufs, Therapie mit Anti-TNF α und den Ergebnissen aus Fragebogen oder persönlichem Interview den Gruppen „Remission“ und „keine Remission“ zugeordnet.

Tabelle 5.2 listet diejenigen Studien an Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen auf, die ein Monitoring von 6-TGN mit einem Ansprechen auf die Thiopurin-Therapie korrelierten. Die Erfassung des Ansprechens erfolgte dabei je nach Erkrankung des Patientenkollektivs mit verschiedenen Hilfsmitteln. Von den 13 analysierten Arbeiten wandten fünf den Harvey-Bradshaw-Index an. Lowry *et al.* (2001) beispielsweise verwendeten zur Messung lediglich den IBDQ, Cuffari und Mitarbeiter (1996; 2001) nutzten den Harvey-Bradshaw-Index. Der CDAI oder PCDAI kam in sechs Untersuchungen zum Einsatz.

Somit wurde die Krankheitsaktivität mit sehr heterogenen Mitteln erfasst, was zusätzlich zur verwendeten Metaboliten-Methode und Verarbeitungszeit die Vergleichbarkeit der Studien erschwert. Eine alleinige Korrelation des Monitorings mit einem Lebensqualitätserfassungsbogen erscheint nicht optimal, ideal dagegen wäre eine Erhebung des CDAI in allen Studien an Morbus Crohn-Patienten.

5.4.4 Non-Compliance

In der vorliegenden Studie wurden 41 Proben (14,3 %) aufgrund nicht bestimmbarer TGDP- und TGTP-Spiegel in Verbindung mit nicht messbaren 6-MMP-Werten ausgeschlossen. Nicht detektierbare Metaboliten-Spiegel stellen einen Hinweis auf *Non-Compliance* dar. *Non-Compliance* oder auch Nicht-Adhärenz bezeichnet hier die mangelhafte Befolgung eines Medikamentenplans durch den Patienten. Diese lässt sich weiter aufteilen in Nicht-Akzeptanz (beispielsweise wird ein Rezept nicht eingelöst) und Nicht-Persistenz (Therapie wird durch den Patienten eigenmächtig abgebrochen).

Einige Studien berichten über mangelnde Therapietreue bei nicht quantifizierbaren Metaboliten-Spiegeln in ähnlicher Höhe (Goldenberg *et al.*, 2004; Wright *et al.*, 2004). Gearry und Barclay (2005) unterscheiden die *Non-Compliance*, definiert durch niedrige oder nicht messbare 6-TGN- und 6-MMP-Werte von einer Unterdosierung, welche

Tabelle 5.2: Erfassung der Krankheitsaktivität

Von den 13 untersuchten Studien wurde in sechs der CDAI/PCDAI und in fünf der Harvey-Bradshaw-Index verwendet. In einer Studie wurde der IBDQ eingesetzt. Abkürzungen: HBI = Harvey-Bradshaw-Index, CDAI = Crohn's Disease Activity Index, SLEDAI = Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index, UCDAI = Ulcerative Colitis Disease Activity Index, PCDAI = Pediatric Crohn's Disease Activity Index, IBDQ = Inflammatory Bowel Disease Questionnaire.

Erstautor	Jahr	Messung des Ansprechens	Erkrankung	Patientenanzahl	Studienpopulation
Belaiche <i>et al.</i>	2001	CDAI	MC	28	Erwachsene
Cuffari <i>et al.</i>	1996	HBI	MC	25	Erwachsene
Cuffari <i>et al.</i>	2001	HBI	CED	82	Erwachsene
Dubinsky <i>et al.</i>	2000	modifizierter HBI oder Truelove und Witts-Kriterien	CED	92	Kinder
Goldenberg <i>et al.</i>	2004	HBI, Powell-Tuck-Activity-Index	CED	74	keine Angabe
Herrlinger <i>et al.</i>	2004	CDAI	MC	26	Erwachsene
Lowry <i>et al.</i>	2001	IBDQ	CED	170	Erwachsene
Ooi <i>et al.</i>	2007	PCDAI	CED	56	Kinder
Reuther <i>et al.</i>	2003	HBI	MC	71	keine Angabe
Roblin <i>et al.</i>	2005	CDAI, UCDAI, Lichtiger Score	MC/CU	70/36	Erwachsene
Schedel <i>et al.</i>	2006	CDAI, SLEDAI	MC, CU, SLE, PSS, RA u. a.	58	keine Angabe
Wright <i>et al.</i>	2004	CDAI/Walmsley simple index	CED	159	Erwachsene
Wusk <i>et al.</i>	2004	keine Angabe	MC/CU/AIH	119/63/18	Erwachsene und Kinder

bei niedrigen 6-TGN und 6-MMP-Werten vorliegt. Bloomfeld und Onken (2003) analysierten die Adhärenz an 9187 Individuen mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. 263 Patienten (3 %) wurden als *non-compliant* und 4260 Patienten (46 %) als unterdosiert klassifiziert. In dieser Arbeit galten nur undetektierbare Metaboliten-Messungen von 6-TGN und 6-MMP als fehlende Therapietreue. Subtherapeutische Spiegel, wie sie möglicherweise bei Patienten mit intermittierender *Non-Compliance* auftreten könnten, wurden als Unterdosierung gewertet. Da eine *Non-Compliance-Quote* von 3 % sehr niedrig und eine Unterdosierungs-Quote von 46 % recht hoch erscheint, erfolgte in dieser Studie möglicherweise eine fehlerhafte Einstufung der Probanden. Bokemeyer und Kollegen (2007) erforschten die Unterschiede in der Messung der Nicht-Adhärenz mittels eines Fragebogens und der Thiopurin-Metaboliten-Messung und errechneten eine Konkordanzrate von 75 %. In dieser Untersuchung lag die Nicht-Adhärenz-Quote nach der Metaboliten-Messung bei 9 %. Maßgebliche Faktoren vermuten Arbeitsgruppen in der aktuellen Krankheitsaktivität, dem Wissen über die Erkrankung, Bildungsstand, Kultur und sozioökonomischem Status (Bernick und Kane, 2010; Lilleyman und Lennard, 1996). Ein großes Problem stellt die mangelhafte Befolgung des Therapieplans bei Kindern und jugendlichen Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und ALL dar. Hommel und Mitarbeiter (2009) ermittelten beispielsweise für nur 14 % der Jugendlichen mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen therapeutische 6-TGN-Spiegel, da von den übrigen Studienteilnehmern etwa 40–50 % der Dosen ausgelassen wurden. Lancaster *et al.* (1997) dokumentierten in einer Studie über Kinder mit ALL immerhin eine fehlende Therapietreue bei 2 %, Lilleyman und Lennard (1996) vermuten, ebenfalls bei ALL-Kindern, eine Quote von 10–30 %. Ooi *et al.* (2007) monierten in ihrer Studie an Kindern mit CED eine Nicht-Adhärenz-Quote von 16 %. Rumbo *et al.* (2004) beklagten an pädiatrischen Patienten mit Posttransplantationshepatitis und rezidivierender Autoimmunhepatitis bei 29 % eine fehlende Bereitschaft zur Befolgung der Therapie. Nevins und Thomas (2009) beanstandeten in einer über vier Jahre durchgeführten Studie an nierentransplantierten Patienten gravierende Mängel in der Regelmäßigkeit der Azathioprin-Einnahme. Mit Hilfe einer elektronischen Vorrichtung in der Verpackung des Medikaments wurde dabei erfasst, ob der Patient die Tabletten regelmäßig einnahm. Zwischen der *Compliance* und dem *Outcome* nach der Transplantation bestand eine direkte Assoziation: Patienten mit unregelmäßiger Medikamenteneinnahme hatten mit akuten und chronischen Abstoßungsreaktionen, Verlust des Transplantats und Tod zu rechnen.

Somit entspricht die in dieser Studie gemessene *Non-Compliance-Quote* von 14,3 % in etwa den Werten, die auch in anderen Studien berechnet wurden. Generell scheint je nach Studienpopulation etwa $\frac{1}{10}$ der Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Unregelmäßigkeiten in der Medikamenteneinnahme aufzuweisen, daher ist der Nutzen des Monitorings der Thiopurin-Metaboliten zur Beurteilung der Patienten-*Compliance* unbestritten (Bokemeyer *et al.*, 2007; Coulthard und Hogarth, 2005; Lichtenstein, 2004; Louis und Belaiche, 2003; Ooi *et al.*, 2007; Reuther *et al.*, 2003; Rumbo *et al.*, 2002; Schwab *et al.*, 2003; Teml *et al.*, 2007; Wright *et al.*, 2004;

Wusk *et al.*, 2004).

5.5 Inter- und Intra-Patienten-Variabilitäten: Mögliche Einflussgrößen

In dieser Arbeit konnte anhand mehrfacher Messungen bei einzelnen Probanden im Rahmen einer Panelstudie dargelegt werden, dass sich die Höhe der Azathioprin-Metaboliten 6-TGN, TGDP und TGTP individuell unterscheidet. Diese Erkenntnis konnte sowohl für Morbus Crohn als auch für Colitis ulcerosa gewonnen werden. Differenziert werden muss zwischen interindividuellen und intraindividuellen Variabilitäten. Erstere konnten in beiden Patientenkollektiven und für alle drei Metaboliten dargestellt werden. Letztere konnten in beiden Stichproben vornehmlich für den Metaboliten TGDP belegt werden. Hier konnten für Morbus Crohn bis zu 4-fache und für Colitis ulcerosa bis zu 8-fache Abweichungen präsentiert werden (TGTP: für Morbus Crohn 2-fache und für Colitis ulcerosa 4-fache Variation). Die maximale Standardabweichung für TGTP bezifferte sich auf $123 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ für Morbus Crohn und auf $103 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ für Colitis ulcerosa.

In verschiedenen Arbeiten wurde eine Inter- (Bruns und Stallmach, 2009; Chan *et al.*, 1990; Chrzanowska *et al.*, 1999; Derijks *et al.*, 2004; Lennard *et al.*, 1990; Lilleyman und Lennard, 1994; Nguyen *et al.*, 2010b; Palle *et al.*, 2009) und Intra- (Bergan *et al.*, 1994; Gearry und Barclay, 2005) Patienten-Variabilität für 6-TGN beschrieben. Auch für 6-Thioguanin ist eine Inter-Patienten-Variabilität bekannt (Lancaster *et al.*, 2001). Wright und Kollegen (2004) berichten in ihrer Studie an 159 Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, bei denen 6-TGN über 2 Jahre zwischen 3 und 14 Mal detektiert wurde, über eine 1- bis 5-fache Variation der 6-TGN-Werte innerhalb eines Probanden. Chan *et al.* (1990) dokumentieren beträchtliche Unterschiede für 6-TGN zwischen den Probanden ihrer Studie. Intraindividuelle Variationen bis 29,8 % wurden ebenfalls beobachtet. Eine Inter-Patienten-Variabilität wurde für TGDP und TGTP konstatiert (De Boer *et al.*, 2007a; Karner *et al.*, 2010). De Boer und Mitarbeiter bestimmten die TGDP- und TGTP-Spiegel von 7 Morbus Crohn-Patienten unter 6-Thioguanin-Therapie und stellten ebenso wie für 6-TGN eine hohe interindividuelle Variabilität fest. Die Standardabweichungen für TGDP und TGTP wurden mit 118 bzw. $464 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ berechnet und lagen damit wesentlich höher als die gemessenen Standardabweichungen der vorliegenden Arbeit. Eine Intra-Patienten-Variabilität wurde für diese beiden Metaboliten bislang noch nicht spezifiziert. Für die TPMT-Aktivität konnten McLeod und Mitarbeiter (1995) demonstrieren, dass die Interpatientenvariabilität 58-fach schwankt, die Intra-Patienten-Variabilität innerhalb eines Jahres jedoch nur 13,5 % beträgt.

Aufgrund der gemessenen vorherrschenden interindividuellen Variabilitäten vor den intraindividuellen Unterschieden kann bei Betrachtung lediglich der punktuellen Daten dieser Arbeit aufgezeigt werden, dass oftmals die Differenzen zwischen einem

Individuum in Remission und im akuten Schub geringer erscheinen, als zwischen zwei Patienten, die sich beide in Remission befinden. Interessanterweise konnten jedoch Gupta *et al.* (2001) anhand serieller 6-TG-Messungen herausstellen, dass eine Assoziation dieses Metaboliten mit einer Remission des Patienten besteht.

Einen möglichen Faktor, welcher die Azathioprin-Metaboliten-Spiegel beeinflussen könnte, stellt die Absorption des Pharmakons im Intestinaltrakt dar. Bei gesunden Individuen wird diese zwischen 16 und 50 % gemessen (Nielsen *et al.*, 2001). Eine schwankende Bioverfügbarkeit zwischen 27 und 83 % wurde bereits thematisiert (Van Os *et al.*, 1996). Zudem könnte bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen die Höhe der Spiegel zusätzlich durch die aktuelle Krankheitsaktivität beeinträchtigt werden. Ebenso könnte der Einfluss unterschiedlicher Enzym-Aktivitäten von Bedeutung sein. Auch ein Zustand nach operativen Eingriffen am Intestinaltrakt könnte einen Einfluss ausüben. So konnte in dieser Arbeit eine Probandin mit Ileostoma-Anlage und bei vorhandener *Compliance* kaum messbaren Spiegeln von TGTP, TGDP und 6-TGN trotz hoher 6-MMP-Spiegel identifiziert werden (TGTP: 6 pmol/8 x 10⁸ RBC; TGDP: 4 pmol/8 x 10⁸ RBC; 6-TGN: 15 pmol/8 x 10⁸ RBC; 6-MMP: 90 pmol/8 x 10⁸ RBC). Zwei weitere Patienten mit Ileostoma konnten allerdings adäquate Metaboliten-Spiegel erzielen. Obwohl hierüber keine Studien existieren, empfiehlt Lichtenstein (2004) die Thiopurin-Metaboliten-Messung bei Patienten mit Kurzdarmsyndrom und bei Malabsorption zur besseren Therapieüberwachung.

Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass die intraindividuellen Unterschiede der Thiopurin-Metaboliten eine geringere Rolle zu spielen scheinen als die hier vorwiegend detektierten interindividuellen Differenzen. Aktuell ist die genaue Bedeutung für ein Monitoring unklar, jedoch deutet sich an, dass ein serielles 6-TGN-Monitoring mit einem Ansprechen korreliert werden kann und anhand punktueller Messungen eine gute Assoziation von TGTP-Spiegeln und Ansprechen besteht.

5.6 Azathioprin und Dosierung – Der Metabolit TGTP korreliert mit der Azathioprin-Dosierung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum ersten Mal beschrieben werden, dass der Azathioprin-Metabolit TGTP, welcher über die GTPase Rac1 und Inhibition der CD28-Kostimulation zur Apoptose von T-Lymphozyten führt, direkt und hochsignifikant mit der Azathioprin-Dosierung assoziiert war. Diese Korrelation war für das Morbus Crohn-Patientenkollektiv höher als für die Colitis ulcerosa-Probanden. Neben TGTP wiesen auch TGDP, 6-TGN und MTGN einen signifikanten Zusammenhang mit der Azathioprin-Dosierung auf.

Weiterhin konnte aufgezeigt werden, dass Patienten mit niedriger Azathioprin-Dosierung meist niedrige TGTP-Spiegel erzielten. Probanden mit hoher Dosierung erreichten jedoch im Umkehrschluss nicht zwangsläufig hohe TGTP-Spiegel; vielmehr waren die TGTP-Spiegel dieser Stichprobe sehr heterogen. Daher wurde diese Untergruppe

Tabelle 5.4: Korrelation der Thiopurin-Dosierung mit 6-TGN

Nachfolgend ist eine Übersicht über die aktuelle Literatur zur Korrelation der Thiopurin-Dosierung mit 6-TGN dargestellt. Es zeigte sich in den Studien eine mäßige Korrelation mit r zwischen 0,18 und 0,51 (in der hier beschriebenen Studie war $r = 0,31$ für 6-TGN und für das gesamte Patientengut).

Erstautor	Jahr	Erkrankung	Patientenanzahl	Thiopurin	Dosierung	r	p	weitere Korrelationen
Decaux <i>et al.</i>	2000	diverse	43	Azathioprin	mg/kg	0,51	< 0,01	
Dubinsky <i>et al.</i>	2002	CED	51	Azathioprin, 6-MP				6-MMPR
Goldenberg <i>et al.</i>	2004	CED	74	Azathioprin, 6-MP	mg/kg	0,22	0,08	6-MMP: $r = 0,36$; $p = 0,002$
Heneghan <i>et al.</i>	2006	AIH	86	Azathioprin	mg/kg	0,41	< 0,0001	6-MMP: $r = 0,39$; $p < 0,001$ meTIMP:
Hindorf <i>et al.</i>	2004	diverse	593	Azathioprin, 6-MP	absolut			$r = 0,45$; $p < 0,001$
Morales <i>et al.</i>	2007	CED	155	Azathioprin, 6-MP	absolut und mg/kg	absolut: 0,18; mg/kg: 0,19	absolut: 0,04; mg/kg: 0,03	

mit hoher Dosierung $> 1,8$ mg/kg KG genauer analysiert, wobei belegt werden konnte, dass sich Patienten mit höheren TGTP-Spiegeln (> 90 pmol/ 8×10^8 RBC) eher in Remission befanden als die Probanden mit niedrigen Spiegeln (< 90 pmol/ 8×10^8 RBC) trotz hoher Azathioprin-Dosierung. Es scheint also eine Patientengruppe zu existieren, die trotz adäquater Azathioprin-Dosis nicht auf die Therapie anspricht. Um weitere Merkmale dieser *Non-Responder*-Gruppe zu definieren, wurden die Metaboliten-Höhen dieses Kollektivs mit denjenigen der *Responder* verglichen. Hier konnten jedoch keine weiteren Hinweise beispielsweise für das Vorliegen eines alternativen Metabolisierungsweges gewonnen werden; TPMT-Aktivität und 6-MMP-Spiegel unterschieden sich nicht signifikant.

Die einzigen Daten zur Dosisabhängigkeit des Metaboliten TGTP stammen aus dem Jahre 1990 von Liliemark *et al.*. Diese konnten an der Maus-Leukämie-Zelllinie WEHI-3b nachweisen, dass bei steigender 6-Mercaptopurin-Dosierung zwischen 0,01 und 1 μ M die Metaboliten TGMP, TGDP, TGTP, TXMP und TIMP anstiegen. Zwischen 1 und 10 μ M blieben TGMP, TGDP und TGTP konstant und fielen ab einer Konzentration über 10 μ M wieder ab. TXMP blieb konstant und TIMP stieg weiter an. Diese Selbstlimitierung des Thiopurin-Metabolismus führten Liliemark und Mitarbeiter auf eine Depletion von ATP durch Inhibition der DNPS durch TIMP zurück.

Eine Dosisabhängigkeit von Azathioprin/6-Mercaptopurin und 6-TGN wurde in vielen Arbeiten beleuchtet. Decaux *et al.* (2000) schilderten in ihrer Studie an 43 Patienten, die an unterschiedlichen Erkrankungen litten und mindestens sechs Monate mit Azathioprin therapiert wurden, eine mäßige Korrelation zwischen Dosierung (in mg/kg/d) und 6-TGN-Spiegeln mit $r = 0,51$ und $p < 0,01$. Dubinsky und Kollegen (2002) berichteten über eine Erhöhung der 6-TGN-Spiegel nach Dosisanhebung von Azathioprin/6-Mercaptopurin bei 51 Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Darüber hinaus wurde hier auch eine Erhöhung der 6-MMP-Spiegel und eine damit assoziierte Hepatotoxizität bei 24 % der Patienten demonstriert. Die Arbeitsgruppe um Goldenberg (2004) untersuchte 74 Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten und konnte ebenfalls eine schwache Korrelation der 6-TGN-Spiegel mit der Azathioprin-/6-Mercaptopurin-Dosierung in mg/kg ($r = 0,22$, $p = 0,08$) herausstellen. Signifikant hingegen war der Zusammenhang der 6-Mercaptopurin-Dosierung mit den 6-MMP-Spiegeln ($r = 0,36$, $p = 0,002$). Lennard und Kollegen (1996) konnten an 21 Kindern mit ALL belegen, dass eine Dosissteigerung von 6-Mercaptopurin um 25 % zu erhöhten 6-TGN-Spiegeln von im Median 90 pmol/ 8×10^8 RBC führen. Auch Morales *et al.* (2007) kalkulierten eine schwache Korrelation zwischen Dosierung von Azathioprin/6-Mercaptopurin und 6-TGN-Spiegeln an 155 Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen: $r = 0,18$, $p = 0,04$ für die absolute Dosis und $r = 0,19$, $p = 0,03$ für die Dosierung in mg/kg. Ebenso konnten Stevens und Mitarbeiter (2004) eine Assoziation zwischen 6-TGN-Spiegeln und Azathioprin, nicht jedoch 6-Mercaptopurin messen ($p < 0,005$, r nicht angegeben). In einigen weiteren Studien wurde ein Zusammenhang von 6-TGN oder 6-MMP mit Azathioprin/6-MP beobachtet (Haines *et al.*, 2010; Heneghan *et al.*, 2006; Hindorf *et al.*, 2004b; Nguyen *et al.*, 2010b).

Somit konnte hier eine direkte Assoziation von TGTP (daneben auch von 6-TGN, TGDP und MTGN) mit der Azathioprin-Dosierung wiedergegeben werden. Niedrige Dosen resultierten in geringen Metaboliten-Spiegeln, hingegen hatten hohe Dosen heterogene Wirkspiegel zur Folge. Tabelle 5.4 bietet einen Überblick über die aktuelle Literatur zum Thema Korrelation der Thiopurin-Dosierung mit den Thiopurin-Metaboliten.

5.7 Hohe Azathioprin-Dosen führen nicht zu einem besseren Ansprechen

Das untersuchte Patientenkollektiv wurde basierend auf den Faktoren endoskopische, bildgebende und histopathologische Diagnostik, Ergebnisse der persönlichen Befragung bzw. des Fragebogens und der Laborergebnisse den Gruppen „Remission“ und „keine Remission“ zugeordnet. Im analysierten Kollektiv konnte nach dieser Einteilung ein inverser Zusammenhang zwischen den beiden angewandten Krankheitsaktivitätsindizes CDAI und CAI mit dem Index für gesundheitsbezogene Lebensqualität, IBDQ, errechnet werden. Weiterhin wurde deutlich, dass CDAI und CAI bei Probanden, welche auf die Azathioprin-Therapie ansprachen, erniedrigt waren, während der IBDQ bei diesen erhöht vorlag. Eine direkte Korrelation der Parameter zur Bestimmung der Krankheitsaktivität mit den Thiopurin-Metaboliten bestand nicht. In Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen untersuchte eine aktuelle Studie mittels IBDQ den Einfluss von Thiopurinen auf die gesundheitsbezogene Lebensqualität (*Health-Related Quality of Life*, HRQoL) von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Sechs und zwölf Monate nach Therapiebeginn wurde ein Anstieg der IBDQ-Punktzahl dokumentiert (Bastida *et al.*, 2010).

Somit konnte hier demonstriert werden, dass ein inverser Zusammenhang zwischen der Krankheitsaktivität und der Lebensqualität bestand.

Darüber hinaus konnte konkretisiert werden, dass Patienten mit hohen Azathioprin-Dosen nicht signifikant häufiger eine Remission erzielen. Eine Remission scheint somit nicht Dosis-abhängig, sondern in erster Linie an die Höhe des Metaboliten TGTP gebunden zu sein. Dieser war zwar schwach mit der Dosierung assoziiert, jedoch wird dessen Höhe möglicherweise durch weitere Faktoren mitbestimmt.

Eine Dosissteigerung bei Patienten mit aktiver Erkrankung kann durch Anstieg des TGTP-Spiegels in einigen Fällen den gewünschten Effekt erzielen (Rumbo *et al.*, 2002), jedoch steigt die Gefahr des Auftretens unerwünschter Wirkungen (Gardiner *et al.*, 2008; Mardini und Arnold, 2003).

Einige Metaanalysen schildern ein vermehrtes Ansprechen auf Azathioprin mit einer steigenden kumulativen Dosis (Pearson *et al.*, 1995) und eine größere Effizienz von höheren Azathioprin-Dosen (2,5 mg/kg) als niedrigeren Dosen (1,0–2,0 mg/kg). Dies konnte jedoch nur für die Remissionserhaltung und nicht für die -induktion bestätigt werden (Prefontaine *et al.*, 2009a; Prefontaine *et al.*, 2009b).

In dieser Studie konnte dargelegt werden, dass Patienten, die nicht oder noch nicht auf die Azathioprin-Therapie ansprechen, im Vergleich zu Patienten, die bereits ein Ansprechen gezeigt hatten, eine signifikant höhere Dosierung an Azathioprin erhielten. Da in diese Studie ausschließlich Patienten mit stabiler Langzeit-Therapie von Azathioprin seit mindestens sechs Monaten inkludiert wurden, kann davon ausgegangen werden, dass sich nachfolgend keine weitere wesentliche Verbesserung hinsichtlich des Ansprechens auf die Therapie ereignete. Auffällig war auch eine erhöhte TPMT-Aktivität unter den *Non-Respondern* mit hoher Dosierung. Wie in Kapitel 5.4.2 beschrieben, fiel dies auch in anderen Gruppen mit schlechtem Ansprechen auf die Therapie und in einigen Studien (Azhary *et al.*, 2009; Chocair *et al.*, 1992; Cuffari *et al.*, 2004b; Dervieux *et al.*, 2000; Hindorf *et al.*, 2010; Kwan *et al.*, 2008; Lennard *et al.*, 1990; Lennard und Lilleyman, 1996; Lennard, 1998; McLeod *et al.*, 1995) auf. Möglicherweise stellt eine TPMT-Aktivität im oberen Bereich einen Risikofaktor für ein Therapieversagen dar, so dass für diese Patientengruppe ein Wechsel der Therapie eine Option darstellt.

Zusammenfassend sind somit hohe Azathioprin-Dosen nicht mit einem verbesserten Ansprechen auf die Therapie korreliert. Dies liegt darin begründet, dass eine höhere Dosis nicht immer einen Anstieg von TGTP zu Folge hat, möglicherweise aufgrund einer Selbstlimitierung des Thiopurin-Metabolismus. Eine Remission lässt sich folglich nicht durch eine Dosis-Steigerung erzwingen. Die TGTP-Höhe ist für das Erreichen einer Remission von größerer Bedeutung als die Höhe der Dosis. Trotz schwacher Korrelation zwischen Dosierung und Metaboliten-Spiegel wirkt sich eine Dosissteigerung nicht direkt auf die Metabolitenhöhe aus. Möglicherweise sind hier weitere Faktoren (Absorption, Bioverfügbarkeit, Darmresektionen, Lokalisation der Entzündung, Enzymhöhen) von Bedeutung. Bei Nicht-Ansprechen ist eine Anpassung der Dosis möglich. Aufgrund des Risikos unerwünschter Wirkungen sollte jedoch die Durchführung eines Monitorings erwogen werden. Eine Dosissteigerung auf $> 2,5$ mg/kg KG scheint keinen weiteren Vorteil gegenüber einer niedrigeren Dosierung zu erbringen. Durch die Bestimmung der Azathioprin-Metaboliten könnten daher in Zukunft gegebenenfalls *Non-Responder* anhand ihrer niedrigen TGTP-Spiegel trotz adäquater oder hoher Dosierung erkannt und die Therapieschemata angepasst oder umgestellt werden.

5.8 Metabolismus und Wirkmechanismus von Azathioprin

Das aktuelle Verständnis des molekularen Wirkmechanismus von Azathioprin ist nach wie vor inkomplett. Azathioprin wird unter Abspaltung eines Methylnitroimidazolrestes, welcher an Glutathion bindet, unter Katalyse von Glutathion-*S*-Transferasen zu 6-Mercaptopurin konvertiert (Eklund *et al.*, 2006; Kurtovic *et al.*, 2008). Eine Glutathion-Depletion könnte im Zusammenhang mit dem Auftreten von Hepatotoxizität unter Azathioprin-Therapie stehen, da sie *in vitro* mit mitochondrialer Schädigung, ATP-Depletion und Nekrose von Hepatozyten assoziiert wurde (Lee und

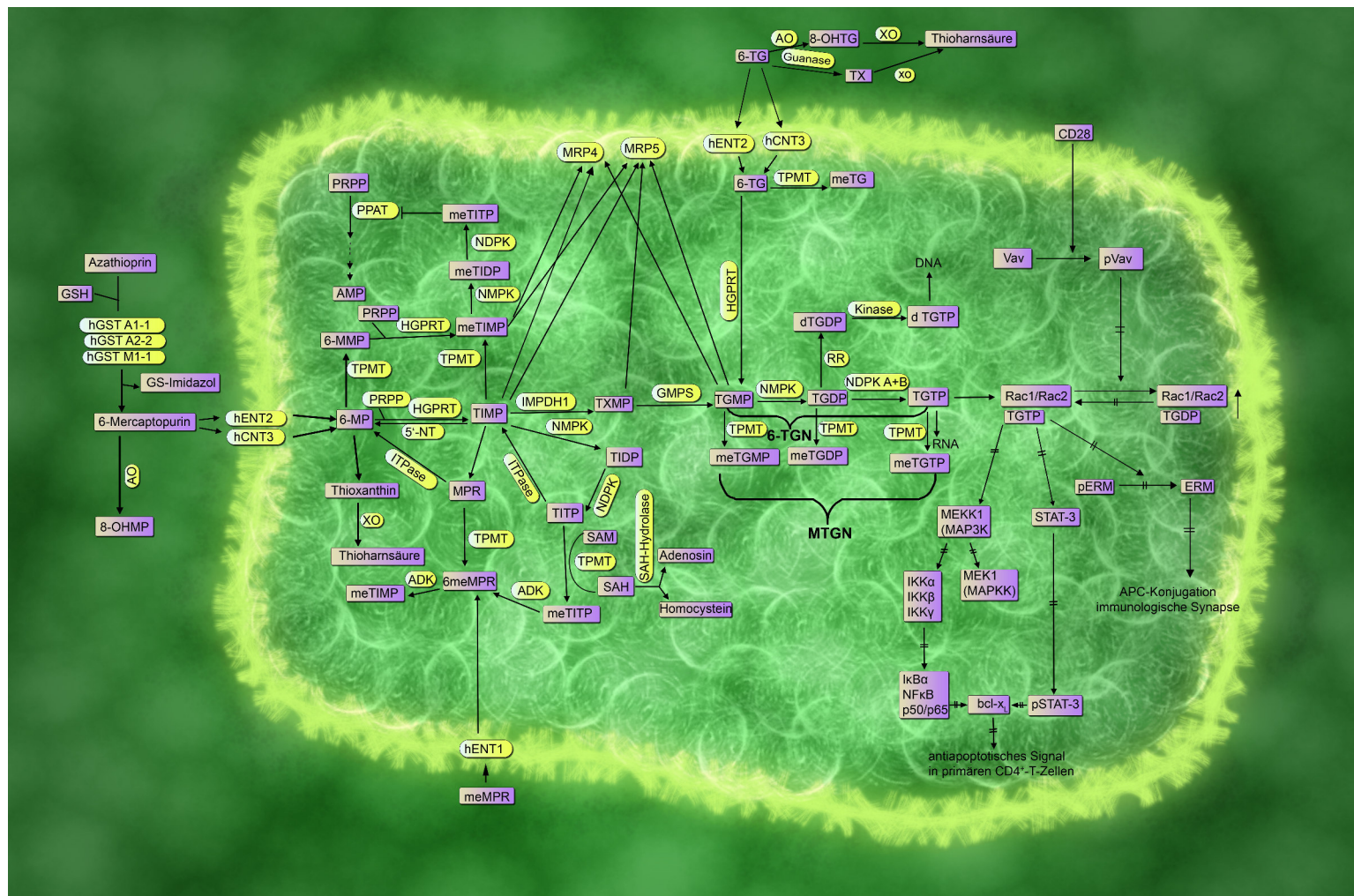


Abbildung 5.1: Metabolismus von Azathioprin

Die Verstoffwechslung von Azathioprin erfolgt über vier Enzymwege (XO, AO, TPMT und HGPRT). HGPRT katalysiert die Entstehung von TIMP und IMPDH1 und GMPS die Bildung der aktiven Metaboliten TGMP, TGDP und TGTP. Letzteres hemmt mittels eines Mechanismus über Rac1 das Auslösen eines antiapoptotischen Signals sowie die APC-Konjugation in T-Zellen.

Farrell, 2001). Patienten mit Hepatotoxizität unter Azathioprin tolerieren oft eine Therapieumstellung auf 6-Mercaptopurin, wobei bei einem kleinen Teil erneut ein Leberschaden auftritt (13 %, Bermejo *et al.*, 2010). Die Bedeutung des Methylnitroimidazolrestes ist unklar, eine potentielle immunsuppressive Wirkung ist nicht auszuschließen (Sauer *et al.*, 1988). In einem Tiermodell zeigte diese Verbindung ohne den 6-Mercaptopurin-Anteil eine immunsuppressive Wirkung bereits nach 14 Tagen und somit einen rascheren Wirkungseintritt als Azathioprin bei Mensch und Tier (Al-Safi *et al.*, 2003), jedoch bleiben Untersuchungen am Menschen abzuwarten. Auffällig ist jedoch ein besserer therapeutischer Index von Azathioprin im Vergleich zu 6-Mercaptopurin (Prefontaine *et al.*, 2009b).

Als Erklärungsmodell für den Wirkmechanismus des 6-Mercaptopurin-Anteils diene bislang unter anderem die Inkorporation der aktiven Thiopurin-Metaboliten dTGTP und TGTP in DNA und zu einem geringeren Anteil in RNA (Bökkerink *et al.*, 1993), was eine Arretierung des Zellzyklus mit Inhibition der chromosomalen Replikation, der DNA-Reparaturmechanismen sowie der Proteinbiosynthese hervorruft. Es kommt zu einer herabgesetzten Stabilität des DNA-Doppelstrangs mit DNA-Protein-Quervernetzungen, Einzelstrangbrüchen, Interstrang-Quervernetzungen, Schwesterchromatidaustausch (Abreu *et al.*, 1995; Bodell, 1991; Maybaum und Mandel, 1983; Pan und Nelson, 1990), einer verminderten Basenpaarlebenszeit und veränderten thermodynamischen Eigenschaften (Somerville *et al.*, 2003).

Daneben wird auch eine Hemmung der *De novo*-Purin-Nukleotid-Synthese über den Metaboliten meTIMP mit Inhibition der Phosphoribosyl-Pyrophosphat-Amidotransferase (PPAT) und konsekutiver Akkumulation von PRPP mit daraus resultierender Depletion insbesondere der Adenosin-Nukleotid-Speicher, aber auch der Guanosin-Nukleotid-Speicher diskutiert (Dayton *et al.*, 1992). Diese Depletion von Purinen führen zu einem entstehenden Ungleichgewicht zwischen Purinen und Pyrimidinen mit nachfolgender Proliferationsinhibition (Ben-Horin *et al.*, 2009; Bökkerink *et al.*, 1993; Quéméneur *et al.*, 2003; Stet *et al.*, 1993; Tay *et al.*, 1969). Dies wurde jedoch zum Teil mit Konzentrationen von $> 500 \mu\text{Mol}$ bewirkt, die im Menschen nicht zu erzielen sind. Interessanterweise konnte vor kurzer Zeit ein weiterer Effekt von Azathioprin nachgewiesen werden, der im Zusammenhang mit der Depletion von Purinen steht. *In vitro* zeigte Azathioprin, genauer 6-MMPR, einen antiviralen Effekt auf das Bovine virale Diarrhoe-Virus in MDBK- (*Madin-Darby bovine kidney*) Zellen ($\text{IC}_{90} 1,0 \mu\text{Mol}$) und auf die HCV-Replikation in Huh7- (*human hepatoma cell line 7*) Zellen. Hier scheinen nicht nur die Depletion der Adenosin-Nukleotid-Speicher, sondern auch die der Inosin-Nukleotid-Speicher von Bedeutung zu sein (Hoover und Striker, 2008).

Eine Erklärung für das spezifische Wirkprofil auf intestinale T-Lymphozyten von Azathioprin liefern diese Modelle nicht. Viele Fragen bleiben offen, beispielsweise weshalb ein spezifisches Nebenwirkungsprofil mit Leukopenie, Hepatotoxizität oder Pankreatitis besteht oder warum Azathioprin in Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen einen verzögerten Wirkungseintritt von bis zu sechs Monaten aufweist.

In der Arbeit von Tiede *et al.* (2003) konnte demonstriert werden, dass dem Metaboliten 6-Thioguanosin-5'-Triphosphat (TGTP) eine entscheidende Bedeutung für den immunsuppressiven Effekt von Azathioprin zukommt. Dieser bindet anstelle von GTP an die kleine GTPase *ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* (Rac1) der Rho-Familie, nicht jedoch an *rat sarcoma* (Ras), was eine Inhibition der CD28-Kostimulation bewirkt. Über Vav und Rac1 kommt es durch Inhibition der Zielgene *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3), *mitogen-activated kinase kinase kinase* (MEKK1) und *nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B) zum Ausbleiben des antiapoptotischen Signals von *B-cell lymphoma extra long* (bcl-xL) und damit zur Apoptose, Anergie oder zum aktivierungs-induzierten Zelltod (*activation induced cell death*, AICD) in pathogenen CD45RO-Gedächtnis-T-Zellen. Somit erfolgt durch den Azathioprin-Metaboliten TGTP durch Umwandlung eines kostimulatorischen in ein apoptotisches Signal eine Kontrolle der *Lamina propria*-T-Zell-Aktivierung.

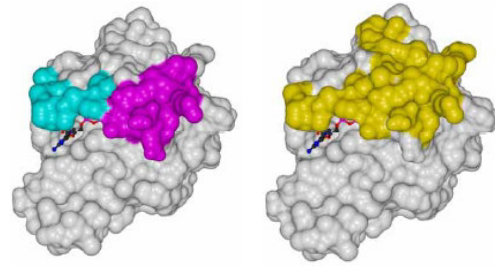


Abbildung 5.2: Darstellung von TGTP

Dreidimensionales Modell von TGTP mit farblicher Hervorhebung der Andockstellen von Rac1 (blau und magenta) und Vav1 (gelb). Quelle: R. Dvorsky, unveröffentlichte Daten.

In diesen Untersuchungen zeigte sich weiterhin, dass TGTP spezifisch an Rac1 und Rac2 bindet und diese inhibiert (Abbildung 5.2). TGTP ist in der Lage, an weitere kleine GTPasen zu binden (Ran, Rab, RhoA, Cdc42 und Rac3) ohne diese zu hemmen (Poppe *et al.*, 2006). Die *In vitro*-Bindung an Rac1 erfolgte dabei mit niedrigerer Affinität als durch GTP (Tiede *et al.*, 2003). Durch die Bindung von TGTP an Rac1 kommt es zur Akkumulation von inaktivem TGDP-gebundenem Rac1, welches zu einer Hemmung von Vav und dadurch zu einer Inhibition der Ezrin-Radixin-Moesin-Dephosphorylierung in T-Lymphozyten führt, was wiederum eine Hemmung der T-Zell-APC-Konjugation bewirkt (Poppe *et al.*, 2006). Weiterhin wird die Bildung von Lamellipodien in primären CD4⁺-Zellen blockiert und über Rac2 die T_H1-Zytokinproduktion in T-Zellen induziert (Poppe *et al.*, 2006).

Die kleine GTPase Rac1, ein Molekül von 21 kDa, zählt neben Rac2, Rac3, RhoA, RhoB, RhoC und Cdc42 zur Rho-Familie, die aus 22 Mitgliedern besteht und der Ras-Superfamilie angehört (Disanza *et al.*, 2005; Hall, 2005). Die Ras-Familie setzt sich aus etwa 150 Mitgliedern zusammen, denen beispielsweise Ras und Rap1A zugeordnet sind (Cantrell, 2003). Rac1, RhoA und Cdc42 sind die am besten studierten Mitglieder der Rho-Familie. Mitglieder dieser Familie findet man in allen eukaryotischen Organismen. Ihre Aufgaben bestehen in der Regulierung von Polarität und Motilität, indem sie Zytoskelett, Zelladhäsion und vesikulären Membrantransport beeinflussen (Ridley, 2006). Mutationen in Rho-GTPasen werden mit der Entstehung von Tumoren assoziiert. Rac1 induziert spezifisch die Ausbildung von Lamellipodien durch Stimulation der Aktinpolymerisation. Lamellipodien sind breite blattähnliche Protrusionen

mit einem Netzwerk verzweigter Aktinfilamente und befinden sich an der Vorderseite migrierender Zellen (Ridley, 2006). Rho-GTPasen besitzen die Fähigkeit, rasch zwischen einer aktiven GTP-gebundenen und einer inaktiven GDP-gebundenen Form zu wechseln und so als molekulare Schalter zu fungieren. In der aktiven Konformation können dadurch Signalkaskaden induziert werden. Reguliert wird ihre Aktivität durch GEFs (*guanin nucleotide exchange factors*), welche die Freisetzung von GDP fördern, so dass GTP an die GTPase andocken kann. Als Gegenspieler dienen GAPs (*GTPase activated proteins*), welche die Hydrolyse von GTP zu GDP katalysieren und somit zu einer GDP-gebundenen inaktiven Form führen. GDIs (*guanin nucleotide dissociation inhibitors*) modulieren die Verteilung von Rho-GTPasen zwischen dem Zytosol und der Plasmamembran, welche den Ort der biologischen Aktivität darstellt (Disanza *et al.*, 2005).

Der GEF Vav ist ein Signaltransduktionsmolekül mit onkogenem Potential, dessen Familie das 95 kDa große Vav1 sowie Vav2 und Vav3 zugeordnet wird (Bustelo, 2001; Cantrell, 2003). Es wird angenommen, dass Vav1 in T-Zellen eine größere Bedeutung als Vav2 besitzt, während in B-Zellen beide überlappende Funktionen inne zu haben scheinen (Cantrell, 2003). Vav-Proteine von Säugetieren bestehen aus einer Calponin-Homologie-Domäne, einer azidischen Region, einer Dbl-Homologie-Domäne, einer Plekstrin-Homologie-Domäne, einer Zink-Finger-Domäne, zwei SH3-Domänen sowie einer SH2-Domäne (Bustelo, 2001). Vav fungiert sowohl als Signaltransduktionsmolekül als auch als GEF für Rho-/Rac-Proteine (Bhavsar *et al.*, 2009). In Säugetieren existieren ca. 85 GEF-Isoformen (Hall, 2005), sie katalysieren die Ablösung von GDP aus der inaktiven GTPase. Die katalytische Aktivität von Vav wird durch Tyrosin-Phosphorylierungen moduliert (Bustelo, 2001). Der nachfolgende Einbau von GTP ist mit einer Konformationsänderung der GTPase verbunden. Vav1 bildet einen Proteinkomplex mit der Tyrosinkinase ZAP70 (*zeta-associated protein*) und dem Adapter SLP76 (*SH2 domain-containing leukocyte protein*) in aktivierten T-Zellen, welche vermutlich für die Regulation der Lokalisation in der Zelle und der katalytischen Aktivität von Vav von Bedeutung sind (Cantrell, 2003).

Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) wird nach Antigen-Erkennung und Aktivierung der Vav-Rac1-Kaskade durch Dephosphorylierung inaktiviert, was die Entankerung des kortikalen Aktin-Zytoskeletts aus der Plasmamembran und eine erhöhte Flexibilität der Zelle zur Folge hat. ERM transportiert Aktinmikrofilamente zur Plasmamembran und ist für Zellwachstumssignale und kortikale Aktinorganisation zuständig (Gautreau *et al.*, 2002). Durch die verminderte Rigidität ist die Zelle in der Lage, eine effizientere Antigen-Präsentation auszuführen. Diese Signalkaskade über Vav und Rac1 ist demnach Antigen-abhängig (Faure *et al.*, 2004). TGTP hemmt die Inaktivierung von ERM in primären CD4⁺-T-Lymphozyten und führt damit zu einer verminderten Flexibilität der Zelle (Poppe *et al.*, 2006) und zu einer verminderten T-Zell-APC-Konjugation, die unabhängig von einer Apoptose und schon nach drei Tagen Zellkultur auftritt (Poppe *et al.*, 2006), während eine Apoptose nach vier bis fünf Tagen Zellkultur beobachtet werden konnte (Tiede *et al.*, 2003).

In einer aktuellen Studie von Bourguine und Kollegen konnten in der Promotor-Region

des Rac1-Gens drei SNPs und eine *Variable Number Tandem Repeat*-Region entschlüsselt werden (Bourguine *et al.*, 2011). Diese könnten einen Einfluss auf das Ansprechen auf eine Thiopurin-Therapie und auf das Auftreten unerwünschter Wirkungen haben. Da die Untersuchungen noch ganz am Anfang stehen, bleiben hier weitere Untersuchungen abzuwarten.

Verschiedene Therapieansätze resultieren aus diesen neuen Erkenntnissen. Denkbar wäre es beispielsweise, TGTP-Derivate oder spezifische Antagonisten von Vav-Rac zu entwickeln und in der Therapie einzusetzen, welche nicht nur nebenwirkungsärmer als Azathioprin wären, sondern auch gezielter und stärker auf T-Lymphozyten wirken, als dies bisher der Fall ist. Dadurch könnte möglicherweise die Latenz von bis zu sechs Monaten zum Wirkungseintritt verkürzt werden, so dass TGTP als Monotherapie in der Remissionsinduktion appliziert werden könnte. Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen blieben damit die bekannten und zahlreichen potentiellen unerwünschten Wirkungen von Glukokortikoiden erspart. Am Tiermodell wurde TGTP erfolgreich getestet, es verlängerte die Überlebenszeit nach Herztransplantation. Bei den langzeitüberlebenden Tieren wurden vermehrt T_{reg}s und eine verminderte Proliferation von T-Lymphozyten festgestellt (Wang *et al.*, 2007).

5.9 TGTP: Ein Metabolit mit Schlüsselfunktion?

5.9.1 Einfluss der Komedikation auf die Höhe der TGTP-Spiegel

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von 5-Aminosalizylaten, Anti-TNF α sowie von Glukokortikoiden auf die Höhe der Thiopurin-Metaboliten und die Aktivität der TPMT ausgewertet. Hierbei konnten signifikant höhere Metaboliten-Spiegel an einer kleinen Untergruppe von Patienten, die eine Anti-TNF α -Therapie erhielt, demonstriert werden.

5-Aminosalizylate übten keinen signifikanten Einfluss auf die Metaboliten und TPMT-Aktivität aus. Zu diesem Ergebnis kamen auch Daperno und Kollegen (2009) in ihrer Studie an 183 Patienten über den Einfluss von 5-Aminosalizylaten auf den Thiopurin-Metabolismus. 6-TGN, 6-MMP und TPMT-Aktivität zeigten sich nicht signifikant verändert.

Zwar ist aus *In vitro*- und *Ex vivo*-Untersuchungen bekannt, dass 5-Aminosalizylat-Derivate die *S*-Methylierung der TPMT inhibieren (Szumlanski und Weinshilboum, 1995; Xin *et al.*, 2005a); jedoch stellt sich die Studienlage bezüglich einer klinischen Relevanz in diesem Punkt nicht eindeutig dar: So berichteten einige Arbeitsgruppen über erhöhte 6-TGN-Spiegel bei Patienten mit simultaner Azathioprin-/6-Mercaptopurin- und 5-Aminosalizylat-Einnahme, wobei in diesen Studien die 6-MMP-Spiegel unverändert blieben (De Boer *et al.*, 2007b; Hande *et al.*, 2006) oder nicht quantifiziert wurden (Dewit *et al.*, 2002; Lowry *et al.*, 2001a). In einer Studie stiegen die 6-MMP-Spiegel nach Absetzen von Mesalazin an, um nach dessen Ansetzen parallel zu einem

6-TGN-Anstieg wieder abzufallen (Gilissen *et al.*, 2005). Eine ähnliche Beobachtung wurde in einer weiteren Studie gemacht, in der TGDP und TGTP quantifiziert wurden. Diese stiegen nach Ansetzen von 5-Aminosalizylaten an, während 6-MMPR zunächst stabil blieb, um bei einer weiteren 5-Aminosalizylat-Dosissteigerung abzufallen (De Graaf *et al.*, 2010a). Alle Studien waren kleiner und die TPMT-Aktivität wurde entweder nicht determiniert (De Boer *et al.*, 2007b; De Graaf *et al.*, 2010a; Hande *et al.*, 2006; Lowry *et al.*, 2001a) oder blieb stabil (Dewit *et al.*, 2002; Gilissen *et al.*, 2005). In einer Studie mit 71 pädiatrischen Patienten stiegen sowohl 6-TGN als auch 6-MMP nach Gabe von 5-Aminosalizylaten an, wobei die Remissionsrate sich nicht veränderte und die Zahl der Lymphopenien zunahm (Nguyen *et al.*, 2010a).

Ein Einfluss des Anti-TNF α -Antikörpers Infliximab auf den Thiopurin-Metabolismus wurde bislang in einer einzigen kontrollierten Studie untersucht. Roblin *et al.* (2003) analysierten die 6-TGN-Spiegel in Patienten mit Morbus Crohn unter Azathioprin und Infliximab-Erstgabe und beobachteten einen Anstieg der 6-TGN-Metaboliten innerhalb von ein bis drei Wochen nach der Infusion, welche sich innerhalb von drei Monaten wieder normalisierten. Zugleich konnte ein Abfall der Leukozyten und des MCV festgestellt werden. Ein Anstieg der 6-TGN-Spiegel auf $> 400 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ war in dieser Studie an 32 Patienten mit einer guten Toleranz und Ansprechen auf die Infliximab-Therapie assoziiert. Zur Frage, ob dies in einer verbesserten Resorption durch eine rückläufige Inflammation der intestinalen Mukosa oder einer Beeinflussung des Azathioprin/6-Mercaptopurin-Metabolismus begründet liegt, sind weitere Untersuchungen notwendig.

Die Remissionsrate und das *Mucosal Healing* wurden in einer Studie von Colombel und Kollegen (2010) analysiert. In dieser Arbeit erwies sich eine Kombinationstherapie aus Azathioprin und Infliximab bei Immunmodulator- und Biologika-naiven Patienten als wirksamer (56,8 % Remission nach sechs Monaten versus 44,4 % für Infliximab alleine und 30,0 % für Azathioprin alleine), so dass anzunehmen ist, dass hier ein synergistischer Effekt von Anti-TNF α und Azathioprin vorliegt.

Glukokortikoide könnten in der Beeinflussung der TPMT-Aktivität von Belang sein. Patienten mit Glukokortikoideinnahme wurden in dieser Studie durch eine signifikant erhöhte TPMT-Aktivität charakterisiert. Möglicherweise ist dies auch ein Hinweis darauf, dass sich in dieser Gruppe viele *Non-Responder* mit gegebenenfalls steroidabhängigem Krankheitsverlauf befanden und ein weiterer Anhaltspunkt dafür, dass eine übermäßige TPMT-Metabolisierung mit daraus resultierenden niedrigeren 6-TGN- bzw. TGTP-Spiegeln einen Auslöser hierfür repräsentieren könnte (vgl. Kapitel 5.4.2).

Zu Interaktionen von Glukokortikoiden mit Thiopurinen existieren nur sehr wenige Daten. Heneghan und Mitarbeiter (2006) stellten in einer Studie an Patienten mit Autoimmunhepatitis fest, dass Patienten mit Kombination von Azathioprin und Prednison einen Trend zu niedrigeren 6-TG-Spiegeln und höheren 6-MMP-Spiegeln aufwiesen und diese Komedikation daher einen antagonistischen Effekt ausübt. Dementsprechend war zur Remissionserhaltung in dieser Gruppe eine höhere Azathioprin-Dosis erforderlich. Weiterhin zeigte sich in diesem Kollektiv im Gegensatz zur Stichpro-

be mit Azathioprin-Monotherapie keine Korrelation zwischen Azathioprin-Dosierung und 6-TG bzw. 6-MMP.

Kamal und Jusko (2004) erforschten in einer *Ex vivo*-Studie die Wirkungen von 6-Mercaptopurin und Prednisolon auf die Proliferation humaner T-Lymphozyten. Bei einer Fallzahl von drei Patientinnen stellte sich bei zwei Studienteilnehmerinnen mit hoher TPMT-Aktivität ein synergistischer Effekt und bei einer Probandin mit niedriger TPMT-Aktivität ein schwach antagonistischer Effekt von Prednisolon auf Azathioprin dar. Hier sind weitere Untersuchungen im Rahmen kontrollierter Studien notwendig, um zu klären, ob Interaktionen zwischen Glukokortikoiden und Thiopurinen von klinischer Relevanz sind.

5.9.2 Patienten mit fistulierendem Verlauf weisen eine erhöhte TPMT-Aktivität auf

Die TPMT-Aktivität der 15 Patienten mit fistulierendem Verlauf lag signifikant höher als in der Kontrollgruppe bei einem Trend zu einer erhöhten Azathioprin-Dosierung. In der Gesamtgruppe sowie im Morbus Crohn-Kollektiv konnten signifikante Korrelationen zwischen TPMT-Aktivität und Azathioprin-Dosierung demonstriert werden (Tabelle 4.5 und 4.6). Möglicherweise könnte dieser Dosis-Effekt auch hier bedeutsam sein, obgleich Patienten mit fistulierendem Verlauf nicht signifikant mehr Azathioprin erhielten. Eine weitere Hypothese besteht darin, dass eine grundlegend erhöhte TPMT-Aktivität in einem komplizierenden Krankheitsverlauf der Patienten mit Fistel-Leiden resultiert. In Studien wurde herausgefunden, dass Patienten mit hoher TPMT-Aktivität vermehrt niedrige 6-TGN-Spiegel aufweisen und generell schlechter auf die Azathioprin-Therapie ansprechen (Azhary *et al.*, 2009; Cuffari *et al.*, 2004b; Lennard, 1998). Es wäre denkbar, dass sich in dieser Gruppe von *Non-Respondern* die höhere Krankheitsaktivität beispielsweise durch das Auftreten von Fisteln manifestierte.

5.9.3 Patienten mit stenosierendem Verlauf verfügen über hohe TGTP-Spiegel

Eine 29-köpfige Untergruppe dieser Studie litt an einem stenosierenden oder fibrostenotischen Verlauf der Morbus Crohn-Erkrankung. Im Vergleich der Metaboliten-Spiegel mit den Morbus Crohn-Patienten mit nicht-stenosierendem Verlauf fielen signifikant erhöhte TGTP-Werte auf. Weitere Metaboliten waren ebenfalls signifikant oder tendenziell erhöht, obwohl dieses Patientenkollektiv keine höhere Azathioprin-Dosis erhielt.

Dieses Ergebnis erstaunt zunächst, da sich Patienten mit diesem aggressiven Phänotyp der Morbus Crohn-Erkrankung weitab von einer Remission befinden und demzufolge erniedrigte Metaboliten-Spiegel naheliegen würden. Eine Stenose entsteht durch eine chronische Entzündung der intestinalen Mukosa und Submukosa, welche sich

im weiteren Verlauf durch Fibrosierung und anormale Kollageneinlagerung zu Narbengewebe restrukturieren kann. Eine muskuläre Hyperplasie kann sich als mögliche Folge anschließen. Eine häufige Lokalisation stellt das terminale Ileum dar. Die chronische Entzündung bewirkt eine trichterförmige Verengung des Darmlumens auf wenige Zentimeter oder Millimeter, einhergehend mit einer prästenotischen Dilatation, in deren Lokalisation es zur Ausbildung von Fisteln kommen kann. Oft ist eine operative Resektion des betroffenen Segments unausweichlich. Daher ist die frühzeitige Identifikation von Patienten mit diesem Phänotyp mit baldiger Einleitung einer immunmodulatorischen und/oder biologischen Therapie von besonderer Bedeutung.

Einen Erklärungsansatz für die erhöhten Thiopurin-Metaboliten bietet die Verlangsamung der Nahrungspassage (mit gegebenenfalls Subileus- oder Ileuszuständen) und dadurch einer möglicherweise verbesserten Absorption des Wirkstoffs. Dem Intestinaltrakt bleibt durch die Verlangsamung mehr Zeit, das Medikament zu absorbieren, was zu höheren Wirkspiegeln führt.

Falls sich dieses gedankliche Konstrukt in weiteren Studien bestätigen sollte, wäre es auch denkbar, dass umgekehrt Patienten ohne stenosierenden Verlauf und mit höheren Stuhlfrequenzen, wie sie bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen üblich sind, bei der Absorption des Wirkstoffes deutlich benachteiligt sein könnten. Die intravenöse Gabe von Azathioprin scheidet als Alternative aus (Sandborn *et al.*, 1999), möglicherweise könnte man diesen Nachteil jedoch durch Änderung der Galenik ausgleichen.

Eine weitere Theorie ist eine veränderte Metabolisierung von Patienten mit stenosierendem Verlauf. Um diese These zu verifizieren, wäre die Bestimmung weiterer Enzymaktivitäten und Metaboliten notwendig. In der vorliegenden Arbeit wurde anhand der gemessenen Metaboliten und der TPMT-Aktivität kein Anhaltspunkt für einen alternativen Metabolisierungsweg gefunden.

Der aktuellen Studienlage ist zu entnehmen, dass diese Fragestellung offensichtlich bislang nie untersucht wurde. Wünschenswert wären also weitere prospektive Studien an dieser Untergruppe von Morbus Crohn-Patienten mit stenosierendem oder fibrostenotischem Krankheitsverlauf mit größerer Fallzahl, die sich mit der Frage befassen, ob dieser Phänotyp eine unterschiedliche Absorption oder Metabolisierung von Thiopurinen aufweist.

5.9.4 TGTP korreliert mit 6-TGN, TGDP und MTGN

Die Verteilung der drei Thioguanin-Nukleotide TGMP, TGDP und TGTP in dieser Arbeit betrug 4 %, 15 % und 81 %. Vikingsson und Kollegen (2009) berichten in ihrer Studie über 6-TGN-Spiegel in ähnlicher Höhe: TGTP lag bei 85 %, TGDP bei 14 %. Quantitativ wurde TGTP als Hauptmetabolit ermittelt.

Die verbleibenden 4 % entfallen mutmaßlich auf den Metaboliten TGMP. Allerdings wurde für diesen bei allen 133 Patienten ein Bereich von unter $1,6 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$

determiniert (Abbildung 4.3). Werte in diesem Bereich sind nicht mehr exakt detektiert. Denkbar wäre daher möglicherweise, dass in den verbleibenden 4 % weitere bislang unidentifizierte Metaboliten enthalten waren. Karner und Kollegen (2010) stellen in ihrer Arbeit fest, dass niedrige oder nicht bestimmbare TGMP-Spiegel auf eine rasche Verarbeitung der Proben hindeuten, da TGMP-Spiegel im zeitlichen Verlauf ansteigen und folglich einen unsachgemäßen Umgang oder eine falsche Lagerung indizieren können.

Auch in weiteren Arbeiten konnte TGTP als Hauptmetabolit identifiziert werden (Lavi und Holcenberg, 1985; Liliemark *et al.*, 1990). In der Arbeit von Liliemark *et al.* waren die TGTP- höher als die TGDP-Spiegel. Jedoch lagen die TGMP-Werte interessanterweise 5–10-fach über denen von TGDP und TGTP. Die Arbeitsgruppe verwendete die murine Leukämiezelllinie WEHI-3b. In zwei weiteren Zelllinien (L-1210 und CCRF-CEM) wurden analoge Resultate erzielt. Liliemark *et al.* beschrieben in ihren Untersuchungen zwar nicht, ob eine Korrelation zwischen den einzelnen Thioguanosin-Nukleotiden zu beobachten war, aber sie berichteten über ähnliche Muster von TGMP, TGDP und TGTP. In einer weiteren Arbeit an der humanen Leukämiezelllinie CCRF-CEM konnte TGMP nicht detektiert werden. Dafür zeigte sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit TGTP als Hauptmetabolit nach Induktion durch 6-Mercaptopurin und 6-Thioguanin (Shi *et al.*, 1998).

Im Rahmen dieser Studie wurden neben dem Azathioprin-Metaboliten TGTP auch die Metaboliten TGMP, TGDP, 6-TGN, MTGN und 6-MMP bestimmt. Weiterhin wurde die TPMT-Aktivität gemessen. TGTP korrelierte im Gesamt-Kollektiv signifikant mit allen Metaboliten, nicht jedoch mit der TPMT-Aktivität. Im Morbus Crohn-Kollektiv war eine Assoziation zwischen TGTP und der TPMT-Aktivität zu beobachten. Auffällig war eine zweifache Verteilung der Punktwolke für 6-TGN, TGDP, TGTP und MTGN, mit enger Korrelation bis je $100 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ 6-TGN und TGTP sowie $20 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ TGDP und $50 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ MTGN, welche auf unterschiedliche Metabolisierungswege unter den Patienten hindeuten könnte.

Patienten mit einem hohen Quotienten Q ($\text{TGTP}/(\text{TGDP} + \text{TGTP})$) scheinen Vorteile hinsichtlich des Ansprechens auf die Therapie zu besitzen; insbesondere scheint eine Kombination aus hohem TGTP und niedrigem TGDP eine prädiktive Funktion inne zu haben.

Ähnliche Berechnungen präsentierten auch De Boer *et al.* (De Boer *et al.*, 2007a) in ihrer Arbeit für TGTP und 6-TGN, allerdings erfolgte die Metaboliten-Messung mit der Methode nach Keuzenkamp-Jansen *et al.* (1995). Zwischen der TPMT-Aktivität und TGTP wurde hier keine Korrelation ermittelt. Vikingsson und Kollegen (2009) untersuchten zwar ebenfalls die Metaboliten-Spiegel von TGMP, TGDP und TGTP, berichteten aber nicht, in welchem Bezug diese zueinander standen. Sie wandten ebenfalls die Methode nach Rabel *et al.* (1995) mit Modifikationen nach Neurath *et al.* (2005) an.

Lavi und Holcenberg (1985) bestimmten die Metaboliten TGMP, TGDP, TGTP, TIMP und Thioharnsäure mittels einer HPLC-Methode, wobei auch hier TGTP als

Hauptmetabolit angesehen wurde. TIDP und TITP konnten in Patientenproben nicht detektiert werden.

Somit konnte TGTP in Übereinstimmung mit Daten aus anderen Studien als wichtigster Metabolit der Thioguanin-Nukleotide identifiziert werden.

5.9.5 Hohe TGTP-Spiegel sind mit einem Ansprechen auf die Azathioprin-Therapie assoziiert

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie zeigen auf, dass hohe Spiegel des Thiopurin-Metaboliten TGTP mit einem Ansprechen auf die Azathioprin-Therapie assoziiert sind und Patienten mit TGTP-Spiegeln $< 90 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ signifikant häufiger mit dem Auftreten eines Schubes rechnen müssen. Bei Betrachtung der Interquartilspannen der Boxplots aus Abbildung 4.29 fällt auf, dass hohe TGTP-Spiegel einen Prädiktor für das Ansprechen auf die Therapie verkörpern und niedrige TGTP-Spiegel mit größerer Wahrscheinlichkeit den Misserfolg der Therapie indizieren. Niedrige TGTP-Spiegel wurden jedoch auch in einer Untergruppe der *Responder* nachgewiesen, wohingegen in der Gruppe der *Non-Responder* hohe TGTP-Spiegel eine Ausnahme bildeten (Ausreißer in Abbildung 4.29). Eine Untergruppe der Patienten, die auf die Therapie ansprach, verfügte daher über niedrige TGTP-Spiegel. Hohe TGTP-Spiegel stellen somit keine notwendige, sondern lediglich eine hinreichende Bedingung für ein Ansprechen auf eine Azathioprin-Therapie dar. Patienten, die gut ansprechen, aber Metaboliten-Spiegel in einem subtherapeutischen Bereich aufwiesen, wurden nicht nur in dieser Studie, sondern auch in vorangegangenen Studien für den Metaboliten 6-TGN identifiziert (Cuffari *et al.*, 1996; Cuffari *et al.*, 2001; Dubinsky *et al.*, 2000).

Eine mögliche Erklärung liefert die Hypothese, dass sich einige der Remissions-Patienten aufgrund des Krankheitsverlaufs und unabhängig von einer Therapie in Remission befanden. Dadurch könnte das Ergebnis verzerrt worden sein. Denkbar wäre auch, dass die TGTP-Spiegel zur Induktion einer Remission ausreichend hoch sein müssen, in einer stabilen mehrjährigen Langzeitremission aber auch niedrigere Spiegel zur Aufrechterhaltung ausreichend sind. Möglicherweise erfolgte bei Patienten in Langzeitremission eine zwischenzeitliche Korrektur der Dosierung nach unten, was in einem Absinken der Wirkspiegel resultierte, aber dennoch für die Aufrechterhaltung der Remission suffizient war. Ein Problem chronischer Erkrankungen, die eine konsequente regelmäßige Medikamenteneinnahme über Jahre erfordern, ist die bei stetig steigendem Wohlbefinden sinkende *Compliance*, die auch hier von Relevanz sein könnte und eine weitere Erklärung für niedrige Wirkspiegel aufzeigen könnte. Auch die in Kapitel 5.5 beschriebenen interindividuellen Unterschiede in der Metabolitenhöhe bieten eine mögliche Erklärung für unterschiedliche TGTP-Spiegel und sind zum Teil durch Enzymaktivitäten aufgrund von genetischen Polymorphismen und Unterschieden in Absorption und Aufnahme in die Zelle durch Transportproteine bedingt.

Diese möglichen Differenzen zwischen Patienten in Langzeitremission und Patienten

mit neu induzierter Remission sollten in weiteren prospektiven Studien geklärt werden.

5.10 Ausblick

Zwei Ansätze zur Optimierung der Azathioprin-Therapie konnten in der vorliegenden Arbeit behandelt werden.

Zum einen existiert aktuell kein zuverlässiges Monitoring der Azathioprin-Therapie. Der Metabolit 6-TGN wird in größeren Zentren und im Rahmen von Studien bestimmt, liefert jedoch teilweise widersprüchliche Resultate. Hier konnte erstmalig ein Monitoring mittels des Thiopurin-Metaboliten TGTP durchgeführt werden, welcher *Responder* und *Non-Responder* verlässlich differenziert. Die Azathioprin-Therapie könnte somit in Zukunft rascher und effizienter optimiert werden. Die Sicherheit der Therapie würde durch das Vermeiden unerwünschter Wirkungen angehoben. Für Therapieversager könnte eine Dosisanpassung oder ein Therapiewechsel kurzfristig erfolgen. Indirekt würde es damit auch zu einer Einsparung von Steroiden und zur Vermeidung dadurch bedingter weiterer Nebenwirkungen kommen.

Zum anderen können die Erkenntnisse dieser Arbeit in Verbindung mit den Forschungsergebnissen von Tiede *et al.* (2003) und Poppe *et al.* (2006) zur Optimierung der Wirksubstanz verwendet werden. Möglicherweise könnte eine direkte Inhibition über die Substanz TGTP oder einen Rac1-/Rac2-/Vav-Antagonisten erzielt werden, um damit einen schnelleren Wirkungseintritt zu induzieren und unerwünschte Wirkungen zu minimieren. Eine Remissionsinduktion würde rascher erfolgen und die Remission würde dauerhafter und stabiler. Die immunsuppressive Therapie könnte als Monotherapie zur Remissionsinduktion und zum Remissionserhalt geführt werden, was auch die *Compliance* verbessern könnte. Ferner könnten komplizierende Verläufe verhindert und somit chirurgische Eingriffe reduziert werden. Glukokortikoide in der Remissionsinduktion und 5-Aminosalizylate sowie Biologika würden in der Therapie an Bedeutung verlieren, wodurch Kosten eingespart werden könnten.

6 Zusammenfassung

Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sind chronisch entzündliche Darmerkrankungen mit steigender Inzidenz, deren Ätiopathogenese bis heute unklar ist. Hierdurch entstehende Kosten für ärztliche Behandlungen, Arzneimittel und Arbeitsausfall beziffern sich auf 3–4 Milliarden €/Jahr. Beiden Krankheitsentitäten scheint eine multifaktorielle Genese unter Beteiligung genetischer, immunologischer, mikrobiologischer und ökologischer Faktoren zugrunde zu liegen.

Eine kausale medikamentöse Therapie existiert nicht. Neben Glukokortikoiden, 5-Aminosalizylaten und Biologika kommen in der Therapie auch klassische Immunsuppressiva zum Einsatz.

Azathioprin, eines der ältesten Immunsuppressiva, wurde Ende der Fünfziger Jahre entwickelt und etablierte sich in den nachfolgenden Jahren in der Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. Heute stellt es das wichtigste Immunsuppressivum in der Remissionsinduktion des Morbus Crohn, im Remissionserhalt für Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sowie für den steroidabhängigen und -refraktären Verlauf dar.

Der Erfolg des Immunsuppressivums wird geschmälert durch seinen in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen verzögerten Wirkbeginn nach etwa drei bis sechs Monaten sowie seine unerwünschten Wirkungen. Bis zu 28 % der Patienten leiden unter anderem unter Unverträglichkeitsreaktionen, Leukopenien, Hepatotoxizität und Pancreatitiden.

Trotz des breiten Einsatzes ist der genaue Wirkmechanismus von Azathioprin nicht bekannt. Eine Entschlüsselung des Wirkmechanismus könnte jedoch genutzt werden, um das Pharmakon weiterzuentwickeln, die pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften zu optimieren sowie die Spezifität zu erhöhen und damit unerwünschte Wirkungen zu reduzieren und den Wirkbeginn zu forcieren.

Die Substanz unterliegt nach einer Glutathion-*S*-Transferase-katalysierten Aufspaltung in 6-Mercaptopurin und einen Methylnitroimidazolrest einem komplexen Metabolismus, an dessen Ende die drei 6-Thioguanin-Nukleotide (6-TGN) 6-Thioguanosin-5'-Monophosphat (TGMP), 6-Thioguanosin-5'-Diphosphat (TGDP) und 6-Thioguanosin-5'-Triphosphat (TGTP) stehen, welche als aktive Metaboliten gelten. Ein Modell zur molekularen Wirkweise geht davon aus, dass Azathioprin über den Einbau der 6-TGN in sich replizierende DNA und RNA über eine Arretierung des Zellzyklus zytotoxisch wirkt. Auch eine Inhibition der *De novo*-Purin-Nukleotid-Synthese mit Hemmung des Enzyms Phosphoribosyl-Pyrophosphat-Amidotransferase und konsekutiver Depletion der Adenosin-Nukleotid-Speicher wird diskutiert. Eine Erklärung

für den verzögerten Wirkbeginn sowie das spezifische Nebenwirkungsmuster von Azathioprin liefern diese Modelle nicht. Ein Monitoring der Azathioprin-Therapie mittels 6-TGN erbrachte widersprüchliche Resultate. Thiopurine werden in weiteren Erkrankungen und Situationen angewendet, für die ein drei- bis sechsmonatiger Wirkungseintritt nicht denkbar wäre (Therapie der akuten lymphatischen Leukämie, Immunsuppression nach Organtransplantation). Diese Tatsache lässt den Schluss zu, dass eine Wirkung auf mehreren Ebenen stattfindet.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der Azathioprin-Metabolit TGTP *in vitro* anstelle von GTP an die kleine GTPase Rac1 bindet, was zu einer Inhibition der CD28-Kostimulation führt. Über eine Akkumulation von inaktivem TGTP-gebundenem Rac1 wird die Inhibition von Vav und damit die Hemmung der Ezrin-Radixin-Moesin-Dephosphorylierung in T-Lymphozyten bewirkt, was unter anderem eine Inhibition der T-Zell-APC-Konjugation zur Folge hat. Über Rac1 kommt es durch Blockade von STAT3, MEKK1 und NF- κ B zum Ausbleiben des antiapoptotischen Signals von bcl-x_L und somit zur Apoptose, Anergie oder zum aktivierungs-induzierten Zelltod in pathogenen Gedächtnis-T-Zellen. *In vivo* konnte eine vermehrte Apoptoseinduktion in *Lamina propria*-T-Zellen von Patienten unter Azathioprin-Therapie nachgewiesen werden.

Wir führten eine prospektive Studie an 133 Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, darunter 94 Morbus Crohn- und 39 Colitis ulcerosa-Patienten, durch. Erstmals sollte das Vorliegen des Metaboliten TGTP in Erythrozyten aus EDTA-Blut Azathioprin-therapierter Patienten mittels einer neuartigen HPLC-Methode untersucht werden. Ziel der Studie war es, durch Bestimmung von TGTP zu beurteilen, ob ein Ansprechen auf die Azathioprin-Therapie prognostiziert werden kann.

Hier konnte eine exzellente Korrelation der Azathioprin-Metaboliten sowohl untereinander als auch mit 6-TGN aufgezeigt werden. Die Höhe der Dosierung des Medikamentes beeinflusste direkt die Metabolitenhöhe von TGDP, TGTP und MTGN. Eine hohe TPMT-Aktivität scheint oft mit einem schlechten Ansprechen assoziiert zu sein, so beispielsweise im Kollektiv der Patienten mit fistulierendem Krankheitsverlauf. Patienten mit stenosierendem Verlauf wiesen höhere Metabolitenspiegel auf. Ebenso konnten bei Anti-TNF α -therapierten Patienten höhere Wirkspiegel nachgewiesen werden. Glukokortikoide und 5-Aminosalizylate scheinen dagegen keinen Einfluss auf die Metabolisierung auszuüben. In der untersuchten Stichprobe resultierten hohe Medikamentendosen nicht in einem besseren Ansprechen, niedrige Dosen hatten jedoch ein fehlendes Ansprechen zur Folge.

Ein Ansprechen lässt sich daher über eine Dosisregulierung nur bedingt beeinflussen, da die Dosis sich zwar in der Metabolitenhöhe bemerkbar macht, welche wiederum mit einem Ansprechen assoziiert ist. Dosishöhe und Ansprechen korrelieren jedoch nicht.

Final konnte bestätigt werden, dass der Azathioprin-Metabolit TGTP ein Ansprechen auf die Azathioprin-Therapie prognostizieren kann. Hierbei scheinen niedrige TGDP-

Spiegel in Verbindung mit hohen TGTP-Spiegeln von entscheidender Bedeutung zu sein. Patienten in Remission weisen signifikant höhere TGTP-Spiegel auf als Patienten mit aktiver Erkrankung. Niedrige TGTP-Spiegel ($< 90 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$) wurden hingegen als Risikofaktor für eine aktive Erkrankung ermittelt. Eine zwingende Voraussetzung für eine stabile Langzeitremission scheinen hohe TGTP-Spiegel nicht darzustellen: In dieser Arbeit konnte eine Untergruppe von Remissions-Patienten identifiziert werden, die über niedrige TGTP-Spiegel verfügt.

Verschiedene Faktoren könnten dieser Beobachtung zugrunde liegen. Zum einen könnten für die Perpetuierung der Remission, im Gegensatz zur Induktion, niedrigere TGTP-Spiegel ausreichend sein. Möglicherweise befand sich diese Untergruppe auch unabhängig von einer Therapie in Remission. Zwischenzeitliche Dosisreduktion oder ein Absinken der *Compliance* könnten einen Beitrag zu den niedrigen TGTP-Spiegeln geleistet haben.

Die vorliegenden Daten heben somit die Bedeutsamkeit eines TGTP-Monitorings hervor. Die Überwachung dürfte insbesondere für Patienten während einer Remissionsinduktion zur Vermeidung unerwünschter Wirkungen, für Patienten mit ausbleibendem Ansprechen oder Rezidiv, für komplizierende Krankheitsverläufe und Anti-TNF α -Komedikation als eine wichtige Entscheidungshilfe zur Dosierungsanpassung und Therapiefortführung dienen.

7 Literaturverzeichnis

- ABBOTT, D. W., A. WILKINS, J. M. ASARA und L. C. CANTLEY (2004). The Crohn's disease protein, NOD2, requires RIP2 in order to induce ubiquitinylation of a novel site on NEMO. *Current Biology* **14**(24): 2217–27.
- ABRAHAM, C. und J. H. CHO (2009). Inflammatory bowel disease. *New England Journal of Medicine* **361**(21): 2066–78.
- ABREU, M. T., K. D. TAYLOR, Y. C. LIN, T. HANG, J. GAIENNIE, C. J. LANDERS, E. A. VASILIAUSKAS, L. Y. KAM, M. ROJANY, K. A. PAPADAKIS, J. I. ROTTER, S. R. TARGAN und H. YANG (2002). Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **123**(3): 679–88.
- ABREU, R. D., L. LAMBOUY, E. STET, T. VOGELS-MENTINK und L. V. den HEUVEL (1995). Thiopurine induced disturbance of DNA methylation in human malignant cells. *Advances In Enzyme Regulation* **35**: 251–63.
- ACTIS, G. C., F. BRESSO, M. ASTEGIANO, B. DEMARCHI, N. SAPONE, C. BOSCAGLIA und M. RIZZETTO (2001). Safety and efficacy of azathioprine in the maintenance of ciclosporin-induced remission of ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **15**(9): 1307–11.
- ADLER, G., A. von HERBAY und M. STARLINGER (1997). In: ADLER, G. (Hrsg.): Morbus Crohn - Colitis ulcerosa. Berlin: Springer Verlag.
- AKOBENG, A. K. und E. GARDENER (2005). Oral 5-aminosalicylic acid for maintenance of medically-induced remission in Crohn's Disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (1): CD003715.
- AL-SAFI, S., B. TASHTOUSH und M. HASSAN (2003). Comparison of the effects of azathioprine and its novel non-mercaptopurine analog on antibody response in rabbits. *Polish Journal of Pharmacology* **55**(2): 239–43.
- ANDERSSON, R. E., G. OLAISON, C. TYSK und A. EKBOM (2001). Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *New England Journal of Medicine* **344**(11): 808–14.
- ANDERSSON, R. E., G. OLAISON, C. TYSK und A. EKBOM (2003). Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease. *Gastroenterology* **124**(1): 40–6.
- ANDOH, A., T. TSUJIKAWA, H. BAN, T. HASHIMOTO, S. BAMBA, A. OGAWA, M. SASAKI, Y. SAITO und Y. FUJIYAMA (2008). Monitoring 6-thioguanine nucleotide concentrations in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **23**(9): 1373–7.

- ANSARI, A., N. PATEL, J. SANDERSON, J. O'DONOHUE, J. A. DULEY und T. H. J. FLORIN (2010). Low-dose azathioprine or mercaptopurine in combination with allopurinol can bypass many adverse drug reactions in patients with inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **31**(6): 640–7.
- ANSARI, A., T. ELLIOTT, F. FONG, M. ARENAS-HERNANDEZ, G. ROTTENBERG, B. PORTMANN, S. LUCAS, A. MARINAKI und J. SANDERSON (2008). Further experience with the use of 6-thioguanine in patients with Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases* **14**(10): 1399–1405.
- ARDIZZONE, S., P. MOLteni, V. IMBESI, S. BOLLANI und G. BIANCHI PORRO (1997). Azathioprine in steroid-resistant and steroid-dependent ulcerative colitis. *Journal of Clinical Gastroenterology* **25**(1): 330–3.
- ARDIZZONE, S., G. MACONI, A. RUSSO, V. IMBESI, E. COLOMBO und G. BIANCHI PORRO (2006). Randomised controlled trial of azathioprine and 5-aminosalicylic acid for treatment of steroid dependent ulcerative colitis. *Gut* **55**(1): 47–53.
- ARMSTRONG, R. G., J. WEST und T. R. CARD (2010). Risk of cancer in inflammatory bowel disease treated with azathioprine: a UK population-based case-control study. *American Journal of Gastroenterology* **105**(7): 1604–09.
- ARNOTT, I. D., E. R. NIMMO, H. E. DRUMMOND, J. FENNEL, B. R. SMITH, E. MACKINLAY, J. MORECROFT, N. ANDERSON, D. KELLEHER, M. O'SULLIVAN, R. MCMANUS und J. SATSANGI (2004). NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe? *Genes Immun* **5**(5): 417–25.
- ASHKENAZI, A. und V. M. DIXIT (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**(5381): 1305–8.
- ASKLING, J., L. BRANDT, A. LAPIDUS, P. KARLÉN, M. BJÖRKHOLM, R. LÖFBERG und A. EKBOM (2005). Risk of haematopoietic cancer in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* **54**(5): 617–22.
- AUPHAN, N., J. A. DIDONATO, C. ROSETTE, A. HELMBERG und M. KARIN (1995). Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* **270**(5234): 286–90.
- AZHARY, R. A. el, S. A. FARMER, L. A. DRAGE, R. S. ROGERS, M. T. McEVOY, M. D. P. DAVIS, A. G. BRIDGES und L. E. GIBSON (2009). Thioguanine nucleotides and thiopurine methyltransferase in immunobullous diseases: optimal levels as adjunctive tools for azathioprine monitoring. *Archives of Dermatology* **145**(6): 644–52.
- BAKKER, J. A., M. DRENT und J. BIERAU (2007). Relevance of pharmacogenetic aspects of mercaptopurine metabolism in the treatment of interstitial lung disease. *Current Opinion In Pulmonary Medicine* **13**(5): 458–63.
- BARRETT, J. C., S. HANSOUL, D. L. NICOLAE, J. H. CHO, R. H. DUERR, J. D. RIOUX, S. R. BRANT, M. S. SILVERBERG, K. D. TAYLOR, M. M. BARMADA, A. BITTON, T. DASSOPOULOS, L. W. DATTA, T. GREEN, A. M. GRIFFITHS, E. O. KISTNER, M. T. MURTHA, M. D. REGUEIRO, J. I. ROTTER, L. P. SCHUMM, A. H.

- STEINHART, S. R., TARGAN, R. J., XAVIER, C., LIBIOULLE, C., SANDOR, M., LATHROP, J., BELAICHE, O., DEWIT, I., GUT, S., HEATH, D., LAUKENS, M., MNI, P., RUTGEERTS, A., VAN GOSSUM, D., ZELENKA, D., FRANCHIMONT, J. P., HUGOT, M., de VOS, S., VERMEIRE, E., LOUIS, L. R., CARDON, C. A., ANDERSON, H., DRUMMOND, E., NIMMO, T., AHMAD, N. J., PRESCOTT, C. M., ONNIE, S. A., FISHER, J., MARCHINI, J., GHORI, S., BUMPSTEAD, R., GWILLIAM, M., TREMELLING, P., DELOUKAS, J., MANSFIELD, D., JEWELL, J., SATSANGI, C. G., MATHEW, M., PARKES, M., GEORGES und M. J. DALY (2008). Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nature Genetics* **40**(8): 955–62.
- BASTIDA, G., P. NOS, M. AGUAS, B. BELTRÁN, M. IBORRA, V. ORTIZ, V. GARRIGUES, R. ESTEVAN und J. PONCE (2010). The effects of thiopurine therapy on health-related quality of life in Inflammatory Bowel Disease patients. *BMC Gastroenterology* **10**: 26.
- BAUMGART, D. C. und S. R. CARDING (2007). Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* **369**(9573): 1627–40.
- BAUMGART, D. C. und W. J. SANDBORN (2007). Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* **369**(9573): 1641–57.
- BAUMGART, D. C., D. METZKE, J. SCHMITZ, A. SCHEFFOLD, A. STURM, B. WIENDENMANN und A. U. DIGNASS (2005). Patients with active inflammatory bowel disease lack immature peripheral blood plasmacytoid and myeloid dendritic cells. *Gut* **54**(2): 228–36.
- BEAUMAIS, T. A. de, T. DERVIEUX, M. FAKHOURY, Y. MEDARD, S. AZOUGAGH, D. ZHANG, K. YAKOUBEN und E. JACQZ-AIGRAIN (2010). The impact of high-dose methotrexate on intracellular 6-mercaptopurine disposition during interval therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **66**(4): 653–8.
- BELAICHE, J., J. P. DESAGER, Y. HORSMANS und E. LOUIS (2001). Therapeutic drug monitoring of azathioprine and 6-mercaptopurine metabolites in Crohn disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **36**(1): 71–6.
- BELL, B. A., G. N. BROCKWAY, J. J. SHUSTER, G. ERDMANN, S. STERIKOFF, B. BOSTROM, B. M. CAMITTA und PEDIATRIC ONCOLOGY GROUP STUDY (NOW THE CHILDREN'S ONCOLOGY GROUP) (2004). A comparison of red blood cell thiopurine metabolites in children with acute lymphoblastic leukemia who received oral mercaptopurine twice daily or once daily: a Pediatric Oncology Group study (now The Children's Oncology Group). *Pediatric Blood and Cancer* **43**(2): 105–109.
- BEN-HORIN, S., I. GOLDSTEIN, E. FUDIM, O. PICARD, Z. YERUSHALMI, I. BARSACK, I. BANK, Y. GOLDSCHMID, S. B. MEIR, L. MAYER und Y. CHOWERS (2009). Early preservation of effector functions followed by eventual T cell memory depletion: a model for the delayed onset of the effect of thiopurines. *Gut* **58**(3): 396–403.

- BERG, D. F., A. M. BAHADURSINGH, D. L. KAMINSKI und W. E. LONGO (2002). Acute surgical emergencies in inflammatory bowel disease. *American Journal of Surgery* **184**(1): 45–51.
- BERG, R. D. (1996). The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends In Microbiology* **4**(11): 430–5.
- BERGAN, S., H. E. RUGSTAD, O. BENTDAL, L. ENDRESEN und O. STOKKE (1994). Kinetics of mercaptopurine and thioguanine nucleotides in renal transplant recipients during azathioprine treatment. *Therapeutic Drug Monitoring* **16**(1): 13–20.
- BERGAN, S., O. BENTDAL, G. SØDAL, A. BRUN, H. E. RUGSTAD und O. STOKKE (1997a). Patterns of azathioprine metabolites in neutrophils, lymphocytes, reticulocytes, and erythrocytes: relevance to toxicity and monitoring in recipients of renal allografts. *Therapeutic Drug Monitoring* **19**(5): 502–9.
- BERGAN, S., H. E. RUGSTAD, B. KLEMETS DAL, T. GIVERHAUG, O. BENTDAL, G. SØDAL, A. HARTMANN, J. AARBAKKE und O. STOKKE (1997b). Possibilities for therapeutic drug monitoring of azathioprine: 6-thioguanine nucleotide concentrations and thiopurine methyltransferase activity in red blood cells. *Therapeutic Drug Monitoring* **19**(3): 318–26.
- BERKOVITCH, M., D. MATSUI, A. ZIPURSKY, V. S. BLANCHETTE, Z. VERJEE, E. GIESBRECHT, E. F. SAUNDERS, W. E. EVANS und G. KOREN (1996). Hepatotoxicity of 6-mercaptopurine in childhood acute lymphocytic leukemia: pharmacokinetic characteristics. *Medical and Pediatric Oncology* **26**(2): 85–9.
- BERLIN, C., E. L. BERG, M. J. BRISKIN, D. P. ANDREW, P. J. KILSHAW, B. HOLZMANN, I. L. WEISSMAN, A. HAMANN und E. C. BUTCHER (1993). $\alpha 4\beta 7$ integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* **74**(1): 185–95.
- BERMEJO, F., A. LÓPEZ-SANROMÁN, A. ALGABA, M. VAN-DOMSelaar, J. P. GIBERT, S. GARCÍA-GARZÓN, E. GARRIDO, B. PIQUERAS, G. D. L. POZA und I. GUERRA (2010). Mercaptopurine rescue after azathioprine-induced liver injury in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **31**(1): 120–124.
- BERNICK, S. J. und S. KANE (2010). Insight into the widespread problem of nonadherence to therapy in ulcerative colitis patients. *Expert Rev Clin Immunol* **6**(4): 677–82.
- BERNSTEIN, C. N., J. F. BLANCHARD, E. KLIEWER und A. WAJDA (2001a). Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer* **91**(4): 854–62.
- BERNSTEIN, C. N., J. F. BLANCHARD, P. RAWSTHORNE und N. YU (2001b). The prevalence of extraintestinal diseases in inflammatory bowel disease: a population-based study. *The American Journal of Gastroenterology* **96**(4): 1116–22.
- BERNSTEIN, C. N., W. D. LESLIE und M. S. LEBOFF (2003). AGA technical review on osteoporosis in gastrointestinal diseases. *Gastroenterology* **124**(3): 795–841.

- BERNSTEIN, C. N., A. WAJDA, L. W. SVENSON, A. MACKENZIE, M. KOEHOORN, M. JACKSON, R. FEDORAK, D. ISRAEL und J. F. BLANCHARD (2006). The epidemiology of inflammatory bowel disease in Canada: a population-based study. *American Journal of Gastroenterology* **101**(7): 1559–68.
- BERREBI, D., R. MAUDINAS, J. P. HUGOT, M. CHAMAILLARD, F. CHAREYRE, P. DE LAGUSIE, C. YANG, P. DESREUMAUX, M. GIOVANNINI, J. P. CEZARD, H. ZOUALI, D. EMILIE und M. PEUCHMAUR (2003). Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon. *Gut* **52**(6): 840–6.
- BERTINO, J. R. (1973). Chemical action and pharmacology of methotrexate, azathioprine and cyclophosphamide in man. *Arthritis and Rheumatism* **16**(1): 79–83.
- BEST, W. R., J. M. BECKTEL, J. W. SINGLETON und F. KERN (1976). Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* **70**(3): 439–44.
- BHAVSAR, P. J., E. VIGORITO, M. TURNER und A. J. RIDLEY (2009). Vav GEFs regulate macrophage morphology and adhesion-induced Rac and Rho activation. *Experimental Cell Research* **315**(19): 3345–58.
- BLOOMFELD, R. S. und J. E. ONKEN (2003). Mercaptopurine metabolite results in clinical gastroenterology practice. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **17**(1): 69–73.
- BODELL, W. J. (1991). Molecular dosimetry of sister chromatid exchange induction in 9L cells treated with 6-thioguanine. *Mutagenesis* **6**(3): 175–7.
- BOER, N. K. de, S. V. JARBANDHAN, P. de GRAAF, C. J. MULDER, R. M. van ELBURG und A. A. van BODEGRAVEN (2006). Azathioprine use during pregnancy: unexpected intrauterine exposure to metabolites. *American Journal of Gastroenterology* **101**(6): 1390–2.
- BOER, N. K. H. de, L. J. J. DERIJKS, J. J. KEIZER-GARRITSEN, L. H. J. LAMBOOY, W. RUITENBEEK, P. M. HOOYMANS, A. A. van BODEGRAVEN und D. J. de JONG (2007a). Extended thiopurine metabolite assessment during 6-thioguanine therapy for immunomodulation in Crohn's disease. *Journal of Clinical Pharmacology* **47**(2): 187–91.
- BOER, N. K. H. de, D. R. WONG, B. JHARAP, P. de GRAAF, P. M. HOOYMANS, C. J. J. MULDER, F. RIJMEN, L. G. J. B. ENGELS und A. A. van BODEGRAVEN (2007b). Dose-dependent influence of 5-aminosalicylates on thiopurine metabolism. *American Journal of Gastroenterology* **102**(12): 2747–53.
- BOIRIVANT, M., M. MARINI, G. DI FELICE, A. M. PRONIO, C. MONTESANI, R. TERSIGNI und W. STROBER (1999). Lamina propria T cells in Crohn's disease and other gastrointestinal inflammation show defective CD2 pathway-induced apoptosis. *Gastroenterology* **116**(3): 557–65.
- BOKEMEYER, B., A. TEMPL, C. ROGGEL, P. HARTMANN, C. FISCHER, E. SCHAEFFELER und M. SCHWAB (2007). Adherence to thiopurine treatment in out-patients with Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **26**(2): 217–25.

- BÖKKERINK, J. P., E. H. STET, R. A. D. ABREU, F. J. DAMEN, T. W. HULSCHER, M. A. BAKKER und J. A. van BAAL (1993). 6-Mercaptopurine: cytotoxicity and biochemical pharmacology in human malignant T-lymphoblasts. *Biochemical Pharmacology* **45**(7): 1455–63.
- BOMAN, H. G. (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annual Review of Immunology* **13**: 61–92.
- BONEN, D. K., Y. OGIURA, D. L. NICOLAE, N. INOHARA, L. SAAB, T. TANABE, F. F. CHEN, S. J. FOSTER, R. H. DUERR, S. R. BRANT, J. H. CHO und G. NUNEZ (2003). Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology* **124**(1): 140–6.
- BORTZ, J. (1999). In: Verfahren zur Überprüfung von Zusammenhangshypothesen. *Statistik für Sozialwissenschaftler*. Berlin/Heidelberg: Springer Verlag; 208.
- BOULIEU, R., A. LENOIR, M. BERTOCCHI und J. F. MORNEX (1997). Intracellular thiopurine nucleotides and azathioprine myelotoxicity in organ transplant patients. *British Journal of Clinical Pharmacology* **43**(1): 116–8.
- BOURGINE, J., A. GARAT, D. ALLORGE, A. CRUNELLE-THIBAUT, J.-M. LOGUIDICE, J.-F. COLOMBEL, F. BROLY und I. BILLAUT-LADEN (2011). Evidence for a functional genetic polymorphism of the Rho-GTPase Rac1. Implication in azathioprine response? *Pharmacogenet Genomics*.
- BOWEN, G. E., J. IRONS G. V., J. B. RHODES und J. B. KIRSNER (1966). Early experiences with azathioprine in ulcerative colitis; a note of caution. *JAMA* **195**(6): 460–4.
- BRAAT, H., M. P. PEPPELENBOSCH und D. W. HOMMES (2006). Immunology of Crohn's disease. *Annals of The New York Academy Of Sciences* **1072**: 135–54.
- BRAND, S. (2009). Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut* **58**(8): 1152–67.
- BRAND, S., T. OLSZAK, F. BEIGEL, J. DIEBOLD, J. M. OTTE, S. T. EICHHORST, B. GOKE und J. DAMBACHER (2006a). Cell differentiation dependent expressed CCR6 mediates ERK-1/2, SAPK/JNK, and Akt signaling resulting in proliferation and migration of colorectal cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry* **97**(4): 709–23.
- BRAND, S., F. BEIGEL, T. OLSZAK, K. ZITZMANN, S. T. EICHHORST, J. M. OTTE, H. DIEPOLDER, A. MARQUARDT, W. JAGLA, A. POPP, S. LECLAIR, K. HERRMANN, J. SEIDERER, T. OCHSENKUHN, B. GOKE, C. J. AUERNHAMMER und J. DAMBACHER (2006b). IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**(4): G827–38.
- BRANT, S. R. und Y. Y. SHUGART (2004). Inflammatory bowel disease gene hunting by linkage analysis: rationale, methodology, and present status of the field. *Inflammatory Bowel Diseases* **10**(3): 300–11.

- BROOKE, B. N., D. C. HOFFMANN und E. T. SWARBRICK (1969). Azathioprine for Crohn's disease. *Lancet* **2**(7621): 612–4.
- BRUNS, T. und A. STALLMACH (2009). Drug monitoring in inflammatory bowel disease: helpful or dispensable? *Digestive Diseases* **27**(3): 394–403.
- BRUNSHUUS, I. und K. SCHMIEGELOW (1989). Analysis of 6-mercaptopurine, 6-thioguanine nucleotides, and 6-thiouric acid in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* **49**(8): 779–84.
- BUCHMAN, A. L. (2006). Etiology and initial management of short bowel syndrome. *Gastroenterology* **130**(2 Suppl 1): S5–S15.
- BUHNER, S., C. BUNING, J. GENSCHEL, K. KLING, D. HERRMANN, A. DIGNASS, I. KUECHLER, S. KRUEGER, H. H. SCHMIDT und H. LOCHS (2006). Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut* **55**(3): 342–7.
- BUISINE, M.-P., P. DESREUMAUX, E. LETEURTRE, M.-C. COPIN, J.-F. COLOMBEL, N. PORCHET und J.-P. AUBERT (2001). Mucin gene expression in intestinal epithelial cells in Crohn's disease. *Gut* **49**(4): 544–51.
- BURKS, A. W., S. LAUBACH und S. M. JONES (2008). Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy: implications for future treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **121**(6): 1344–50.
- BURTON, P. R., D. G. CLAYTON, L. R. CARDON, N. CRADDOCK, P. DELOUKAS, A. DUNCANSON, D. P. KWIATKOWSKI, M. I. MCCARTHY, W. H. OUWEHAND, N. J. SAMANI, J. A. TODD, P. DONNELLY, J. C. BARRETT, D. DAVISON, D. EASTON, D. M. EVANS, H.-T. LEUNG, J. L. MARCHINI, A. P. MORRIS, C. C. A. SPENCER, M. D. TOBIN, A. P. ATTWOOD, J. P. BOORMAN, B. CANT, U. EVERSON, J. M. HUSSEY, J. D. JOLLEY, A. S. KNIGHT, K. KOCH, E. MEECH, S. NUTLAND, C. V. PROWSE, H. E. STEVENS, N. C. TAYLOR, G. R. WALTERS, N. M. WALKER, N. A. WATKINS, T. WINZER, R. W. JONES, W. L. MCARDLE, S. M. RING, D. P. STRACHAN, M. PEMBREY, G. BREEN, D. S. CLAIR, S. CAESAR, K. GORDON-SMITH, L. JONES, C. FRASER, E. K. GREEN, D. GROZEVA, M. L. HAMSHERE, P. A. HOLMANS, I. R. JONES, G. KIROV, V. MOSKIVINA, I. NIKOLOV, M. C. O'DONOVAN, M. J. OWEN, D. A. COLLIER, A. ELKIN, A. FARMER, R. WILLIAMSON, P. MCGUFFIN, A. H. YOUNG, I. N. FERRIER, S. G. BALL, A. J. BALMFORTH, J. H. BARRETT, T. D. BISHOP, M. M. ILES, A. MAQBOOL, N. YULDASHEVA, A. S. HALL, P. S. BRAUND, R. J. DIXON, M. MANGINO, S. STEVENS, J. R. THOMPSON, F. BREDIN, M. TREMELLING, M. PARKES, H. DRUMMOND, C. W. LEES, E. R. NIMMO, J. SATSANGI, S. A. FISHER, A. FORBES, C. M. LEWIS, C. M. ONNIE, N. J. PRESCOTT, J. SANDERSON, C. G. MATTHEW, J. BARBOUR, M. K. MOHIUDDIN, C. E. TODHUNTER, J. C. MANSFIELD, T. AHMAD, F. R. CUMMINGS, D. P. JEWELL, J. WEBSTER, M. J. BROWN, M. G. LATHROP, J. CONNELL, A. DOMINICZAK, C. A. B. MARCANO, B. BURKE, R. DOBSON, J. GUNGADOO, K. L. LEE, P. B. MUNROE, S. J. NEWHOUSE, A. ONIPINLA, C. WALLACE, M. XUE, M. CAULFIELD, M. FARRALL,

- A. BARTON, B. in RA GENETICS, G. S. S. B. S. COMMITTEE, I. N. BRUCE, H. DONOVAN, S. EYRE, P. D. GILBERT, S. L. HILDER, A. M. HINKS, S. L. JOHN, C. POTTER, A. J. SILMAN, D. P. M. SYMMONS, W. THOMSON, J. WORTHINGTON, D. B. DUNGER, B. WIDMER, T. M. FRAYLING, R. M. FREATHY, H. LANGO, J. R. B. PERRY, B. M. SHIELDS, M. N. WEEDON, A. T. HATTERSLEY, G. A. HITMAN, M. WALKER, K. S. ELLIOTT, C. J. GROVES, C. M. LINDGREN, N. W. RAYNER, N. J. TIMPSON, E. ZEGGINI, M. NEWPORT, G. SIRUGO, E. LYONS, F. VANNBERG, A. V. S. HILL, L. A. BRADBURY, C. FARRAR, J. J. POINTON, P. WORDSWORTH, M. A. BROWN, J. A. FRANKLYN, J. M. HEWARD, M. J. SIMMONDS, S. C. L. GOUGH, S. SEAL, B. C. S. C. (UK), M. R. STRATTON, N. RAHMAN, M. BAN, A. GORIS, S. J. SAWCER, A. COMPSTON, D. CONWAY, M. JALLOW, M. NEWPORT, G. SIRUGO, K. A. ROCKETT, S. J. BUMPSTEAD, A. CHANEY, K. DOWNES, M. J. R. GHORI, R. GWILLIAM, S. E. HUNT, M. INOUE, A. KENIRY, E. KING, R. MCGINNIS, S. POTTER, R. RAVINDRARAJAH, P. WHITTAKER, C. WIDDEN, D. WITHERS, N. J. CARDIN, D. DAVISON, T. FERREIRA, J. PEREIRA-GALE, I. B. HALLGRIMSDOTTIR, B. N. HOWIE, Z. SU, Y. Y. TEO, D. VUKCEVIC, D. BENTLEY, M. A. BROWN, A. COMPSTON, M. FARRALL, A. S. HALL, A. T. HATTERSLEY, A. V. S. HILL, M. PARKES, M. PEMBREY, M. R. STRATTON, S. L. MITCHELL, P. R. NEWBY, O. J. BRAND, J. CARR-SMITH, S. H. S. PEARCE, R. MCGINNIS, A. KENIRY, P. DELOUKAS, J. D. REVEILLE, X. ZHOU, A.-M. SIMS, A. DOWLING, J. TAYLOR, T. DOAN, J. C. DAVIS, L. SAVAGE, M. M. WARD, T. L. LEARCH, M. H. WEISMAN und M. BROWN (2007). Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nature Genetics* **39**(11): 1329–37.
- BUSTELO, X. R. (2001). Vav proteins, adaptors and cell signaling. *Oncogene* **20**(44): 6372–81.
- CADWELL, K., J. Y. LIU, S. L. BROWN, H. MIYOSHI, J. LOH, J. K. LENNERZ, C. KISHI, W. KC, J. A. CARRERO, S. HUNT, C. D. STONE, E. M. BRUNT, R. J. XAVIER, B. P. SLECKMAN, E. LI, N. MIZUSHIMA, T. S. STAPPENBECK und H. W. VIRGIN (2008). A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* **456**(7219): 259–63.
- CALKINS, B. M. (1989). A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases and Sciences* **34**(12): 1841–54.
- CALNE, R. Y., G. P. ALEXANDRE und J. E. MURRAY (1962). A study of the effects of drugs in prolonging survival of homologous renal transplants in dogs. *Annals of The New York Academy Of Sciences* **99**: 743–61.
- CANDY, S., J. WRIGHT, M. GERBER, G. ADAMS, M. GERIG und R. GOODMAN (1995). A controlled double blind study of azathioprine in the management of Crohn's disease. *Gut* **37**(5): 674–8.
- CANTRELL, D. A. (2003). GTPases and T cell activation. *Immunological Reviews* **192**: 122–30.
- CARGILL, M., S. J. SCHRODI, M. CHANG, V. E. GARCIA, R. BRANDON, K. P. CALLIS, N. MATSUNAMI, K. G. ARDLIE, D. CIVELLO, J. J. CATANESE, D. U. LEONG, J.

- M. PANKO, L. B. McALLISTER, C. B. HANSEN, J. PAPPENFUSS, S. M. PRESCOTT, T. J. WHITE, M. F. LEPPERT, G. G. KRUEGER und A. B. BEGOVICH (2007). A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *American Journal of Human Genetics* **80**(2): 273–90.
- CARIO, E. und D. K. PODOLSKY (2000). Differential Alteration in Intestinal Epithelial Cell Expression of Toll-Like Receptor 3 (TLR3) and TLR4 in Inflammatory Bowel Disease. *Infection and Immunity* **68**(12): 7010–7.
- CARNEY, D. M., C. F. ZUKOSKI und D. A. OGDEN (1974). Massive azathioprine overdose. Case report and review of the literature. *American Journal of Medicine* **56**(1): 133–6.
- CHAMAILLARD, M., D. PHILPOTT, S. E. GIRARDIN, H. ZOUALI, S. LESAGE, F. CHAREYRE, T. H. BUI, M. GIOVANNINI, U. ZAEHRINGER, V. PENARD-LACRONIQUE, P. J. SANSONETTI, J. P. HUGOT und G. THOMAS (2003). Gene-environment interaction modulated by allelic heterogeneity in inflammatory diseases. *Proceedings of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **100**(6): 3455–60.
- CHAN, G. L., G. R. ERDMANN, S. A. GRUBER, A. J. MATAS und D. M. CANAFAX (1990). Azathioprine metabolism: pharmacokinetics of 6-mercaptopurine, 6-thiouric acid and 6-thioguanine nucleotides in renal transplant patients. *Journal of Clinical Pharmacology* **30**(4): 358–63.
- CHIODINI, R. J., H. J. VAN KRUININGEN, R. S. MERKAL, J. THAYER W. R. und J. A. COUTU (1984). Characteristics of an unclassified Mycobacterium species isolated from patients with Crohn's disease. *Journal of Clinical Microbiology* **20**(5): 966–71.
- CHOCAIR, P. R., J. A. DULEY, H. A. SIMMONDS und J. S. CAMERON (1992). The importance of thiopurine methyltransferase activity for the use of azathioprine in transplant recipients. *Transplantation* **53**(5): 1051–6.
- CHRISTENSEN, L. A., J. F. DAHLERUP, M. J. NIELSEN, J. F. FALLINGBORG und K. SCHMIEGELOW (2008). Azathioprine treatment during lactation. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **28**(10): 1209–13.
- CHRZANOWSKA, M., P. KOLECKI, B. DUCZMAL-CICHOCKA und J. FIET (1999). Metabolites of mercaptopurine in red blood cells: a relationship between 6-thioguanine nucleotides and 6-methylmercaptopurine metabolite concentrations in children with lymphoblastic leukemia. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **8**(4): 329–34.
- CIMA, R. R. und J. H. PEMBERTON (2005). Medical and surgical management of chronic ulcerative colitis. *Archives of Surgery* **140**(3): 300–10.
- COLOMBEL, J. F., B. GRANDBASTIEN, C. GOWER-ROUSSEAU, S. PLEGAT, J. P. EVRARD, J. L. DUPAS, J. P. GENDRE, R. MODIGLIANI, J. BELAICHE, J. HOSTEIN, J. P. HUGOT, H. van KRUININGEN und A. CORTOT (1996). Clinical characteristics of Crohn's disease in 72 families. *Gastroenterology* **111**(3): 604–7.

- COLOMBEL, J. F., N. FERRARI, H. DEBUYSERE, P. MARTEAU, J. P. GENDRE, B. BONAZ, J. C. SOULE, R. MODIGLIANI, Y. TOUZE, P. CATALA, C. LIBERSA und F. BROLY (2000). Genotypic analysis of thiopurine S-methyltransferase in patients with Crohn's disease and severe myelosuppression during azathioprine therapy. *Gastroenterology* **118**(6): 1025–30.
- COLOMBEL, J. F., W. J. SANDBORN, W. REINISCH, G. J. MANTZARIS, A. KORNBLUTH, D. RACHMILEWITZ, S. LICHTIGER, G. D'HAENS, R. H. DIAMOND, D. L. BROUSSARD, K. L. TANG, C. J. van der WOUDE, P. RUTGEERTS und S. O. N. I. C. STUDY GROUP (2010). Infliximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease. *New England Journal of Medicine* **362**(15): 1383–95.
- CONNELL, W. R., M. A. KAMM, J. K. RITCHIE und J. E. LENNARD-JONES (1993). Bone marrow toxicity caused by azathioprine in inflammatory bowel disease: 27 years of experience. *Gut* **34**(8): 1081–5.
- CONNELL, W. R., I. C. TALBOT, N. HARPAZ, N. BRITTO, K. H. WILKINSON, M. A. KAMM und J. E. LENNARD-JONES (1994a). Clinicopathological characteristics of colorectal carcinoma complicating ulcerative colitis. *Gut* **35**(10): 1419–23.
- CONNELL, W. R., M. A. KAMM, M. DICKSON, A. M. BALKWILL, J. K. RITCHIE und J. E. LENNARD-JONES (1994b). Long-term neoplasia risk after azathioprine treatment in inflammatory bowel disease. *Lancet* **343**(8908): 1249–52.
- COOK, M. G. und M. F. DIXON (1973). An analysis of the reliability of detection and diagnostic value of various pathological features in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* **14**(4): 255–62.
- COOK, W. J. und C. E. BUGG (1975). Crystal structures of azathioprine dihydrate and 6-methylmercaptapurine trihydrate. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **64**(2): 221–25.
- CORTHESEY, B. (2007). Roundtrip ticket for secretory IgA: role in mucosal homeostasis? *Journal of Immunology* **178**(1): 27–32.
- COSNES, J., S. CATTAN, A. BLAIN, L. BEAUGERIE, F. CARBONNEL, R. PARC und J. P. GENDRE (2002). Long-term evolution of disease behavior of Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases* **8**(4): 244–50.
- COULTHARD, S. und L. HOGARTH (2005). The thiopurines: an update. *Investigational New Drugs* **23**(6): 523–32.
- COULTHARD, S. A., L. A. HOGARTH, M. LITTLE, E. C. MATHESON, C. P. F. REDFERN, L. MINTO und A. G. HALL (2002). The effect of thiopurine methyltransferase expression on sensitivity to thiopurine drugs. *Molecular Pharmacology* **62**(1): 102–9.
- CRABTREE, G. R. (2001). Calcium, calcineurin, and the control of transcription. *Journal of Biological Chemistry* **276**(4): 2313–6.
- CRUICKSHANK, S. M., L. D. McVAY, D. C. BAUMGART, P. J. FELSBURG und S. R. CARDING (2004). Colonic epithelial cell mediated suppression of CD4 T cell activation. *Gut* **53**(5): 678–84.

- CUFFARI, C., Y. THÉORËT, S. LATOUR und G. SEIDMAN (1996). 6-Mercaptopurine metabolism in Crohn's disease: correlation with efficacy and toxicity. *Gut* **39**(3): 401–6.
- CUFFARI, C., S. HUNT und T. M. BAYLESS (2000). Enhanced bioavailability of azathioprine compared to 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease: correlation with treatment efficacy. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **14**(8): 1009–14.
- CUFFARI, C., S. HUNT und T. BAYLESS (2001). Utilisation of erythrocyte 6-thioguanine metabolite levels to optimise azathioprine therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* **48**(5): 642–6.
- CUFFARI, C., D. Y. LI, J. MAHONEY, Y. BARNES und T. M. BAYLESS (2004a). Peripheral blood mononuclear cell DNA 6-thioguanine metabolite levels correlate with decreased interferon-gamma production in patients with Crohn's disease on AZA therapy. *Digestive Diseases and Sciences* **49**(1): 133–7.
- CUFFARI, C., T. DASSOPOULOS, L. TURNBOUGH, R. E. THOMPSON und T. M. BAYLESS (2004b). Thiopurine methyltransferase activity influences clinical response to azathioprine in inflammatory bowel disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **2**(5): 410–7.
- CUNLIFFE, R. N. und B. B. SCOTT (2002). Review article: monitoring for drug side-effects in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **16**(4): 647–62.
- CUTHBERT, A. P., S. A. FISHER, M. M. MIRZA, K. KING, J. HAMPE, P. J. CROUCHER, S. MASCHERETTI, J. SANDERSON, A. FORBES, J. MANSFIELD, S. SCHREIBER, C. M. LEWIS und C. G. MATHEW (2002). The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **122**(4): 867–74.
- DAMBACHER, J., F. BEIGEL, K. ZITZMANN, E. N. DE TONI, B. GOKE, H. M. DIEPOLDER, C. J. AUERNHAMMER und S. BRAND (2009). The role of the novel Th17 cytokine IL-26 in intestinal inflammation. *Gut* **58**(9): 1207–17.
- DAPERNO, M., R. SOSTEGNI, R. CANAPARO, L. SERPE, A. LAVAGNA, L. CROCELLÀ, F. CASTAGNO, A. VERNETTO, C. RIGAZIO, E. ERCOLE, S. D'ANTICO, A. PERA, G. ZARA und R. ROCCA (2009). Prospective study of the effects of concomitant medications on thiopurine metabolism in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **30**(8): 843–53.
- DARDALHON, V., A. AWASTHI, H. KWON, G. GALILEOS, W. GAO, R. A. SOBEL, M. MITSDOERFFER, T. B. STROM, W. ELYAMAN, I. C. HO, S. KHOURY, M. OUKKA und V. K. KUCHROO (2008). IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nature Immunology* **9**(12): 1347–55.
- DARFEUILLE-MICHAUD, A., C. NEUT, N. BARNICH, E. LEDERMAN, P. DI MARTINO, P. DESREUMAUX, L. GAMBIEZ, B. JOLY, A. CORTOT und J.-F. COLOMBEL (1998).

- Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **115**(6): 1405–13.
- DARFEUILLE-MICHAUD, A., J. BOUDEAU, P. BULOIS, C. NEUT, A.-L. GLASSER, N. BARNICH, M.-A. BRINGER, A. SWIDSINSKI, L. BEAUGERIE und J.-F. COLOMBEL (2004). High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* **127**(2): 412–21.
- DAVEY, M. P., T. M. MARTIN, S. R. PLANCK, J. LEE, D. ZAMORA und J. T. ROSENBAUM (2006). Human endothelial cells express NOD2/CARD15 and increase IL-6 secretion in response to muramyl dipeptide. *Microvascular Research* **71**(2): 103–7.
- DAYHARSH, G. A., E. V. LOFTUS JR., W. J. SANDBORN, W. J. TREMAINE, A. R. ZINSMEISTER, T. E. WITZIG, W. R. MACON und L. J. BURGART (2002). Epstein-Barr virus-positive lymphoma in patients with inflammatory bowel disease treated with azathioprine or 6-mercaptopurine. *Gastroenterology* **122**(1): 72–7.
- DAYTON, J. S., L. A. TURKA, C. B. THOMPSON und B. S. MITCHELL (1992). Comparison of the effects of mizoribine with those of azathioprine, 6-mercaptopurine, and mycophenolic acid on T lymphocyte proliferation and purine ribonucleotide metabolism. *Molecular Pharmacology* **41**(4): 671–6.
- DECAUX, G., F. PROSPERT, Y. HORSMANS und J. P. DESAGER (2000). Relationship between red cell mean corpuscular volume and 6-thioguanine nucleotides in patients treated with azathioprine. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **135**(3): 256–62.
- DEIBERT, P., K. DILGER, C. FISCHER, U. HOFMANN, S. NAUCK, S. STOELBEN und W. KREISEL (2003). High variation of thioguanine absorption in patients with chronic active Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **18**(2): 183–9.
- DERIJKS, L. J. J., D. J. de JONG, L. P. L. GILISSEN, L. G. J. B. ENGELS, P. M. HOOYMANS, J. B. M. J. JANSEN und C. J. J. MULDER (2003). 6-Thioguanine seems promising in azathioprine- or 6-mercaptopurine-intolerant inflammatory bowel disease patients: a short-term safety assessment. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* **15**(1): 63–7.
- DERIJKS, L. J. J., L. P. L. GILISSEN, L. G. J. B. ENGELS, L. P. BOS, P. J. BUS, J. J. H. M. LOHMAN, W. L. CURVERS, S. J. H. V. DEVENTER, D. W. HOMMES und P. M. HOOYMANS (2004). Pharmacokinetics of 6-mercaptopurine in patients with inflammatory bowel disease: implications for therapy. *Therapeutic Drug Monitoring* **26**(3): 311–8.
- DERVIEUX, T. und R. BOULIEU (1998). Simultaneous determination of 6-thioguanine and methyl 6-mercaptopurine nucleotides of azathioprine in red blood cells by HPLC. *Clinical Chemistry* **44**(3): 551–5.
- DERVIEUX, T., Y. MÉDARD, V. BAUDOIN, A. MAISIN, D. ZHANG, C. LOIRAT und E. JACQZ-AIGRAIN (2000). Monitoring azathioprine therapy in pediatric renal transplant patients with red blood cell thiopurine methyltransferase. *Transplantation Proceedings* **32**(2): 361–3.

- DESSEIN, R., M. CHAMAILLARD und S. DANESE (2008). Innate immunity in Crohn's disease: the reverse side of the medal. *Journal of Clinical Gastroenterology* **42 Suppl 3 Pt 1**: S144–7.
- DEWIT, O., R. VANHEUVERZWYN, J. P. DESAGER und Y. HORSMANS (2002). Interaction between azathioprine and aminosalicylates: an in vivo study in patients with Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **16**(1): 79–85.
- D'HAENS, G., L. LEMMENS, K. GEBOES, L. VANDEPUTTE, F. VAN ACKER, L. MORTELMANS, M. PEETERS, S. VERMEIRE, F. PENNINCKX, F. NEVENS, M. HIELE und P. RUTGEERTS (2001). Intravenous cyclosporine versus intravenous corticosteroids as single therapy for severe attacks of ulcerative colitis. *Gastroenterology* **120**(6): 1323–9.
- D'HAENS, G., F. BAERT, G. van ASSCHE, P. CAENEPEEL, P. VERGAUWE, H. TUYNMAN, M. DE VOS, S. van DEVENTER, L. STITT, A. DONNER, S. VERMEIRE, F. J. Van de MIEROP, J. C. COCHE, J. van der WOUDE, T. OCHSENKUHN, A. A. van BODEGRAVEN, P. P. VAN HOOTEGEM, G. L. LAMBRECHT, F. MANA, P. RUTGEERTS, B. G. FEAGAN und D. HOMMES (2008). Early combined immunosuppression or conventional management in patients with newly diagnosed Crohn's disease: an open randomised trial. *Lancet* **371**(9613): 660–7.
- D'HAENS, G. R., K. GEBOES, M. PEETERS, F. BAERT, F. PENNINCKX und P. RUTGEERTS (1998). Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. *Gastroenterology* **114**(2): 262–7.
- D'HALLUIN, P.-N., O. TRIBUT, B. BRANGER, C. LEBRETON, J.-F. BRETAGNE, D. BENTUE-FERRER und D. HERESBACH (2005). RBC 6-TGN and hematological parameters in patients with Crohn's disease treated by azathioprine. *Gastroenterologie Clinique Et Biologique* **29**(12): 1264–9.
- DHEIN, J., P. T. DANIEL, B. C. TRAUTH, A. OEHM, P. MOLLER und P. H. KRAMMER (1992). Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. *Journal of Immunology* **149**(10): 3166–73.
- DIGNASS, A. U., K. HERRLINGER und J. SCHÖLMERICH (2004). Ulcerative colitis. Chronic active course. *Zeitschrift Für Gastroenterologie* **42**(9): 1012–16.
- DIGNASS, A. U., F. HARTMANN, A. STURM und J. STEIN (2009). Management of inflammatory bowel diseases during pregnancy. *Digestive Diseases* **27**(3): 341–6.
- DISANZA, A., A. STEFFEN, M. HERTZOG, E. FRITTOLO, K. ROTTNER und G. SCITA (2005). Actin polymerization machinery: the finish line of signaling networks, the starting point of cellular movement. *Cellular and Molecular Life Sciences* **62**(9): 955–70.
- DOERING, J., B. BEGUE, M. J. LENTZE, F. RIEUX-LAUCAT, O. GOULET, J. SCHMITZ, N. CERF-BENSUSSAN und F. M. RUEMMELE (2004). Induction of T lymphocyte apoptosis by sulphasalazine in patients with Crohn's disease. *Gut* **53**(11): 1632–8.

- DOMENECH, E., E. GARCIA-PLANELLA, I. BERNAL, M. ROSINACH, E. CABRE, L. FLUVIA, J. BOIX und M. A. GASSULL (2002). Azathioprine without oral ciclosporin in the long-term maintenance of remission induced by intravenous ciclosporin in severe, steroid-refractory ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **16**(12): 2061–5.
- DOMÈNECH, E., S. CARRIÓN, E. GARCIA-PLANELLA, M. MAÑOSA, J. GORDILLO, M. CONCEPCIÓN, C. GUARNER und E. CABRÉ (2010). Smoking status and response to thiopurines in steroid-dependent inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*.
- DUBINSKY, M. C., S. LAMOTHE, H. Y. YANG, S. R. TARGAN, D. SINNETT, Y. THÉORËT und E. G. SEIDMAN (2000). Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **118**(4): 705–13.
- DUBINSKY, M. C., P. V. HASSARD, E. G. SEIDMAN, L. Y. KAM, M. T. ABREU, S. R. TARGAN und E. A. VASILIAUSKAS (2001). An open-label pilot study using thioguanine as a therapeutic alternative in Crohn's disease patients resistant to 6-mercaptopurine therapy. *Inflammatory Bowel Diseases* **7**(3): 181–9.
- DUBINSKY, M. C., H. YANG, P. V. HASSARD, E. G. SEIDMAN, L. Y. KAM, M. T. ABREU, S. R. TARGAN und E. A. VASILIAUSKAS (2002). 6-MP metabolite profiles provide a biochemical explanation for 6-MP resistance in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **122**(4): 904–15.
- DUCHMANN, R., J. HOFFMANN, T. MARTH, T. SCHNEIDER, A. STALLMACH und M. ZEITZ (1999). Mukosales Immunsystem im Darm - Immunologische Grundlagen chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen und der HIV-induzierten Enteropathie. *Magazin Forschung der Universität des Saarlandes* **1**: 47–64.
- DUERR, R. H., K. D. TAYLOR, S. R. BRANT, J. D. RIOUX, M. S. SILVERBERG, M. J. DALY, A. H. STEINHART, C. ABRAHAM, M. REGUEIRO, A. GRIFFITHS, T. DASSOPOULOS, A. BITTON, H. YANG, S. TARGAN, L. W. DATTA, E. O. KISTNER, L. P. SCHUMM, A. T. LEE, P. K. GREGERSEN, M. M. BARMADA, J. I. ROTTER, D. L. NICOLAE und J. H. CHO (2006). A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* **314**(5804): 1461–3.
- DUIST, M. M. van, M. ALBRECHT, M. PODSWIADEK, D. GIACHINO, T. LENGAUER, L. PUNZI und M. DE MARCHI (2005). A new CARD15 mutation in Blau syndrome. *European Journal of Human Genetics* **13**(6): 742–7.
- DULEY, J. A. und T. H. J. FLORIN (2005). Thiopurine therapies: problems, complexities, and progress with monitoring thioguanine nucleotides. *Therapeutic Drug Monitoring* **27**(5): 647–54.
- EADEN, J., K. ABRAMS, A. EKBOM, E. JACKSON und J. MAYBERRY (2000). Colorectal cancer prevention in ulcerative colitis: a case-control study. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **14**(2): 145–53.
- EADEN, J. A., K. R. ABRAMS und J. F. MAYBERRY (2001). The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* **48**(4): 526–35.

- EDWARDS, F. C. und S. C. TRUELOVE (1963). The Course and Prognosis of Ulcerative Colitis. *Gut* **4**: 299–315.
- EKBOM, A., H. O. ADAMI, C. G. HELMICK, A. JONZON und M. M. ZACK (1990). Perinatal risk factors for inflammatory bowel disease: a case-control study. *American Journal of Epidemiology* **132**(6): 1111–9.
- EKBOM, A., A. J. WAKEFIELD, M. ZACK und H. O. ADAMI (1994). Perinatal measles infection and subsequent Crohn's disease. *Lancet* **344**(8921): 508–10.
- EKLUND, B. I., M. MOBERG, J. BERGQUIST und B. MANNERVIK (2006). Divergent activities of human glutathione transferases in the bioactivation of azathioprine. *Molecular Pharmacology* **70**(2): 747–54.
- ELGEMEIE, G. H. (2003). Thioguanine, mercaptopurine: their analogs and nucleosides as antimetabolites. *Current Pharmaceutical Design* **9**(31): 2627–42.
- ELION, G. B. (1993). The George Hitchings and Gertrude Elion Lecture. The pharmacology of azathioprine. *Annals of The New York Academy Of Sciences* **685**: 400–7.
- ELION, G. B., S. CALLAHAN, R. W. RUNDLES und G. H. HITCHINGS (1963). Relationship between Metabolic Fates and Antitumor Activities of Thiopurines. *Cancer Research* **23**: 1207–17.
- ERB, N., D. O. HARMS und G. JANKA-SCHAUB (1998). Pharmacokinetics and metabolism of thiopurines in children with acute lymphoblastic leukemia receiving 6-thioguanine versus 6-mercaptopurine. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **42**(4): 266–72.
- ERDMANN, G. R., L. A. FRANCE, B. C. BOSTROM und D. M. CANAFAX (1990). 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. *Biomedical Chromatography* **4**(2): 47–51.
- ERI, R., J. R. JONSSON, N. PANDEYA, D. M. PURDIE, A. D. CLOUSTON, N. MARTIN, D. DUFFY, E. E. POWELL, J. FAWCETT, T. H. FLORIN und G. L. RADFORD-SMITH (2004). CCR5-Delta32 mutation is strongly associated with primary sclerosing cholangitis. *Genes Immun* **5**(6): 444–50.
- EWE, K., A. G. PRESS, C. C. SINGE, M. STUFLER, B. UEBERSCHAER, G. HOMMEL und K. H. Meyer zum BÜSCHENFELDE (1993). Azathioprine combined with prednisolone or monotherapy with prednisolone in active Crohn's disease. *Gastroenterology* **105**(2): 367–72.
- FARMER, R. G., W. A. HAWK und J. TURNBULL R. B. (1975). Clinical patterns in Crohn's disease: a statistical study of 615 cases. *Gastroenterology* **68**(4 Pt 1): 627–35.
- FAUBION W. A., J., E. V. LOFTUS JR., W. S. HARMSSEN, A. R. ZINSMEISTER und W. J. SANDBORN (2001). The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gastroenterology* **121**(2): 255–60.

- FAURE, S., L. I. SALAZAR-FONTANA, M. SEMICHON, V. L. J. TYBULEWICZ, G. BISMUTH, A. TRAUTMANN, R. N. GERMAIN und J. DELON (2004). ERM proteins regulate cytoskeleton relaxation promoting T cell-APC conjugation. *Nature Immunology* **5**(3): 272–9.
- FAZIO, V. W., Y. ZIV, J. M. CHURCH, J. R. OAKLEY, I. C. LAVERY, J. W. MILSOM und T. K. SCHROEDER (1995). Ileal pouch-anal anastomoses complications and function in 1005 patients. *Annals of Surgery* **222**(2): 120–7.
- FAZIO, V. W., F. MARCHETTI, M. CHURCH, J. R. GOLDBLUM, C. LAVERY, T. L. HULL, J. W. MILSOM, S. A. STRONG, J. R. OAKLEY und M. SECIC (1996). Effect of resection margins on the recurrence of Crohn's disease in the small bowel. A randomized controlled trial. *Annals of Surgery* **224**(4): 563–71; Diskussion 571–3.
- FEAGAN, B. G., R. N. FEDORAK, E. J. IRVINE, G. WILD, L. SUTHERLAND, A. H. STEINHART, G. R. GREENBERG, J. KOVAL, C. J. WONG, M. HOPKINS, S. B. HANAUER und J. W. McDONALD (2000). A comparison of methotrexate with placebo for the maintenance of remission in Crohn's disease. North American Crohn's Study Group Investigators. *New England Journal of Medicine* **342**(22): 1627–32.
- FERRERO-MILIANI, L., O. H. NIELSEN, P. S. ANDERSEN und S. E. GIRARDIN (2007). Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. *Clinical and Experimental Immunology* **147**(2): 227–35.
- FICHERA, A., S. LOVADINA, M. RUBIN, F. CIMINO, R. D. HURST und F. MICHELASSI (2006). Patterns and operative treatment of recurrent Crohn's disease: a prospective longitudinal study. *Surgery* **140**(4): 649–54.
- FIOCCHI, C. (2009). Susceptibility genes and overall pathogenesis of inflammatory bowel disease: where do we stand? *Digestive Diseases* **27**(3): 226–35.
- FISCHBACH, W. (1996). In: Therapiekonzepte Morbus Crohn – Colitis ulcerosa. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- FOOCHAROEN, C., S. TIAMKAO, J. SRINAKARIN, N. CHAMADOL und K. SAWANYAWISUTH (2006). Reversible posterior leukoencephalopathy caused by azathioprine in systemic lupus erythematosus. *Journal of The Medical Association Of Thailand* **89**(7): 1029–32.
- FOTOOHI, A. K., M. LINDQVIST, C. PETERSON und F. ALBERTIONI (2006a). Involvement of the concentrative nucleoside transporter 3 and equilibrative nucleoside transporter 2 in the resistance of T-lymphoblastic cell lines to thiopurines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **343**(1): 208–15.
- FOTOOHI, A. K., A. WRABEL, A. MOSHFEGH, C. PETERSON und F. ALBERTIONI (2006b). Molecular mechanisms underlying the enhanced sensitivity of thiopurine-resistant T-lymphoblastic cell lines to methyl mercaptopurineriboside. *Biochemical Pharmacology* **72**(7): 816–23.
- FOTOOHI, A. K., S. A. COULTHARD und F. ALBERTIONI (2010). Thiopurines: factors influencing toxicity and response. *Biochemical Pharmacology* **79**(9): 1211–20.

- FRANCELLA, A., A. DYAN, C. BODIAN, P. RUBIN, M. CHAPMAN und D. H. PRESENT (2003). The safety of 6-mercaptopurine for childbearing patients with inflammatory bowel disease: a retrospective cohort study. *Gastroenterology* **124**(1): 9–17.
- FRANK, D. N., A. L. ST. AMAND, R. A. FELDMAN, E. C. BOEDEKER, N. HARPAZ und N. R. PACE (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**(34): 13780–5.
- FRASER, A. G., T. R. ORCHARD, E. M. ROBINSON und D. P. JEWELL (2002a). Long-term risk of malignancy after treatment of inflammatory bowel disease with azathioprine. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **16**(7): 1225–32.
- FRASER, A. G., T. R. ORCHARD und D. P. JEWELL (2002b). The efficacy of azathioprine for the treatment of inflammatory bowel disease: a 30 year review. *Gut* **50**(4): 485–9.
- FRENCH, L. E. und J. TSCHOPP (2003). Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors. *Cell Death and Differentiation* **10**(1): 117–23.
- FRIES, W., M. C. RENDA, M. A. LO PRESTI, A. RASO, A. ORLANDO, L. OLIVA, M. R. GIOFRE, A. MAGGIO, A. MATTALIANO, A. MACALUSO und M. COTTONE (2005). Intestinal permeability and genetic determinants in patients, first-degree relatives, and controls in a high-incidence area of Crohn’s disease in Southern Italy. *American Journal of Gastroenterology* **100**(12): 2730–6.
- FRITZ, J. H. und S. E. GIRARDIN (2005). How Toll-like receptors and Nod-like receptors contribute to innate immunity in mammals. *Journal of Endotoxin Research* **11**(6): 390–4.
- FUENTES-PRIOR, P. und G. S. SALVESEN (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochemical Journal* **384**(Pt 2): 201–32.
- GARDINER, S. J., R. B. GEARRY, M. J. BURT, S. L. DING und M. L. BARCLAY (2008). Severe hepatotoxicity with high 6-methylmercaptopurine nucleotide concentrations after thiopurine dose escalation due to low 6-thioguanine nucleotides. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* **20**(12): 1238–42.
- GARDINER, S. J., R. B. GEARRY, M. J. BURT, T. CHALMERS-WATSON, B. A. CHAPMAN, A. G. ROSS, C. A. M. STEDMAN, A. HUELSEN und M. L. BARCLAY (2011). Allopurinol might improve response to azathioprine and 6-mercaptopurine by correcting an unfavorable metabolite ratio. *J Gastroenterol Hepatol* **26**(1): 49–54.
- GARSIDE, P. und A. M. MOWAT (2001). Oral tolerance. *Seminars In Immunology* **13**(3): 177–85.
- GASCHE, C., J. SCHOLMERICH, J. BRYNSKOV, G. D’HAENS, S. B. HANAUER, E. J. IRVINE, D. P. JEWELL, D. RACHMILEWITZ, D. B. SACHAR, W. J. SANDBORN und L. R. SUTHERLAND (2000). A simple classification of Crohn’s disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflammatory Bowel Diseases* **6**(1): 8–15.

- GAUTREAU, A., D. LOUWARD und M. ARPIN (2002). ERM proteins and NF2 tumor suppressor: the Yin and Yang of cortical actin organization and cell growth signaling. *Current Opinion In Cell Biology* **14**(1): 104–9.
- GEARRY, R. B. und M. L. BARCLAY (2005). Azathioprine and 6-mercaptopurine pharmacogenetics and metabolite monitoring in inflammatory bowel disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **20**(8): 1149–57.
- GENESTIER, L., R. PAILLOT, S. FOURNEL, C. FERRARO, P. MIOSSEC und J. P. REVILLARD (1998). Immunosuppressive properties of methotrexate: apoptosis and clonal deletion of activated peripheral T cells. *Journal of Clinical Investigation* **102**(2): 322–8.
- GENT, A. E., M. D. HELLIER, R. H. GRACE, E. T. SWARBRICK und D. COGGON (1994). Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet* **343**(8900): 766–7.
- GILISSEN, L. P. L., L. J. J. DERIJKS, L. P. BOS, P. J. BUS, P. M. HOOYMANS und L. G. J. B. ENGELS (2004). Therapeutic drug monitoring in patients with inflammatory bowel disease and established azathioprine therapy. *Clin Drug Investig* **24**(8): 479–86.
- GILISSEN, L. P. L., J. BIERAU, L. J. J. DERIJKS, L. P. BOS, P. M. HOOYMANS, A. van GENNIP, R. W. STOCKBRÜGGER und L. G. J. B. ENGELS (2005). The pharmacokinetic effect of discontinuation of mesalazine on mercaptopurine metabolite levels in inflammatory bowel disease patients. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **22**(7): 605–11.
- GIRARDIN, S. E., I. G. BONECA, J. VIALA, M. CHAMAILLARD, A. LABIGNE, G. THOMAS, D. J. PHILPOTT und P. J. SANSONETTI (2003). Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *Journal of Biological Chemistry* **278**(11): 8869–72.
- GISBERT, J. P. und F. GOMOLLÓN (2008). Thiopurine-induced myelotoxicity in patients with inflammatory bowel disease: a review. *American Journal of Gastroenterology* **103**(7): 1783–1800.
- GISBERT, J. P., F. GOMOLLÓN, C. CARA, M. LUNA, Y. GONZÁLEZ-LAMA, J. M. PAJARES, J. MATÉ und L. G. GUIJARRO (2007). Thiopurine methyltransferase activity in Spain: a study of 14,545 patients. *Digestive Diseases and Sciences* **52**(5): 1262–9.
- GLASSER, A.-L., J. BOUDEAU, N. BARNICH, M.-H. PERRUCHOT, J.-F. COLOMBEL und A. DARFEUILLE-MICHAUD (2001). Adherent Invasive Escherichia coli Strains from Patients with Crohn's Disease Survive and Replicate within Macrophages without Inducing Host Cell Death. *Infection and Immunity* **69**(9): 5529–37.
- GOCKEL, H. R., A. LÜGERING, J. HEIDEMANN, M. SCHMIDT, W. DOMSCHKE, T. KUCHARZIK und N. LÜGERING (2004). Thalidomide induces apoptosis in human monocytes by using a cytochrome c-dependent pathway. *Journal of Immunology* **172**(8): 5103–9.

- GOLDENBERG, B. A., P. RAWSTHORNE und C. N. BERNSTEIN (2004). The utility of 6-thioguanine metabolite levels in managing patients with inflammatory bowel disease. *American Journal of Gastroenterology* **99**(9): 1744–8.
- GONVERS, J. J., P. JUILLERAT, C. MOTTET, C. FELLE, B. BURNAND, J. P. VADER, P. MICHETTI und F. FROEHLICH (2005). Maintenance of remission in Crohn's disease. *Digestion* **71**(1): 41–8.
- GONVERS, J. J., P. JUILLERAT, C. MOTTET, V. PITTET, C. FELLE, J. P. VADER, P. MICHETTI und F. FROEHLICH (2007). Maintenance of medically induced remission of Crohn's disease. *Digestion* **76**(2): 116–29.
- GORFINE, S. R., J. J. BAUER, M. T. HARRIS und I. KREEL (2000). Dysplasia complicating chronic ulcerative colitis: is immediate colectomy warranted? *Diseases of The Colon and Rectum* **43**(11): 1575–81.
- GRAAF, P. de, N. K. H. de BOER, D. R. WONG, S. KARNER, B. JHARAP, P. M. HOOYMANS, A. I. VELDKAMP, C. J. J. MULDER, A. A. van BODEGRAVEN und M. SCHWAB (2010a). Influence of 5-aminosalicylic acid on 6-thioguanosine phosphate metabolite levels: a prospective study in patients under steady thiopurine therapy. *British Journal of Pharmacology* **160**(5): 1083–1091.
- GRAAF, P. de, R. M. VOS, N. H. K. de BOER, A. SINJEWEL, B. JHARAP, C. J. J. MULDER, A. A. van BODEGRAVEN und A. I. VELDKAMP (2010b). Limited stability of thiopurine metabolites in blood samples: relevant in research and clinical practise. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **878**(19): 1437–42.
- GRAAF, P. de, N. K. H. de BOER, B. JHARAP, C. J. J. MULDER, A. A. van BODEGRAVEN und A. I. VELDKAMP (2008). Stability of thiopurine metabolites: a potential analytical bias. *Clinical Chemistry* **54**(1): 216–18.
- GREENSTEIN, A. J., H. D. JANOWITZ und D. B. SACHAR (1976). The extra-intestinal complications of Crohn's disease and ulcerative colitis: a study of 700 patients. *Medicine* **55**(5): 401–12.
- GROSS, A., J. M. MCDONNELL und S. J. KORSMEYER (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes and Development* **13**(15): 1899–911.
- GUPTA, P., R. GOKHALE und B. S. KIRSCHNER (2001). 6-mercaptopurine metabolite levels in children with inflammatory bowel disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **33**(4): 450–4.
- GUYATT, G., A. MITCHELL, E. J. IRVINE, J. SINGER, N. WILLIAMS, R. GOODACRE und C. TOMPKINS (1989). A new measure of health status for clinical trials in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **96**(3): 804–10.
- HAGLUND, S., J. TAIPALENSUU, C. PETERSON und S. ALMER (2008). IMPDH activity in thiopurine-treated patients with inflammatory bowel disease - relation to TPMT activity and metabolite concentrations. *British Journal of Clinical Pharmacology* **65**(1): 69–77.

- HAINES, M. L., Y. AJLOUNI, P. M. IRVING, M. P. SPARROW, R. ROSE, R. B. GEARRY und P. R. GIBSON (2010). Clinical usefulness of therapeutic drug monitoring of thiopurines in patients with inadequately controlled inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*.
- HALFVARSON, J., L. BODIN, C. TYSK, E. LINDBERG und G. JARNEROT (2003). Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology* **124**(7): 1767–73.
- HALL, A. (2005). Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochemical Society Transactions* **33**(Pt 5): 891–5.
- HALONEN, P., J. MATTILA, A. MÄKIPERNA, T. RUUSKA und K. SCHMIEGELLOW (2006). Erythrocyte concentrations of metabolites or cumulative doses of 6-mercaptopurine and methotrexate do not predict liver changes in children treated for acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Blood and Cancer* **46**(7): 762–6.
- HAMPE, J., A. CUTHBERT, P. J. CROUCHER, M. M. MIRZA, S. MASCHERETTI, S. FISHER, H. FRENZEL, K. KING, A. HASSELMAYER, A. J. MACPHERSON, S. BRIDGER, S. van DEVENTER, A. FORBES, S. NIKOLAUS, J. E. LENNARD-JONES, U. R. FOELSCH, M. KRAWCZAK, C. LEWIS, S. SCHREIBER und C. G. MATHEW (2001). Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* **357**(9272): 1925–8.
- HANAI, H., T. IIDA, K. TAKEUCHI, O. ARAI, F. WATANABE, J. ABE, Y. MARUYAMA, A. OOHATA, K. IKEYA, M. KAGEOKA, I. MIWA, S. YOSHIROU, Y. HOSODA und T. KUBOTA (2010). Thiopurine maintenance therapy for ulcerative colitis: the clinical significance of monitoring 6-thioguanine nucleotide. *Inflammatory Bowel Diseases* **16**(8): 1376–81.
- HANAUER, S. B. (2003). Crohn's disease: step up or top down therapy. *Best Practice and Research. Clinical Gastroenterology* **17**(1): 131–7.
- HANDE, S., N. WILSON-RICH, A. BOUSVAROS, A. ZHOLUDEV, R. MAURER, P. BANKS, F. MAKRAUER, S. REDDY, R. BURAKOFF und S. FRIEDMAN (2006). 5-aminosalicylate therapy is associated with higher 6-thioguanine levels in adults and children with inflammatory bowel disease in remission on 6-mercaptopurine or azathioprine. *Inflammatory Bowel Diseases* **12**(4): 251–7.
- HARMS, D. O., U. GÖBEL, H. J. SPAAR, U. B. GRAUBNER, N. JORCH, P. GUTJAHR und G. E. JANKA-SCHAUB (2003). Thioguanine offers no advantage over mercaptopurine in maintenance treatment of childhood ALL: results of the randomized trial COALL-92. *Blood* **102**(8): 2736–40.
- HARPER, P. H., E. C. LEE, M. G. KETTLEWELL, M. K. BENNETT und D. P. JEWELL (1985). Role of the faecal stream in the maintenance of Crohn's colitis. *Gut* **26**(3): 279–84.
- HARRIES, A. D., A. BAIRD und J. RHODES (1982). Non-smoking: a feature of ulcerative colitis. *Br Med J (Clin Res Ed)* **284**(6317): 706.

- HART, A. L., H. O. AL-HASSI, R. J. RIGBY, S. J. BELL, A. V. EMMANUEL, S. C. KNIGHT, M. A. KAMM und A. J. STAGG (2005). Characteristics of Intestinal Dendritic Cells in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* **129**(1): 50–65.
- HARTON, J. A., M. W. LINHOFF, J. ZHANG und J. P. TING (2002). Cutting edge: CATERPILLER: a large family of mammalian genes containing CARD, pyrin, nucleotide-binding, and leucine-rich repeat domains. *Journal of Immunology* **169**(8): 4088–93.
- HAWTHORNE, A. B., R. F. LOGAN, C. J. HAWKEY, P. N. FOSTER, A. T. AXON, E. T. SWARBRICK, B. B. SCOTT und J. E. LENNARD-JONES (1992). Randomised controlled trial of azathioprine withdrawal in ulcerative colitis. *BMJ (Clinical Research Ed.)* **305**(6844): 20–2.
- HEDELAND, R. L., K. HVIDT, J. NERSTING, S. ROSTHØJ, K. DALHOFF, B. LAUSEN und K. SCHMIEGELOW (2010). DNA incorporation of 6-thioguanine nucleotides during maintenance therapy of childhood acute lymphoblastic leukaemia and non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **66**(3): 485–91.
- HEEL, D. A. van, S. A. FISHER, A. KIRBY, M. J. DALY, J. D. RIOUX und C. M. LEWIS (2004). Inflammatory bowel disease susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis of 1952 affected relative pairs. *Human Molecular Genetics* **13**(7): 763–70.
- HENEGHAN, M. A., M. L. ALLAN, J. D. BORNSTEIN, A. J. MUIR und D. A. TENDLER (2006). Utility of thiopurine methyltransferase genotyping and phenotyping, and measurement of azathioprine metabolites in the management of patients with autoimmune hepatitis. *Journal of Hepatology* **45**(4): 584–91.
- HENGARTNER, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**(6805): 770–6.
- HERRLINGER, K. R., K. FELLERMANN, C. FISCHER, W. KREISEL, P. DEIBERT, J. SCHÖLMERICH, W. E. FLEIG, A. RUHL, M. REINSHAGEN, R. GREINWALD, E. F. STANGE und M. SCHWAB (2004). Thioguanine-nucleotides do not predict efficacy of tioguanine in Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **19**(12): 1269–76.
- HILDEMAN, D., T. JORGENSEN, J. KAPPLER und P. MARRACK (2007). Apoptosis and the homeostatic control of immune responses. *Current Opinion In Immunology* **19**(5): 516–21.
- HINDORF, U., E. LYRENÄS, A. NILSSON und K. SCHMIEGELOW (2004a). Monitoring of long-term thiopurine therapy among adults with inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **39**(11): 1105–12.
- HINDORF, U., M. LINDQVIST, C. PETERSON, P. SÖDERKVIST, M. STRÖM, H. HJORTSWANG, A. POUSETTE und S. ALMER (2006). Pharmacogenetics during standardised initiation of thiopurine treatment in inflammatory bowel disease. *Gut* **55**(10): 1423–31.
- HINDORF, U., C. PETERSON und S. ALMER (2004b). Assessment of thiopurine methyltransferase and metabolite formation during thiopurine therapy: results from a large Swedish patient population. *Therapeutic Drug Monitoring* **26**(6): 673–8.

- HINDORF, U., K. JAHED, A. BERGQUIST, H. VERBAAN, H. PRYTZ, S. WALLERSTEDT, M. WERNER, R. OLSSON, E. BJÖRNSSON, C. PETERSON und S. H. C. ALMER (2010). Characterisation and utility of thiopurine methyltransferase and thiopurine metabolite measurements in autoimmune hepatitis. *Journal of Hepatology* **52**(1): 106–11.
- HISAMATSU, T., M. SUZUKI, H. C. REINECKER, W. J. NADEAU, B. A. McCORMICK und D. K. PODOLSKY (2003). CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **124**(4): 993–1000.
- HITCHINGS, G. H. und G. B. ELION (Okt. 1962): Purine Derivatives. Burroughs Wellcome & Co. (U.S.A.) Inc., Tuckahoe, New York. Patent US3056785 (United States).
- HOFFMANN, J. C. (2009a). In: HOFFMANN, J. C. (Hrsg.): Medikamentöse Therapie in Orientierung an der Klinik: Morbus Crohn. *Chronisch entzündliche Darmerkrankungen*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 220.
- HOFFMANN, J. C., M. ZEITZ, S. C. BISCHOFF, H. J. BRAMBS, H. P. BRUCH, H. J. BUHR, A. DIGNASS, I. FISCHER, W. FLEIG, U. R. FOLSCH, K. HERRLINGER, W. HOHNE, G. JANTSCHKEK, B. KALTZ, K. M. KELLER, U. KNEBEL, A. J. KROESEN, W. KRUIS, H. MATTHES, G. MOSER, S. MUNDT, C. POX, M. REINSHAGEN, A. REISSMANN, J. RIEMANN, G. ROGLER, W. SCHMIEGEL, J. SCHOLMERICH, S. SCHREIBER, O. SCHWANDNER, H. K. SELBMANN, E. F. STANGE, M. UTZIG und C. WITTEKIND (2004). Diagnosis and therapy of ulcerative colitis: results of an evidence based consensus conference by the German society of Digestive and Metabolic Diseases and the competence network on inflammatory bowel disease. *Zeitschrift Fur Gastroenterologie* **42**(9): 979–83.
- HOFFMANN, J. C., J. C. PREISS, F. AUTSCHBACH, H. J. BUHR, W. HÄUSER, K. HERRLINGER, W. HÖHNE, S. KOLETZKO, C. F. KRIEGLSTEIN, W. KRUIS, H. MATTHES, G. MOSER, M. REINSHAGEN, G. ROGLER, S. SCHREIBER, A. G. SCHREYER, B. SIDO, B. SIEGMUND, A. STALLMACH, B. BOKEMEYER, E. F. STANGE und M. ZEITZ (2008a). Clinical practice guideline on diagnosis and treatment of Crohn's disease. *Zeitschrift Fur Gastroenterologie* **46**(9): 1094–146.
- HOFFMANN, J. C., J. C. PREISS, F. AUTSCHBACH, H. J. BUHR, W. HAUSER, K. HERRLINGER, W. HOHNE, S. KOLETZKO, C. F. KRIEGLSTEIN, W. KRUIS, H. MATTHES, G. MOSER, M. REINSHAGEN, G. ROGLER, S. SCHREIBER, A. G. SCHREYER, B. SIDO, B. SIEGMUND, A. STALLMACH, B. BOKEMEYER, E. F. STANGE und M. ZEITZ (2008b). S3-Leitlinie "Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn". *Zeitschrift Fur Gastroenterologie* **46**(9): 1098.
- HOFFMANN, J. C., J. C. PREISS, F. AUTSCHBACH, H. J. BUHR, W. HAUSER, K. HERRLINGER, W. HOHNE, S. KOLETZKO, C. F. KRIEGLSTEIN, W. KRUIS, H. MATTHES, G. MOSER, M. REINSHAGEN, G. ROGLER, S. SCHREIBER, A. G. SCHREYER, B. SIDO, B. SIEGMUND, A. STALLMACH, B. BOKEMEYER, E. F. STANGE und M. ZEITZ (2008c). S3-Leitlinie "Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn". *Zeitschrift Fur Gastroenterologie* **46**(9): 1099.

- HOFFMANN, M., J. RYCHLEWSKI, M. CHRZANOWSKA und T. HERMANN (2001). Mechanism of activation of an immunosuppressive drug: azathioprine. Quantum chemical study on the reaction of azathioprine with cysteine. *Journal of the American Chemical Society* **123**(26): 6404–9.
- HOFFMANN, M., M. CHRZANOWSKA, T. HERMANN und J. RYCHLEWSKI (2005). Modeling of purine derivatives transport across cell membranes based on their partition coefficient determination and quantum chemical calculations. *Journal of Medicinal Chemistry* **48**(13): 4482–6.
- HOFFMANN, R. M. (2009b). In: HOFFMANN, J. C. (Hrsg.): *Medikamentöse Therapie in Orientierung an der Klinik: Colitis ulcerosa. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 241.
- HOLTMANN, M., O. SCHREINER, H. KÖHLER, U. DENZER, M. NEURATH, P. R. GALLE und T. HÖHLER (2003). Veno-occlusive disease (VOD) in Crohn's disease (CD) treated with azathioprine. *Digestive Diseases and Sciences* **48**(8): 1503–5.
- HOLTMANN, M. H., F. KRUMMENAUER, C. CLAAS, K. KREMEYER, D. LORENZ, O. RAINER, I. VOGEL, U. BOCKER, S. BOHM, C. BUNING, R. DUCHMANN, G. GERKEN, H. HERFARTH, N. LUGERING, W. KRUIS, M. REINSHAGEN, J. SCHMIDT, A. STALLMACH, J. STEIN, A. STURM, P. R. GALLE, D. W. HOMMES, G. D'HAENS, P. RUTGEERTS und M. F. NEURATH (2006). Long-term effectiveness of azathioprine in IBD beyond 4 years: a European multicenter study in 1176 patients. *Digestive Diseases and Sciences* **51**(9): 1516–24.
- HOMMEL, K. A., C. M. DAVIS und R. N. BALDASSANO (2009). Objective versus subjective assessment of oral medication adherence in pediatric inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases* **15**(4): 589–93.
- HOOPER, L. V., T. MIDTVEDT und J. I. GORDON (2002). How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual Review of Nutrition* **22**: 283–307.
- HOOVER, S. und R. STRIKER (2008). Thiopurines inhibit bovine viral diarrhea virus production in a thiopurine methyltransferase-dependent manner. *Journal of General Virology* **89**(Pt 4): 1000–9.
- HORIGOME, A., T. HIRANO, K. OKA, H. TAKEUCHI, E. SAKURAI, K. KOZAKI, N. MATSUNO, T. NAGAO und M. KOZAKI (1997). Glucocorticoids and cyclosporine induce apoptosis in mitogen-activated human peripheral mononuclear cells. *Immunopharmacology* **37**(1): 87–94.
- HOUNNOU, G., C. DESTRIEUX, J. DESME, P. BERTRAND und S. VELUT (2002). Anatomical study of the length of the human intestine. *Surgical and Radiologic Anatomy* **24**(5): 290–4.
- HOVE, T. ten, C. van MONTFRANS, M. P. PEPPELENBOSCH und S. J. van DEVENTER (2002). Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. *Gut* **50**(2): 206–11.

- HUGOT, J. P., M. CHAMAILLARD, H. ZOUALI, S. LESAGE, J. P. CEZARD, J. BELACHE, S. ALMER, C. TYSK, C. A. O'MORAIN, M. GASSULL, V. BINDER, Y. FINKEL, A. CORTOT, R. MODIGLIANI, P. LAURENT-PUIG, C. GOWER-ROUSSEAU, J. MACRY, J. F. COLOMBEL, M. SAHBATOU und G. THOMAS (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**(6837): 599–603.
- HUIJSDENS, X. W., R. K. LINSKENS, M. MAK, S. G. M. MEUWISSEN, C. M. J. E. VANDENBROUCKE-GRAULS und P. H. M. SAVELKOUL (2002). Quantification of Bacteria Adherent to Gastrointestinal Mucosa by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **40**(12): 4423–7.
- HYDE, G. M. und D. P. JEWELL (1997). Review article: the management of severe ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **11**(3): 419–24.
- IERARDI, E., M. PRINCIPI, R. FRANCAVILLA, A. PISANI, M. RENDINA, M. INGROSSO, F. W. GUGLIELMI, C. PANELLA und A. FRANCAVILLA (2001). Oral tacrolimus long-term therapy in patients with Crohn's disease and steroid resistance. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **15**(3): 371–7.
- INA, K., J. ITOH, K. FUKUSHIMA, K. KUSUGAMI, T. YAMAGUCHI, K. KYOKANE, A. IMADA, D. G. BINION, A. MUSSO, G. A. WEST, G. M. DOBREA, T. S. MCCORMICK, E. G. LAPETINA, A. D. LEVINE, C. A. OTTAWAY und C. FIOCCHI (1999). Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance. *Journal of Immunology* **163**(2): 1081–90.
- INNOCENTI, F., R. DANESI, C. FAVRE, M. NARDI, M. C. MENCONI, A. D. PAOLO, G. BOCCI, S. FOGLI, C. BARBARA, S. BARACHINI, G. CASAZZA, P. MACCHIA und M. D. TACCA (2000). Variable correlation between 6-mercaptopurine metabolites in erythrocytes and hematologic toxicity: implications for drug monitoring in children with acute lymphoblastic leukemia. *Therapeutic Drug Monitoring* **22**(4): 375–82.
- INOHARA, N., Y. OGURA, A. FONTALBA, O. GUTIERREZ, F. PONS, J. CRESPO, K. FUKASE, S. INAMURA, S. KUSUMOTO, M. HASHIMOTO, S. J. FOSTER, A. P. MORAN, J. L. FERNANDEZ-LUNA und G. NUNEZ (2003). Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *Journal of Biological Chemistry* **278**(8): 5509–12.
- INOUE, N., K. TAMURA, Y. KINOCHI, Y. FUKUDA, S. TAKAHASHI, Y. OGURA, N. INOHARA, G. NUNEZ, Y. KISHI, Y. KOIKE, T. SHIMOSEGAWA, T. SHIMOYAMA und T. HIBI (2002). Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **123**(1): 86–91.
- IRVINE, E. J. und J. K. MARSHALL (2000). Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk. *Gastroenterology* **119**(6): 1740–4.
- IRVINE, E. J., B. FEAGAN, J. ROCHON, A. ARCHAMBAULT, R. N. FEDORAK, A. GROLL, D. KINNEAR, F. SAIBIL und J. W. McDONALD (1994). Quality of life: a valid and reliable measure of therapeutic efficacy in the treatment of inflam-

- matory bowel disease. Canadian Crohn's Relapse Prevention Trial Study Group. *Gastroenterology* **106**(2): 287–96.
- ITOH, J., C. de LA MOTTE, S. A. STRONG, A. D. LEVINE und C. FIOCCHI (2001). Decreased Bax expression by mucosal T cells favours resistance to apoptosis in Crohn's disease. *Gut* **49**(1): 35–41.
- ITOH, N., S. YONEHARA, A. ISHII, M. YONEHARA, S. MIZUSHIMA, M. SAMESHIMA, A. HASE, Y. SETO und S. NAGATA (1991). The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* **66**(2): 233–43.
- ITZKOWITZ, S. H. und D. H. PRESENT (2005). Consensus conference: Colorectal cancer screening and surveillance in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases* **11**(3): 314–21.
- IVEN, H. (1996). In: KUHLMANN, J. und U. KLOTZ (Hrsg.): Methylation of 6-mercaptopurine and 6-thioguanine in renal transplant recipients on azathioprine treatment. *Clinical Pharmacology and Oncology*. München: Zuckschwerdt Verlag; 89–95.
- JACKSON, R. C., G. WEBER und H. P. MORRIS (1975). IMP dehydrogenase, an enzyme linked with proliferation and malignancy. *Nature* **256**(5515): 331–3.
- JENKINS, D., M. BALSITIS, S. GALLIVAN, M. F. DIXON, H. M. GILMOUR, N. A. SHEPHERD, A. THEODOSSI und G. T. WILLIAMS (1997). Guidelines for the initial biopsy diagnosis of suspected chronic idiopathic inflammatory bowel disease. The British Society of Gastroenterology Initiative. *Journal of Clinical Pathology* **50**(2): 93–105.
- JESS, T., E. V. LOFTUS JR., F. S. VELAYOS, W. S. HARMSSEN, A. R. ZINSMEISTER, T. C. SMYRK, C. D. SCHLECK, W. J. TREMAINE, L. J. MELTON 3RD, P. MUNKHOLM und W. J. SANDBORN (2006). Risk of intestinal cancer in inflammatory bowel disease: a population-based study from olmsted county, Minnesota. *Gastroenterology* **130**(4): 1039–46.
- JESS, T., E. V. LOFTUS JR., F. S. VELAYOS, K. V. WINTHER, W. J. TREMAINE, A. R. ZINSMEISTER, W. SCOTT HARMSSEN, E. LANGHOLZ, V. BINDER, P. MUNKHOLM und W. J. SANDBORN (2007). Risk factors for colorectal neoplasia in inflammatory bowel disease: a nested case-control study from Copenhagen county, Denmark and Olmsted county, Minnesota. *American Journal of Gastroenterology* **102**(4): 829–36.
- JOHNSON, P. J., I. G. MCFARLANE und R. WILLIAMS (1995). Azathioprine for long-term maintenance of remission in autoimmune hepatitis. *New England Journal of Medicine* **333**(15): 958–63.
- JØRGENSEN, L. G. M., L. FREDHOLM, P. H. PETERSEN, H. HEY, P. MUNKHOLM und I. BRANDSLUND (2005). How accurate are clinical activity indices for scoring of disease activity in inflammatory bowel disease (IBD)? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **43**(4): 403–11.
- KAMAL, M. A. und W. J. JUSKO (2004). Interactions of prednisolone and other immunosuppressants used in dual treatment of systemic lupus erythematosus in lymphocyte proliferation assays. *Journal of Clinical Pharmacology* **44**(9): 1034–45.

- KAMM, M. A. (2004). Review article: chronic active disease and maintaining remission in Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **20 Suppl 4**: 102–5.
- KANDIEL, A., A. G. FRASER, B. I. KORELITZ, C. BRENSINGER und J. D. LEWIS (2005). Increased risk of lymphoma among inflammatory bowel disease patients treated with azathioprine and 6-mercaptopurine. *Gut* **54**(8): 1121–5.
- KARNER, S., S. SHI, C. FISCHER, E. SCHÄFFELER, M. F. NEURATH, K. R. HERRLINGER, U. HOFMANN und M. SCHWAB (2010). Determination of 6-thioguanosine diphosphate and triphosphate and nucleoside diphosphate kinase activity in erythrocytes: novel targets for thiopurine therapy? *Therapeutic Drug Monitoring* **32**(2): 119–28.
- KARRAN, P. (2001). Mechanisms of tolerance to DNA damaging therapeutic drugs. *Carcinogenesis* **22**(12): 1931–7.
- KASKAS, B. A., E. LOUIS, U. HINDORF, E. SCHAEFFELER, J. DEFLANDRE, F. GRAEPLER, K. SCHMIEGELOW, M. GREGOR, U. M. ZANGER, M. EICHELBAUM und M. SCHWAB (2003). Safe treatment of thiopurine S-methyltransferase deficient Crohn's disease patients with azathioprine. *Gut* **52**(1): 140–2.
- KERR, J. F., A. H. WYLLIE und A. R. CURRIE (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* **26**(4): 239–57.
- KEUZENKAMP-JANSEN, C. W., R. A. D. ABREU, J. P. BÖKKERINK und J. M. TRIJBELS (1995). Determination of extracellular and intracellular thiopurines and methylthiopurines by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B, Biomedical Applications* **672**(1): 53–61.
- KIRK, A. P. und J. E. LENNARD-JONES (1982). Controlled trial of azathioprine in chronic ulcerative colitis. *Br Med J (Clin Res Ed)* **284**(6325): 1291–2.
- KIRSCHNER, B. S. (1998). Safety of azathioprine and 6-mercaptopurine in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **115**(4): 813–21.
- KIRSNER, J. B. (1991). Inflammatory bowel disease. Part II: Clinical and therapeutic aspects. *Disease-A-Month* **37**(11): 669–746.
- KOLETZKO, S., P. SHERMAN, M. COREY, A. GRIFFITHS und C. SMITH (1989). Role of infant feeding practices in development of Crohn's disease in childhood. *BMJ (Clinical Research Ed.)* **298**(6688): 1617–8.
- KOONIN, E. V. und L. ARAVIND (2000). The NACHT family - a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation. *Trends In Biochemical Sciences* **25**(5): 223–4.
- KRATZER, W., C. von TIRPITZ, R. MASON, M. REINSHAGEN, G. ADLER, P. MOLLER, A. RIEBER und V. KACHELE (2002). Contrast-enhanced power Doppler sonography of the intestinal wall in the differentiation of hypervascularized and hypovascularized intestinal obstructions in patients with Crohn's disease. *Journal of Ultrasound In Medicine* **21**(2): 149–57.

- KRÖPLIN, T., N. WEYER, S. GUTSCHE und H. IVEN (1998). Thiopurine S-methyltransferase activity in human erythrocytes: a new HPLC method using 6-thioguanine as substrate. *European Journal of Clinical Pharmacology* **54**(3): 265–71.
- KRÖPLIN, T., C. FISCHER und H. IVEN (1999). Inhibition of thiopurine S-methyltransferase activity by impurities in commercially available substrates: a factor for differing results of TPMT measurements. *European Journal of Clinical Pharmacology* **55**(4): 285–91.
- KÜBLER, I., M. J. KOSLOWSKI, M. GERSEMANN, K. FELLERMANN, J. BEISNER, S. BECKER, K. ROTHFUSS, K. R. HERRLINGER, E. F. STANGE und J. WEHKAMP (2009). Influence of standard treatment on ileal and colonic antimicrobial defensin expression in active Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **30**(6): 621–33.
- KUGATHASAN, S., A. LOIZIDES, U. BABUSUKUMAR, E. MCGUIRE, T. WANG, P. HOOPER, J. NEBEL, G. KOFMAN, R. NOEL, U. BROECKEL und V. TOLIA (2005). Comparative phenotypic and CARD15 mutational analysis among African American, Hispanic, and White children with Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases* **11**(7): 631–8.
- KUGATHASAN, S., R. N. BALDASSANO, J. P. BRADFIELD, P. M. SLEIMAN, M. IMIELINSKI, S. L. GUTHERY, S. CUCCHIARA, C. E. KIM, E. C. FRACKELTON, K. ANNAIAH, J. T. GLESSNER, E. SANTA, T. WILLSON, A. W. ECKERT, E. BONKOWSKI, J. L. SHANER, R. M. SMITH, F. G. OTIENO, N. PETERSON, D. J. ABRAMS, R. M. CHIAVACCI, R. GRUNDMEIER, P. MAMULA, G. TOMER, D. A. PICCOLI, D. S. MONOS, V. ANNESE, L. A. DENSON, S. F. GRANT und H. HAKONARSON (2008). Loci on 20q13 and 21q22 are associated with pediatric-onset inflammatory bowel disease. *Nature Genetics* **40**(10): 1211–5.
- KUROWSKI, V. und H. IVEN (1991). Plasma concentrations and organ distribution of thiopurines after oral application of azathioprine in mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **28**(1): 7–14.
- KURTOVIC, S., L. GREHN, A. KARLSSON, U. HELLMAN und B. MANNERVIK (2008). Glutathione transferase activity with a novel substrate mimics the activation of the prodrug azathioprine. *Analytical Biochemistry* **375**(2): 339–44.
- KWAN, L. Y., S. M. DEVLIN, J. M. MIROCHA und K. A. PAPADAKIS (2008). Thiopurine methyltransferase activity combined with 6-thioguanine metabolite levels predicts clinical response to thiopurines in patients with inflammatory bowel disease. *Digestive and Liver Disease* **40**(6): 425–32.
- KWAN, L. Y. und U. MAHADEVAN (2010). Inflammatory bowel disease and pregnancy: an update. *Expert Rev Clin Immunol* **6**(4): 643–57.
- LALA, S., Y. OGIURA, C. OSBORNE, S. Y. HOR, A. BROMFIELD, S. DAVIES, O. OGUNBIYI, G. NUNEZ und S. KESHAV (2003). Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology* **125**(1): 47–57.

- LANCASTER, D., L. LENNARD und J. S. LILLEYMAN (1997). Profile of non-compliance in lymphoblastic leukaemia. *Archives of Disease In Childhood* **76**(4): 365–6.
- LANCASTER, D. L., L. LENNARD, K. ROWLAND, A. J. VORA und J. S. LILLEYMAN (1998). Thioguanine versus mercaptopurine for therapy of childhood lymphoblastic leukaemia: a comparison of haematological toxicity and drug metabolite concentrations. *British Journal of Haematology* **102**(2): 439–43.
- LANCASTER, D. L., N. PATEL, L. LENNARD und J. S. LILLEYMAN (2001). 6-Thioguanine in children with acute lymphoblastic leukaemia: influence of food on parent drug pharmacokinetics and 6-thioguanine nucleotide concentrations. *British Journal of Clinical Pharmacology* **51**(6): 531–9.
- LANCASTER, D. L., N. PATEL, L. LENNARD und J. S. LILLEYMAN (2002). Leucocyte versus erythrocyte thioguanine nucleotide concentrations in children taking thiopurines for acute lymphoblastic leukaemia. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **50**(1): 33–6.
- LANGAGERGAARD, V., L. PEDERSEN, M. GISLUM, B. NORGARD und H. T. SORENSEN (2007). Birth outcome in women treated with azathioprine or mercaptopurine during pregnancy: A Danish nationwide cohort study. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **25**(1): 73–81.
- LANGHOLZ, E., P. MUNKHOLM, M. DAVIDSEN und V. BINDER (1994). Course of ulcerative colitis: analysis of changes in disease activity over years. *Gastroenterology* **107**(1): 3–11.
- LATELLA, G., P. VERNIA, A. VISCIDO, G. FRIERI, G. CADAU, A. COCCO, A. COSU, E. TOMEI und R. CAPRILLI (2002). GI distension in severe ulcerative colitis. *American Journal of Gastroenterology* **97**(5): 1169–75.
- LATIANO, A., O. PALMIERI, S. CUCCHIARA, M. CASTRO, R. D’INCA, G. GUARISO, B. DALLAPICCOLA, M. R. VALVANO, T. LATIANO, A. ANDRIULLI und V. ANNESE (2009). Polymorphism of the IRGM gene might predispose to fistulizing behavior in Crohn’s disease. *American Journal of Gastroenterology* **104**(1): 110–6.
- LAVI, L. E. und J. S. HOLCENBERG (1985). A rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic assay for 6-mercaptopurine metabolites in red blood cells. *Analytical Biochemistry* **144**(2): 514–21.
- LEE, A. U. und G. C. FARRELL (2001). Mechanism of azathioprine-induced injury to hepatocytes: roles of glutathione depletion and mitochondrial injury. *Journal of Hepatology* **35**(6): 756–64.
- LÉMANN, M., J. Y. MARY, J. F. COLOMBEL, B. DUCLOS, J. C. SOULE, E. LEREBOURS, R. MODIGLIANI und Y. BOUHNİK (2005). A randomized, double-blind, controlled withdrawal trial in Crohn’s disease patients in long-term remission on azathioprine. *Gastroenterology* **128**(7): 1812–8.
- LENNARD, L. (1998). Clinical implications of thiopurine methyltransferase—optimization of drug dosage and potential drug interactions. *Therapeutic Drug Monitoring* **20**(5): 527–31.

- LENNARD, L. und J. S. LILLEYMAN (1996). Individualizing therapy with 6-mercaptopurine and 6-thioguanine related to the thiopurine methyltransferase genetic polymorphism. *Therapeutic Drug Monitoring* **18**(4): 328–34.
- LENNARD, L. und J. L. MADDOCKS (1983). Assay of 6-thioguanine nucleotide, a major metabolite of azathioprine, 6-mercaptopurine and 6-thioguanine, in human red blood cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **35**(1): 15–18.
- LENNARD, L. und H. J. SINGLETON (1992). 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. *Journal of Chromatography* **583**(1): 83–90.
- LENNARD, L., J. S. LILLEYMAN, J. V. LOON und R. M. WEINSHILBOUM (1990). Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* **336**(8709): 225–9.
- LENNARD, L., J. WELCH und J. S. LILLEYMAN (1996). Mercaptopurine in childhood leukaemia: the effects of dose escalation on thioguanine nucleotide metabolites. *British Journal of Clinical Pharmacology* **42**(4): 525–7.
- LENNARD, L., J. C. WELCH und J. S. LILLEYMAN (1997). Thiopurine drugs in the treatment of childhood leukaemia: the influence of inherited thiopurine methyltransferase activity on drug metabolism and cytotoxicity. *British Journal of Clinical Pharmacology* **44**(5): 455–61.
- LENNARD, L., C. A. REES, J. S. LILLEYMAN und J. L. MADDOCKS (2004). Childhood leukaemia: a relationship between intracellular 6-mercaptopurine metabolites and neutropenia. 1983. *British Journal of Clinical Pharmacology* **58**(7): S867–71; Diskussion S872–4.
- LENNARD-JONES, J. E., B. C. MORSON, J. K. RITCHIE und C. B. WILLIAMS (1983). Cancer surveillance in ulcerative colitis. Experience over 15 years. *Lancet* **2**(8342): 149–52.
- LEONG, R. W., A. ARMUZZI, T. AHMAD, M. L. WONG, P. TSE, D. P. JEWELL und J. J. SUNG (2003). NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn’s disease in the Chinese population. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **17**(12): 1465–70.
- LESAGE, S., H. ZOUALI, J. P. CEZARD, J. F. COLOMBEL, J. BELAICHE, S. ALMER, C. TYSK, C. O’MORAIN, M. GASSULL, V. BINDER, Y. FINKEL, R. MODIGLIANI, C. GOWER-ROUSSEAU, J. MACRY, F. MERLIN, M. CHAMAILLARD, A. S. JANNOT, G. THOMAS und J. P. HUGOT (2002). CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *American Journal of Human Genetics* **70**(4): 845–57.
- LEWIS, J. D., W. B. BILKER, C. BRENSINGER, J. J. DEREN, D. J. VAUGHN und B. L. STROM (2001). Inflammatory bowel disease is not associated with an increased risk of lymphoma. *Gastroenterology* **121**(5): 1080–7.

- LEWIS, J. D., O. ABRAMSON, M. PASCUA, L. LIU, L. M. ASAKURA, F. S. VELAYOS, S. M. HUTFLESS, J. E. ALISON und L. J. HERRINTON (2009). Timing of myelosuppression during thiopurine therapy for inflammatory bowel disease: implications for monitoring recommendations. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **7**(11): 1195–201.
- LEWIS, R. J. (1996). In: VAN NOSTRAND, R. (Hrsg.): Sax's dangerous properties of industrial materials. 9. Aufl. Bd. 1–3. New York, 297.
- LI, H., H. ZHU, C. J. XU und J. YUAN (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**(4): 491–501.
- LI, J. und J. YUAN (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* **27**(48): 6194–206.
- LI, P., D. NIJHAWAN, I. BUDIHardJO, S. M. SRINIVASULA, M. AHMAD, E. S. ALNEMRI und X. WANG (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**(4): 479–89.
- LICHTENSTEIN, G. R. (2004). Use of laboratory testing to guide 6-mercaptopurine/azathioprine therapy. *Gastroenterology* **127**(5): 1558–64.
- LILJEMARK, J., B. PETTERSSON, B. ENGBERG, P. LAFOLIE, M. MASQUELIER und C. PETERSON (1990). On the paradoxically concentration-dependent metabolism of 6-mercaptopurine in WEHI-3b murine leukemia cells. *Cancer Research* **50**(1): 108–12.
- LILLEYMAN, J. S. und L. LENNARD (1994). Mercaptopurine metabolism and risk of relapse in childhood lymphoblastic leukaemia. *Lancet* **343**(8907): 1188–90.
- LILLEYMAN, J. S. und L. LENNARD (1996). Non-compliance with oral chemotherapy in childhood leukaemia. *BMJ (Clinical Research Ed.)* **313**(7067): 1219–20.
- LINDBERG, E., G. JARNEROT und B. HUITFELDT (1992). Smoking in Crohn's disease: effect on localisation and clinical course. *Gut* **33**(6): 779–82.
- LIU, X., C. N. KIM, J. YANG, R. JEMMERSON und X. WANG (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **86**(1): 147–57.
- LOFTUS, C. G., E. V. LOFTUS JR., W. S. HARMSSEN, A. R. ZINSMEISTER, W. J. TREMAINE, L. J. MELTON 3RD und W. J. SANDBORN (2007). Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-2000. *Inflammatory Bowel Diseases* **13**(3): 254–61.
- LOFTUS JR., E. V., W. J. SANDBORN, W. J. TREMAINE, D. W. MAHONEY, A. R. ZINSMEISTER, K. P. OFFORD und L. J. MELTON 3RD (1996). Risk of colorectal neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* **110**(2): 432–40.
- LOFTUS JR., E. V., W. J. TREMAINE, T. M. HABERMANN, W. S. HARMSSEN, A. R. ZINSMEISTER und W. J. SANDBORN (2000). Risk of lymphoma in inflammatory bowel disease. *American Journal of Gastroenterology* **95**(9): 2308–12.

- LOFTUS JR., E. V., P. SCHOENFELD und W. J. SANDBORN (2002). The epidemiology and natural history of Crohn's disease in population-based patient cohorts from North America: a systematic review. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **16**(1): 51–60.
- LOGAN, R. F. und C. R. KAY (1989). Oral contraception, smoking and inflammatory bowel disease—findings in the Royal College of General Practitioners Oral Contraception Study. *International Journal of Epidemiology* **18**(1): 105–7.
- LOUIS, E. und J. BELAICHE (2003). Optimizing treatment with thioguanine derivatives in inflammatory bowel disease. *Best Practice and Research. Clinical Gastroenterology* **17**(1): 37–46.
- LOWRY, P. W., C. L. FRANKLIN, A. L. WEAVER, C. L. SZUMLANSKI, D. C. MAYS, E. V. LOFTUS, W. J. TREMAINE, J. J. LIPSKY, R. M. WEINSHILBOUM und W. J. SANDBORN (2001a). Leucopenia resulting from a drug interaction between azathioprine or 6-mercaptopurine and mesalamine, sulphasalazine, or balsalazide. *Gut* **49**(5): 656–64.
- LOWRY, P. W., C. L. FRANKLIN, A. L. WEAVER, M. G. PIKE, D. C. MAYS, W. J. TREMAINE, J. J. LIPSKY und W. J. SANDBORN (2001b). Measurement of thiopurine methyltransferase activity and azathioprine metabolites in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* **49**(5): 665–70.
- LUDWIG, D. und E. F. STANGE (1999). Efficacy of azathioprine in the treatment of chronic active Crohn's disease: prospective one-year follow-up study. German Imurek Study Group. *Zeitschrift Für Gastroenterologie* **37**(11): 1085–91.
- LÜGERING, A., M. SCHMIDT, N. LÜGERING, H. G. PAUELS, W. DOMSCHKE und T. KUCHARZIK (2001). Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's disease by using a caspase-dependent pathway. *Gastroenterology* **121**(5): 1145–57.
- LÜGERING, A., P. LEBIEDZ, S. KOCH und T. KUCHARZIK (2006). Apoptosis as a therapeutic tool in IBD? *Annals of The New York Academy Of Sciences* **1072**: 62–77.
- LYSAA, R. A., T. GIVERHAUG, H. L. WOLD und J. AARBAKKE (1996). Inhibition of human thiopurine methyltransferase by furosemide, bendroflumethiazide and trichlormethiazide. *European Journal of Clinical Pharmacology* **49**(5): 393–6.
- MACDONALD, T. T. und G. MONTELEONE (2005). Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* **307**(5717): 1920–5.
- MALCHOW, H., K. EWE, J. W. BRANDES, H. GOEBELL, H. EHMS, H. SOMMER und H. JESDINSKY (1984). European Cooperative Crohn's Disease Study (ECCDS): results of drug treatment. *Gastroenterology* **86**(2): 249–66.
- MARDINI, H. E. und G. L. ARNOLD (2003). Utility of measuring 6-methylmercaptopurine and 6-thioguanine nucleotide levels in managing inflammatory bowel disease patients treated with 6-mercaptopurine in a clinical practice setting. *Journal of Clinical Gastroenterology* **36**(5): 390–5.

- MARINAKI, A. M., A. ANSARI, J. A. DULEY, M. ARENAS, S. SUMI, C. M. LEWIS, M. SHOBOWALE-BAKRE EL, E. ESCUREDO, L. D. FAIRBANKS und J. D. SANDERSON (2004). Adverse drug reactions to azathioprine therapy are associated with polymorphism in the gene encoding inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPase). *Pharmacogenetics* **14**(3): 181–7.
- MARKS, D. J. und A. W. SEGAL (2008). Innate immunity in inflammatory bowel disease: a disease hypothesis. *Journal of Pathology* **214**(2): 260–6.
- MARTINI, G. A. und J. W. BRANDES (1976). Increased consumption of refined carbohydrates in patients with Crohn's disease. *Klinische Wochenschrift* **54**(8): 367–71.
- MASON, M., H. L. CURREY, C. G. BARNES, J. F. DUNNE, B. L. HAZLEMAN und I. D. STRICKLAND (1969). Azathioprine in rheumatoid arthritis. *British Medical Journal* **1**(5641): 420–2.
- MATE-JIMENEZ, J., C. HERMIDA, J. CANTERO-PERONA und R. MORENO-OTERO (2000). 6-mercaptopurine or methotrexate added to prednisone induces and maintains remission in steroid-dependent inflammatory bowel disease. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* **12**(11): 1227–33.
- MAYBAUM, J. und H. G. MANDEL (1983). Unilateral chromatid damage: a new basis for 6-thioguanine cytotoxicity. *Cancer Research* **43**(8): 3852–6.
- MAYER, L. und D. EISENHARDT (1990). Lack of induction of suppressor T cells by intestinal epithelial cells from patients with inflammatory bowel disease. *Journal of Clinical Investigation* **86**(4): 1255–60.
- MAYNARD, C. L. und C. T. WEAVER (2009). Intestinal Effector T Cells in Health and Disease. *Immunity* **31**(3): 389–400.
- MCGOVERN, D. P. und S. P. TRAVIS (2003). Thiopurine therapy: when to start and when to stop. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* **15**(3): 219–23.
- MCGOVERN, D. P., S. P. TRAVIS, J. DULEY, M. SHOBOWALE-BAKRE EL und H. R. DALTON (2002). Azathioprine intolerance in patients with IBD may be imidazole-related and is independent of TPMT activity. *Gastroenterology* **122**(3): 838–9.
- MCHENRY, P. M., J. G. ALLAN, R. S. RODGER und R. S. LEVER (1993). Nephrotoxicity due to azathioprine. *British Journal of Dermatology* **128**(1): 106.
- MCLEOD, H. L., M. V. RELING, Q. LIU, C. H. PUI und W. E. EVANS (1995). Polymorphic thiopurine methyltransferase in erythrocytes is indicative of activity in leukemic blasts from children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **85**(7): 1897–1902.
- MEDICI, V., S. MASCHERETTI, P. J. CROUCHER, M. STOLL, J. HAMPE, J. GREBE, G. C. STURNIOLO, C. SOLBERG, J. JAHNSEN, B. MOUM, S. SCHREIBER und M. H. VATN (2006). Extreme heterogeneity in CARD15 and DLG5 Crohn disease-associated polymorphisms between German and Norwegian populations. *European Journal of Human Genetics* **14**(4): 459–68.

- MELLE, U., U. ROSIEN, P. LAYER, J. KELLER und V. GROSS (2008). In: MELLE, U. und U. ROSIEN (Hrsg.): Chronisch entzündliche Darmerkrankungen. Azathioprin und 6-Mercaptopurin. *Praktische Gastroenterologie*. München: Urban & Fischer Verlag; 312.
- MERTIN, J., P. RUDGE, M. KREMER, M. J. HEALEY, S. C. KNIGHT, A. COMPSTON, J. R. BATCHELOR, E. J. THOMPSON, A. M. HALLIDAY, M. DENMAN und P. B. MEDAWAR (1982). Double-blind controlled trial of immunosuppression in the treatment of multiple sclerosis: final report. *Lancet* **2**(8294): 351–4.
- MEUCCI, G., M. VECCHI, M. ASTEGIANO, L. BERETTA, P. CESARI, P. DIZIOLI, L. FERRARIS, M. R. PANELLI, A. PRADA, R. SOSTEGNI und R. de FRANCHIS (2000). The natural history of ulcerative proctitis: a multicenter, retrospective study. Gruppo di Studio per le Malattie Infiammatorie Intestinali (GSMII). *American Journal of Gastroenterology* **95**(2): 469–73.
- MICELI-RICHARD, C., S. LESAGE, M. RYBOJAD, A. M. PRIEUR, S. MANOUVRIER-HANU, R. HAFNER, M. CHAMAILLARD, H. ZOUALI, G. THOMAS und J. P. HUGOT (2001). CARD15 mutations in Blau syndrome. *Nature Genetics* **29**(1): 19–20.
- MIGITA, K. und K. EGUCHI (2001). FK 506-mediated T-cell apoptosis induction. *Transplantation Proceedings* **33**(3): 2292–3.
- MONTERO, C., J. A. DULEY, L. D. FAIRBANKS, M. B. MCBRIDE, V. MICHELI, A. J. CANT und G. MORGAN (1995). Demonstration of induction of erythrocyte inosine monophosphate dehydrogenase activity in Ribavirin-treated patients using a high performance liquid chromatography linked method. *Clinica Chimica Acta* **238**(2): 169–78.
- MORALES, A., S. SALGUTI, C. L. MIAO und J. D. LEWIS (2007). Relationship between 6-mercaptopurine dose and 6-thioguanine nucleotide levels in patients with inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases* **13**(4): 380–5.
- MOTTET, C., P. JUILLERAT, V. PITTET, J.-J. GONVERS, F. FROELICH, J.-P. VADER, P. MICHETTI und C. FELLE (2007). Pregnancy and breastfeeding in patients with Crohn's disease. *Digestion* **76**(2): 149–60.
- MÜLLER-QUERNHEIM, J., K. KIENAST, M. HELD, S. PFEIFER und U. COSTABEL (1999). Treatment of chronic sarcoidosis with an azathioprine/prednisolone regimen. *European Respiratory Journal* **14**(5): 1117–22.
- MUNKHOLM, P., E. LANGHOLZ, M. DAVIDSEN und V. BINDER (1993). Intestinal cancer risk and mortality in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **105**(6): 1716–23.
- NAGAI, K., K. NAGASAWA, Y. KIHARA, H. OKUDA und S. FUJIMOTO (2007). Anticancer nucleobase analogues 6-mercaptopurine and 6-thioguanine are novel substrates for equilibrative nucleoside transporter 2. *International Journal of Pharmacetics* **333**(1-2): 56–61.
- NAGY, F., T. MOLNAR, E. MAKULA, I. KISS, P. MILASSIN, E. ZOLLEI, L. TISZLAVICZ und J. LONOVICS (2007). A case of interstitial pneumonitis in a patient with ulce-

- rative colitis treated with azathioprine. *World Journal of Gastroenterology* **13**(2): 316–9.
- NATHAN, H. C., S. BIEBER, G. B. ELION und G. H. HITCHINGS (1961). Detection of agents which interfere with the immune response. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **107**: 796–9.
- NEUNLIST, M., P. AUBERT, C. TOQUET, T. ORESHKOVA, J. BAROUK, P. A. LEHUR, M. SCHEMANN und J. P. GALMICHE (2003). Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. *Gut* **52**(1): 84–90.
- NEURATH, M. F., S. FINOTTO, I. FUSS, M. BOIRIVANT, P. R. GALLE und W. STROBER (2001). Regulation of T-cell apoptosis in inflammatory bowel disease: to die or not to die, that is the mucosal question. *Trends in Immunology* **22**(1): 21–6.
- NEURATH, M. F., R. KIESSLICH, U. TEICHGRÄBER, C. FISCHER, U. HOFMANN, M. EICHELBAUM, P. R. GALLE und M. SCHWAB (2005). 6-thioguanosine diphosphate and triphosphate levels in red blood cells and response to azathioprine therapy in Crohn's disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **3**(10): 1007–14.
- NEURATH, M. F. und S. FINOTTO (2009). Translating inflammatory bowel disease research into clinical medicine. *Immunity* **31**(3): 357–61.
- NEVINS, T. E. und W. THOMAS (2009). Quantitative patterns of azathioprine adherence after renal transplantation. *Transplantation* **87**(5): 711–8.
- NGUYEN, G. C., A. TUSKEY, T. DASSOPOULOS, M. L. HARRIS und S. R. BRANT (2007). Rising hospitalization rates for inflammatory bowel disease in the United States between 1998 and 2004. *Inflammatory Bowel Diseases* **13**(12): 1529–35.
- NGUYEN, T., P. M. VACEK, P. O'NEILL, R. B. COLLETTI und B. A. FINETTE (2009). Mutagenicity and potential carcinogenicity of thiopurine treatment in patients with inflammatory bowel disease. *Cancer Research* **69**(17): 7004–12.
- NGUYEN, T.-M.-H., C. L. GALL, A. LACHAUX und R. BOULIEU (2010a). High thiopurine metabolite concentrations associated with lymphopenia in inflammatory bowel disease (IBD) pediatric patients receiving aminosalicylates combined with azathioprine. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* **48**(4): 275–81.
- NGUYEN, T.-M.-H., M. DAUBARD, C. L. GALL, M. LARGER, A. LACHAUX und R. BOULIEU (2010b). Monitoring of azathioprine metabolites in pediatric patients with autoimmune hepatitis. *Therapeutic Drug Monitoring* **32**(4): 433–7.
- NIELSEN, O. H., B. VAINER und J. RASK-MADSEN (2001). Review article: the treatment of inflammatory bowel disease with 6-mercaptopurine or azathioprine. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **15**(11): 1699–1708.
- NOOMEN, C. G., D. W. HOMMES und H. H. FIDDER (2009). Update on genetics in inflammatory disease. *Best Practice and Research. Clinical Gastroenterology* **23**(2): 233–43.
- NORGARD, B., L. PEDERSEN, L. A. CHRISTENSEN und H. T. SORENSEN (2007). Therapeutic drug use in women with Crohn's disease and birth outcomes: a Danish nationwide cohort study. *American Journal of Gastroenterology* **102**(7): 1406–13.

- ODLIND, B., P. HARTVIG, B. LINDSTROM, G. LONNERHOLM, G. TUFVESON und N. GREFBERG (1986). Serum azathioprine and 6-mercaptopurine levels and immunosuppressive activity after azathioprine in uremic patients. *International Journal of Immunopharmacology* **8**(1): 1–11.
- OGURA, Y., D. K. BONEN, N. INOHARA, D. L. NICOLAE, F. F. CHEN, R. RAMOS, H. BRITTON, T. MORAN, R. KARALIUSKAS, R. H. DUERR, J. P. ACHKAR, S. R. BRANT, T. M. BAYLESS, B. S. KIRSCHNER, S. B. HANAUER, G. NUNEZ und J. H. CHO (2001a). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**(6837): 603–6.
- OGURA, Y., N. INOHARA, A. BENITO, F. F. CHEN, S. YAMAOKA und G. NUNEZ (2001b). Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *Journal of Biological Chemistry* **276**(7): 4812–8.
- OGURA, Y., S. LALA, W. XIN, E. SMITH, T. A. DOWDS, F. F. CHEN, E. ZIMMERMANN, M. TRETIAKOVA, J. H. CHO, J. HART, J. K. GREENSON, S. KESHAV und G. NUNEZ (2003). Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut* **52**(11): 1591–7.
- OOI, C. Y., T. D. BOHANE, D. LEE, D. NAIDOO und A. S. DAY (2007). Thiopurine metabolite monitoring in paediatric inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **25**(8): 941–7.
- OPELZ, G. und R. HENDERSON (1993). Incidence of non-Hodgkin lymphoma in kidney and heart transplant recipients. *Lancet* **342**(8886-8887): 1514–6.
- OSTERMAN, M. T., R. KUNDU, G. R. LICHTENSTEIN und J. D. LEWIS (2006). Association of 6-thioguanine nucleotide levels and inflammatory bowel disease activity: a meta-analysis. *Gastroenterology* **130**(4): 1047–53.
- PALACE, J., J. NEWSOM-DAVIS und B. LECKY (1998). A randomized double-blind trial of prednisolone alone or with azathioprine in myasthenia gravis. Myasthenia Gravis Study Group. *Neurology* **50**(6): 1778–83.
- PALLE, J., B.-M. FROST, C. PETERSSON, H. HASLE, M. HELLEBOSTAD, J. KANERVA, K. SCHMIEGELOW und G. LÖNNERHOLM (2009). Thioguanine pharmacokinetics in induction therapy of children with acute myeloid leukemia. *Anti-Cancer Drugs* **20**(1): 7–14.
- PAN, B. F. und J. A. NELSON (1990). Characterization of the DNA damage in 6-thioguanine-treated cells. *Biochemical Pharmacology* **40**(5): 1063–9.
- PARKES, M., J. C. BARRETT, N. J. PRESCOTT, M. TREMELLING, C. A. ANDERSON, S. A. FISHER, R. G. ROBERTS, E. R. NIMMO, F. R. CUMMINGS, D. SOARS, H. DRUMMOND, C. W. LEES, S. A. KHAWAJA, R. BAGNALL, D. A. BURKE, C. E. TODHUNTER, T. AHMAD, C. M. ONNIE, W. McARDLE, D. STRACHAN, G. BETHEL, C. BRYAN, C. M. LEWIS, P. DELOUKAS, A. FORBES, J. SANDERSON, D. P. JEWELL, J. SATSANGI, J. C. MANSFIELD, L. CARDON und C. G. MATHEW (2007). Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nature Genetics* **39**(7): 830–2.

- PARNHAM, A. P., I. DITTMER, P. W. MATHIESON, A. MCIVER und C. DUDLEY (1996). Acute allergic reactions associated with azathioprine. *Lancet* **348**(9026): 542–3.
- PARTRIDGE, S. K. und R. A. HODIN (2004). Small bowel adenocarcinoma at a strictureplasty site in a patient with Crohn’s disease: report of a case. *Diseases of The Colon and Rectum* **47**(5): 778–81.
- PEARSON, D. C., G. R. MAY, G. H. FICK und L. R. SUTHERLAND (1995). Azathioprine and 6-mercaptopurine in Crohn disease. A meta-analysis. *Annals of Internal Medicine* **123**(2): 132–42.
- PEARSON, D. C., G. R. MAY, G. FICK und L. R. SUTHERLAND (2000). Azathioprine for maintaining remission of Crohn’s disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (2): CD000067.
- PENG, X.-X., Z. SHI, V. L. DAMARAJU, X.-C. HUANG, G. D. KRUEH, H.-C. WU, Y. ZHOU, A. TIWARI, L. FU, C. E. CASS und Z.-S. CHEN (2008). Up-regulation of MRP4 and down-regulation of influx transporters in human leukemic cells with acquired resistance to 6-mercaptopurine. *Leukemia Research* **32**(5): 799–809.
- PENN, I., E. L. MAKOWSKI und P. HARRIS (1980). Parenthood following renal transplantation. *Kidney International* **18**(2): 221–33.
- PEPPELENBOSCH, M. P. und S. J. H. VAN DEVENTER (2004). T cell apoptosis and inflammatory bowel disease. *Gut* **53**(11): 1556–8.
- PETTERSSON, B., S. ALMER, F. ALBERTIONI, S. SÖDERHÄLL und C. PETERSON (2002). Differences between children and adults in thiopurine methyltransferase activity and metabolite formation during thiopurine therapy: possible role of concomitant methotrexate. *Therapeutic Drug Monitoring* **24**(3): 351–8.
- PEYRIN-BIROULET, L., P. DELTENRE, S. ARDIZZONE, G. D’HAENS, S. B. HANAUER, H. HERFARTH, M. LEMANN und J. F. COLOMBEL (2009). Azathioprine and 6-mercaptopurine for the prevention of postoperative recurrence in Crohn’s disease: a meta-analysis. *American Journal of Gastroenterology* **104**(8): 2089–96.
- PEYRIN-BIROULET, L., A. OUSSALAH, X. ROBLIN und M. P. SPARROW (2011). The use of azathioprine in Crohn’s disease during pregnancy and in the post-operative setting: a worldwide survey of experts. *Aliment Pharmacol Ther* **33**(6): 707–13.
- PIKE, M. G., C. L. FRANKLIN, D. C. MAYS, J. J. LIPSKY, P. W. LOWRY und W. J. SANDBORN (2001). Improved methods for determining the concentration of 6-thioguanine nucleotides and 6-methylmercaptopurine nucleotides in blood. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **757**(1): 1–9.
- PLAS, D. R., J. C. RATHMELL und C. B. THOMPSON (2002). Homeostatic control of lymphocyte survival: potential origins and implications. *Nature Immunology* **3**(6): 515–21.
- POLITO 2ND, J. M., R. C. REES, B. CHILDS, A. I. MENDELOFF, M. L. HARRIS und T. M. BAYLESS (1996). Preliminary evidence for genetic anticipation in Crohn’s disease. *Lancet* **347**(9004): 798–800.

- POPPE, D., I. TIEDE, G. FRITZ, C. BECKER, B. BARTSCH, S. WIRTZ, D. STRAND, S. TANAKA, P. R. GALLE, X. R. BUSTELO und M. F. NEURATH (2006). Azathioprine suppresses ezrin-radixin-moesin-dependent T cell-APC conjugation through inhibition of Vav guanosine exchange activity on Rac proteins. *Journal of Immunology* **176**(1): 640–51.
- POTTEN, C. S., M. KELLETT, S. A. ROBERTS, D. A. REW und G. D. WILSON (1992). Measurement of in vivo proliferation in human colorectal mucosa using bromodeoxyuridine. *Gut* **33**(1): 71–8.
- PREFONTAINE, E., J. K. MACDONALD und L. R. SUTHERLAND (2009a). Azathioprine or 6-mercaptopurine for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (4): CD000545.
- PREFONTAINE, E., L. R. SUTHERLAND, J. K. MACDONALD und M. CEPOIU (2009b). Azathioprine or 6-mercaptopurine for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (1): CD000067.
- PRESENT, D. H., B. I. KORELITZ, N. WISCH, J. L. GLASS, D. B. SACHAR und B. S. PASTERNAK (1980). Treatment of Crohn's disease with 6-mercaptopurine. A long-term, randomized, double-blind study. *New England Journal of Medicine* **302**(18): 981–7.
- PRICE, A. B. und B. C. MORSON (1975). Inflammatory bowel disease: the surgical pathology of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Human Pathology* **6**(1): 7–29.
- QUÉMÉNEUR, L., L.-M. GERLAND, M. FLACHER, M. FFRENCH, J.-P. REVILLARD und L. GENESTIER (2003). Differential control of cell cycle, proliferation, and survival of primary T lymphocytes by purine and pyrimidine nucleotides. *Journal of Immunology* **170**(10): 4986–95.
- RABEL, S. R., J. F. STOBAUGH und R. TRUEWORTHY (1995). Determination of intracellular levels of 6-mercaptopurine metabolites in erythrocytes utilizing capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Analytical Biochemistry* **224**(1): 315–22.
- RACHMILEWITZ, D. (1989). Coated mesalazine (5-aminosalicylic acid) versus sulphasalazine in the treatment of active ulcerative colitis: a randomised trial. *BMJ (Clinical Research Ed.)* **298**(6666): 82–6.
- RAHHAL, R. M. und W. P. BISHOP (2008). Initial clinical experience with allopurinol-thiopurine combination therapy in pediatric inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases* **14**(12): 1678–82.
- RANSFORD, R. A. und M. J. LANGMAN (2002). Sulphasalazine and mesalazine: serious adverse reactions re-evaluated on the basis of suspected adverse reaction reports to the Committee on Safety of Medicines. *Gut* **51**(4): 536–9.
- RECTOR, A., S. VERMEIRE, I. THOELLEN, E. KEYAERTS, F. STRUYF, R. VLIETINCK, P. RUTGEERTS und M. VAN RANST (2001). Analysis of the CC chemokine receptor 5 (CCR5) delta-32 polymorphism in inflammatory bowel disease. *Human Genetics* **108**(3): 190–3.

- REDDY, D., S. J. MURPHY, S. V. KANE, D. H. PRESENT und A. A. KORNBLUTH (2008). Relapses of inflammatory bowel disease during pregnancy: in-hospital management and birth outcomes. *American Journal of Gastroenterology* **103**(5): 1203–9.
- REIF, S., I. KLEIN, N. ARBER und T. GILAT (1995). Lack of association between smoking and inflammatory bowel disease in Jewish patients in Israel. *Gastroenterology* **108**(6): 1683–7.
- REINSHAGEN, M., E. SCHÜTZ, V. W. ARMSTRONG, C. BEHRENS, C. von TIRPITZ, A. STALLMACH, H. HERFARTH, J. STEIN, P. BIAS, G. ADLER, M. SHIPKOVA, W. KRUIS, M. OELLERICH und N. von AHSEN (2007). 6-thioguanine nucleotide-adapted azathioprine therapy does not lead to higher remission rates than standard therapy in chronic active crohn disease: results from a randomized, controlled, open trial. *Clinical Chemistry* **53**(7): 1306–14.
- REISSMANN, A., S. C. BISCHOFF und W. FLEIG (2004). Colitis ulcerosa: Akuter Schub. *Zeitschrift Für Gastroenterologie* **42**(9): 997.
- RELLING, M. V., M. L. HANCOCK, J. M. BOYETT, C. H. PUI und W. E. EVANS (1999). Prognostic importance of 6-mercaptopurine dose intensity in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **93**(9): 2817–23.
- REMBACKEN, B. J., A. M. SNELLING, P. M. HAWKEY, D. M. CHALMERS und A. T. AXON (1999). Non-pathogenic Escherichia coli versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* **354**(9179): 635–9.
- RESTA-LENERT, S und K. E. BARRETT (2003). Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive Escherichia coli (EIEC). *Gut* **52**(7): 988–97.
- REUTHER, L. O., J. SONNE, N. E. LARSEN, B. LARSEN, S. CHRISTENSEN, S. N. RASMUSSEN, F. TOFTENG, A. HAABER, N. JOHANSEN, J. KJELDSSEN und K. SCHMIEGELOW (2003). Pharmacological monitoring of azathioprine therapy. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **38**(9): 972–7.
- RIDLEY, A. J. (2006). Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends in Cell Biology* **16**(10): 522–9.
- RING, J., J. SEIFERT, G. LOB, K. COULIN, H. ANGSTWURM, E. FRICK, B. BRASS, J. MERTIN, H. BACKMUND und W. BRENDEL (1974). Intensive immunosuppression in the treatment of multiple sclerosis. *Lancet* **2**(7889): 1093–6.
- ROBLIN, X., F. SERRE-DEBEAUVAIS, J. M. PHELIP, G. BESSARD und B. BONAZ (2003). Drug interaction between infliximab and azathioprine in patients with Crohn’s disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **18**(9): 917–25.
- ROBLIN, X., F. SERRE-DEBEAUVAIS, J.-M. PHELIP, J.-L. FAUCHERON, G. HARDY, A. CHARTIER, F. HELLUWAERT, G. BESSARD und B. BONAZ (2005). 6-thioguanine monitoring in steroid-dependent patients with inflammatory bowel diseases receiving azathioprine. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **21**(7): 829–39.

- ROBLIN, X., L. PEYRIN-BIROULET, L. P. BIROULET, J. M. PHELIP, S. NANCEY und B. FLOURIE (2008). A 6-thioguanine nucleotide threshold level of 400 pmol/8 x 10⁸ erythrocytes predicts azathioprine refractoriness in patients with inflammatory bowel disease and normal TPMT activity. *American Journal of Gastroenterology* **103**(12): 3115–22.
- RODRIGUEZ-BORES, L., G. C. FONSECA, M. A. VILLEDA und J. K. YAMAMOTO-FURUSHO (2007). Novel genetic markers in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology* **13**(42): 5560–70.
- RÖSCH, M., R. LEIDL, C. von TIRPITZ, M. REINSHAGEN, G. ADLER und H. H. KÖNIG (2002). Cost measurement based on a cost diary in patients with inflammatory bowel disease. *Zeitschrift Für Gastroenterologie* **40**(4): 217–28.
- ROSENSTIEL, P., M. FANTINI, K. BRAUTIGAM, T. KUHbacher, G. H. WAETZIG, D. SEEGER und S. SCHREIBER (2003). TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **124**(4): 1001–9.
- ROWLAND, K., L. LENNARD und J. S. LILLEYMAN (1999). In vitro metabolism of 6-mercaptopurine by human liver cytosol. *Xenobiotica* **29**(6): 615–28.
- RUEDA, B., G. OROZCO, E. RAYA, J. L. FERNANDEZ-SUEIRO, J. MULERO, F. J. BLANCO, C. VILCHES, M. A. GONZALEZ-GAY und J. MARTIN (2008). The IL23R Arg381Gln non-synonymous polymorphism confers susceptibility to ankylosing spondylitis. *Annals of The Rheumatic Diseases* **67**(10): 1451–4.
- RUMBO, C., K. M. EMERICK, S. EMRE und B. L. SHNEIDER (2002). Azathioprine metabolite measurements in the treatment of autoimmune hepatitis in pediatric patients: a preliminary report. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **35**(3): 391–8.
- RUMBO, C., B. L. SHNEIDER und S. H. EMRE (2004). Utility of azathioprine metabolite measurements in post-transplant recurrent autoimmune and immune-mediated hepatitis. *Pediatric Transplantation* **8**(6): 571–5.
- RUTGEERTS, P., W. J. SANDBORN, B. G. FEAGAN, W. REINISCH, A. OLSON, J. JOHANNIS, S. TRAVERS, D. RACHMILEWITZ, S. B. HANAUER, G. R. LICHTENSTEIN, W. J. de VILLIERS, D. PRESENT, B. E. SANDS und J. F. COLOMBEL (2005). Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *New England Journal of Medicine* **353**(23): 2462–76.
- SAHASRANAMAN, S., D. HOWARD und S. ROY (2008). Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines. *European Journal of Clinical Pharmacology* **64**(8): 753–67.
- SANDBORN, W., L. SUTHERLAND, D. PEARSON, G. MAY, R. MODIGLIANI und C. PRANTERA (2000). Azathioprine or 6-mercaptopurine for inducing remission of Crohn's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (2): CD000545.
- SANDBORN, W. J., O. E. VAN, B. J. ZINS, W. J. TREMAINE, D. C. MAYS und J. J. LIPSKY (1995). An intravenous loading dose of azathioprine decreases the time to response in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **109**(6): 1808–17.

- SANDBORN, W. J., W. J. TREMAINE, D. C. WOLF, S. R. TARGAN, C. A. SNINSKY, L. R. SUTHERLAND, S. B. HANAUER, J. W. McDONALD, B. G. FEAGAN, R. N. FEDORAK, K. L. ISAACS, M. G. PIKE, D. C. MAYS, J. J. LIPSKY, S. GORDON, C. S. KLEOUDIS und J. MURDOCK R. H. (1999). Lack of effect of intravenous administration on time to respond to azathioprine for steroid-treated Crohn's disease. North American Azathioprine Study Group. *Gastroenterology* **117**(3): 527–35.
- SANDBORN, W. J., J. F. COLOMBEL, R. ENNS, B. G. FEAGAN, S. B. HANAUER, I. C. LAWRENCE, R. PANACCIONE, M. SANDERS, S. SCHREIBER, S. TARGAN, S. van DEVENTER, R. GOLDBLUM, D. DESPAIN, G. S. HOGGE, P. RUTGEERTS und INTERNATIONAL EFFICACY OF NATALIZUMAB AS ACTIVE CROHN'S THERAPY (ENACT-1) TRIAL GROUP AND EVALUATION OF NATALIZUMAB AS CONTINUOUS THERAPY (ENACT-2) TRIAL GROUP (2005). Natalizumab induction and maintenance therapy for Crohn's disease. *New England Journal of Medicine* **353**(18): 1912–25.
- SANDBORN, W. J., B. G. FEAGAN, S. STOINOV, P. J. HONIBALL, P. RUTGEERTS, D. MASON, R. BLOOMFIELD, S. SCHREIBER und P. R. E. C. I. S. E. 1 STUDY INVESTIGATORS (2007). Certolizumab pegol for the treatment of Crohn's disease. *New England Journal of Medicine* **357**(3): 228–38.
- SANDBORN, W. J. (2004). Pharmacogenomics and IBD: TPMT and thiopurines. *Inflammatory Bowel Diseases* **10 Suppl 1**: S35–S37.
- SANDS, B. E., F. H. ANDERSON, C. N. BERNSTEIN, W. Y. CHEY, B. G. FEAGAN, R. N. FEDORAK, M. A. KAMM, J. R. KORZENIK, B. A. LASHNER, J. E. ONKEN, D. RACHMILEWITZ, P. RUTGEERTS, G. WILD, D. C. WOLF, P. A. MARSTERS, S. B. TRAVERS, M. A. BLANK und S. J. van DEVENTER (2004). Infliximab maintenance therapy for fistulizing Crohn's disease. *New England Journal of Medicine* **350**(9): 876–85.
- SARTOR, R. B. (1998). Postoperative recurrence of Crohn's disease: The enemy is within the fecal stream. *Gastroenterology* **114**(2): 398–400.
- SARTOR, R. B. (2004). Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* **126**(6): 1620–33.
- SARUTA, M., Q. T. YU, P. R. FLESHNER, P. Y. MANTEL, C. B. SCHMIDT-WEBER, A. H. BANHAM und K. A. PAPADAKIS (2007). Characterization of FOXP3+CD4+ regulatory T cells in Crohn's disease. *Clinical Immunology* **125**(3): 281–90.
- SAUER, H., U. HANTKE und W. WILMANN (1988). Azathioprine lymphocytotoxicity. Potentially lethal damage by its imidazole derivatives. *Arzneimittel-Forschung* **38**(6): 820–4.
- SAUVIAT, M., M. BOLON und R. BOULIEU (2005). Stability of thiopurine metabolites and thiopurine methyltransferase activity in human blood. *Therapeutic Drug Monitoring* **27**(2): 213.

- SCAFFIDI, C., S. FULDA, A. SRINIVASAN, C. FRIESEN, F. LI, K. J. TOMASELLI, K. M. DEBATIN, P. H. KRAMMER und M. E. PETER (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO Journal* **17**(6): 1675–87.
- SCHEDL, J., A. GÖDDE, E. SCHÜTZ, T. A. BONGARTZ, B. LANG, J. SCHÖLMERICH und U. MÜLLER-LADNER (2006). Impact of thiopurine methyltransferase activity and 6-thioguanine nucleotide concentrations in patients with chronic inflammatory diseases. *Annals of The New York Academy Of Sciences* **1069**: 477–91.
- SCHÄFFELER, E., T. LANG, U. M. ZANGER, M. EICHELBAUM und M. SCHWAB (2001). High-throughput genotyping of thiopurine S-methyltransferase by denaturing HPLC. *Clinical Chemistry* **47**(3): 548–55.
- SCHMIDT, M., N. LÜGERING, A. LÜGERING, H. G. PAUELS, K. SCHULZE-OSTHOFF, W. DOMSCHKE und T. KUCHARZIK (2001). Role of the CD95/CD95 ligand system in glucocorticoid-induced monocyte apoptosis. *Journal of Immunology* **166**(2): 1344–51.
- SCHNEIDER, M. U., G. LAUDAGE, I. GUGGENMOOS-HOLZMANN und J. F. RIEMANN (1985). Metronidazole in the treatment of Crohn disease. Results of a controlled randomized prospective study. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* **110**(45): 1724–30.
- SCHREIBER, S., S. NIKOLAUS und J. HAMPE (1998). Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut* **42**(4): 477–84.
- SCHÜTZ, E., J. GUMMERT, F. W. MOHR, V. W. ARMSTRONG und M. OELLERICH (1996). Should 6-thioguanine nucleotides be monitored in heart transplant recipients given azathioprine? *Therapeutic Drug Monitoring* **18**(3): 228–33.
- SCHWAB, M., K. HERRLINGER, E. SCHAEFFELER und E. F. STANGE (2003). Therapy of chronic inflammatory bowel diseases with azathioprine, 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. Clinico-pharmacologic aspects. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* **128**(8): 378–85.
- SCHWARTZ, D. A., J. H. PEMBERTON und W. J. SANDBORN (2001). Diagnosis and treatment of perianal fistulas in Crohn disease. *Annals of Internal Medicine* **135**(10): 906–18.
- SEIDERER, J., I. ELBEN, J. DIEGELMANN, J. GLAS, J. STALLHOFER, C. TILLACK, S. PFENNIG, M. JURGENS, S. SCHMECHEL, A. KONRAD, B. GOKE, T. OCHSENKUHN, B. MULLER-MYHSOK, P. LOHSE und S. BRAND (2008). Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD. *Inflammatory Bowel Diseases* **14**(4): 437–45.
- SHAI, Y. (1999). Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1462**(1-2): 55–70.
- SHANAHAN, F. (2002). Crohn's disease. *Lancet* **359**(9300): 62–9.

- SHEN, C., G. V. ASSCHE, S. COLPAERT, P. MAERTEN, K. GEBOES, P. RUTGEERTS und J. L. CEUPPENS (2005). Adalimumab induces apoptosis of human monocytes: a comparative study with infliximab and etanercept. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **21**(3): 251–8.
- SHI, R. Z., S. D. LYONS und R. I. CHRISTOPHERSON (1998). Metabolic effects of thiopurine derivatives against human CCRF-CEM leukaemia cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **30**(8): 885–95.
- SHIPKOVA, M., V. W. ARMSTRONG, E. WIELAND und M. OELLERICH (2003). Differences in nucleotide hydrolysis contribute to the differences between erythrocyte 6-thioguanine nucleotide concentrations determined by two widely used methods. *Clinical Chemistry* **49**(2): 260–8.
- SHIVANANDA, S., J. LENNARD-JONES, R. LOGAN, N. FEAR, A. PRICE, L. CARPENTER und M. van BLANKENSTEIN (1996). Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* **39**(5): 690–7.
- SINGLETON, J. D. und L. CONYERS (1992). Warfarin and azathioprine: an important drug interaction. *American Journal of Medicine* **92**(2): 217.
- SMITHSON, J. E., A. CAMPBELL, J. M. ANDREWS, J. D. MILTON, R. PIGOTT und D. P. JEWELL (1997). Altered expression of mucins throughout the colon in ulcerative colitis. *Gut* **40**(2): 234–40.
- SÖDERHOLM, J. D., G. OLAISSON, K. H. PETERSON, L. E. FRANZÉN, T. LINDMARK, M. WIRÉN, C. TAGESSON und R. SJÖDAHL (2002). Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease. *Gut* **50**(3): 307–13.
- SÖDERLUND, S., L. BRANDT, A. LAPIDUS, P. KARLÉN, O. BROSTRÖM, R. LÖFBERG, A. EKBOM und J. ASKLING (2009). Decreasing time-trends of colorectal cancer in a large cohort of patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **136**(5): 1561–7.
- SOMERVILLE, K. W., R. F. LOGAN, M. EDMOND und M. J. LANGMAN (1984). Smoking and Crohn's disease. *British Medical Journal (Clinical research ed.)* **289**(6450): 954–6.
- SOMERVILLE, L., E. Y. KRYNETSKI, N. F. KRYNETSKAIA, R. D. BEGER, W. ZHANG, C. A. MARHEFKA, W. E. EVANS und R. W. KRIWACKI (2003). Structure and dynamics of thioguanine-modified duplex DNA. *Journal of Biological Chemistry* **278**(2): 1005–11.
- SOOD, A., V. KAUSHAL, V. MIDHA, K. L. BHATIA, N. SOOD und V. MALHOTRA (2002). The beneficial effect of azathioprine on maintenance of remission in severe ulcerative colitis. *Journal of Gastroenterology* **37**(4): 270–4.
- SPARROW, M. P., S. A. HANDE, S. FRIEDMAN, W. C. LIM, S. I. REDDY, D. CAO und S. B. HANAUER (2005). Allopurinol safely and effectively optimizes tioguanine

- metabolites in inflammatory bowel disease patients not responding to azathioprine and mercaptopurine. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **22**(5): 441–6.
- SPECK, W. T. und H. S. ROSENKRANZ (1976). Mutagenicity of azathioprine. *Cancer Research* **36**(1): 108–9.
- STALLMACH, A. und M. ZEITZ (1999). In: CASPARY, W. F. und J. STEIN (Hrsg.): Immunologie des Intestinaltraktes. *Darmkrankheiten*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag; 55–61.
- STANGE, E. F., S. P. TRAVIS, S. VERMEIRE, C. BEGLINGER, L. KUPCINKAS, K. GEBOS, A. BARAKAUSKIENE, V. VILLANACCI, A. VON HERBAY, B. F. WARREN, C. GASCHE, H. TILG, S. W. SCHREIBER, J. SCHOLMERICH und W. REINISCH (2006). European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut* **55** Suppl 1: i1–15.
- STARK, R., H.-H. KÖNIG und R. LEIDL (2006). Costs of inflammatory bowel disease in Germany. *Pharmacoeconomics* **24**(8): 797–814.
- STEINHART, A. H., K. EWE, A. M. GRIFFITHS, R. MODIGLIANI und O. O. THOMSEN (2003). Corticosteroids for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (4): CD000301.
- STET, E. H., R. A. D. ABREU, J. P. BÖKKERINK, T. M. VOGELS-MENTINK, L. H. LAMBOOY, F. J. TRIJBELS und R. C. TRUEWORTHY (1993). Reversal of 6-mercaptopurine and 6-methylmercaptopurine ribonucleoside cytotoxicity by amidoimidazole carboxamide ribonucleoside in Molt F4 human malignant T-lymphoblasts. *Biochemical Pharmacology* **46**(3): 547–50.
- STEVENS, T., J. P. ACHKAR, K. EASLEY, A. BRZEZINSKI und B. LASHNER (2004). Azathioprine formulation optimizes metabolite profile in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **20**(6): 601–6.
- STICHTENOTH, D. O. (2009). In: HOFFMANN, J. C. (Hrsg.): Internistische Therapie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen – Pharmakologie der Substanzgruppen. *Chronisch entzündliche Darmerkrankungen*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 190–1.
- STOCCO, G., M. LONDERO, A. CAMPANOZZI, S. MARTELOSSI, S. MARINO, N. MALUSA, F. BARTOLI, G. DECORTI und A. VENTURA (2010). Usefulness of the measurement of azathioprine metabolites in the assessment of non-adherence. *J Crohns Colitis* **4**(5): 599–602.
- STURM, A. (2008). What is the role of apoptosis in the normal and inflamed intestine? *Inflammatory Bowel Diseases* **14** Suppl 2: S113–4.
- STURM, A., A. Z. LEITE, S. DANESE, K. A. KRIVACIC, G. A. WEST, S. MOHR, J. W. JACOBBERGER und C. FIOCCHI (2004). Divergent cell cycle kinetics underlie the distinct functional capacity of mucosal T cells in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* **53**(11): 1624–31.
- SUMMERS, R. W., D. M. SWITZ, J. SESSIONS J. T., J. M. BECKTEL, W. R. BEST, J. KERN F. und J. W. SINGLETON (1979). National Cooperative Crohn's Disease Study: results of drug treatment. *Gastroenterology* **77**(4 Pt 2): 847–69.

- SUTHERLAND, L. und J. K. MACDONALD (2006). Oral 5-aminosalicylic acid for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (2): CD000544.
- SWANN, P. F., T. R. WATERS, D. C. MOULTON, Y. Z. XU, Q. ZHENG, M. EDWARDS und R. MACE (1996). Role of postreplicative DNA mismatch repair in the cytotoxic action of thioguanine. *Science* **273**(5278): 1109–11.
- SWIDSINSKI, A., A. LADHOFF, A. PERNTHALER, S. SWIDSINSKI, V. LOENING-BAUCKE, M. ORTNER, J. WEBER, U. HOFFMANN, S. SCHREIBER, M. DIETEL und H. LOCHS (2002). Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **122**(1): 44–54.
- SZUMLANSKI, C. L. und R. M. WEINSHILBOUM (1995). Sulphasalazine inhibition of thiopurine methyltransferase: possible mechanism for interaction with 6-mercaptopurine and azathioprine. *British Journal of Clinical Pharmacology* **39**(4): 456–9.
- TAKAHASHI, T., M. TANAKA, J. INAZAWA, T. ABE, T. SUDA und S. NAGATA (1994). Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. *International Immunology* **6**(10): 1567–74.
- TAN, T. und I. C. LAWRENCE (2009). Use of mycophenolate mofetil in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology* **15**(13): 1594–9.
- TARGAN, S. R., S. B. HANAUER, S. J. van DEVENTER, L. MAYER, D. H. PRESENT, T. BRAAKMAN, K. L. DEWOODY, T. F. SCHAIBLE und P. J. RUTGEERTS (1997). A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *New England Journal of Medicine* **337**(15): 1029–35.
- TAXONERA, C., D. A. SCHWARTZ und D. GARCIA-OLMO (2009). Emerging treatments for complex perianal fistula in Crohn's disease. *World Journal of Gastroenterology* **15**(34): 4263–72.
- TAY, B. S., R. M. LILLEY, A. W. MURRAY und M. R. ATKINSON (1969). Inhibition of phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase from Ehrlich ascites-tumour cells by thiopurine nucleotides. *Biochemical Pharmacology* **18**(4): 936–8.
- TEML, A., E. SCHAEFFELER, K. R. HERRLINGER, U. KLOTZ und M. SCHWAB (2007). Thiopurine treatment in inflammatory bowel disease: clinical pharmacology and implication of pharmacogenetically guided dosing. *Clinical Pharmacokinetics* **46**(3): 187–208.
- THIA, K. T., E. V. LOFTUS JR., W. J. SANDBORN und S. K. YANG (2008). An update on the epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. *American Journal of Gastroenterology* **103**(12): 3167–82.
- THIA, K. T., U. MAHADEVAN, B. G. FEAGAN, C. WONG, A. COCKERAM, A. BITTON, C. N. BERNSTEIN und W. J. SANDBORN (2009). Ciprofloxacin or metronidazole for the treatment of perianal fistulas in patients with Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Inflammatory Bowel Diseases* **15**(1): 17–24.

- THOMAS, C. W., P. W. LOWRY, C. L. FRANKLIN, A. L. WEAVER, G. M. MYHRE, D. C. MAYS, W. J. TREMAINE, J. J. LIPSKY und W. J. SANDBORN (2003). Erythrocyte mean corpuscular volume as a surrogate marker for 6-thioguanine nucleotide concentration monitoring in patients with inflammatory bowel disease treated with azathioprine or 6-mercaptopurine. *Inflammatory Bowel Diseases* **9**(4): 237–45.
- THOMAS, C. W., G. M. MYHRE, R. TSCHUMPER, R. SREEKUMAR, D. JELINEK, D. J. MCKEAN, J. J. LIPSKY, W. J. SANDBORN und L. J. EGAN (2005). Selective inhibition of inflammatory gene expression in activated T lymphocytes: a mechanism of immune suppression by thiopurines. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **312**(2): 537–45.
- THOMPSON, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**(5203): 1456–62.
- THOMPSON, N. P., S. M. MONTGOMERY, R. E. POUNDER und A. J. WAKEFIELD (1995). Is measles vaccination a risk factor for inflammatory bowel disease? *Lancet* **345**(8957): 1071–4.
- THOMPSON, N. P., R. DRISCOLL, R. E. POUNDER und A. J. WAKEFIELD (1996). Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ (Clinical Research Ed.)* **312**(7023): 95–6.
- TIEDE, I., G. FRITZ, S. STRAND, D. POPPE, R. DVORSKY, D. STRAND, H. A. LEHR, S. WIRTZ, C. BECKER, R. ATREYA, J. MUDTER, K. HILDNER, B. BARTSCH, M. HOLTSMANN, R. BLUMBERG, H. WALCZAK, H. IVEN, P. R. GALLE, M. R. AHMADIAN und M. F. NEURATH (2003). CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *Journal of Clinical Investigation* **111**(8): 1133–45.
- TIMMER, A., B. BREUER-KATSCHINSKI und H. GOEBELL (1999). Time trends in the incidence and disease location of Crohn's disease 1980-1995: a prospective analysis in an urban population in Germany. *Inflammatory Bowel Diseases* **5**(2): 79–84.
- TIMMER, A., J. W. McDONALD und J. K. MACDONALD (2007). Azathioprine and 6-mercaptopurine for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (1): CD000478.
- TING, J. P. und B. K. DAVIS (2005). CATERPILLER: a novel gene family important in immunity, cell death, and diseases. *Annual Review of Immunology* **23**: 387–414.
- TRAORE, F., M. A. O'RIORDAN, C. MYERS, K. GROTH, A. HOFF, A. ANGIOLILLO, S. RHEINGOLD, D. DROTAR und E. KODISH (2006). How low is too low? Use of cluster analysis to define low levels of mercaptopurine metabolites. *Pediatric Blood and Cancer* **46**(2): 187–92.
- TRAVIS, S. P., E. F. STANGE, M. LEMANN, T. ORESLAND, Y. CHOWERS, A. FORBES, G. D'HAENS, G. KITIS, A. CORTOT, C. PRANTERA, P. MARTEAU, J. F. COLOMBEL, P. GIONCHETTI, Y. BOUHNIC, E. TIRET, J. KROESEN, M. STARLINGER und N. J. MORTENSEN (2006a). European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. *Gut* **55** Suppl 1: i21.

- TRAVIS, S. P. L., E. F. STANGE, M. LÉMANN, T. ORESLAND, Y. CHOWERS, A. FORBES, G. D'HAENS, G. KITIS, A. CORTOT, C. PRANTERA, P. MARTEAU, J.-F. COLOMBEL, P. GIONCHETTI, Y. BOUHNİK, E. TIRET, J. KROESEN, M. STARLINGER und N. J. M. EUROPEAN CROHN'S AND COLITIS ORGANISATION (2006b). European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. *Gut* **55** Suppl 1: i16–i35.
- TRAVIS, S. P. L., E. F. STANGE, M. LÉMANN, T. ORESLAND, W. A. BEMELMAN, Y. CHOWERS, J. F. COLOMBEL, G. D'HAENS, S. GHOSH, P. MARTEAU, W. KRUIS, N. J. M. MORTENSEN, F. PENNINGCKX und M. GASSULL (2008). European evidence-based Consensus on the management of ulcerative colitis: Current management. *Journal of Crohn's and Colitis* **2**: 24–62.
- TRUELOVE, S. C. und L. J. WITTS (1955). Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. *British Medical Journal* **2**(4947): 1041–8.
- TYSK, C., E. LINDBERG, G. JARNEROT und B. FLODERUS-MYRHED (1988). Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* **29**(7): 990–6.
- VAN DEN BRANDE, J. M., M. P. PEPPELENBOSCH und S. J. VAN DEVENTER (2002). Treating Crohn's disease by inducing T lymphocyte apoptosis. *Annals of The New York Academy Of Sciences* **973**: 166–80.
- VAN OS, E. C., B. J. ZINS, W. J. SANDBORN, D. C. MAYS, W. J. TREMAINE, D. W. MAHONEY, A. R. ZINSMEISTER und J. J. LIPSKY (1996). Azathioprine pharmacokinetics after intravenous, oral, delayed release oral and rectal foam administration. *Gut* **39**(1): 63–8.
- VAN PARIJS, L. und A. K. ABBAS (1998). Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* **280**(5361): 243–8.
- VELAYOS, F. S., E. V. LOFTUS JR., T. JESS, W. S. HARMSEN, J. BIDA, A. R. ZINSMEISTER, W. J. TREMAINE und W. J. SANDBORN (2006). Predictive and protective factors associated with colorectal cancer in ulcerative colitis: A case-control study. *Gastroenterology* **130**(7): 1941–9.
- VELDHOEN, M., C. UYTENHOVE, J. van SNICK, H. HELMBY, A. WESTENDORF, J. BUER, B. MARTIN, C. WILHELM und B. STOCKINGER (2008). Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nature Immunology* **9**(12): 1341–6.
- VELOSO, F. T., J. CARVALHO und F. MAGRO (1996). Immune-related systemic manifestations of inflammatory bowel disease. A prospective study of 792 patients. *Journal of Clinical Gastroenterology* **23**(1): 29–34.
- VIKINGSSON, S., B. CARLSSON, S. H. C. ALMER und C. PETERSON (2009). Monitoring of thiopurine metabolites in patients with inflammatory bowel disease-what is actually measured? *Therapeutic Drug Monitoring* **31**(3): 345–50.
- VOOGD, C. E. (1981). On the mutagenicity of nitroimidazoles. *Mutation Research* **86**(3): 243–77.

- WAHL, C., S. LIPTAY, G. ADLER und R. M. SCHMID (1998). Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. *Journal of Clinical Investigation* **101**(5): 1163–74.
- WALJEE, A. K., J. C. JOYCE, S. WANG, A. SAXENA, M. HART, J. ZHU und P. D. R. HIGGINS (2010). Algorithms outperform metabolite tests in predicting response of patients with inflammatory bowel disease to thiopurines. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **8**(2): 143–50.
- WANG, S., H. DIAO, Q. GUAN, A. M. JEVNIKAR und C. DU (2007). Enhanced cardiac allograft survival by Vav1-Rac signaling blockade in a mouse model. *Transplant Immunology* **18**(1): 53–61.
- WANG, X., H. KUIVANIEMI, G. BONAVIDA, L. MUTKUS, U. MAU, E. BLAU, N. INOHARA, G. NUNEZ, G. TROMP und C. J. WILLIAMS (2002). CARD15 mutations in familial granulomatosis syndromes: a study of the original Blau syndrome kindred and other families with large-vessel arteritis and cranial neuropathy. *Arthritis and Rheumatism* **46**(11): 3041–5.
- WEHKAMP, J., J. HARDER, M. WEICHENTHAL, M. SCHWAB, E. SCHÄFFELER, M. SCHLEE, K. R. HERRLINGER, A. STALLMACH, F. NOACK, P. FRITZ, J. M. SCHRODER, C. L. BEVINS, K. FELLERMANN und E. F. STANGE (2004). NOD2 (CARD15) mutations in Crohn’s disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* **53**(11): 1658–64.
- WEHKAMP, J., N. H. SALZMAN, E. PORTER, S. NUDING, M. WEICHENTHAL, R. E. PETRAS, B. SHEN, E. SCHÄFFELER, M. SCHWAB, R. LINZMEIER, R. W. FEATHERS, H. CHU, J. LIMA H., K. FELLERMANN, T. GANZ, E. F. STANGE und C. L. BEVINS (2005). Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn’s disease. *Proceedings of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **102**(50): 18129–34.
- WEINSHILBOUM, R. M. und S. L. SLADEK (1980). Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *American Journal of Human Genetics* **32**(5): 651–62.
- WIELINGA, P. R., G. REID, E. E. CHALLA, I. van der HEIJDEN, L. van DEEMTER, M. de HAAS, C. MOL, A. J. KUIL, E. GROENEVELD, J. D. SCHUETZ, C. BROUWER, R. A. D. ABREU, J. WIJNHOLDS, J. H. BEIJNEN und P. BORST (2002). Thiopurine metabolism and identification of the thiopurine metabolites transported by MRP4 and MRP5 overexpressed in human embryonic kidney cells. *Molecular Pharmacology* **62**(6): 1321–31.
- WITTIG, B. M. und M. ZEITZ (2003). The gut as an organ of immunology. *International Journal of Colorectal Disease* **18**(3): 181–7.
- WRIGHT, S., D. S. SANDERS, A. J. LOBO und L. LENNARD (2004). Clinical significance of azathioprine active metabolite concentrations in inflammatory bowel disease. *Gut* **53**(8): 1123–8.

- WUSK, B., G. A. KULLAK-UBLICK, C. RAMMERT, A. von ECKARDSTEIN, M. FRIED und K. M. RENTSCH (2004). Therapeutic drug monitoring of thiopurine drugs in patients with inflammatory bowel disease or autoimmune hepatitis. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* **16**(12): 1407–13.
- XIN, H., C. FISCHER, M. SCHWAB und U. KLOTZ (2005a). Effects of aminosalicylates on thiopurine S-methyltransferase activity: an ex vivo study in patients with inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **21**(9): 1105–9.
- XIN, H. W., C. FISCHER, M. SCHWAB und U. KLOTZ (2005b). Thiopurine S-methyltransferase as a target for drug interactions. *European Journal of Clinical Pharmacology* **61**(5-6): 395–8.
- YAMAMOTO, T., V. W. FAZIO und P. P. TEKKIS (2007). Safety and efficacy of strictureplasty for Crohn’s disease: a systematic review and meta-analysis. *Diseases of The Colon and Rectum* **50**(11): 1968–86.
- YAMAZAKI, K., D. MCGOVERN, J. RAGOISSIS, M. PAOLUCCI, H. BUTLER, D. JEWELL, L. CARDON, M. TAKAZOE, T. TANAKA, T. ICHIMORI, S. SAITO, A. SEKINE, A. IIDA, A. TAKAHASHI, T. TSUNODA, M. LATHROP und Y. NAKAMURA (2005). Single nucleotide polymorphisms in TNFSF15 confer susceptibility to Crohn’s disease. *Human Molecular Genetics* **14**(22): 3499–506.
- YANG, H., C. MCELREE, M. P. ROTH, F. SHANAHAN, S. R. TARGAN und J. I. ROTTER (1993). Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: differences between Jews and non-Jews. *Gut* **34**(4): 517–24.
- YANG, S. K., E. V. LOFTUS JR. und W. J. SANDBORN (2001). Epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. *Inflammatory Bowel Diseases* **7**(3): 260–70.
- ZAHN, A., U. HINZ, M. KARNER, R. EHEHALT und W. STREMMEL (2006). Health-related quality of life correlates with clinical and endoscopic activity indexes but not with demographic features in patients with ulcerative colitis. *Inflammatory Bowel Diseases* **12**(11): 1058–67.


7.1 Internetquellen

- Azathioprine*. URL: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b6/Azathioprine_3d_structure.png. Abgerufen am: 19.08.2010.
- BALALI-MOOD, M. (1995). *Azathioprine*. Poisons Control Centre, Imam Reza Hospital, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad 91735, I.R.Iran. URL: <http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/azathiop.htm>. Abgerufen am: 11.03.2010.

- CAS Registry Number of Azathioprine*. National Library of Medicine - Division of Specialized Information Services. URL: http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/ProxyServlet?objectHandle=DBMaint&actionHandle=default&nextPage=jsp/chemidheavy/ResultScreen.jsp&ROW_NUM=0&TXTSUPERLISTID=0000446866. Abgerufen am: 10.08.2010.
- CHANG, A. *et al.* Department of Bioinformatics, Biochemistry Institute for Biochemistry und Biotechnology Technische Universität Braunschweig. *Brenda Enzyme Database*. URL: <http://www.brenda-enzymes.org/>. Abgerufen am: 09.04.2010.
- Gertrude B. Elion* (1950). URL: <http://www.achievement.org/autodoc/photocredit/achievers/eli0-008>. Abgerufen am: 19.08.2010.
- Gertrude B. Elion und George H. Hitchings*. URL: <http://www.achievement.org/autodoc/photocredit/achievers/eli0-024>. Abgerufen am: 10.08.2010.

8 Anhang

Patientenfragebogen

JOHANNES GUTENBERG – UNIVERSITÄT MAINZ KLINIKUM GEMEINNÜTZIGE ANSTALT DES ÖFFENTLICHEN RECHTS		Allgemeine Poliklinik (061 31) 17 72 77 Endoskopie (061 31) 17 72 89	55101 Mainz Telefon (061 31) 17 – 1 Telefax (061 31) 17 66 09
I. Medizinische Klinik und Poliklinik Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Peter R. Galle		Spezialambulanzen Leber / Lebertransplantation Rheuma- Immunologie (061 31) 17 26 24 Gastro- Crohn (061 31) 17 28 72 Nieren- und Hochdruck/ Nierentransplantation (061 31) 17 71 28 Onkologie (061 31) 17 71 46 HIV- Virushepatitis (061 31) 17 71 87	
Bitte senden Sie diesen Fragebogen an:		<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> Uniklinik Mainz Gastro-Crohn-Ambulanz - z. Hd. Fr. Ludwig - Langenbeckstr. 1 55131 Mainz </div>	
Mainz, den 21.04.2006			
Prof. Dr. Markus F. Neurath 1. Med. Klinik und Poliklinik der Johannes Gutenberg-Universität Langenbeckstr. 1 55131 Mainz			
PD Dr. Matthias Schwab Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie Auerbachstr. 112 70376 Stuttgart			
Messung von Wirkmetaboliten bei Azathioprin- Therapie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen			
Liebe Patientin, lieber Patient!			
Im Rahmen einer prospektiven Studie über den Wirkmechanismus von Azathioprin (z. B. Imurek®, Azafalk®, Azamedac®, Puri-Nethol®) möchten wir Sie bitten, nachfolgenden Fragebogen auszufüllen. Azathioprin wird im Körper von Enzymen in verschiedene Stoffwechselprodukte umgewandelt. Diese sind nicht alle gleich wirksam und bestimmte Zwischenprodukte sind für die Wirksamkeit von besonderer Bedeutung. Es soll nun durch die Messung der verschiedenen Substanzen im Blut herausgefunden werden, welche für die Wirksamkeit des Medikaments am aussagekräftigsten ist.			

2

Die Teilnahme an der Studie besteht im Ausfüllen des Fragebogens sowie einer einmaligen Blutentnahme. Im Ausnahmefall können weitere Blutentnahmen notwendig sein. Die Blutprobe wird im Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie in Stuttgart anonymisiert ausgewertet. Bei Interesse können Sie das Ergebnis Ihrer Analyse in der Crohn-Ambulanz erfragen.

Einschlusskriterium in die Studie ist die regelmäßige Einnahme des Medikaments für mindestens 6 Monate. Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig.

Vielen Dank für Ihre Mithilfe!

Einwilligungserklärung des Patienten

Mit meiner Einbeziehung in die Studie bin ich einverstanden. Über Zielsetzung und Verlauf der Studie wurde ich aufgeklärt. Mir ist bekannt, dass ich meine Einwilligungserklärung zur Teilnahme an der Studie jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne nachteilige Folgen zurückziehen kann.

Hiermit erkläre ich mich einverstanden, dass das von mir gespendete Blut für wissenschaftliche Untersuchungen verwendet wird. Es werden die Konzentrationen verschiedener Azathioprinmetaboliten bestimmt und eventuell Enzymaktivitätsmessungen durchgeführt. Abhängig vom Ergebnis dieser initialen Untersuchungen besteht die Möglichkeit, dass ein genetisches Screening durchgeführt wird.

Ich bin damit einverstanden, dass im Rahmen dieser Studie meine Krankheitsdaten verschlüsselt aufgezeichnet, verschlüsselt gespeichert und anonymisiert veröffentlicht werden und diese Aufzeichnungen zur Überprüfung an die zuständige Überwachungsbehörde oder die zuständige Bundesoberbehörde weitergegeben werden können.

Eine Kopie der Einwilligungserklärung habe ich erhalten.

Name: _____

Vorname: _____

Geburtsdatum: _____

Ort, Datum

Unterschrift des Patienten

Patientennr.:

3

Name, Vorname: _____

Geburtsdatum: _____

Telefonnummer für eventuelle Rückfragen: _____

Geschlecht: männlich weiblichErkrankung: Morbus Crohn Colitis ulcerosa

Seit wann besteht die Erkrankung? _____

Gewicht: _____ kg Körpergröße: _____ m

1. Nehmen Sie Azathioprin oder Mercaptopurin ein? Seit wann? _____

In welcher Dosierung (wie viele Tabletten am Tag)? _____

2. Tritt die Erkrankung bei Ihnen in Schüben auf, oder sind die Beschwerden chronisch?

 in Schüben chronisch keine Beschwerden

Bei einem Verlauf in Schüben: Wann war der letzte Schub?

Beginn: _____ Ende: _____

Wie viele Schübe treten seit Beginn der Azathioprin-Therapie durchschnittlich pro Jahr auf?

Durchschnittliche Dauer der Schübe: _____

Durchschnittliche Dauer der schubfreien Intervalle: _____

3. Wie sahen die Beschwerden vor Beginn der Azathioprin-Therapie aus?

 chronisch Schübe, durchschnittliche Anzahl der Schübe pro Jahr: _____

Durchschnittliche Dauer der Schübe: _____

Durchschnittliche Dauer der schubfreien Intervalle: _____

4. Leiden Sie zur Zeit an einer oder mehreren Fisteln?

 ja, an einer/mehreren nässenden Fisteln ja, an einer/mehreren verschlossenen Fisteln nein

4

5. Besteht bei Ihnen zur Zeit eine Stenose (Verengung) des Darms?

- ja
 nein

6. Haben Sie Azathioprin während einer Schwangerschaft eingenommen?

- ja
 nein

7. Sind Sie Raucher? ja nein Nichtraucher seit weniger als einem Jahr

8. Haben Sie jemals das Medikament Infliximab (Remicade®) erhalten?

- ja
 nein

Wenn ja, wie oft und wann? _____

In welcher Dosierung? _____

9. Nehmen Sie zur Zeit Cortison ein?

- ja
 nein

Wenn ja, seit wann: _____ bis: _____

Unterbrechungen: _____

Aktuelle Dosierung: _____

10. Nehmen Sie weitere Medikamente ein?

11. Haben Sie in letzter Zeit krankheitsbedingt abgenommen?

- ja, _____ kg in ca. _____ Wochen
 nein

12. Möchten Sie noch etwas hinzufügen? Wurde eine Frage vergessen?

5

Wie sahen Ihre Beschwerden *vor* und wie sehen sie *seit* Beginn der Azathioprin-Therapie aus?

vor Beginn der Azathioprin-Therapie:

durchschnittliche Stuhlfrequenz pro Tag:

durchschnittlicher Grad der
Bauchschmerzen (1 = keine Schmerzen,
6 = unerträgliche Schmerzen):

Allgemeinbefinden (1 = sehr gut, 6 =
unerträglich):

durchschnittliche Anzahl der Schübe pro
Jahr:

Haben Sie an einer (oder mehreren)
Fisteln gelitten?

- nein
 ja, sezernierend
 ja, nicht sezernierend

War bei Ihnen eine Stenose (Verengung)
des Darms bekannt?

- ja
 nein

Haben Sie dauerhaft (länger als 6
Monate) Cortison eingenommen?

- ja
 nein

Falls ja, wie viel mg pro Tag haben Sie
dauerhaft eingenommen?

seit Beginn der Azathioprin-Therapie:

durchschnittliche Stuhlfrequenz pro Tag:

durchschnittlicher Grad der
Bauchschmerzen (1 = keine Schmerzen,
6 = unerträgliche Schmerzen):

Allgemeinbefinden (1 = sehr gut, 6 =
unerträglich):

durchschnittliche Anzahl der Schübe pro
Jahr:

Leiden Sie an einer (oder mehreren)
Fisteln?

- nein
 ja, sezernierend
 ja, nicht sezernierend

Ist bei Ihnen eine Stenose (Verengung)
des Darms bekannt?

- ja
 nein

Haben Sie seit Beginn der Azathioprin-
Therapie dauerhaft (länger als 6 Monate)
Cortison eingenommen?

- ja
 nein

Falls ja, wie viel mg pro Tag haben Sie
dauerhaft eingenommen bzw. nehmen
Sie ein?

6

Bestimmung des Aktivitätsindex
(Crohn's Disease Activity Index/CDAI + Colitis ulcerosa-Aktivitätsindex/CAI)

1. Anzahl der ungeformten Stühle und Durchfälle in der **letzten Woche vor der Blutabnahme** (bitte für jeden Wochentag die Anzahl der Stühle in die Kästchen eintragen):

Mo	Di	Mi	Do	Fr	Sa	So
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

2. Bauchschmerzen in der letzten Woche: tägliche Einzelbewertung
 0 = keine, 1 = leichte, 2 = mäßige, 3 = starke (bitte für jeden Wochentag die Bewertung in die Kästchen eintragen)

Mo	Di	Mi	Do	Fr	Sa	So
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

3. Allgemeinbefinden in der letzten Woche: tägliche Einzelbewertung
 0 = meistens gut, 1 = mäßig, 2 = schlecht, 3 = sehr schlecht, 4 = unerträglich (bitte für jeden Wochentag die Bewertung in die Kästchen eintragen)

Mo	Di	Mi	Do	Fr	Sa	So
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

4. Bitte kreuzen Sie diejenigen Symptome (extraintestinale Manifestationen) an, unter denen Sie **zur Zeit** leiden:

- Gelenkschmerzen (Arthritis, Arthralgien)
 Augensymptome (Iritis, Uveitis)
 Läsionen an Haut oder Mund (Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum, Stomatitis aphthosa)
 Analfissur, Analfistel, perirektale Abszesse
 andere Fisteln
 Fieber über 37,5°C in den letzten 7 Tagen

5. Nehmen Sie **im Moment** Medikamente gegen Durchfall (z. B. Imodium®, Codein) ein?

ja nein Name des Medikaments: _____

6. Blutbeimengungen im Stuhl (auf der Basis des wöchentlichen Durchschnitts): keine wenig viel

7. Krampfartige Bauchschmerzen: keine leicht mittel stark

8. Erhöhte Temperatur: keine 37-38°C über 38°C

Fragebogen über die Lebensqualität von Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung (IBDQ)

Der vorliegende Fragebogen dient dazu, zu erfassen, wie es Ihnen in den **vergangenen 2 Wochen vor der Blutabnahme** gegangen ist. Sie werden danach gefragt, welche Symptome bei Ihnen als Folge Ihrer chronisch entzündlichen Darmerkrankung auftraten, wie Ihr Allgemeinbefinden und wie Ihre Stimmung waren. Bitte kreuzen Sie für jede Frage nur eine Antwort an.

1. Wie oft hatten Sie in den letzten 2 Wochen Stuhlgang? (Bitte nur eine Antwort ankreuzen.)

- Stuhlgang so oft wie bisher oder häufiger denn je
- extrem oft
- sehr oft
- mäßige Zunahme der Häufigkeit des Stuhlgangs
- geringe Zunahme der Häufigkeit des Stuhlgangs
- fast keine Zunahme der Häufigkeit des Stuhlgangs
- normal, keine Zunahme der Häufigkeit des Stuhlgangs

2. Wie oft war das Gefühl der Müdigkeit, Erschöpfung oder Abgeschlagenheit in den letzten 2 Wochen ein Problem für Sie?

- ständig
- meistens
- oft
- manchmal
- gelegentlich
- kaum
- nie

3. Wie oft haben Sie sich in den letzten 2 Wochen frustriert, ungeduldig oder ruhelos gefühlt?

- ständig
- meistens
- oft
- manchmal
- gelegentlich
- kaum
- nie

8

4. Wie oft konnten Sie in den letzten 2 Wochen auf Grund Ihres Darmproblems nicht zur Arbeit (zur Schule) gehen?

- ständig
- meistens
- oft
- manchmal
- gelegentlich
- kaum
- nie

5. Wie oft war Ihr Stuhlgang in den letzten 2 Wochen flüssig?

- ständig
- meistens
- oft
- manchmal
- gelegentlich
- kaum
- nie

6. Wie viel Energie hatten Sie in den letzten 2 Wochen?

- überhaupt keine Energie
- sehr wenig Energie
- wenig Energie
- etwas Energie
- mäßig viel Energie
- viel Energie
- volle Energie

7. Wie oft haben Sie sich in den letzten 2 Wochen Sorgen gemacht, wegen Ihres Darmproblems eventuell operiert werden zu müssen?

- ständig
- meistens
- oft
- manchmal
- gelegentlich
- kaum
- nie

9

8. Wie oft mussten Sie in den letzten 2 Wochen eine gesellschaftliche Verabredung wegen Ihres Darmproblems verschieben oder absagen?

- ständig
- meistens
- oft
- manchmal
- gelegentlich
- kaum
- nie

9. Wie oft hatten Sie in den letzten 2 Wochen Bauchkrämpfe?

- ständig
- meistens
- oft
- manchmal
- gelegentlich
- kaum
- nie

10. Wie oft haben Sie sich in den letzten 2 Wochen allgemein unwohl gefühlt?

- ständig
- meistens
- oft
- manchmal
- gelegentlich
- kaum
- nie

11. Wie oft waren Sie in den letzten 2 Wochen beunruhigt, weil Sie Angst hatten, keine Toilette (Badezimmer, WC) zu finden?

- ständig
- meistens
- oft
- manchmal
- gelegentlich
- kaum
- nie

10

12. Welche Schwierigkeiten hatten Sie in den letzten 2 Wochen, Ihre Freizeit- oder Sportaktivitäten auszuüben?

- äußerst schwierig; Aktivitäten waren unmöglich
- sehr schwierig
- ziemlich schwierig
- schwierig
- nicht so schwierig
- fast nicht schwierig
- nicht schwierig; Sport- und Freizeitaktivitäten waren durch das Darmproblem nicht eingeschränkt

13. Wie oft haben Sie in den letzten 2 Wochen Bauchschmerzen gehabt?

- ständig
- meistens
- oft
- manchmal
- gelegentlich
- kaum
- nie

14. Wie oft hatten Sie in den letzten 2 Wochen Probleme, nachts gut zu schlafen oder während der Nacht aufzuwachen?

- ständig
- meistens
- oft
- manchmal
- gelegentlich
- kaum
- nie

15. Wie oft haben Sie sich in den letzten 2 Wochen deprimiert oder entmutigt gefühlt?

- ständig
- meistens
- oft
- manchmal
- gelegentlich
- kaum
- nie

11

16. Wie oft haben Sie in den letzten 2 Wochen an Ereignissen nicht teilgenommen, weil es keine Toilette (Badezimmer, WC) in der Nähe gab?

- ständig
- meistens
- oft
- manchmal
- gelegentlich
- kaum
- nie

17. Wie groß war in den letzten 2 Wochen insgesamt das Problem, starke Winde abgehen zu lassen?

- ein sehr großes Problem
- ein großes Problem
- ein Problem
- problematisch
- weniger problematisch
- kaum problematisch
- kein Problem

18. Wie problematisch war es für Sie in den letzten 2 Woche insgesamt, Ihr Wunschgewicht zu halten oder zu erreichen?

- ein sehr großes Problem
- ein großes Problem
- ein Problem
- problematisch
- weniger problematisch
- kaum problematisch
- kein Problem

19. Viele Patienten mit Darmproblemen haben häufig Sorgen und Ängste im Zusammenhang mit Ihrer Erkrankung. Dazu gehören die Angst vor Krebs, die Sorge, sich nie mehr besser zu fühlen und Angst vor einem Rückfall. Wie oft waren Sie in den letzten 2 Wochen generell besorgt oder ängstlich?

- ständig
- meistens
- oft
- manchmal
- gelegentlich
- kaum
- nie

12

20. Wie oft hatten Sie in den letzten 2 Wochen Blähungen?

- ständig
- meistens
- oft
- manchmal
- gelegentlich
- kaum
- nie

21. Wie oft haben Sie sich in den letzten 2 Wochen entspannt und frei von Spannungen gefühlt?

- nie
- gelegentlich
- manchmal
- oft
- meistens
- fast ständig
- ständig

22. Wie oft hatten Sie in den letzten 2 Wochen ein Problem mit Rektumblutungen beim Stuhlgang?

- ständig
- meistens
- oft
- manchmal
- gelegentlich
- kaum
- nie

23. Wie oft war Ihnen in den letzten 2 Wochen Ihr Darmproblem peinlich?

- ständig
- meistens
- oft
- manchmal
- gelegentlich
- kaum
- nie

13

24. Wie oft hatten Sie in den letzten 2 Wochen das Gefühl, zur Toilette zu müssen, obwohl Ihr Darm entleert war?

- ständig
- meistens
- oft
- manchmal
- gelegentlich
- kaum
- nie

25. Wie oft haben Sie sich in den letzten 2 Wochen weinerlich oder verärgert gefühlt?

- ständig
- meistens
- oft
- manchmal
- gelegentlich
- kaum
- nie

26. Wie oft sind Sie in den letzten 2 Wochen durch versehentliche Verschmutzung Ihrer Unterwäsche geplagt worden?

- ständig
- meistens
- oft
- manchmal
- gelegentlich
- kaum
- nie

27. Wie oft waren Sie in den letzten 2 Wochen wegen Ihres Darmproblems verärgert?

- ständig
- meistens
- oft
- manchmal
- gelegentlich
- kaum
- nie

14

28. Inwieweit hat Ihr Darmproblem Ihre sexuelle Aktivität in den letzten 2 Wochen eingeschränkt?

- kein Sex wegen der Darmerkrankung
- große Einschränkung wegen der Darmerkrankung
- mäßige Einschränkung wegen der Darmerkrankung
- etwas Einschränkung wegen der Darmerkrankung
- geringe Einschränkung wegen der Darmerkrankung
- kaum Einschränkung wegen der Darmerkrankung
- keine Einschränkung wegen der Darmerkrankung

29. Wie oft sind Sie in den letzten 2 Wochen von Übelkeit oder ungutem Gefühl im Magen geplagt worden?

- ständig
- meistens
- oft
- manchmal
- gelegentlich
- kaum
- nie

30. Wie oft haben Sie sich in den letzten 2 Wochen gereizt gefühlt?

- ständig
- meistens
- oft
- manchmal
- gelegentlich
- kaum
- nie

31. Wie oft haben Sie sich in den letzten 2 Wochen von anderen unverstanden gefühlt?

- ständig
- meistens
- oft
- manchmal
- gelegentlich
- kaum
- nie

15

32. Wie zufrieden, glücklich oder erfreut waren Sie in den letzten 2 Wochen mit Ihrem/über Ihr Privatleben?

- äußerst unzufrieden, meistens unglücklich
- allgemein unzufrieden, unglücklich
- etwas unzufrieden, unglücklich
- allgemein zufrieden, erfreut
- meistens zufrieden, glücklich
- meistens sehr zufrieden, glücklich
- äußerst zufrieden, könnte nicht glücklicher oder erfreuter sein

Datenerhebungsbogen für ein telefonisches Interview

Datenerhebungsbogen telefonisches Interview

Name:
Telefonnummer:
Abnahmedatum:

Azathioprin-Einnahme seit:
Dosierung in mg:

Remission/Schub/chronischer Verlauf
Remission seit/letzter Schub:

Rauchen:
Glukokortikoide:
5-Aminosalicylate:
Infliximab:
Schwangerschaft:
Gewicht:
Körpergröße:

CDAI:
Stuhlfrequenz/Tag:
Bauchschmerzen:
Allgemeinbefinden:
extraintestinale Symptome:
Loperamid:

CAI:
Stuhlfrequenz/Tag:
Blut im Stuhl:
Bauchschmerzen:
Allgemeinbefinden:
Fieber:

Datum:

Datenerhebungsbogen für Aktenstudien

Datenerhebungsbogen Aktenstudie			
Name:			
Geburtsdatum:			
Telefon:			
Datum der Blutentnahme:			
Morbus Crohn / Colitis ulcerosa			
Gewicht:			
Größe:			
Erkrankung seit:			
Azathioprin-Einnahme seit:			
Aza/6-MP/Imurek:			
Dosierung:			
Schübe	chronisch		Remission (seit)
letzter Schub:			
Fistel/Abzseß:			
Stenose:			
Raucher:			
Schwangerschaft:			
Glukokortikoide:			
Infliximab:			
sonstige Medikamente:			
Gewichtsverlust:			
Stühle/d:			
Bauchschmerzen:			
Allgemeinbefinden:			
extraintestinale Symptome:			
Loperamid:			
Blut im Stuhl:			
Bauchkrämpfe:			
Fieber:			
Resistenz palpabel:			
OPs:			
refraktärer Verlauf/postOP Rezidiv:			
Befall:	Dünndarm	Dickdarm	Dünndarm+Dickdarm
Labor:			
Hb			
Hkt			
Leber			
CRP			
BSG			
Leukopenie			
Anämie			
Thrombozyten			
sonstige Erkrankungen:			
Datum:			

Auswertungsbogen für den CAI

CAI (Clinical Activity Index) nach Rachmilewitz

	Wert
Anzahl der Stühle pro Woche < 18 = 0, 18 - 35 = 1, 36 - 60 = 2, > 60 = 3	
Blut im Stuhl kein = 0, wenig = 2, viel = 4	
Allgemeinbefinden gut = 0, mäßig = 1, schlecht = 2, sehr schlecht = 3	
Bauchschmerzen keine = 0, leicht = 1, mäßig = 2, stark = 3	
Fieber infolge der Kolitis 37 = 0, > 38 = 3	
Extraintestinale Manifestationen Iritis = 3, Erythema nodosum = 3, Arthritis = 3	
Laborbefunde BSG > 50 mm (1 h) = 1, > 100 mm = 2, Hb < 10,0 g % = 4	
Summe	_____

Auswertungsbogen für den CDAI

CDAI (Crohn's Disease Activity Index) nach Best

Kriterium	Multiplikator	Ergebnis
Anzahl der ungeformten Stühle der letzten Woche:	x 2	
Grad der Bauchschmerzen Keine Schmerzen an ___ Tagen x 0 = _____ Leichte Schmerzen an ___ Tagen x 1 = _____ Mäßige Schmerzen an ___ Tagen x 2 = _____ Starke Schmerzen an ___ Tagen x 3 = _____ Gesamtsumme: _____	x 5	
Grad des Allgemeinbefindens über eine Woche Gutes Allgemeinbefinden an ___ Tagen x 0 = _____ Mäßiges Befinden an ___ Tagen x 1 = _____ Schlechtes Befinden an ___ Tagen x 2 = _____ Sehr schlechtes Befinden an ___ Tagen x 3 = _____ Unerträgliches Befinden an ___ Tagen x 4 = _____ Gesamtsumme: _____	x 7	
Assoziierte Symptome <ul style="list-style-type: none"> • Iritis/Uveitis • Stomatitis aphthosa • Pyoderma gangraenosum • Erythema nodosum • Arthralgien/Arthritis • Analfissur/Analfisteln • Andere Fisteln • Temperatur > 37°C 	x 20	
Anzahl der zutreffenden Punkte _____		
Symptomatische Durchfallbehandlung (z. B. Loperamid) Ja = 30 Nein = 0		
Resistenz im Abdomen Nein = 0 Fraglich = 2 Sicher = 5	x 10	
Hämatokrit Männer: 47 Frauen: 42 Minus Hämatokrit = _____	x 6	
Gewicht 1 – (Körpergewicht in kg/Standardgewicht in kg) = _____	x 100	
Gesamtsumme Aktivitätsindex		_____

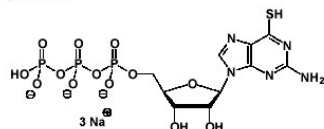
Datenblatt für 6-Thioguanosin-5'-Triphosphat

6-Thio-GTP

Data sheet

6-Thio-guanosine-5'-triphosphate, Sodium salt

Structure:



Catalogue-No.: NU-1106

Molecular Formula: $C_{10}H_{13}N_5O_{13}P_3S$ (Anion)

Molecular Weight: 536.22 (Anion)

Purity: > 95%, clear aqueous solution, pH 7.5

Storage conditions:

Short term exposure (up to 1 week cumulative) to ambient temperature possible. Long term storage at $\leq -20^\circ\text{C}$. If stored as recommended, Jena Bioscience guarantees optimal performance of this product for 12 months after date of delivery.

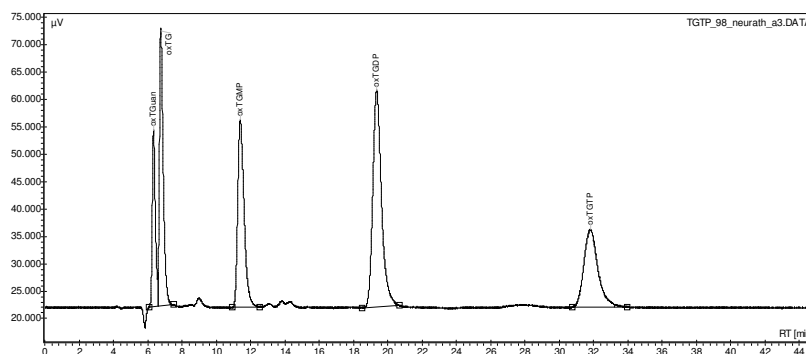
For research use only!

Prices / package sizes:

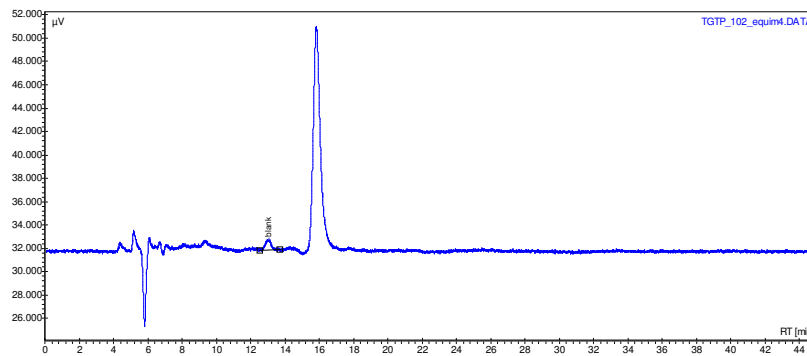
Cat.-No.	Amount (Units)
NU-1106S	150
NU-1106L	750

* 1 unit = 1 μl of a 10 mM solution

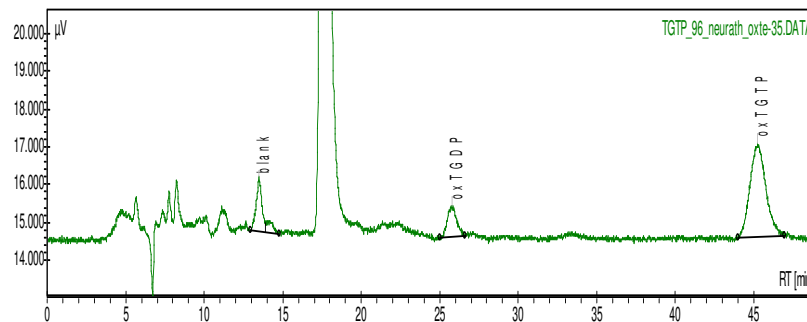
Chromatogramm für die Reinsubstanzen 6-TG, TGMP, TGDP, TGTP



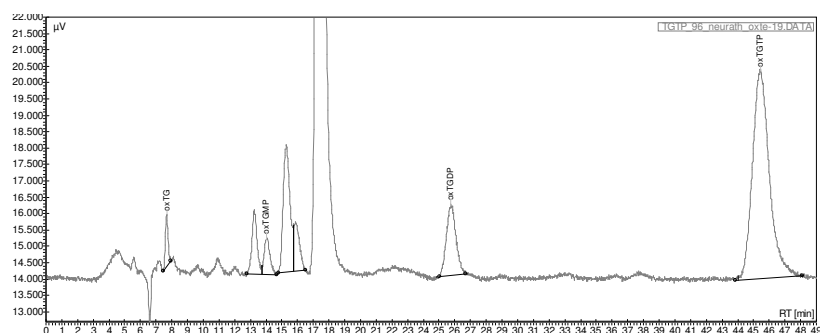
Chromatogramm für Blank-RBC



Chromatogramm für die Kalibrierprobe



Chromatogramm für die Patientenprobe



Geräteparameter und Messbedingungen für die HPLC

Es wurden 2 verschiedene HPLC-Anlagen eingesetzt:

HPLC-System 1: zur Bestimmung von MMP und MTG, bestehend aus Autosampler, HPLC-Pumpe, Säulentermostat, UV- und Fluoreszenzdetektor (hintereinandergeschaltet).

HPLC-System 2: zur Bestimmung von 6-TG, bestehend aus Autosampler, HPLC-Pumpe, Säulentermostat und UV-Detektor.

HPLC-System 1

Autosampler Injektionsvolumen 50 µl

HPLC-Säule Lichrospher C18 5 µm, 250x4,6 mm ID

Pumpenfluß 0,7 ml/min

Säulentermostat 35° C

Detektoreinstellungen für MMP UV-Detektor: 290 nm

für MTG Fluoreszenz-Detektor, EX: 315 nm, EM: 390 nm

Methodenparameter zur Datenaufnahme im Programm Galaxie:

Control Data rate 5 Pt/Sec

Voltage Range 1,0 Volt

Start on trigger Contact Closure

Acquisition: Acquisition length 15 minutes

HPLC-System 2

Autosampler Injektionsvolumen 50 µl

HPLC-Säule Xterra RP18, 3,5 µm, 150 · 4,6 mm ID, Waters

Vorsäule Kartusche Hypersil ODS, 5 µm

Pumpenfluß 0,6 ml/min

Säulentermostat 35° C

Detektoreinstellung UV-Detektor: 332 nm

Methodenparameter zur Datenaufnahme im Programm Galaxie:

Control Data rate 5 Pt/Sec

Voltage Range 1,0 Volt

Start on trigger Contact Closure

Acquisition: Acquisition length 15 minutes

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden mit Genehmigung als Posterbeiträge auf Kongressen oder in wissenschaftlichen Zeitschriften vorgestellt. Die Publikationen sind im Folgenden aufgelistet.

Posterbeiträge

M. F. Neurath, R. Kießlich, C. Fischer, **U. Teichgräber**, U. Hofmann, P. R. Galle, M. Schwab: Measurement of 6-thioguanosine mono-, di- and triphosphates for monitoring of azathioprine therapy in IBD; Digestive Disease Week, New Orleans, Louisiana, USA (2004)

U. Teichgräber, R. Kießlich, C. Fischer, U. Hofmann, M. Eichelbaum, P. R. Galle, M. Schwab, M. F. Neurath: Zusammenhänge zwischen 6-Thioguanosin-Di- und Triphosphat-Spiegeln in Erythrozyten und Ansprechen auf Azathioprin-Therapie bei Morbus Crohn; 49. Jahreskongress der Saarländisch-Pfälzischen Internistengesellschaft, Neustadt/Weinstraße (2005)

U. Teichgräber, R. Kießlich, C. Fischer, U. Hofmann, M. Eichelbaum, P. R. Galle, M. Schwab, M. F. Neurath: Zusammenhänge zwischen 6-Thioguanosin-Di- und Triphosphat-Spiegeln in Erythrozyten und Ansprechen auf Azathioprin-Therapie bei Morbus Crohn; 60. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, Köln (2005)

Originalarbeiten

Neurath, M. F., R. Kießlich, **U. Teichgräber**, C. Fischer, U. Hofmann, M. Eichelbaum, P. R. Galle und M. Schwab (2005). 6-thioguanosine diphosphate and triphosphate levels in red blood cells and response to azathioprine therapy in Crohn's disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **3**(10): 1007–14.