

Pharmacogenetic studies of thiopurines – focus on thiopurine methyltransferase

Malin Lindqvist

Klinisk farmakologi, IMV, Hälsouniversitetet, Linköpings universitet, 58185 Linköping
Malin.lindqvist@imv.liu.se, Disputation 050513

Vid laboratoriet för klinisk farmakologi vid Linköpings universitet i Linköping har forskning bedrivits kring tiopuriner sedan 1998. Mer än 5000 laboratorieanalyser av tiopurinmetyltransferas och tiopurinmetaboliter har genomförts på klinisk indikation för att underlätta utvärdering av tiopurinbehandling. Avhandlingen är sprungen ur ett samarbete mellan kliniska farmakologer, gastroenterologer och genetiker vid Linköpings universitet och US i Linköping. Handledare har varit Prof Curt Peterson (klinisk farmakolog), Doc Sven Almer (gastroenterolog) samt Prof Peter Söderkvist (genetiker).

Tiopuriner (6-merkaptopurin, 6-MP, azatioprin, AZA och 6-tioguanin, 6-TG) är en grupp läkemedel som utvecklades av Nobelpristagaren Gertrude Elion redan på 1950-talet. 6-MP (Puri-nethol®) är en av hörnstenarna i underhållsbehandlingen av akut lymfatisk leukemi hos barn, medan AZA (Imurel®) framförallt används för behandling av inflammatoriska tarm-sjukdomar (IBD), samt för att förhindra avstötning av transplanterade organ. 6-TG (Lanvis®) används för behandling av leukemi hos vuxna men har pga. levertoxicitet använts ytterst begränsat vid IBD. Skälen till de olika användningsområdena är snarare olika terapitradition än identifierade skillnader mellan medlens biokemiska effekter. Medlen genomgår en omfattande metabolism i kroppen.

Några metaboliter har identifierats som inaktiva nedbrytningsprodukter t.ex. tiourinsyra. Samtliga tiopuriner bildar samma terminala *fosforylerade* metaboliter (tioguaninnukleotider, TGN), av vilka trifosfaterna kan inkorporeras i DNA och

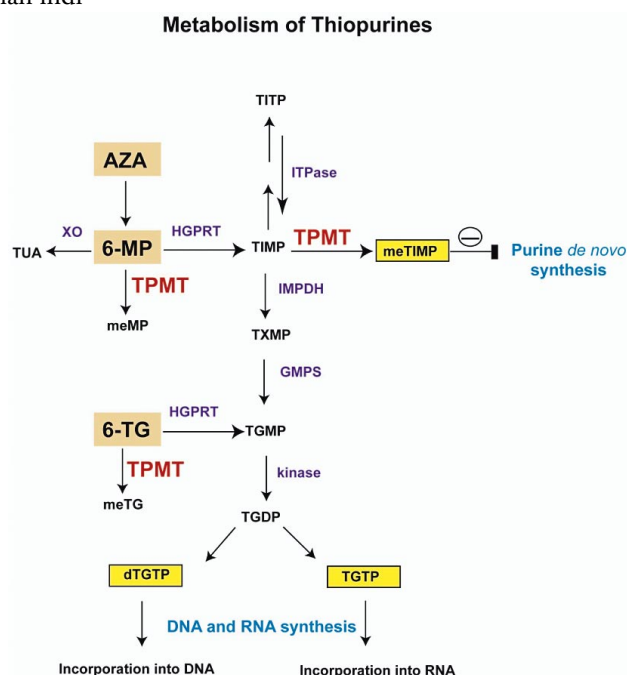
RNA och utöva cytotoxiska effekter. En annan metabolisk väg är *metylering*. Tiopurinmetyltransferas (TPMT) är ett cytosoliskt enzym som katalyserar *metylering* av sulfhydrylföreningar, inklusive 6-MP, 6-TG och AZA. Eftersom metyl-6-MP ej är cytotoxiskt på celler i kultur har man utgått ifrån att en hög metyleringsaktivitet leder till minskad klinisk effekt pga. kompetition med fosforyleringen. Vi menar att detta är en förenklad bild då vissa metylerade metaboliter, t.ex. meTIMP, har hög cytotoxicitet.

Det är väl känt att läkemedel kan ha mycket olika effekter på patienter med samma sjukdom trots att de får samma dos. En viktig orsak till detta är genetiskt betingade skillnader i uttryck av receptorer och aktiviteten av läkemedelsmetaboliserande enzymer. Det finns för vissa läkemedel stora skillnader mellan olika populationer vilket skulle tala för olika dosering till olika etniska grupper men det finns också stora variationer mellan individer i en befolkning baserat på normal genetisk variation, så kallade single nucleotide polymorphisms (SNPs). Kunskaper om den genetiska regleringen av tiopurinmetabolismen har öppnat nya möjligheter att individualisera behandlingen och fokus har sedan början av 80-talet legat på enzymet TPMT.

Enzymaktiviteten av TPMT uppvisar en genetisk polymorfism med trimodal distribution i de flesta befolkningar. Ca 90% har hög enzymaktivitet, 10% har intermediär enzymaktivitet och 1 på 300 har mycket låg enzymaktivitet. Individer med



sänkt enzymaktivitet löper hög risk för biverkningar vid behandling med normala doser tiopuriner då de ackumulerar höga koncentrationer av TGN. Aktiviteten av TPMT mäts i röda blodkroppar (fenotypning), eftersom det är känt att aktiviteten korrelerar med den i vita blodkroppar, lever- och njurceller. Ett alternativ till



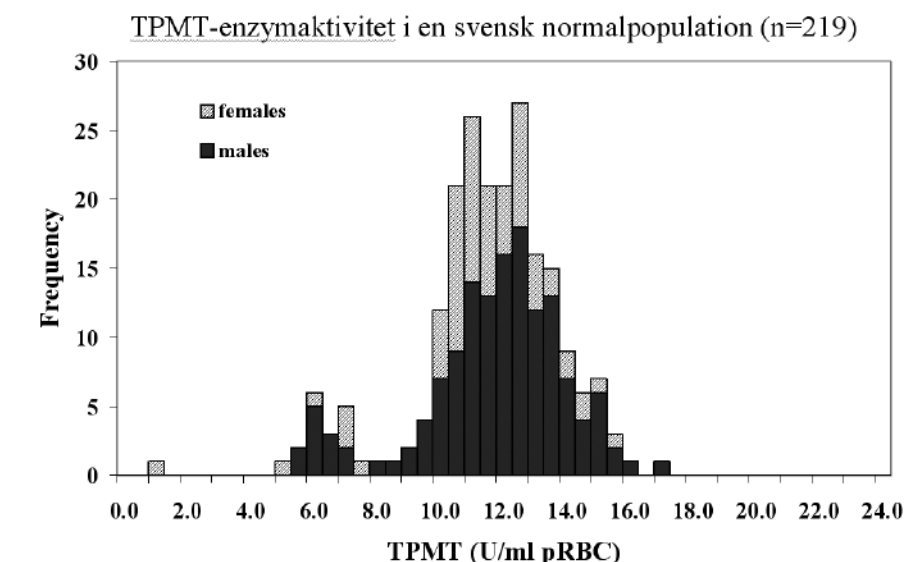
fenotypning är genotypning då man studerar förekomsten av TPMT-polymorfier. Genotypen är alltid densamma hos patienten, medan TPMT-aktiviteten som mäts i de röda blodkropparna kan påverkas av läkemedelsinteraktioner och den aktuella blodkroppsuppsättningen (patienten kan ha fått erytrocyttransfusioner eller ha en störd blodkroppproduktion pga. leukemi).

Det övergripande syftet med avhandlingen var att studera tiopurinens farmakogenetik med fokus på det polymorfa enzymet TPMT.

I studierna har vi satt upp molekylärbio-logiska metoder för att studera TPMT-genen. Dels en realtids-PCR metod för kvantifiering av TPMT-mRNA, och dels en genotypningsmetod för att studera polymorfier i TPMT-genen. Eftersom RNA är mycket instabil i ett vanligt blodprov (som t ex EDTA-rör) har vi därför också utvärderat ett nytt provrör som har tagits fram för att stabilisera RNA under längre tid, vilket skulle möjliggöra att prover skickas med post. I våra studier fann vi att detta rör inte stabiliserade de genprodukter vi studerade, även om den totala integriteten på RNA såg bra ut. Konklusionen blev att det därför är viktigt att undersöka stabiliteten av just den genprodukt man är intresserad av och inte integriteten av total RNA.

Vi undersökte vidare TPMT-aktivitet och genuttryck (mRNA-produktion) hos 39 individer. Vi var särskilt intresserade av relationen mellan genuttryck och enzymaktivitet inom den grupp med hög enzymaktivitet, som inte bär några polymorfier i TPMT-genen. Vi fann att TPMT-genuttrycket korrelerade med TPMT-enzymaktiviteten vid hög enzymaktivitet. Det är således troligt att den variation som finns i gruppen beror på skillnader i mRNA-produktion. Däremot fann vi ingen korrelation hos personer med sänkt enzymaktivitet som bär polymorfier. Detta överensstämmer med att de vanligaste polymorfier inte påverkar genuttrycket i sig, men leder till en snabb nedbrytning av bildat enzym.

Pyrosekvensering är en ny teknik för att enkelt kunna bestämma korta DNA-sek-



venser och metoden är mycket lämplig för att analysera polymorfier. Vi har satt upp metoder för att undersöka 12 olika polymorfier, som leder till sänkt enzymaktivitet. I en biobank med prover från 800 individer födda i Sverige, undersöktes frekvensen av de i andra befolkningar vanliga TPMT-polymorfier. Vi fann att ca 9% av individerna bär en variant TPMT-allel, vanligast var TPMT*3A (i vilken två polymorfier förekommer på samma allel), i överensstämmelse med undersökningar som gjorts i andra kaukasiska befolkningar.

Vi valde sedan ut 30 individer med IBD som inbördes hade stor spridning av enzymaktiviteter. Dessa genotypades för de då 10 kända polymorfier i TPMT-genen. För två obesläktade ungdomar överensstämde inte genotyp och fenotyp. Båda uppvisade en mycket låg enzymaktivitet, vilket indikerar en homozygot defekt genotyp, men de genotypades som heterozygoter för vildtyp-allelen (TPMT*1) och den i västerländsk befolkning vanligaste icke-funktionella allelen (TPMT*3A). Dessa fynd talade för att de kunde vara bärare av hittills okända icke-funktionella alleler. Föräldrarna undersöktes också. Alla protein-kodande delar av TPMT genen sekvenserades hos ungdomarna och föräldrarna. En av ungdomarna bär förutom TPMT*3A-allelen, ett basutbyte i startkodonet av TPMT-proteinet i exon III (TPMT*14). Båda föräldrarna uppvisade en intermediär fenotyp (TPMT-

enzymaktivitet 5,0 U/ml pRBCs och 6,3 U/ml pRBCs). Den nya polymorfin i startkodonet bekräftades hos fadern och modern genotypades som TPMT*1/*3A. Hos den andra ungdomen detekterades ännu en ny allel, som bestod i ett basutbyte i 3' intron VII/exon VIII acceptor splice site (TPMT*15). Både modern och fadern uppvisade en intermediär fenotyp med enzymaktivitet på 5,0 och 6,9 U/ml pRBCs. Den nya splicemutationen bekräftades hos modern, medan fadern genotypades som TPMT*1/*3A.

I studier på barn med leukemi har observerats att TPMT-aktiviteten varit högre efter en tids behandling med tiopuriner jämfört med före start av behandling. Detta skulle kunna bero på enzyminduktion och innebära att läkemedelsdosen egentligen borde ökas under behandlingens gång för att behålla full effekt av behandlingen. För att studera mekanismerna bakom en eventuell sådan induktion har vi följt 60 patienter med IBD som satts in på tiopuriner utefter ett standardiserat doseringsschema. Dosen trappades under de tre första veckorna upp till fulldos. Patienterna har följts med provtagning under 20 veckor. Vi tog prover för mätning av TPMT-enzymaktivitet, TPMT-genuttryck (mRNA) och tiopurinmetabolitnivåer (TGN och meTIMP). Behandlingens effekt och uppkomst av biverkningar registrerades. Av de 60 inkluderade patienterna, exkluderas 1 pga. mkt låg TPMT-aktivitet, 5 pga

non-compliance och 27 pga. biverkningar. Tjugosju patienter fullföljde studien som planerat. Det är sannolikt att den höga biverkningsfrekvensen beror på en väl snabb upptrappning av dosen. Vi fann att TPMT-aktiviteten var stabil under 20 veckors perioden, men att TPMT-genuttrycket sjönk redan efter 1 veckas behandling. Detta fynd är mycket intressant och ska studeras närmare. Vi fann dock att hos individer med låg enzymaktivitet, skedde en viss ökning under behandlingstiden, men inte som en följd av att TPMT-mRNA-produktionen ökade. Individer heterozygota för TPMT*1/*3A hade en lägre sannolikhet att fullfölja studien som planerat jämfört med de som hade två funktionella alleler. Steady-state nivåer av tiopurinmetaboliterna uppnåddes v. 5, dvs. efter två veckor på stabil dos. Vi kunde inte finna några bevis för att interaktioner med 5-ASA preparat påverkade metabolitkoncentrationer i vår studie. Det har förekommit rapporter om att polymorfier i genen för enzymet ITPase skulle leda till ackumulation av toxiska tiopurinmetaboliter, och därmed ge biverkningar. Samtliga patienter genotypades för ITPase polymorfin ITPA94C>A, men vi kunde inte finna någon relation mellan biverkningsförekomst och denna polymorfi. Betydelsen av ITPase för biverkningsuppkomst vid behandling med tiopuriner är alltså tveksam och ITPase-genotypning har idag ingen plats i den kliniska rutinprovtagningen.

Sammanfattningsvis har resultaten i avhandlingen gett oss en ökad förståelse av den genetiska regleringen av TPMT, två nya TPMT-alleler har upptäckts och beskrivits hos två svenskar, och vi har visat att TPMT-aktiviteten generellt inte induceras hos IBD-patienter under tiopurinbehandling. Avhandlingen lägger en grund för bättre möjligheter att individualisera tiopurinbehandlingen av patienter med IBD. I fortsättningen kommer fördjupade mekanistiska studier att genomföras genom att metoder sätts upp för detektion av fler tiopurinmetaboliter i nukleära celler såsom vita blodkroppar och benmärgsblaster, som ju är målcellerna för tiopurinbehandlingen. Andra enzym inblandade i tiopurinmetabolismen (IMPDH och HGPRT) kommer också att studeras närmare.