

Interindividual differences in thiopurine metabolism – studies with focus on inflammatory bowel disease



Respondent: Sofie Haglund, Biokemist, Medicinsk diagnostik, laboratoriemedicin, Länssjukhuset Ryhov, Jönköping.

Huvudhandledare: Professor Sven Almer, Institutionen för Klinisk och experimentell medicin, Linköpings universitet samt EM-kliniken, Universitetssjukhuset, Linköping.

Biträdande handledare: Professor Curt Peterson, Avdelningen för Läkemedelsforskning, Institutionen för Medicin och hälsa, Linköpings Universitet.

Docent Jan Söderman, Medicinsk diagnostik, laboratoriemedicin, Länssjukhuset Ryhov, Jönköping.

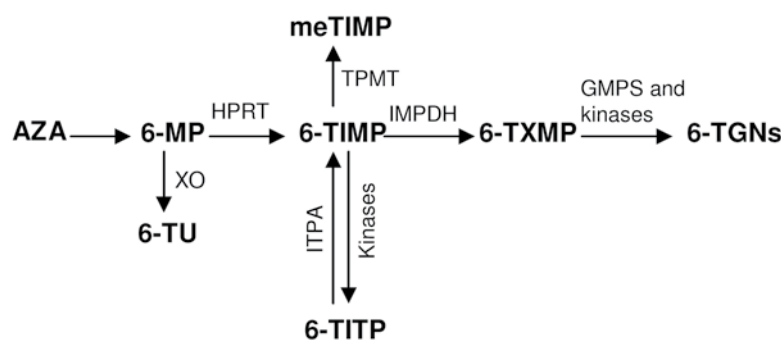
Opponent: Professor Åke Nilsson, Gastroenterologi och nutrition, Institutionen för Kliniska vetenskaper, Lunds Universitet.

Det är sedan tidigare välkänt att genetiska variationer i vissa enzymer som metaboliserar läkemedel i kroppen spelar stor roll för hur patienten tolererar dem. En ökad kunskap om olika faktorer, såväl genetiska som andra, vilka påverkar omsättningen av läkemedel kan bidra till möjligheten att individanpassa en potentiellt toxisk behandling för att undvika allvarliga biverkningar, men även utebliven effekt.

Immunhämmande läkemedel som tiopuriner (azatioprin och 6-merkaptopurin) används bland annat vid kronisk inflammatorisk tarmsjukdom (ulcerös kolit och Crohns sjukdom). I kroppen omvandlas de via en omfattande metabolism till aktiva metaboliter; tioguanin-nukleotider (6-TGN) och metyltioinosinmonofosfat (meTIMP; Figur 1). Användningen av tiopuriner begränsas av allvarliga biverkningar eller utebliven effekt hos ända upp till 40% av patienterna. Delvis förklaras den ökade risken för biverkningar av genetiska varianter som resulterar i låg aktivitet i det välkaraktäriserade enzymet tiopurin S-metyltransferas (TPMT). TPMT-aktiviteten korrelerar positivt till metaboliten meTIMP och negativt till de viktigaste immunhämmande metaboliterna 6-TGN.

Delstudie I

I en inledande studie utvecklades en metod baserad på pyrosekvensering för att bestämma alla då kända genvarianter av *TPMT*. Förekomsten av de vanligaste varianterna (*TPMT*2*, *TPMT*3A*, *TPMT*3B*, *TPMT*3C*) undersöktes i en svensk bakgrundspopulation bestående av 800 individer från sydöstra Sverige. Vi observerade att 91% av befolkningen inte bar någon av de undersökta genvarianterna och de



Figur 1. Förenklad bild över metabolismen av azatioprin (AZA) och 6-merkaptopurin (6-MP). XO, xantinoxidas; HPRT, hypoxantinguaninfosforibosyltransferas; TPMT, tiopurine S-metyltransferas; IMPDH, inosin 5'-monofosfatdehydrogenas; ITPA, inosintrifosfat; GMPS, guanosinmonofosfat-syntetas; 6-TU, 6-tiourinsyra; 6-TIMP, 6-tioinosinmonofosfat; 6-TXMP, 6-tioxantoinmonofosfat; 6-TITP, 6-tioinosintrifosfat; meTIMP, metyltioinosinmonofosfat; 6-TGNs, 6-tioguaninnukleotider.

Sofie Haglund et al. The role of inosine-5'-monophosphate dehydrogenase in thiopurine metabolism in patients with inflammatory bowel disease. *Therapeutic Drug Monitoring* 2011; 33(2): 200-208. ©Wolters Kluwer Health.

kan därför antas ha normal enzymaktivitet (Tabell I). Förekomsten av de olika genvarianterna var ungefär desamma som i andra europeiska populationer.

TPMT genotyp	Allelfrekvens (n = 1600)
<i>TPMT*3A</i> (G460A, A719G)	3.75
<i>TPMT*3C</i> (A719G)	0.44
<i>TPMT*3B</i> (G460A)	0.13
<i>TPMT*2</i> (G238C)	0.06

Tabell I. Förekomsten av de vanligaste genetiska varianterna, efter vildtyp, av *TPMT* i en svensk bakgrundspopulation.

Överensstämmelsen mellan genotyp och fenotyp bland 30 patienter selekterade utifrån *TPMT*-aktivitet var 93%. DNA från de två diskordanta patienterna sekvenserades senare. Dessa individer visades bära två icke tidigare kända genvarianter av *TPMT*.

Fenotypning och/eller genotypning av TPMT innan behandling med tiopuriner sätts in rekommenderas av the Food and Drug Administration (FDA) sedan 2004. Sedan 2006 utför vårt laboratorium i Linköping fenotypning och genotypning för de vanligaste genvarianterna av *TPMT* parallellt som rutin.

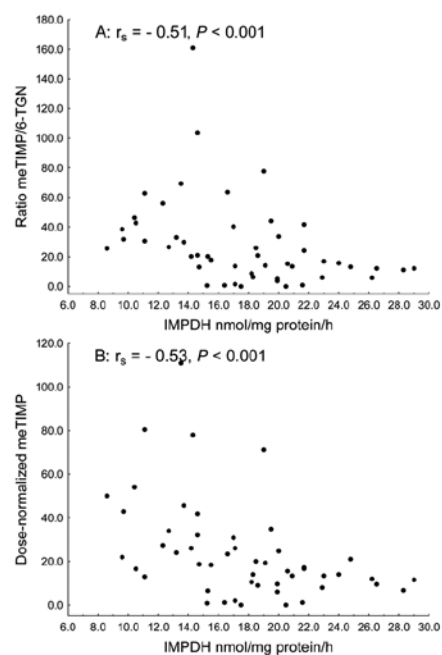
Delstudie II och III

Alla oönskade effekter av tiopuriner kan inte förklaras utifrån TPMT. Patienter med en oväntat hög kvot meTIMP/6-TGN och normal TPMT-aktivitet har i tidigare studier visats vara utsatta för såväl en större risk att svara sämre på behandlingen (otillräckligt 6-TGN), som en ökad risk för hepatotoxicitet (för mycket meTIMP) men även myelotoxicitet. En reducerad aktivitet av enzymet inosinmonofosfatdehydrogenas (IMPDH) skulle, utifrån dess placering i tiopurinmetabolismen (Figur 1), kunna

förklara en sådan avvikande metabolitprofil. Den cellulära IMPDH-aktiviteten utgörs av summan av två genprodukter IMPDH 1 och IMPDH 2. Dessa har näst intill identiska kinetiska egenskaper och går ej att särskilja enzymatiskt.

I två studier undersöktes mängden bildade metaboliter i relation till IMPDH-aktiviteten, dels i en oselektad grupp patienter (n=50) och dels i en grupp (n=60) som selekterats utifrån specifika metabolitprofiler (hög, normal, eller låg meTIMP/6-TGN kvot). Dessutom kartlades IMPDH-aktiviteten bland 100 blodgivare.

IMPDH-aktiviteten spände över ett brett intervall både bland blodgivare och patienter. Det rådde ingen skillnad i aktivitet mellan de två grupperna. IMPDH-aktiviteten var lägre bland patienter med höga metabolitkvoter (meTIMP/6-TGN >20), vilket förklarades av ett negativt samband till mängden bildad meTIMP (Figur 2).



Figur 2. IMPDH-aktivitet och dosnormaliserade metabolitkoncentrationer bland patienter med normal TPMT-aktivitet, selekterade utifrån metabolitprofiler (n=50), delarbete III.

Modifierad från Sofie Haglund et al. *The role of inosine-5'-monophosphate dehydrogenase in thiopurine metabolism in patients with inflammatory bowel disease. Therapeutic Drug Monitoring* 2011; 33(2): 200-208. ©Wolters Kluwer Health.

Inget samband till koncentrationen 6-TGN noterades. I delstudie III inkluderades även en grupp patienter (n=10) med reducerad TPMT-aktivitet (<8.9 U/mL pRBC). IMPDH-aktiviteten bland dessa var inte annorlunda jämfört med de med normal TPMT-aktivitet. Alla patienter med reducerad TPMT-aktivitet visade ett metabolitratio <10. Med hjälp av en cellmodell (HEK293 celler) undersöktes IMPDHs roll i ett kontrollerat system avseende tiopurinbehandlingen ytterligare. Modellen tillät samtidigt modulering av TPMT-aktiviteten. Då IMPDH-aktiviteten nedreglerades med hjälp av siRNA-teknik, erhöles tvärt emot det förväntade, en stegring av 6-TGN oavsett TPMT-status, vilket antyder effekter av andra farmakogener än IMPDH och TPMT. Även om förhållandena i kroppen och i en cellmodell inte är helt jämförbara så pekar resultaten på att 6-TGN regleras av andra, ännu okända farmakogener.

Delstudie IV

För att identifiera nya farmakogener av betydelse för metabolitprofilen och mängden bildade metaboliter utfördes en helgenoms-expressionsanalys där uttrycket av samtliga gener i det mänskliga genomet jämfördes mellan grupperna; kvot meTIMP/6-TGN >20, kvot 10-14, samt kvot ≤4, i en explorativ patient-kohort (n=23). Data validerades med kvantitativ realtids-PCR och i en oberoende patient-kohort (n=33). Denna analys visade inga signifikanta gruppskillnader som kunde karaktärisera metabolitprofilerna med hjälp av diskriminantanalys. För att öka möjligheten att identifiera subtila samband mellan uttrycksnivåer och metabolitkoncentrationer kombinerades de två kohorterna. En separat analys av gener relaterade till tiopurinmetabolismen visade stora interindividuella skillnader i genuttryck, men endast små skillnader mellan metabolitprofilerna. Vår preliminära data-analys visade att koncentrationen av meTIMP korrelerade positivt till uttrycket av genen för 5'-ectonukleotidas (*NT5E*) och negativt till *TPMT*. Koncentrationen av 6-TGN korrelerade positivt till uttrycket av genen för transportproteinet equilibrative nucleoside transporter 1 (*SLC29A1*) och negativt till genen för hypoxantinguanin-fosforibosyltransferas. En interaktion mellan genuttrycken av *NT5E* och *SLC29A1* kunde tillsammans förklara 16% av variationen i kvoten meTIMP/6-TGN.

Konklusion

Sammantaget visar våra resultat att pyrosequensering är en enkel och flexibel metod för genotypning. Den har införts i den kliniska verksamheten och används parallellt till aktivitetsmätningarna av TPMT. Vidare visar resultaten att regleringen av tiopurinmetabolismen är komplex och att en hög meTIMP/6-TGN kvot sannolikt involverar fler farmakogener än *IMPDH* and *TPMT*. Avsaknaden av signifikanta resultat i den initiala helgenoms-expressionsanalysen kan bero på att en individs metabolitprofil orsakas av interaktioner mellan många gener där var och en bidrar med små effekter. För att utreda det vore det idealt om såväl metabolitkoncentrationer som enzymaktiviteter och genuttryck kunde analyseras i målcellerna för behandlingen, dvs. de vita blodkropparna. För närvarande har data från ytterligare ett set av gener, identifierade utifrån helgenoms-expressionsanalysen, bearbetats. Preliminära analyser har visat att det finns en samvariation mellan ett antal nya kandidatgener och mängden bildade metaboliter. Genom våra studier har kunskapen kring faktorer som kan påverka tiopurinmetabolismen ökat samtidigt som de ytterligare belyser dess komplexitet.

Sofie Haglund

Medicinsk diagnostik,
laboratoriemedicin
Länssjukhuset Ryhov
551 85 Jönköping
sofie.haglund@lj.se

Delarbeten i avhandlingen:

- Sofie Haglund, Malin Lindqvist, Sven Almer, Curt Peterson, Jan Taipalensuu. Pyrosequencing of TPMT alleles in a general Swedish population and in patients with inflammatory bowel disease. *Clinical Chemistry* 2004; Feb;50(2): 288-295.
- Sofie Haglund, Jan Taipalensuu, Curt Peterson, Sven Almer. IMPDH activity in thiopurine-treated patients with inflammatory bowel disease – relation to TPMT activity and metabolite concentrations. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2008; Jan;65(1): 69-77
- Sofie Haglund, Svante Vikingsson, Jan Söderman, Ulf Hindorf, Christer Grännö, Margareta Danellius, Sally Coulthard, Curt Peterson, Sven Almer. The role of inosine-5'-monophosphate dehydrogenase in thiopurine metabolism in patients with inflammatory bowel disease. *Therapeutic Drug Monitoring* 2011; 33(2): 200-208
- Sofie Haglund, Sven Almer, Curt Peterson, Jan Söderman. Pharmacotranscriptomics in thiopurine treated IBD patients with different metabolite profiles. Manuscript submitted as Pharmacotranscriptomics in thiopurine treated patients with IBD identifies new candidate genes associated with the concentration of meTIMP and 6-TGN.