

## Thiopurin-S-Methyltransferase (TPMT) Genotypisierung

Ab sofort bietet das ZIMCL die Genotypisierung der Allele \*2, \*3B, \*3C und \*3A des Enzyms Thiopurin-S-Methyltransferase (TPMT, OMIM-ID \*187680) mittels PCR und nachfolgender Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)-Analyse an.

---

### KURZINFO

Bedeutung der TPMT: TPMT ist ein Enzym, welches im Rahmen der Biotransformation körperfremde Substanzen wie 6-Mercaptopurin, 6-Thioguanin oder das Immunsuppressivum Azathioprin methyliert und dadurch ausscheidbar macht. Bei reduzierter TPMT-Aktivität kann es zu erhöhten intrazellulären Konzentrationen und dadurch zu toxischen Nebenwirkungen (Panzytopenie) kommen.

Verminderung der TPMT-Aktivität: Unterschiede in der TPMT-Aktivität sind genetisch durch Polymorphismen im TPMT-Gen bedingt. Die in Europa häufigsten genetischen Varianten, welche eine erniedrigte TPMT-Aktivität verursachen, sind TPMT\*2 (G238C), TPMT\*3B (G460A), TPMT\*3C (A719G) und TPMT\*3A (kombiniert G460A und A719G Polymorphismus). Diese Genotypen sind für >95% der genetisch bedingten verminderten TPMT-Aktivitäten ursächlich. Eine reduzierte Aktivität tritt in Europa bei ca. 11% der Bevölkerung auf.

TPMT-Genotypen und Enzymaktivität:

Genotyp	Anzahl mut. Allele	Enzymaktivität
TPMT *1/*1	0	hoch
TPMT *1/*2	1	intermediär
TPMT *1/*3A	1	intermediär
TPMT *1/*3C	1	intermediär
TPMT *2/*2	2	nieder
TPMT *2/*3A	2	nieder
TPMT *3A/*3A	2	nieder
TPMT *3A/*3C	2	nieder

Eine verringerte (intermediäre bzw. niedere) Enzymaktivität erfordert eine Dosisadaptierung zur Reduktion des Risikos von unerwünschten Arzneimittel-Nebenwirkungen.

Indikation der TPMT-Genotypisierung: Die TPMT-Genotypisierung ist indiziert bei Patienten, bei denen eine Therapie mit 6-Mercaptopurin, 6-Thioguanin oder Azathioprin geplant ist (z.B. im Rahmen akuter Leukämien, entzündlicher Darmerkrankungen, Hauterkrankungen oder nach Transplantation), um das Toxizitäts-Risiko frühzeitig zu erkennen und eine Dosisadaptierung vornehmen zu können.

Anforderung der TPMT Genotypisierung: Benötigt werden 3ml EDTA-Blut. Bei längeren Transportzeiten (>30 min) ist die Probenanlieferung bei 4-8°C erforderlich (nicht frieren!). Zur Durchführung dieser Analyse ist keine Einverständniserklärung erforderlich. Bei manueller Anforderung im Feld *Zusatzanalytik* „TPMT-Genotypisierung“ vermerken oder online unter „TPMT-Genotypisierung“ anfordern. Dauer der Untersuchung: ca. 1 Woche nach Probeneingang.

**Pharmakogenetik der Thiopurine und die Rolle der TPMT**

6-Mercaptopurin, welches u.a. auch durch Umwandlung aus Azathioprin entstehen kann, wird durch eine Reihe von enzymatischen Reaktionen in 6-Thioguanin-Nucleotide (6-TGNs) umgewandelt. Diese aktiven Metaboliten können in der Folge in die DNA eingebaut werden, wo sie zu einem Strangabbruch führen und dadurch ihre Wirkung entfalten. In vivo werden die Thiopurine durch zwei grundlegende Reaktionen inaktiviert: Durch Oxidation mittels Xanthin-Oxidase (XO) oder durch Methylierung mittels TPMT.

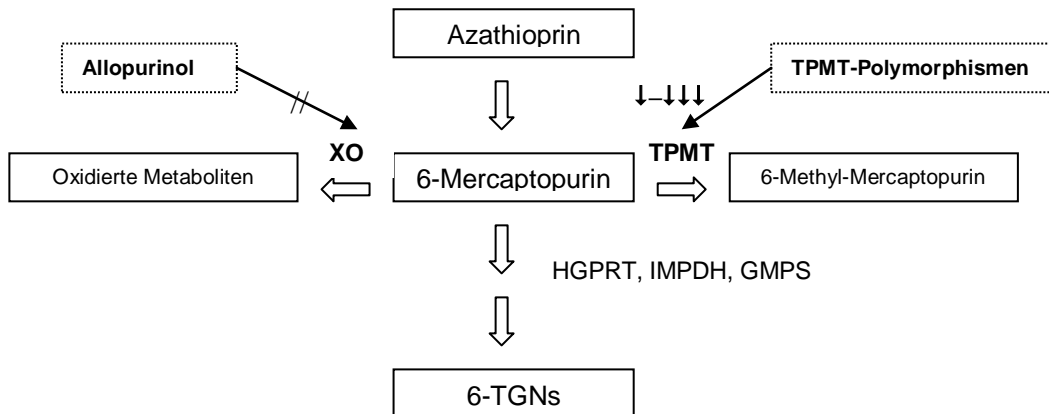


Abb. 1: Schema Verstoffwechslung der Thiopurine (modifiziert nach Dewit et al, 2010)

(XO: Xanthin-Oxidase; TPMT: Thiopurin-S-methyltransferase; 6-TGNs: 6-Thioguanin-Nucleotide; HGPRT: Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase; IMPDH: Inosinmonophosphat-Dehydrogenase; GMPS: Guaninmonophosphat-Synthetase)

Während der Großteil der Thiopurine durch die XO verstoffwechselt wird, ist die Methylierung durch TPMT in hämatopoetischen Zellen durch Abwesenheit der XO der einzige Metabolisierungsweg. Zudem sind Varianten in der TPMT viel häufiger. Nachdem die TPMT-Aktivität umgekehrt proportional zum Spiegel der aktiven 6-TGNs ist, dürfen Patienten mit einer durch Polymorphismen bedingten niederen Aktivität nur 1/10 bis 1/15 der Standarddosis erhalten, um eine erhöhte Konzentration und in der Folge medikamenteninduzierte Myelosuppression zu verhindern.

TPMT	Subjects (N)	Phenotype	Therapeutic dose recommendation	
Azathioprine/ Mercaptopurine	2,853	PM	Select alternative drug or reduce dose by 90%. Increase dose in response of hematologic monitoring and efficacy	455-467
		IM	Select alternative drug or reduce dose by 50%. Increase dose in response of hematologic monitoring and efficacy	455, 456, 458, 459, 461, 462, 464-466, 468-477
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> <b>PM (Poor metabolizer):</b>                      2/2, 2/3A, 3A/3A, 3A/3C  <b>IM (Intermediate metabolizer):</b>                      1/2, 1/3A, 1/3C                 </div>				
Thioguanine	792	PM	Select alternative drug. Insufficient data to allow calculation of dose adjustment	478, 479
		IM	Select alternative drug. Insufficient data to allow calculation of dose adjustment	480-483

Tab. 1: Empfehlungen der Royal Dutch Association for the Advancement of Pharmacy für TPMT-Dosisanpassungen (Swen et al, Clinical Pharmacology & Therapeutics 89, 662-673 (May 2011)

(⇒ siehe auch [www.pharmgkb.org/](http://www.pharmgkb.org/), [medicine.iupui.edu/clinpharm/ddis/table.asp](http://medicine.iupui.edu/clinpharm/ddis/table.asp), [www.genemedrx.com/](http://www.genemedrx.com/) und [secure.medicalletter.org/](http://secure.medicalletter.org/))

**Wissenschaftlicher Hintergrund:**

Das Enzym Thiopurin-S-methyltransferase (TPMT) ist ein zytosolisches Enzym, welches in vielen Geweben, insbesondere in Leber, Niere und Darm exprimiert wird. Es wandelt im Rahmen der Biotransformation durch eine S-Methylierung nicht ausscheidbare Stoffe wie Katecholamine, Phenole oder Thiole in ausscheidbare Verbindungen um. Als Methyl-Donor fungiert dabei S-Adenosyl-L-Methionin, welches zu S-Adenosyl-L-Homocystein konvertiert wird.

Dieser Vorgang ist auch in die Ausscheidung von körperfremden Substanzen wie z.B. der antineoplastischen Therapeutika 6-Mercaptopurin und 6-Thioguanin oder des Immunsuppressivums Azathioprin involviert. Die genannten Medikamente, die Thiopurine, wirken als Antimetaboliten und werden bei akuter lymphoblastischer Leukämie, bei Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoider Arthritis und Mb. Crohn oder zur Immunsuppression nach Organtransplantationen eingesetzt. Ihr therapeutischer Bereich ist jedoch relativ begrenzt. Eine Überdosierung kann zu lebensbedrohlicher Medikamenten-induzierter Toxizität (hierbei insbesondere zu Myelosuppression) führen. Bereits vor 30 Jahren wurde eine starke Varianz in der Enzymaktivität der TPMT beschrieben (siehe Abb. 1).

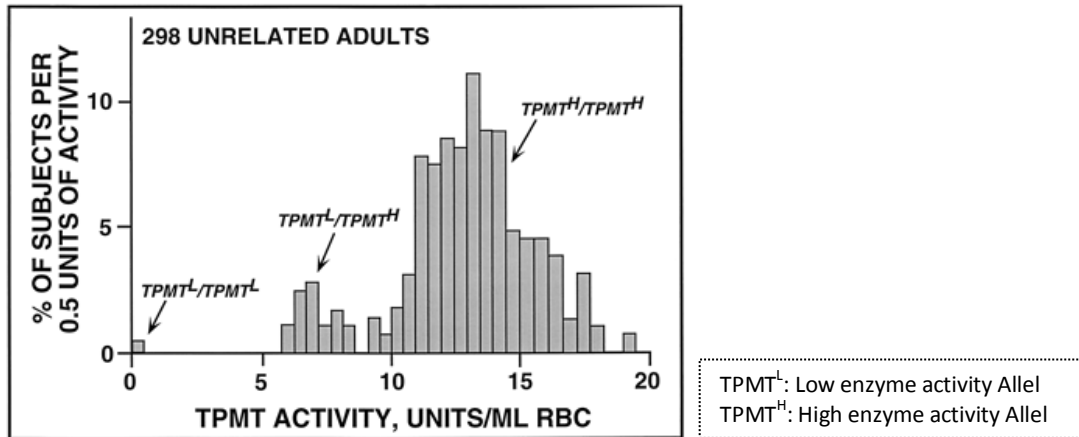


Abb. 2: Häufigkeitsverteilung der TPMT-Aktivität von 298 randomisierten Patienten (Weinshilboum und Sladek, 1980)

Das TPMT-Gen ist auf Chromosom 6 (6p22.3) lokalisiert und weist eine Größe von 34kb auf. 21 genetische TPMT-Polymorphismen sind bis dato bekannt. Die größte Auswirkung auf die TPMT-Aktivität weisen die Varianten G238C, G460A und A719G auf. Zusammen sind diese drei Polymorphismen für 95% der vererbten TPMT-Defizienzen ursächlich. Wahrscheinlich führen diese SNPs durch Veränderung der Tertiärstruktur zu einem verstärkten Abbau des TPMT-Proteins und somit zu einer reduzierten Proteinmenge. Die häufigste Allel-Variante mit einer Frequenz von ca. 4% in der kaukasischen Bevölkerung ist TPMT \*3A (kombiniertes Vorliegen von G460A und A719G auf einem Allel). In Ost-Asien tritt hingegen der Genotyp \*3C (A719G) am häufigsten auf (bei ca. 4%), während die Frequenz der Genotypen \*2 und \*3B geringer ist (siehe Abb. 2 und Tab. 1).

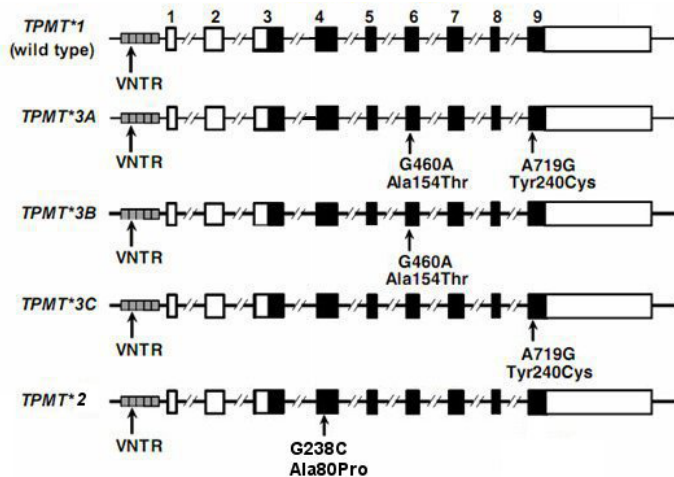


Abb. 3: Übersicht der TPMT-Genotypen (modifiziert nach Wang et al, 2006)

Allel	Anteil bei Kaukasiern	Anteil bei Afrikanern	Anteil bei Asiaten
TPMT*2	0,17%	0,4%	n.n.
TPMT*3A	3,2%	0,8%	n.n.
TPMT*3B	n.n.	n.n.	n.n.
TPMT*3C	0,17%	2,4%	4,7%
<b>Total mut.</b>	<b>3,7%</b>	<b>4,6%</b>	<b>4,7%</b>
<b>TPMT*1 (WT)</b>	<b>96,3%</b>	<b>95,4%</b>	<b>95,3%</b>

Tab. 2: Prozentuelle Anteile des TPMT-Genotyps in einzelnen ethnischen Populationen (Hon et al, 1999; Collie-Duguid et al, 1999)

Die Vererbung erfolgt autosomal kodominant. Alle genannten Genotypen sind mit einer signifikanten Reduktion des TPMT-Proteins assoziiert. Das heterozygote Vorliegen einer Variante verursacht idR eine intermediär erniedrigte Enzymaktivität, eine Variante in beiden Allelen dagegen eine stark erniedrigte Enzymaktivität (siehe Abb. 1). Andererseits unterscheidet sich die relativ häufige heterozygote Ausprägung des Genotyps 3A\* (\*1/\*3A) stark von einer sehr seltenen compound-Heterozygotität der Genotypen \*3B und \*3C (\*3B/\*3C), obwohl die gleichen SNPs betroffen sind: Während \*1/\*3A eine intermediäre Aktivität zur Folge hat, verursacht \*3B/\*3C eine sehr niedrige (siehe Abb. 4).

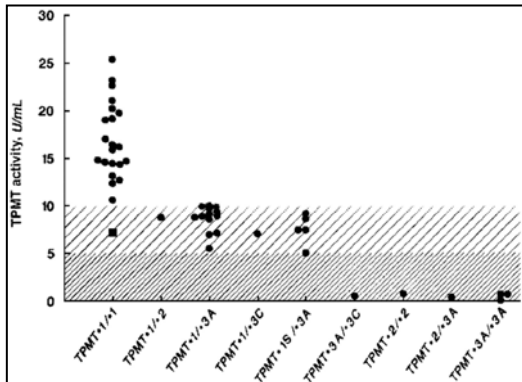


Abb. 4: Korrelation TPMT-Genotyp / Phänotyp

### **Pharmakogenetische Bedeutung der TPMT-Polymorphismen**

Es gibt eine klare Korrelation zwischen TPMT-Variante und Enzymaktivität. In jedem Fall kann bei Vorliegen wenigstens einer genetischen Variante eine Reduktion der TPMT-Enzymaktivität erwartet werden. Eine normale Enzymaktivität ist bei Trägern zweier Wildtypallele zu erwarten, vorausgesetzt, es beeinflussen keine anderen nicht-genetischen Faktoren die Enzymaktivität. Eine eingeschränkte Enzymaktivität ist bei Trägern mindestens eines genetisch veränderten Allels zu erwarten, während ein Polymorphismus auf beiden Allelen zu einer Enzymdefizienz führt.

Genotyp	Anzahl mut. Allele	Enzymaktivität
TPMT *1/*1	0	hoch
TPMT *1/*2	1	intermediär
TPMT *1/*3A	1	intermediär
TPMT *1/*3C	1	intermediär
TPMT *2/*2	2	nieder
TPMT *2/*3A	2	nieder
TPMT *3A/*3A	2	nieder
TPMT *3A/*3C	2	nieder

Tab. 3: TPMT-Enzymaktivität / Genotyp

### **Indikation zur TPMT-Genotypisierung:**

Die TPMT-Genotypisierung ist indiziert bei Patienten, bei denen eine Therapie mit 6-Mercaptopurin, 6-Thioguanin oder Azathioprin geplant ist, um ggf. ein bestehendes Toxizitäts-Risiko bei der Gabe von Thiopurin-Derivaten vorherzusagen oder nach Therapiebeginn eine Dosisadaptierung oder Therapieumstellung vornehmen zu können.

### **Literatur:**

- Salavaggione et al. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: variant allele functional and comparative genomics. *Pharmacogenet Genomics*. 2005 Nov;15(11):801-15.
- Wang et al. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: chaperone protein association and allozyme degradation. *Pharmacogenetics*. 2003 Sep;13(9):555-64.
- Wang et al. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: insights, challenges and future directions. *Oncogene*. 2006 Mar 13;25(11):1629-38.
- Weinshilboum. Thiopurine pharmacogenetics: clinical and molecular studies of thiopurine methyltransferase. *Drug Metab Dispos*. 2001 Apr;29(4 Pt 2):601-5.
- (Weiterführende Informationen siehe OMIM-ID: \*187680 (TPMT), #610460 (TPMT deficiency))

**Testprinzip:**

Die Genotypisierung erfolgt nach dem Prinzip der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-(RFLP) Analyse. Nach erfolgter PCR (drei unabhängige Reaktionen) werden in einem zweiten Schritt die Amplifikate durch einen jeweils spezifischen Restriktionsenzym-Verdau hinsichtlich des vorliegenden Genotyps durch Vorliegen unterschiedlich langer DNA-Fragmente charakterisiert.

**Probenmaterial:** 3 ml EDTA-Blut. Bei längeren Transportzeiten (>30 min) ist die Probenanlieferung bei 4-8°C erforderlich (nicht frieren!). Zur Durchführung dieser Analyse ist keine Einverständniserklärung erforderlich!

**Anforderung:** Bei manueller Anforderung im Feld *Zusatzanalytik* „TPMT-Genotypisierung“ vermerken oder online unter „TPMT-Genotypisierung“ anfordern.

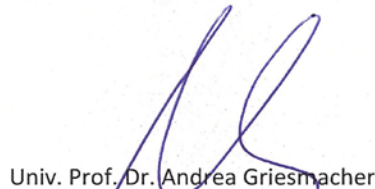
Bei Rückfragen: Tel.: 81590 (Werner Wohlfarter), 81173 (Dr. Locker), 82549 (Prof. Weigel)

**Dauer der Untersuchung:** Ca. 1 Woche nach Probeneingang.

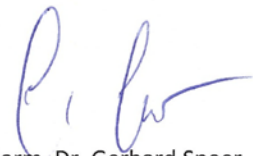
Für weitere Fragen stehen wir gerne zur Verfügung



Ao. Univ. Prof. Dr. Günter Weigel



Univ. Prof. Dr. Andrea Griesmacher



Mag. pharm. Dr. Gerhard Speer  
Direktor der Anstaltsapotheke

Innsbruck, im Juli 2011