

Algemene achtergrondtekst Farmacogenetica – Thiopurine-S-methyltransferase (TPMT)

Laatst gewijzigd: 15 augustus 2023

Begrippen in de farmacogenetica

Het **genotype** is de erfelijke informatie over een bepaalde eigenschap van een individu. Deze informatie bevindt zich in de genen, in het DNA dat bestaat uit nucleotiden. Het deel van het DNA met informatie voor één specifieke erfelijke eigenschap wordt **gen** genoemd. Het DNA is verdeeld in chromosomen die meestal in paren voorkomen. Dit betekent dat een individu van de meeste genen twee exemplaren (twee **allelen**) bezit. Elk allel is gelegen op één van de chromosomen van een chromosomenpaar.

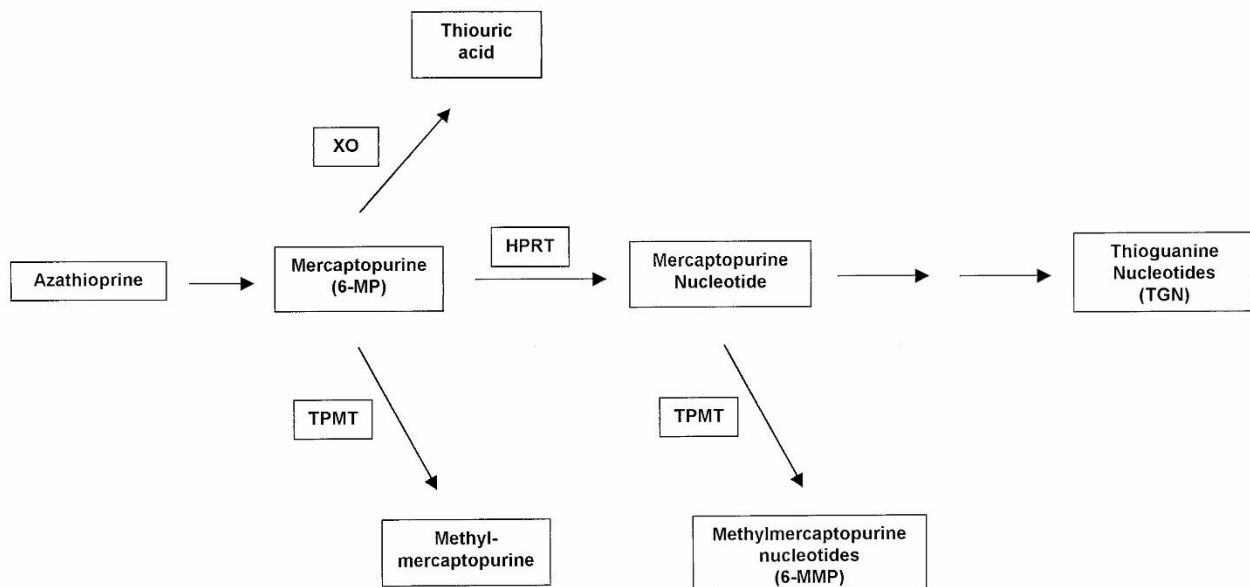
Het **fenotype** geeft aan wat de uiteindelijke verschijningsvorm van een bepaald genotype is. Dit kan de functionaliteit van een eiwit (bijvoorbeeld het enzym of de receptor) betreffen, maar ook de verschijningsvorm van een ziekte. Het fenotype vloeit voort uit het genotype dat men bezit, de mate van expressie van het desbetreffende gen en de combinatie met omgevingsfactoren bijvoorbeeld comedicaatie, voeding en ziekte toestanden.

Van DNA dat codeert voor een eiwit kunnen variaties bestaan in de bevolking. Variaties kunnen er toe leiden dat allelen coderen voor niet of minder actieve eiwitten. De eenvoudigste vorm van variaties zijn '**single-nucleotide polymorphisms**' (**SNP's**), waarbij een bepaald deel van een gen slechts in één nucleotide verschilt. Als een genvariant bij ten minste 1% van de bevolking voorkomt, spreekt men van een genetisch **polymorfisme**. **Wildtype** is de benaming voor het meest voorkomende actieve allel. Voor een bepaald allel kan sprake zijn van verschillende polymorfismen.

De **promoter** is een gedeelte voorafgaand aan het gen, dat met name verantwoordelijk is voor het regelen van de activiteit (expressie) van het gen.

Metabolisme van thiopurines

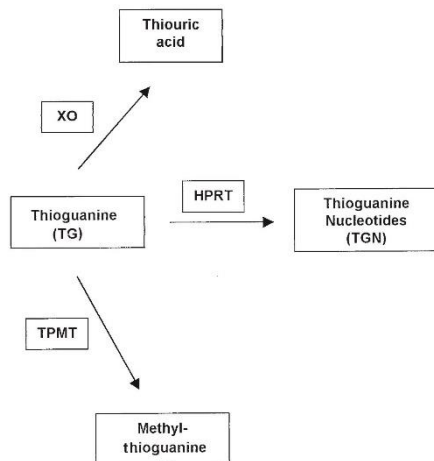
Thiopurines (azathioprine, mercaptopurine en tioguanine) zijn inactieve prodrugs, die in het lichaam omgezet worden in de actieve metabolieten: de thioguaninenucleotiden.



Figuur 1. Schematische weergave van het vereenvoudigd metabolisme van azathioprine en mercaptopurine. De mercaptopurinenucleotiden zijn 6-thioinosineribonucleotiden.
(Naar: Corominas et al., 2000)

Bij azathioprine en mercaptopurine worden de actieve metabolieten gevormd in meerdere stappen. Azathioprine wordt in het lichaam niet-enzymatisch gesplitst in mercaptopurine en nitromethylimidazool. Mercaptopurine wordt vervolgens in drie stappen omgezet in thioguaninenucleotiden. De eerste van deze stappen wordt gekatalyseerd door het enzym hypoxanthine-guanine-fosforibosyltransferase (HPRT).

Twee katabole routes verminderen de voor vorming van thioguaninenucleotiden beschikbare mercaptopurine. Mercaptopurine wordt door het enzym xanthine-oxidase (XO), dat met name in lever en darmen voorkomt, geoxideerd tot het inactieve 6-thiourinezuur. Thiopurinemethyltransferase (TPMT) katalyseert de S-methylering van zowel mercaptopurine als de door HPRT gevormde metabolieten (mercaptopurinenucleotiden oftewel 6-thioinosineribonucleotiden). De gemethyleerde 6-thioinosineribonucleotiden dragen bij aan de anti-proliferatieve eigenschappen van de thiopurines, waarschijnlijk door remming van *de novo* purinesynthese. Hoge concentraties van gemethyleerde 6-thioinosinenucleotiden zijn daarnaast geassocieerd met een hoger risico op levertoxiciteit.



Figuur 2. Schematische weergave van het vereenvoudigd metabolisme van tioguanine.

(Naar: Corominas et al., 2000)

Tioguanine wordt in één stap door het enzym HPRT omgezet in thioguaninenucleotiden. Bij tioguanine spelen de katabole routes een minder belangrijke rol dan bij mercaptopurine. Het deaminerende enzym guanase zet tioguanine om in de inactieve metaboliet 6-thioxanthine, die vervolgens door xanthine-oxidase wordt omgezet in 6-thiourinezuur. S-methylering van tioguanine vindt plaats door TPMT.

De absorptie van alle drie de thiopurines is incompleet en variabel.

Veranderde metabole capaciteit en klinische gevolgen

Variaties in het gen dat codeert voor het TPMT-enzym kunnen leiden tot een verlaagde of afwezige enzymactiviteit. Op basis van de aanwezige metabole capaciteit van het TPMT kan de populatie in drie fenotypes opgedeeld worden:

- poor metaboliser (PM), sterk verlaagde of afwezige metabole capaciteit (2 allelen met een afwezige functionaliteit)
- intermediate metaboliser (IM), verlaagde metabole capaciteit (1 allel met normale activiteit en 1 allel met afwezige functionaliteit)
- normal metaboliser (NM), 'normale' metabole capaciteit (2 allelen met normale activiteit)

Binnen de groepen IM en NM bestaat ook nog een grote variatie in de metabole capaciteit.

Uit tabel 1 en 2 is af te leiden tot welk van de drie fenotypes een bepaald genotype leidt.

Met name het PM-fenotype leidt tot een sterke verhoging van de cellulaire concentratie van de actieve metabolieten (thioguaninenucleotiden), waardoor bij normale thiopurinedosering vrijwel altijd ernstige bijwerkingen als beenmergsuppressie optreden. Een aanpassing van de standaarddosering of de keuze voor een ander geneesmiddel is in dit geval nodig. Bij IM is de noodzaak voor een aanpassing van de standaarddosering minder eenduidig.

Omdat het genotype slechts voor een deel de metabole capaciteit bepaalt zijn adviezen voor dosisaanpassing op basis van het genotype niet meer dan een handvat om de gewenste plasmaconcentratie te bereiken. Voor stoffen waarvoor monitoring gebruikelijk is, kan therapeutisch drug monitoring (TDM) nuttig zijn om de dosering te optimaliseren. Voor thiopurines is TDM (bepaling van concentraties van thioguaninenucleotiden en gemethyleerde 6-thioinosinenucleotiden in erythrocyten) mogelijk, maar wordt alleen gebruikt bij het onverwacht optreden van ernstige bijwerkingen. De gemeten concentraties zijn methodeafhankelijk. Hoewel een verband tussen metabolietconcentraties en therapeutisch effect en bijwerkingen aanwezig is, is er een groot grijs gebied aan de boven- en onderkant van het therapeutisch gebied. In verschillende studies worden tegenstrijdige resultaten gevonden.

Enkele studies melden een verminderd therapeutisch effect in de subgroep van patiënten met het NM-genotype, die de hoogste metabole activiteit hebben. Omdat de oorzaak van de variatie in metabole capaciteit binnen de NM-groep niet bekend is, kan met genotypering geen onderscheid worden gemaakt tussen NM-patiënten met normale en met zeer hoge metabole capaciteit. Ook de studies die op basis van TPMT-activiteit een onderscheid maken, hanteren geen eenduidige grens tussen normale en zeer hoge metabole activiteit. Hierdoor is het momenteel niet mogelijk om voor TPMT een 'ultra rapid metaboliser'-fenotype (UM) te definiëren.

Genotypering

Bij genotypering wordt het genotype vastgesteld. Het geeft aan welke allelen van het gen voor TPMT het geteste individu bezit. Elk allel heeft een naam die bestaat uit een ster (*) en een nummer, een voorbeeld van een mogelijk TPMT-genotype is TPMT*1/*3A.

Voor TPMT bestaan zeer veel variaties, er zijn meer dan 20 verschillende allelvarianten geïdentificeerd/ beschreven in de literatuur. Een aantal hiervan is in Tabel 1 weergegeven, ook de functionaliteit is hierin opgenomen. Bij genotypering wordt meestal gescreend op slechts de meest voorkomende allelvarianten. Hierdoor kan het voorkomen dat minder vaak voorkomende varianten gemist en ten onrechte als wildtype getypeerd worden (zie ook het document 'Onzekerheden in genotyperingsuitkomsten' in de KNMP Kennisbank).

De TPMT-allelen *2, *3A, *3B en *3C maken samen ongeveer 95% uit van de variant TPMT-allelen. Alle andere allelen komen elk zeer weinig voor.

Allel *3A heeft 2 SNP's, namelijk de SNP die voorkomt in allel *3B en de SNP in allel *3C. Hierdoor is het op basis van standaard PCR-technieken niet mogelijk om onderscheid te maken tussen de genotypes *1/*3A (2 variaties in een allel) en *3B/*3C (de 2 variaties verdeeld over 2 allelen). Met behulp van speciale genotyperingstechnieken of door fenotypering is dit onderscheid wel mogelijk. In de Kaukasische bevolking is het fenotype *3B/*3C echter zo zeldzaam, dat onderzoekers in de regel een *1/*3A-genotype aannemen bij detectie van beide variaties met PCR.

In de promotor van het TPMT-gen kan een variërend aantal van een repeterende sequentie voorkomen. Deze sequentie wordt 'variable number tandem repeat' of VNTR genaamd. Er is ontdekt dat de TPMT-activiteit wordt beïnvloed door het totale aantal VNTR's in beide TPMT-allelen. Omdat momenteel niet duidelijk is in hoeverre deze variatie in VNTR's bijdraagt aan de variatie in TPMT-activiteit bij personen met hetzelfde genotype, is in tabel 1 vooralsnog geen onderscheid gemaakt tussen allelen met verschillende aantallen VNTR's.

Tabel 1. TPMT-allelen en metabole capaciteit

metabole capaciteit	allel-nummer
toegenomen functionaliteit	-
volledig functioneel (wildtype)	*1 *1S *1A
verminderd functioneel	-
volledig disfunctioneel (nulallelen) #	*2 *3A *3B *3C *3D *4 t/m *18

De weergegeven TPMT-allelen zijn bijna volledig disfunctioneel. Er is nog wel enige metabole activiteit, maar deze ligt in de regel beneden de detectielimiet van de fenotyperingsmethoden.

Voor die TPMT-allelen waarvan de oorzaak van de sterk verminderde metabole capaciteit bepaald is, bleek dit steeds een zeer sterke toename van de proteolyse van het enzym en daarmee een zeer sterke afname van de hoeveelheid enzym te zijn.

Allelen *3D en *4 t/m *18 komen zeer weinig voor. Zij maken samen ongeveer 5% van de variantallelen uit.

Voor 8 heterozygoten voor *8 werd gevonden dat de mediane TPMT-activiteit en de mediane getolereerde dosis significant hoger waren dan voor heterozygoten van *2, *3A of *3C, maar niet significant lager dan voor *1/*1. Voor 2 heterozygoten voor *12 werd gevonden dat de mediane TPMT-activiteit numeriek hoger was dan voor *1/*1. Dit suggereert dat het bij deze allelen toch niet om nul-allelen gaat.

Fenotypering

Bij fenotypering wordt het fenotype vastgesteld, dit houdt in: het meten of schatten van de activiteit van het TPMT-enzym. Hierbij wordt de TPMT-activiteit in de rode bloedcellen vastgesteld. Deze correleert goed met de TPMT-activiteit in het doelorgaan van de thiopurines (de leukocyten).

De enzymactiviteit die bij fenotypering voor een individu wordt vastgesteld hangt af van zowel genetische- als omgevingsfactoren. Er is een grote variatie in TPMT-activiteit tussen personen met hetzelfde genotype. Daarnaast kan inductie door thiopurines en andere medicatie de TPMT-activiteit beïnvloeden. Fenotypering kan hierdoor in vergelijking met genotypering extra informatie opleveren. In het algemeen is er echter een goede correlatie tussen genotypering en fenotypering van TPMT. De grens tussen de verschillende TPMT-fenotypen is afhankelijk van de voor fenotypering gebruikte methode (zie tabel 3 voor de twee meest gebruikte methoden). Omdat thiopurines TPMT kunnen induceren, zijn de grenzen ook afhankelijk van het thiopurinegebruik.

Een nadeel van fenotypering ten opzichte van genotypering is dat een recente bloedtransfusie het resultaat kan beïnvloeden.

Tabel 2. Verband tussen TPMT-fenotype en -genotype

fenotype	genotype	voorbeeld genotype
NM	volledig functioneel / volledig functioneel	*1/*1
IM	volledig functioneel / nulallel	*1/*2, *1/*3A
PM	nulallel / nulallel	*2/*3A, *3A/*3A

Tabel 3. Fenotypering van TPMT

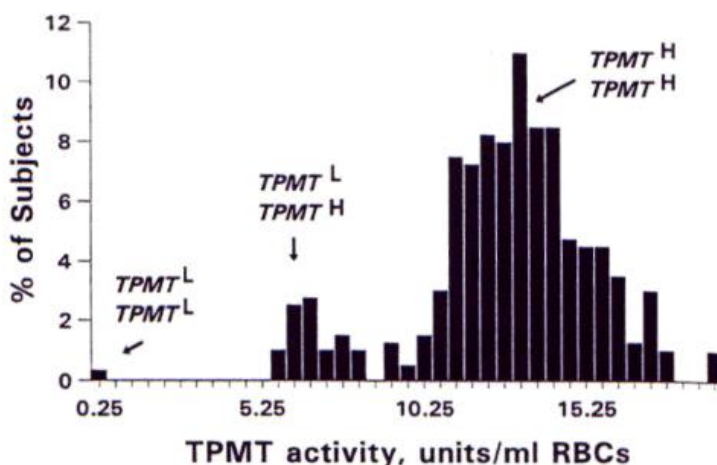
voor fenotypering gebruikt substraat	thiopurinegebruik op het moment van fenotypering	enzymactiviteit per fenotype [#]		
		NM	IM	PM
mercaptopurine ¹	nee	≥ 10 U	≥ 5 U en < 10 U	< 5 U
mercaptopurine ²	ja	≥ 13,7 U	≥ 5 U en < 13,7 U	< 5 U
tioguanine ³	nee	≥ 24 U	4-23 U	≤ 3 U

[#] 1 U is gedefinieerd als de vorming van 1 nmol methylmercaptopurine/ml gepakte rode bloedcellen of 1 nmol methylthioguanine/g hemoglobine per uur.

¹ Weinshilboum et al., 1980.

² Lowry et al., 2001.

³ Schaeffeler et al., 2003.



Figuur 3. Trimodale verdeling van de TPMT-activiteit binnen de (Kaukasische) bevolking. (Bron: Weinshilboum et al., 1980)

Etnische variatie in prevalentie fenotypes en allel- en genvariantfrequenties

De frequentie van voorkomen van de verschillende TPMT-allelen alsmede van de verschillende fenotypes kent een sterke variatie tussen etnische groeperingen.

Bij de Aziatische bevolking komen variantallelen minder vaak voor (2-5%) dan bij de Europees Kaukasische en Afrikaanse bevolking (7-14%). De Aziatische bevolking heeft daarom een lagere frequentie van de IM- en PM-fenotypes.

Bij de Europees Kaukasische en Zuid-Amerikaanse bevolking is *3A het meest voorkomende variantallel. Bij de Aziatische en Afrikaanse bevolking is *3C het meest voorkomende variantallel en komt *3A niet of nauwelijks voor. Gevonden fenotype- en allelfrequenties per bevolkingsgroep zijn weergegeven in tabel 4 en gevonden genvariantfrequenties in tabel 5.

Tabel 4. Etnische variatie in prevalentie fenotypes en allelfrequentie

bevolkings-groep	land	prevalentie voorspeld fenotype (%) [#]			allelfrequentie (%)			
		PM	IM	NM	*2	*3A	*3B	*3C
Kaukasisch		0,1-0,5	7-13	86-93	0,2-0,5	3,2-5,7	0-0,2	0,2-0,8
	Nederland [@]	0,26	10	90	0,4	3,5	0,4	0,8
Mediterraan		0,14	7	93	0,4	2,5	0,4	0,5
Aziatisch	ZW-Azië	0,003-0,12	1-7	93-99	0-0,2	0,5-1	0	0-2,3
	Oost-Azië	0,02-0,05	3-4	95-97	0	0	0	1,5-2,3
Afrikaans		0,3-0,6	10-14	85-89	0	0-0,2	0	5,4-7,6
Afrikaans-Amerikaans		0,13	7	93	0,4	0,8	0	2,4
Zuid-Amerikaans		0,03-0,7	4-16	84-96	0,3-2,2	1,5-3,6	0-0,2	0-2,5

[#] De prevalenties van de voorspelde fenotypes zijn berekend uit de gevonden allelfrequenties.

[@] Voor Nederland zijn de weergegeven allelfrequenties de gewogen gemiddeldes van drie studies.

Noot: Volgens de richtlijn van de Association for Molecular Pathology moeten bij genotypering van TPMT minimaal de allelen *2, *3A, *3B en *3C worden bepaald.

Tabel 5. Etnische variatie in genvariantfrequentie

bevolkingsgroep	gebied of subgroep	genvariantfrequentie (%)		
		238G>C (*2)	460G>A (*3A en *3B)	719A>G (*3A en *3C)
Kaukasisch	Europa zonder Finland	0,2	3,8	4,3
	Finland	0,008	2,7	3,0
Aziatisch	Oost-Azië	0	0,02	1,4
	Zuid-Azië	0	0,7	1,8
Afrikaans/Afro-Amerikaans		0,04	0,7	5,5
Latijns-Amerikaans/Amerikaans, gemengde etniciteit		0,4	4,2	4,7
Asjkenazisch joods		0,2	1,3	1,3

Literatuur

- Derijks LJJ et al. Thiopurines in inflammatory bowel disease. Aliment Pharmacol Ther 2006;24:715-29.
- Lennard L. TPMT in the treatment of Crohn's disease with azathioprine. Gut 2002;51:143-6.
- Weinshilboum RM et al. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. Am J Hum Genet 1980;32:651-62.
- Lowry PW et al. Measurement of thiopurine methyltransferase activity and azathioprine metabolites in patients with inflammatory bowel disease. Gut 2001;49:665-70.
- Schaeffeler E et al. A novel TPMT missense mutation associated with TPMT deficiency in a 5-year-old boy with ALL. Leukemia 2003;17:1422-4.
- Corominas H et al. Allelic variants of the thiopurine S-methyltransferase deficiency in patients with ulcerative colitis and in healthy controls. Am J Gastroenterol 2000;95:2313-7.
- Stanulla M et al. Thiopurine methyltransferase (TPMT) genotype and early treatment response to mercaptopurine in childhood acute lymphoblastic leukemia. JAMA 2005;293:1485-9.
- Duley JA et al. Do ITPA and TPMT genotypes predict the development of side effects to AZA? Gut 2006;55:1048-9.
- De Ridder L et al. Pharmacogenetics of thiopurine therapy in paediatric IBD patients. Aliment Pharmacol Ther 2006;23:1137-41.

- Relling MV et al. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing: 2013 update. Clin Pharmacol Ther 2013;93:324-5.
- Liu C et al. A genomewide approach validates that thiopurine methyltransferase activity is a monogenic pharmacogenomic trait. Clin Pharmacol Ther 2017;101:373-381. PubMed PMID: 27564568.
- Coenen MJ et al. Identification of patients with variants in TPMT and dose reduction reduces hematologic events during thiopurine treatment of inflammatory bowel disease. Gastroenterology 2015;149:907-17. PubMed PMID: 26072396.
- Pratt VM et al. TPMT and NUDT15 genotyping recommendations: a joint consensus recommendation of the Association for Molecular Pathology, Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium, College of American Pathologists, Dutch Pharmacogenetics Working Group of the Royal Dutch Pharmacists Association, European Society for Pharmacogenomics and Personalized Therapy, and Pharmacogenomics Knowledgebase. J Mol Diagn 2022;24:1051-63. PMID: 35931343.
- genome aggregation database (gnomAD) v2.1.1, <https://gnomad.broadinstitute.org>.