

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

THIOPURIN S-METHYLTRANSFERASA – KLINICKÝ VÝZNAM
GENOTYPIZACE A FENOTYPIZACE
Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. PharmDr. Martin Beránek, PhD.

Hradec Králové 2010

Blanka Černá

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala mému školiteli Doc. PharmDr. Martinu Beránkovi, PhD. za cenné rady, připomínky a vedení diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat zaměstnancům Ústavu klinické biochemie a diagnostiky, úseku molekulární biologie, ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové za možnost vykonání experimentální části mojí diplomové práce.

Další poděkování patří Ing. Miloši Hrochovi za pomoc s experimentální částí kapitoly týkající se fenotypizace, za dodané výsledky, odborné rady a připomínky k mojí práci.

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány“.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Blanka Černá

Školitel: Doc. PharmDr. Martin Beránek, PhD.

Název diplomové práce: Thiopurin S-methyltransferasa – klinický význam genotypizace a fenotypizace

Thiopurin S-methyltransferasa (TPMT) katalyzuje S-methylaci thiopurinových léčiv jako jsou 6-merkaptopurin a thioguanin. Polymorfismy v genu pro TPMT představují důležitý fakt v oblasti klinické farmakogenetiky. Velké rozdíly ve stupni aktivity TPMT v lidské tkáni jsou důsledkem přítomnosti mutace v genu pro tento enzym. Tyto polymorfismy jsou tak důležitým faktorem v účinnosti léčby thiopuriny. Nízká hodnota aktivity enzymu se objevuje v přítomnosti mutace v genu pro tento enzym, vyšší hodnota aktivity enzymu naopak bez přítomnosti mutace.

Genotypizovali jsme TPMT gen pomocí metody real-time PCR u vybrané skupiny pacientů (n=55) s autoimunitními onemocněními. Pacienti byli v průměrném věku 16,7 roku. Z nesrážlivé krve sbírané do EDTA (n=55) byla izolována DNA pomocí QIAmp Mini Kitu (Qiagen, Německo) a použita pro genotypizaci enzymu TPMT. Genotypizace byla provedena metodou real time PCR metody v Light Cycleru (Roche, Německo). TPMT byla fenotypizována na Lékařské fakultě v Hradci Králové na Ústavu farmakologie. Pro fenotypizaci byl použit lyzát suspenze erytrocytů (krev byla sbírána do Li-heparinizovaných zkumavek) a pro stanovení aktivity enzymu TPMT byla použita RP-HPLC (C18) metoda s gradientovou elucí.

Bylo potvrzeno, že aktivita enzymu TPMT závisí na genotypu TPMT. Nízká hodnota aktivity enzymu byla nalezena u mutovaných alel, TPMT*3A. Vyšší hodnoty aktivit jsme potvrdili u pacientů s wild type alelou (TPMT*1). Retenční čas 6-methylmerkaptopuirnu (6-MMP) byl 8,5 min a aktivita enzymu byla vyjádřena jako koncentrace vzniklého 6-MMP za 1 hod na 1 ml suspenze erytrocytů.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical science

Candidate: Blanka Černá

Supervisor: Doc. PharmDr. Martin Beránek, PhD.

Title of Diploma Thesis: Thiopurine S-methyltransferase – clinical importance of genotyping and phenotyping.

Thiopurine S-methyltransferase catalyzes S-methylation thiopurine's drugs such as 6-mercaptopurine and thioguanine. TPMT genetic polymorphisms represent an important role in clinical pharmacogenetics. The differences in TPMT activity result from mutations in gene for TPMT. The polymorphisms are important factor in efficacy of treatment by thiopurine drugs. Patients inheriting low activity of enzyme TPMT have mutated alleles, patients inheriting high activity of TPMT are usually wild types.

TPMT gen was genotyped by method real-time PCR in volunteers (n=55) with autoimmune diseases. The average of patient's age was 16,7 years. From blood collected into EDTA DNA was isolated by using QIAmp Mini Kit (Quiagen, Germany) and it was used for genotyping of TPMT. Genotyping was carried out by real-time PCR in LightCycler (Roche, Germany). TPMT was phenotyped in Hradec Králové in Medical Faculty of Charles University in Department of Pharmacology. The lysate of suspension of erythrocyte was used for phenotyping (The blood was collected into Li-heparinized tubes) and for phenotyping RP-HPLC with gradient was used.

The activity of enzyme TPMT depends on genotype of TPMT. The low activity of TPMT was observed in mutated samples (TPMT*3A), the high activity was observed in wild type alleles (TPMT*1). Retention time of 6-MMP was 8,5 minutes and the activity of TPMT was shown like concentration 6-MMP in 1 hour in 1 ml of suspension of erythrocytes.

OBSAH

1.	Úvod a cíle diplomové práce	1
2.	Thiopurin S-methyltransferasa (TPMT)	2
	2.1 TPMT a její struktura	2
	2.2 Funkce a vlastnosti TPMT	5
3.	Defekty TPMT	7
	3.1 Genetické změny podmiňující změny katalytické aktivity enzymu	7
	3.2 Choroby související s defekty katalytické aktivity TPMT	11
4.	Význam diagnostiky defektů TPMT	14
	4.1 Metody fenotypizační	15
	4.2 Metody genotypizační	22
	4.2.1 PCR – RFLP (polymorfismus délky restrikčních fragmentů)	22
	4.2.2 AS – PCR (alelově specifická PCR)	24
	4.2.3 SSCP – PCR (Single strand conformation polymorphism - konfirmační)	24
	4.2.4 Real – time PCR	26
	4.2.5 Čipová technologie	29
5.	Materiál a metodika	32
	5.1 Použitý materiál	32
	5.1.1 Přístroje	32
	5.1.2 Roztoky, chemikálie a kity	32
	5.1.3 Ostatní	33
	5.2 Použitá metodika	35
	5.2.1 Fenotypizace TPMT	35
	5.2.2 Genotypizace TPMT	38
	5.2.2.1 Charakteristika vyšetřovaného souboru pacientů	38
	5.2.2.2 Izolace DNA	42
	5.2.2.3 Amplifikace PCR produktů	43
6.	Výsledky	47
	6.1 Analýza alel	47
	6.3 Porovnání shody genotyp/fenotyp	50
7.	Diskuse	53
8.	Závěry	55
9.	Seznam použitých zkratk	56
10.	Seznam použité literatury	57

TEORETICKÁ ČÁST

1. Úvod a cíle diplomové práce

Thiopurin S-methyltransferasa (TPMT) se řadí mezi tzv. biotransformační enzymy. Biotransformace je důležitý proces, jehož cílem je vyloučení cizorodé látky z organismu. Během tohoto procesu je původně lipofilní látka přeměňována na hydrofilní, kterou je možné snadno vyloučit ledvinami. Jde o metabolickou přeměnu pro organismus cizorodých látek, tzv. xenobiotik.

Biotransformace probíhá ve třech fázích. První je fáze transformační, navazuje druhá fáze konjugační a ve třetí fázi, která není fází biotransformační, se jedná o eliminaci xenobiotika z organismu. V první fázi vznikají látky méně nebo více toxické než látka původní, ve fázi druhé vznikají téměř bez výjimky látky netoxické.

Pro cíl této práce je nejvíce významná fáze konjugační. Mezi nejvýznamnější enzymy této fáze patří TPMT. Dalšími enzymy jsou glukuronyltransferasa, glutathione – S – transferasa, N – acetyltransferasa. Hlavními konjugačními reakcemi jsou sulfatace, acetylace, glukuronidace, tvorba kys. merkapturové a **methylace**.

Thiopurinová léčiva, např. azathioprin, jsou podávána pacientům s autoimunitními onemocněními, s akutní lymfoblastickou leukémií a s idiopatickými střevními záněty. U deficitu nebo snížené aktivity enzymu TPMT dochází při podání standardní dávky léčiva k cytotoxickým stavům, které ohrožují život. V závislosti na aktivitě tohoto enzymu jsou určovány dávky léčiv pro pacienty. Diplomová práce se věnuje genetickým změnám, které podmiňují změny v katalytické aktivitě enzymu, a onemocněním, která s těmito defekty souvisejí.

Cílem práce bylo vytvořit přehled používaných metod v minulosti i současnosti pro fenotypizaci a genotypizaci TPMT, genotypizovat a fenotypizovat vyšetřovaný soubor pacientů (n=55) a zhodnotit shodu aktivity s genotypem TPMT s předchozími studiemi.

2. Thiopurin S-methyltransferasa (TPMT)

2.1 TPMT a její struktura

TPMT (EC 2.1.1.67, S-adenosyl-L-methionin: thiopurin S-methyltransferasa, thiopurine S-methyltransferase) je cytosolický enzym, který katalyzuje S-methylaci aromatických a heterocyklických sulfhydrylových sloučenin, jež jsou obsaženy v thiopurinových léčivech. TPMT se vyskytuje v různých tkáních, v ledvinách, játrech a v tenkém i tlustém střevu.

TPMT gen je lokalizován na chromosomu 6p22.3 a skládá se z devíti intronů a deseti exonů. Tento gen má velikost cca 27kb (Seki et al., 2000).

Lidská forma TPMT obsahuje 245 aminokyselin (obr.1). Její relativní molekulová hmotnost je 28180

(www.brenda-enzymes.info/index.php4?page=sequences/seq.php4?ID=124783).

Struktura enzymu je spojena s jeho základní charakteristikou. Pro přehled uvádím funkční parametry TPMT v tab. I.

```
MDGTRTSLDI EEYSDTEVQK NQVLTLEEWQ DKWVNGKTAF HQEQGHQLLK
KHLDTFLK GK SGLRVFFPLC GKAVEMKWFA DRGHSVVGVE ISELGIQEFF
TEQNLSYSEE PITEIPGTKV FKSSSGNISL YCCSIFDLPR TNIGKFDMIW
DRGALVAINP GDRKCYADTM FLLGKKFQY LLCVLSYDPT KHPGPPFYVP
HAEIERLFGK ICNIRCLEKV DAFEERHKS W GIDCLFEKLY LLTEK
```

Obr.1. Sekvence aminokyselin odpovídající lidské TPMT

(www.brenda-enzymes.info/index.php4?page=sequences/seq.php4?ID=124783)

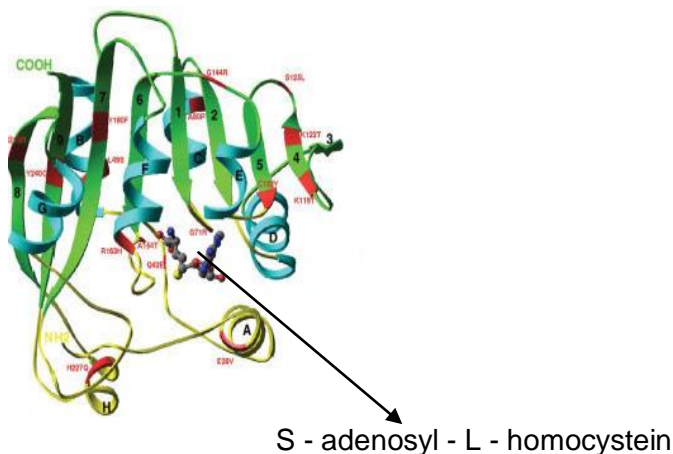
Tab.1 Funkční parametry TPMT

(www.brendaenzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=2.1.1.67&Suchword=&organism%5B%5D=Homo+sapiens&show_tm=0)

Funkční parametr, molekulární charakteristika	Hodnoty	Poznámka
Specifická aktivita	1,03 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	Hodnota specifické aktivity závisí na použité metodice
pH optimum	6,7	
Tepelná stabilita	45°C, maximum 56°C	23% aktivity enzymu se ztrácí po 20 min zahřívání při 45°C, 95% aktivity je ztraceno už po 6 min při 56°C

Molekulová hmotnost viz výše.

TPMT je tvořena devíti beta skládanými listy a alfa helixy, které se mezi nimi nacházejí. Struktura lidské TPMT je znázorněna na Obr.2.



Obr.2 Struktura lidské TPMT (hTPMT) (Wu et al., 2007)

β – listy jsou značeny zeleně a α – helixy modře, vyskytující se mutace jsou vyznačeny červeně. S - adenosyl – L – homocystein (SAH), navázaný v aktivním místě, je zde vyznačen kuličkovým modelem (uhlíkové atomy šedivě, dusík modře, kyslík červeně a síra žlutě).

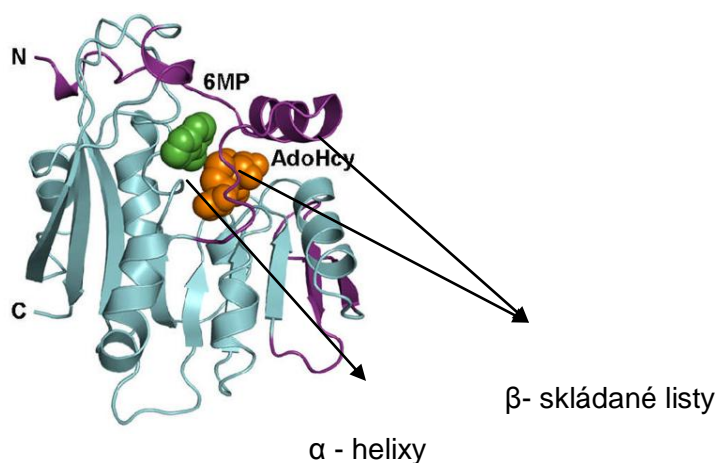
Výzkum struktury hTPMT vycházel z myší TPMT. Myší TPMT se z 80% podobá TPMT lidské. Je tvořena 240 aminokyselinami (obr.3) a relativní molekulová hmotnost odpovídá 27586 (Peng et al., 2008). Struktura mTPMT je ukázána na obr.4.

```

MSLDMKEHPD AEVQKNQVLT LEDWKEKWVT RHISFHQEQG HQLLKKHLDT
FLKGQSGLRV FFPLCGKAIE MKWFADRGHY VVGVEISEIG IREFFAEQNL
SYTEEPLAEI AGAKVFKSSS GSISLYCCSI FDLPRANIGK FDRIWDRGAL
VAINPGDHDR YADIILSLLR KEFQYLVAVL SYDPTKHAGP PFYVPSAELK
RLFGTKCSMQ CLEEVDALEE RHKAWGLDYL FEKLYLLTEK
    
```

Obr. 3 Aminokyselinová sekvence pro myší TPMT

(www.brendaenzymes.info/index.php4?page=sequences/seq.php4?ID=174812)



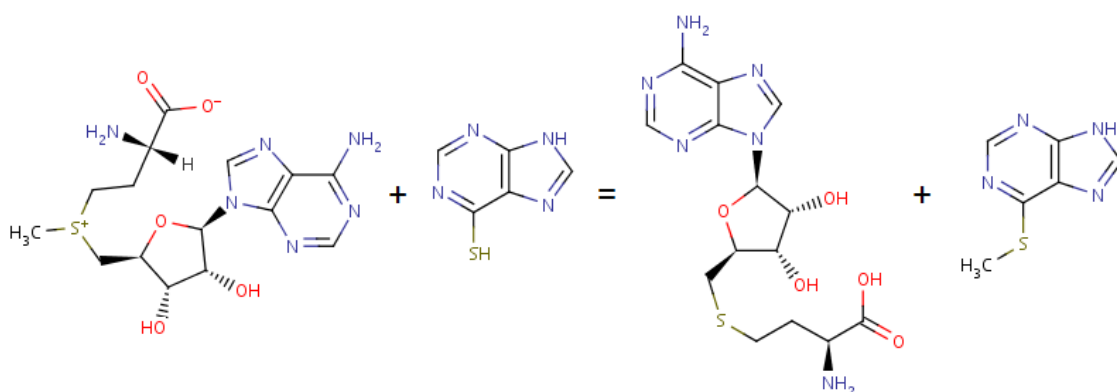
Obr.4 Struktura mTPMT (Peng et al., 2008)

Jádro enzymu, tvořeno β - listy a α - helixy, je modrošedivě zbarveno, oblasti charakteristické pro mTPMT jsou vyznačeny fialově. V aktivním místě je navázán SAH (oranžově) a 6 - MP.

2.2 Funkce a vlastnosti TPMT

V současné době není znám žádný endogenní substrát pro tento enzym a jeho biologická role tak zůstává nejasná (Fessing et al., 1998).

Jedná se o enzym katalyzující methylyaci substrátu (thiopurin) pomocí kofaktoru (S - adenosyl - L - methionin; SAM). Methylace obecně znamená přenos methylové skupiny z donoru (S – adenosyl - L - methioninu) na akceptor (např. 6 - merkaptopurin). Umožňují ji methyltransferasy. N – a O – methylace jsou důležité při inaktivaci biogenních aminů a S–methylace při detoxikaci thiopurinů, hydrogensulfidu a merkaptanu (obr.5).

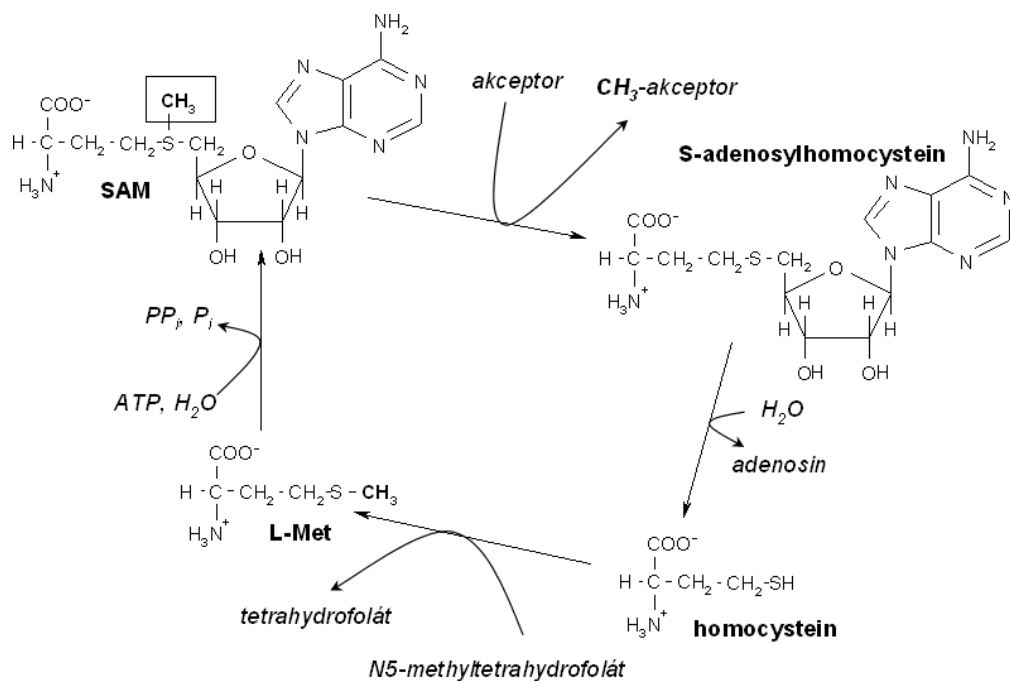


S – adenosyl – L - methionin thiopurin S – adenosyl – L - homocystein methylovaný
thiopurin

Obr.5 Methylace thiopurinu

([http://www.brenda-enzymes.info/Mol/reaction-popup.php?id=43910&type=l&isplayType=marvin](http://www.brenda-enzymes.info/Mol/reaction-popup.php?id=43910&type=l&displayType=marvin))

SAM vzniká přenosem adenosylu z ATP na atom síry methioninu. SAM je donorem nukleových kyselin, polyaminů, proteinů, fosfolipidů. SAM transmethylační reakcí katalyzovanou TPMT vzniká S – adenosyl - L- homocystein (SAH), který je pak následně hydrolyzován na homocystein. Ten je pak převeden na methionin. Tyto reakční děje jsou popsány na obr.6.



Obr.6 Role SAM a TPMT (Kodíček, 2007)

Jako inhibitor reakce působí produkt reakce, SAH. Dalšími zjištěnými inhibitory jsou např. furosemid, benzoová kyselina, azathioprin, 6 - thioguanin, 6 - methylmerkaptopurin (6 - MMP).

3. Defekty TPMT

3.1 Genetické změny podmiňující změny katalytické aktivity enzymu

TPMT, jak je již zmíněno, je cytosolický enzym, který katalyzuje S – metylaci aromatických a heterocyklických sloučenin, mezi které patří thiopurinové deriváty jako např. 6 – merkaptopurin, thioguanin a azathiopurin. Jde o léčiva, která se používají při léčbě akutní lymfoblastické leukemie a imunosupresí (Seki et al., 2000).

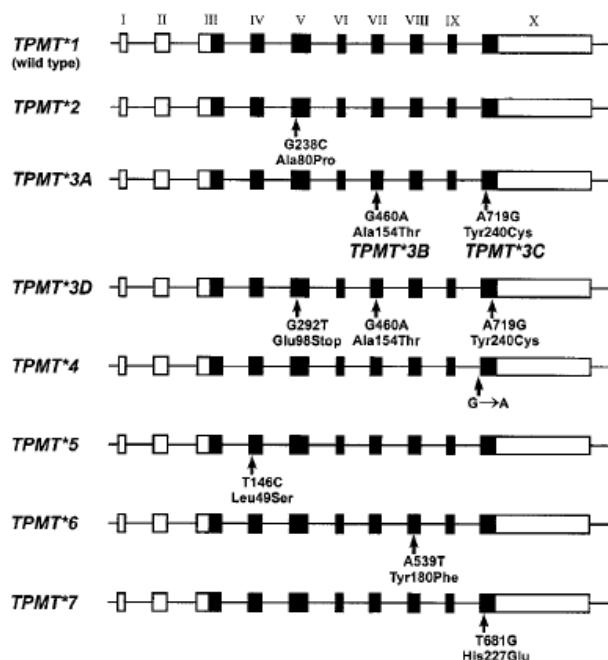
Funkční aktivita genu pro TPMT byla prokázána na základě charakterizování lidského promotoru genu (Fessing et al., 1998). Ukázalo se, že transkripční factor stimulující protein 1 (Sp1) je důležitým *trans*-aktivátorem lidského TPMT promotoru (Fessing et al., 1998). Aktivita tohoto proteinu se dědí jako autosomální znak s neúplnou dominancí.

Vysoká exprese genu je v játrech a ledvinách, se středním stupněm exprese nebo nižším stupněm se setkáváme v mozku a v plicích. Erytrocytární aktivita enzymu je vyšší u novorozenců, a to o 50%, než u zdravých dospělých jedinců (Fessing et al., 1998).

Aktivita enzymu je určena interindividuální a interetnickou variabilitou danou genetickými polymorfismy genu enzymu. Tyto genetické polymorfismy jsou spojovány s těžkými nebo dokonce život ohrožujícími myelosupresemi, viz dále. Různé alely genu pro TPMT obsahují bodovou mutaci nebo kombinaci mutací v některém z deseti exonů či devíti intronů. Jsou spojeny s defekty enzymu, které se projevují různou aktivitou enzymu. Bodové mutace určující polymorfismy TPMT byly objasněny pomocí identifikace a charakterizace mutantních alel u pacientů.

V evropské populaci najdeme cca u 89–94% pacientů vysokou aktivitu tohoto enzymu, 6–11% pacientů se střední aktivitou a 0,3% jsou spojována s nízkou aktivitou enzymu (Nishida et al., 2002).

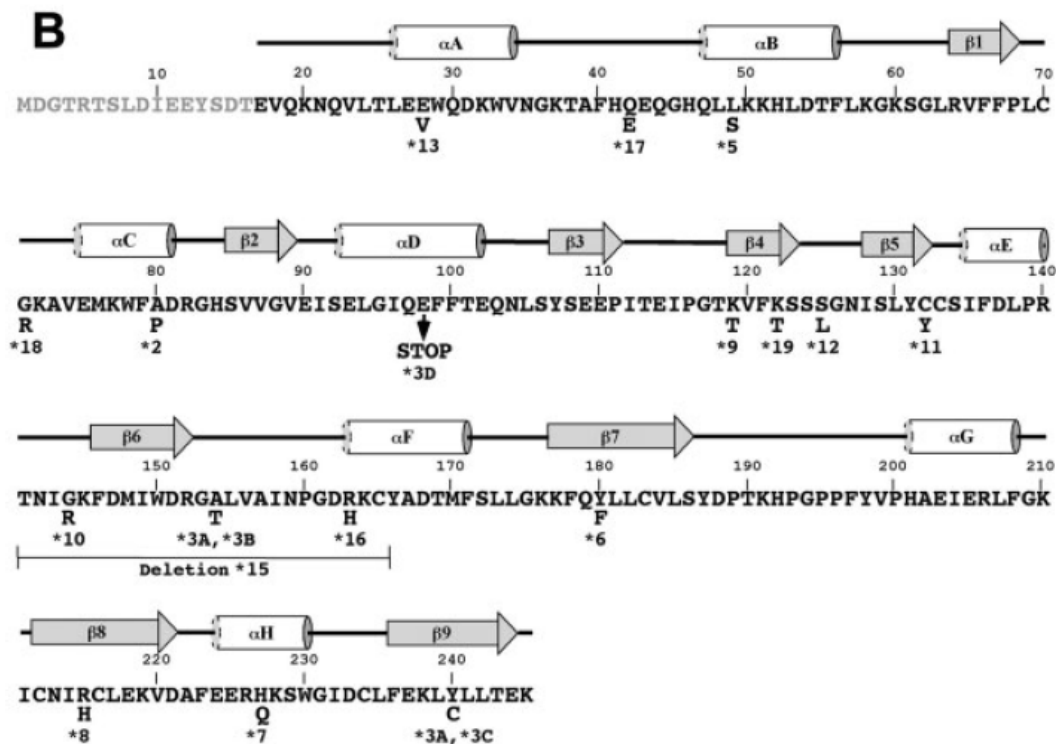
Tři bodové mutace, G238C, G460A a A719G podmiňují nejvíce se vyskytující defekty (Spire-Vayron de la Moureyre et al., 1998). Každá z těchto mutací představuje alelickou variantu pro gen (Obr.7).



Obr. 7 Schéma TPMT genu (Schutz et al., 2000)

TPMT*3A je mutantní alela, která je nejvíce zastoupena v bělošské populaci. Obsahuje mutaci G460A a A719G. První bodová mutace, G460A, umístěna v exonu 7, vede k záměně aminokyseliny alaninu za threonin v pozici 154 (Ala154Thr). V druhém případě bodové mutace (A719G), nacházející se v exonu 10, se jedná o záměnu aminokyseliny threonionu za cystein v pozici 240 (Thr240Cys). TPMT*3B označuje mutaci G460A a TPMT*3C mutaci A719G, které jsou společně zahrnuty pod TPMT*3A. Forma TPMT*2 je označována podle mutace G238C, díky níž dochází k záměně aminokyseliny alaninu za prolin v pozici 80 (Ala80Pro). TPMT*2 a TPMT*3C jsou v bělošské populaci vzácnější (Schutz et al., 2000; Tai et al., 1999).

TPMT*4, 5, 6 a 7 jsou poměrně vzácné mutantní alely a nacházejí se individuálně u různých populací. TPMT*4 obsahuje záměnu guaninu za adenin, která přerušuje spojení na konečném nukleotidu intronu 9, jenž je zároveň terminálním intronem TPMT genu. S TPMT*4 se setkáváme u osob pocházejících z oblasti Severní Evropy. Pro TPMT*5 (T146C) nebyl zjištěn původ jedinců. Dochází zde k záměně aminokyseliny leucinu za serin v pozici 49 (Leu49Ser). U korejské populace byla zaznamenána především forma TPMT*6 (A539T). Tato mutace vede k přeměně aminokyseliny tyrosin na fenylalanin v pozici 180 (Tyr180Phe). U některých Evropanů se setkáváme s TPMT*7 (T681G), kdy dochází k přeměně histidinu za glutamovou kyselinu v pozici 227 (His227Glu) (obr.8).



Obr.8 Sekvence lidské TPMT s vyznačenou polohou možných mutací (Wu et al., 2007)

Označení písmeny A-G představují alfa-helixy, číslice 1-9 beta skládané listy. Vyskytující se změny v aminokyselinové sekvenci a pojmenování mutací se nachází pod sekvencí aminokyselin TPMT.

Mutacemi jsou ovlivněny vzájemné interakce mezi aminokyselinami mající vliv na povahu enzymu. Záměna aminokyselin vede k změně aktivity enzymu. Vzájemné interakce pak můžeme rozdělit do tří skupin:

1. Van der Waalsovy interakce (L49S, **A80P (Ala80Pro)** = TPMT*2, C132Y, **A154T (Ala154Thr)** = TPMT*3B, Y180F, **Y240C (Tyr240Cys)** =TPMT*3C. (TPMT*3A = TPMT*3B a TPMT*3C)
2. Intramolekulární polární interakce (E28V, K119T, K122T, S125L, G144R, R163H, R215H, H227Q)
3. Ty, které přímo či nepřímo vážou kofaktor (G71R, Q42E) (Wu et al., 2007)

Mutace G460A a A719G (Ala154Thr) způsobuje nejzávažnější změny v aktivitě enzymu. Velký rozměr threoninu a jeho polarita přerušuje jaderné interakce s kofaktorem. Mutace G238C (Ala80Pro) vyvolá deformaci ve struktuře alfa helixu a destabilizuje interakce s hydrofobním jádrem. Mutace A719C, substituce menšího cysteinu místo tyrosinu (Tyr240Cys) vede ke ztrátě vodíkových vazeb s H201 (His 201)

a K238 (Lys 238) a vyvolá vznik dutiny. Tyto strukturní změny pak vedou ke snížení aktivity enzymu a následnému vzniku defektů (Wu et al., 2007).

3.2 Choroby související s defekty katalytické aktivity TPMT

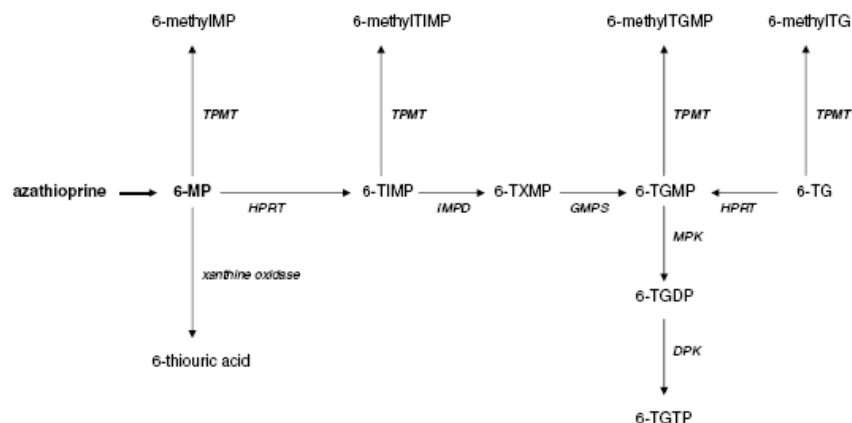
U pacientů s deficitem nebo se sníženou aktivitou TPMT byly popsány vážné cytotoxické stavy během léčby thioupuriny, a to u autoimunitních onemocnění, idiopatických střevních zánětů (tzn. bez známé příčiny) a u dětské akutní lymfoblastické leukémie.

Autoimunitní onemocnění je onemocnění imunitního systému, jehož činnost je zaměřena proti vlastním orgánům a tkáním. Autoimunitní mechanismy se podílejí na vzniku řady chorob: idiopatických střevních zánětů, některé formy zánětu jater, některá onemocnění žláz s vnitřní sekrecí (Addisonova choroba, zánět štítné žlázy), revmatická a systémová onemocnění (systémový lupus erythematosus, revmatoidní artritida aj.) V léčbě se uplatňují zpravidla imonosupresiva a kortikosteroidy.

Defekty aktivity TPMT se projevují při léčbě idiopatických střevních zánětů, zejména Crohnovy choroby. Jedná se o závažné chronické zánětlivé onemocnění gastrointestinálního traktu, které může zasáhnout oblast jícnu až po konečník. Jako léky se běžně používají protizánětlivé medikamenty, kortikosteroidy a řada antibiotik. Crohnova choroba patří mezi autoimunitní onemocnění, proto se k léčbě používají léky na potlačení imunity, azathioprin (AZA) a 6 – merkaptopurin (6 - MP) (Hugo a kol., 1998).

Akutní lymfoblastická leukémie je krevní nádorové onemocnění, které vzniká maligní transformací hematopoetické kmenové buňky. Postupná diferenciací krevních buněk v lymfoblasty vede k nahrazení normální krevetvorby. Leukemické buňky postupně zaplňují kostní dřeň, slezinu a lymfatické uzliny (Pecka, 2006). Léčba akutní lymfoblastické leukémie úzce souvisí s katalytickou aktivitou TPMT. Akutní lymfoblastická leukémie představuje 25–30% všech dětských maligních onemocnění. Dlouhodobé podávání 6 – merkaptopurinu společně se methotrexátem během léčby snižuje vznik relapsu onemocnění.

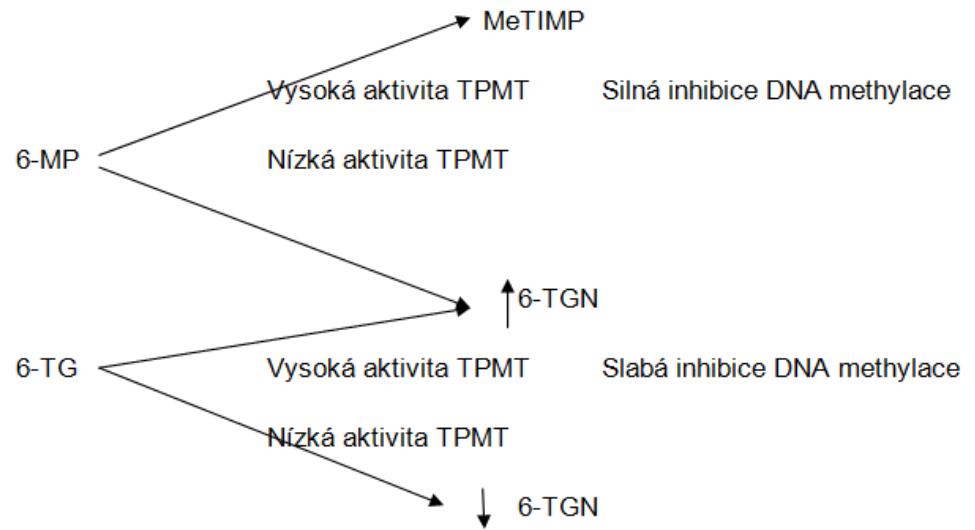
6 – merkaptopurin jako thiopurinové proléčivo je metabolizováno několika cestami, anabolicky i katabolicky. Anabolickou cestou hypoxantin fosforibosyltransferasou přejde na thioinosin monofosfát, který je dále metabolizován na 6 – thioguaninové nukleotidy. Ty se zabudovávají do DNA. Katabolickou cestu představuje reakce s xantinoxidasou a TPMT (Fakhoury et al., 2007). Nízká aktivita enzymu představuje pro organismus ohrožení toxicitou, pokud jsou podávány standardní dávky thiopurinových léčiv. Dochází ke zvýšení koncentrace cytotoxických metabolitů, 6 - thioguaninových nukleotidů (6 -TGN), které vznikají neschopností metabolizace 6 – merkaptopurinu na 6 - methylmerkaptopurin (6-MMP) (Obr. 9).



Obr. 9 Metabolická cesta azathioprinu (Gardiner et al., 2006)

6–thioguaninové nukleotidy jsou aktivními produkty při metabolizaci 6-merkaptopurinu. Čím nižší je aktivita TPMT, tím vyšší je koncentrace thioguaninových nukleotidů, což má negativní vliv na průběh léčby onemocnění (Lennard, 2002). Často podporuje relaps onemocnění či cytotoxickou reakci. Proto je důležité před nasazením léčby thiopuriny provést screening pacientů na aktivitu TPMT.

Cytotoxicita léčiv je odlišná díky různé aktivitě enzymu, což je dáno přítomností polymorfismů. TPMT metabolizuje thioinosin-5´monofosfát na methylthioinosin-5´monofosfát, který je silným inhibítoem, naopak 6–thioguanosinmonofosfát vzniklý přeměnou 6–thioguaninu je TPMT metabolizován na methylthioguanosinmonofosfát a ten je inhibítoem slabým. Tyto vztahy platí při vysoké expresi TPMT. Naopak při nízké aktivitě TPMT 6–merkaptopurin a 6–thioguanin inhibují DNA metylace podobně jako silné inhibitory (obr.10) (Hogarth et al., 2008).



Obr. 10 Inhibice metylace 6-MP a 6-TG enzymem TPMT (Hogarth et al., 2008)

4. Význam diagnostiky defektů TPMT

Důsledkem genetického polymorfismu v TPMT genu je různá reakce pacientů na podané léčivo. Pokud pacient patří mezi tzv. pomalé metabolizátory, dochází k tomu, že metabolismus léčiv má sníženou rychlost nebo vůbec neprobíhá, což vede k přehnané odpovědi na podané léčivo. Na druhé straně může být pacient tzv. rychlým metabolizátorem. Může to tedy vést k nedosažení terapeutických hladin léčiva.

Metody sledování defektů TPMT jsou založeny na určení genotypu a určení fenotypu pacienta.

Genotyp je pojem, který charakterizuje soubor genetické informace v organismu. Genotyp představuje základní charakteristiku člověka. Jeho stanovení stačí provést jednou za život, protože se nemění.

Fenotyp znamená určitou charakteristiku jedince, kterou se projevuje navenek. Znamená to nejen projev na úrovni organismu jako například váha, výška jedince apod., ale i charakteristiku určité fyziologické či biochemické funkce. Fenotyp je podmíněn genotypem, epigenetickými změnami genů a vlivy prostředí. Epigenetické změny ovlivňují fenotyp beze změny genotypu. Epigenetické děje se v průběhu života podílejí na buněčné diferenciaci, morfogenezi, proměnlivosti a adaptabilitě organismu. Fenotyp pacienta je tak ovlivňován prostředím, ve kterém žije, stravou, kterou přijímá.

4.1 Metody fenotypizační

Metody fenotypizační patří mezi metody kvantitativní. Odvíjí se od dané charakteristiky sledovaného fenotypu.

Aktivitu enzymu TPMT stanovujeme pomocí hladiny 6 - thioguaninových nukleotidů a 6 - methylmerkaptopurinu. Koncentrace 6 – thioguaninových nukleotidů se určují, protože mají blízký vztah k účinnosti léčby a 6 – methylmerkaptopurin je ve vztahu k hepatotoxicitě. 6 - merkaptopurin a thioguanin jsou prekurzory, které se na účinné látky teprve aktivují navázáním na (deoxy-)ribózu a fosforylací.

Pro klinickou praxi se v případě TPMT jako matrice používají erytrocyty. Vzorky krve jsou sbírány buď do EDTA nebo Li-heparinizovaných zkumavek. Z krve jsou erytrocyty separovány, poté promývány a centrifugovány. Supernatant erytrocýtů je použit k měření aktivity a obsahu hemoglobinu. Pro další analýzu jsou erytrocyty zmraženy až na – 80°C a skladovány (Khalil et al., 2005).

Pro stanovení TPMT aktivity se v současnosti používají dvě metody, radiochemická (RC) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Jako substrát v obou případech slouží 6 - merkaptopurin, S - adenosyl methionin se přidává jako kofaktor.

Radiochemická metoda je založena na enzymově katalyzovaném přenosu radioaktivně značeného uhlíku ^{14}C nebo ^3H v methylové skupině S – adenosyl – L - methioninu na 6 - merkaptopurin (Indjova et al., 2003). Produktem reakce je 6 - methylmerkaptopurin. Jedna jednotka aktivity enzymu je podle toho definována jako vytvoření 1 nmol 6 – methylmerkaptopurinu na 1 ml erytrocýtů, které se nechaly inkubovat při 37°C po dobu 60 minut (Oselin et al., 2006).

Použití radiochemické metody je v praxi velmi problematické z důvodu přítomnosti radioaktivních látek. V roce 1994 Lennard et al. vyvinuli neradioaktivní HPLC metodu pro stanovení aktivity enzymu. Jako substrát využívá také 6 - MP. Produkt enzymatické reakce (6 – MMP) je pak následně extrahován liquid - liquid extrakcí nebo liquid-solid extrakcí užitím různých organických rozpouštědel, např. ethyl acetát, 2 - propanol/chloroform, dichlormethan/2 - propanol atd. Extrakční kroky jsou ale příliš pracné a zabírají mnoho času. Tím roste i možnost větší chyby (Oselin et al., 2006). Neradioaktivní metodu HPLC s extrakčními kroky použili ve svém výzkumu Menor, C. et al. (2001) a porovnali s radiochemickou metodou (tab. 2).

Tab. 2 Porovnání výsledků RC a HPLC metody pro stanovení aktivity TPMT (Menor et al., 2001)

	RC	HPLC
Počet pacientů	20	20
Průměrná hodnota aktivity TPMT	14,6 ± 1,6	14,6 ± 1,5
Hodnoty aktivit TPMT	0 – 35 nmol/h/ml ERY	3,4 – 31 nmol/h/ml ERY

Z tab. 2 je zřetelné, že výsledky jsou velmi podobné.

U obou metod byly výsledky téměř stejné. Výběr metody závisí na instrumentaci laboratoře nebo na možnosti použití radioaktivní látky. Ty v některých laboratořích především klinických nejsou povoleny (Menor et al., 2001).

Nyní se používá HPLC metoda v reverzním módu s jednoduchou a rychlou přípravou vzorků. Jako methylový donor zde slouží neznačený SAM. Tato metoda vynechává extrakční krok, což vede k zlepšení přesnosti analýzy, tím i k menší možnosti vzniku chyby. Podmínky, při kterých reakce probíhá, uvádím v tab. 3

Tab. 3 Podmínky reakce HPLC (Anglicheau et al., 2002; Indjova et al., 2003; Oliveira et al., 2004; Oselin et al., 2006)

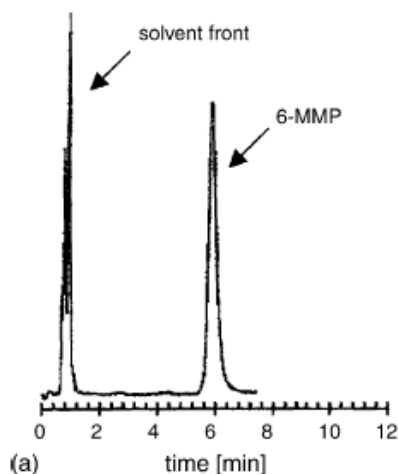
Kolona	Výrobce	MF (mobilní fáze)	Průtok	Detekce
C18	Inertsil ODS-3	Fosf.pufř : MetOH; 80:20	1,3ml/min	UV 290nm
SB-phenyl	WiCom GmbH	A (acetonitril:fosf.pufř; 50:950ml) B (acetonitril:fosf.pufř; 400:600ml)	1,1ml/min	UV 290nm
C18	LiChrocart, Merck	A (0,1% k. octová) B (100% acetonitril)	1 ml/min	UV 290 nm
C18	RADIAL -PAK	MetOH : VODA; 7,5:92,5	1,4ml/min	6MP - 322nm 6TGN - 42nm

Z tab. 3 vyplývá, že se pro stanovení aktivity enzymu se používá především kolona C18 RP (reverse phase; reverzní fáze). Velikost pórů na koloně je 5 μ m. Výhodou neradioaktivní metody je především použití kolony Zorbax CN, která umožňuje snažší separaci substrátu ve srovnání s kolonou C18, která je nejvíce používaná v reverzní fázi. Není nutné eliminovat endogenní substance nebo nukleotidy. Další výhodou je retenční čas, který je 12 minut, což je kratší než u jiných kolon. Není třeba takové ředění vzorku jako u kolony C18. Kromě použití této kolony přináší i své výhody extrakce ethylacetátem. Přináší dobrou „recovery“ (znovuzískání) produktu, snadnou eliminaci proteinů ze vzorku jako např. hemoglobinu. Toxicita ethylacetátu je ve srovnání s jinými rozpouštědly nižší.

O separaci složek výrazně rozhoduje nejen interakce složek se stacionární fází, ale také především mobilní fáze. Jako mobilní fáze je obvykle používán Na – fosfátový pufř případně K – fosfátový pufř v kombinaci s acetonitrilem nebo methanolem. V tabulce jsou uvedeny poměry mobilních fází, které byly použity.

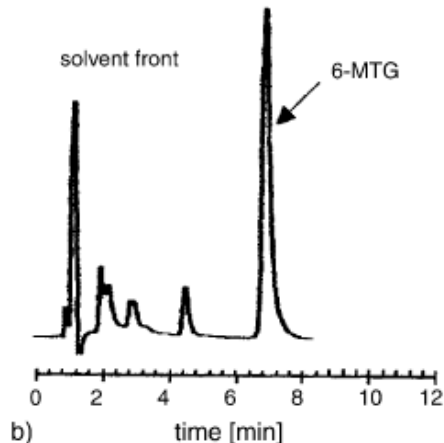
Jako detektor se používá UV VIS detektor. Detekce probíhá při vlnové délce $\lambda=290$ nm. Je možné také použít detektor s diodovým polem (diode array detektor – DAD).

Výsledkem je chromatogram (Obr.11, 12).



Obr. 11 Chromatografická separace 6-MMP (Khalil et al., 2005)

Chromatografické podmínky : RP phase, C18, Průtok 0,5 ml/min a objem nástřiku 25 μ l, mobilní fáze tvořena Na-fosfátovým pufrém (pH=2,7) se 7% acetonitrilu. Detekce byla provedena při 290 nm. Retenční čas byl 6,0 minut.

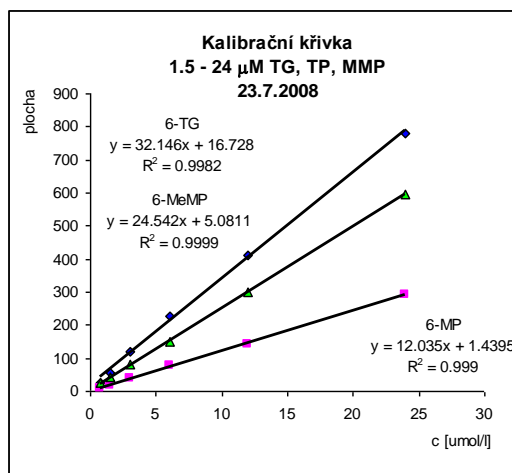


Obr. 12 Chromatografická separace 6-MTG (Khalil et al., 2005)

Chromatografické podmínky : RP phase, C18, Průtok 0,5 ml/min a objem nástřiku 25 μ l, mobilní fáze tvořena Na-fosfátovým pufrém (pH=2,7) s 3,5% acetonitrilu, detekce při $\lambda=315$ nm. Retenční čas byl 7,3 minuty.

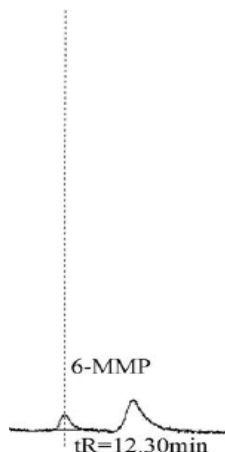
Posledním krokem je určení aktivity TPMT ze směrnice křivky koncentrace 6-MMP a po přepočtu vyjádření aktivity jako koncentrace vzniklého 6-MMP za jednu hodinu v 1 ml suspenze erytrocytů. Normalizace výsledků se provádí na hematokrit. Směrnice kalibrační křivky udává citlivost metody, výhodný je lineární tvar křivky. Je-li

kalibrační křivka nelineární, bývá stanovení zatíženo větší chybou. Jako příklad kalibrační křivky je uveden obr. 13.

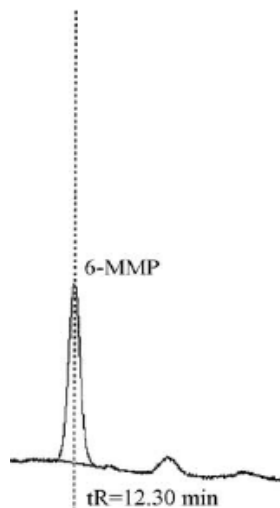


Obr. 13 Kalibrační křivka stanovena na LF UK v Hradci Králové 23.7.2008

Změnou chromatografických, inkubačních a extrakčních podmínek je sledována linearita reakce. Měří se v různých inkubačních časech (0-120 min, příp. 0-150 min) nebo změnou objemu lysátu mezi 0-250 μ l, příp. 0-300 μ l při fixovaném čase. Limit kvantifikace určuje nejnižší koncentraci, kdy je křivka ještě lineární. Jako příklad uvádím ukázkou grafů na obr. 14 (Oselin et al., 2006).



Obr.14 a) LOQ = limit of quantification; Chromatografická separace 6-MMP při nejnižší koncentraci 6-MMP, kdy je kalibrační křivka ještě lineární. Retenční čas byl 12:30 min.



Obr. 14 b) Separace 6-MMP po 60 min inkubace při 37°C. Retenční čas byl 12:30 min.

Z obr. 14 vyplývá, že po delší době inkubace je pík více symetrický a ostrý ve srovnání s počáteční inkubací při nejnižší koncentraci 6-MMP.

Dále se sleduje stabilita vzorků. Je pozorována ihned po přípravě a v průběhu skladování ze zpracovaných zmražených aliquotů v průběhu tří měsíců. Mluvíme pak o tzv. „intraday“ a „interday“ stabilitě. Bylo zaznamenáno, že při laboratorní teplotě je vzorek stabilní 24 hodin a při zmražení na -80°C je stabilní až několik měsíců. Při opakovaném zmrazování a rozmrazování vzorků dochází k poklesu aktivity TPMT (Indjova et al., 2003) Jako příklad uvádím získané hodnoty aktivity TPMT z výzkumu provedeného Indjovou et al. (2003) v tab.4.

Tab. 4 Přehled hodnot aktivity TPMT v závislosti na stabilitě vzorků (Indjova et al., 2003)

	Prům. nízká hodnota aktivity TPMT (nmol/(ml Ery.h)	Prům. střední hodnota aktivity TPMT (nmol/(ml Ery.h)	Prům. vysoká hodnota aktivity TPMT (nmol/(ml Ery.h)
Iniciální hodnoty	9,2	11,7	16,5
Skladování -20°C 21 dnů	8,4	11,5	14,6
Hodnoty po opakovaném zmrazení a rozmrazení	8,1	9,8	14,3

Z tab. 4 je zřejmý pokles hodnot aktivity TPMT po opakovaném zmrazení a rozmrazení aliqotů vzorků.

HPLC metoda je více používaná ve srovnání s RC metodou nebo HPLC metodou s extrakčními kroky. Je to hlavně z důvodu vysoké přesnosti, větší instrumentální dostupnosti a menší časové náročnosti.

4.2 Metody genotypizační

K určení genotypu je třeba extrahovat a analyzovat DNA. DNA je prakticky možné získat ze všech tkání, krve, mozkomíšního moku, vlasů, nehtů aj. Pro vyšetření se používají se PCR metody.

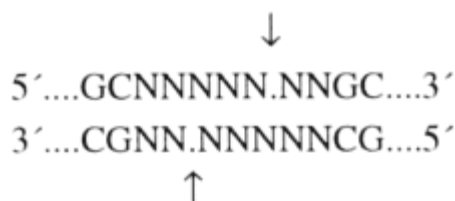
Zdrojem vyšetření genotypu pro TPMT je venózní krev. Jako biologický materiál slouží bílé krvinky, leukocyty. Z používaných metodik jsou to PCR reakce, a to PCR-RFLP, PCR-SSCP, alelově specifická PCR metoda, sekvenační metody. Díky neustálému zjednodušování a miniaturizaci metod se zavádějí čipové a mikročipové techniky.

4.2.1 PCR – RFLP (polymorfismus délky restričních fragmentů)

PCR – RFLP je modifikace standardní PCR reakce používaná pro typizaci cílové sekvence. Tato sekvence se amplifikuje pomocí primerů, které jsou synteticky připraveny.

Výsledkem jsou produkty PCR reakce o stejné délce. Tyto amplifikované produkty jsou štěpeny restričními endonukleázami na fragmenty. Identifikace a analýza produktů štěpení se provádí elektroforetickým dělením. Jako gel se používá agarosový gel, a to zpravidla 2%. Lze použít i polyakrylamidový gel. Existuje velká řada restričních endonukleas, které se liší tím, že rozpoznávají různé sekvence nukleotidů a že štěpí tak DNA na různě dlouhé fragmenty. Počet i délka fragmentů je pro daného jedince specifická. Odlišení různých DNA se provádí na základě polymorfismu délky štěpných úseků.

Tuto metodu ve své studii použili Oender et al. (2006) pro určení TPMT*3A (G460A, A719G) a TPM *3C (A719G). Jako restriční enzymy pro vyšetření mutace G460A použili MwoI (Methanobacterium wolfei). Sekvenci cílového místa ukazuje obr. 15.



Obr. 15 Sekvence cílového místa štěpení MwoI
(www.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-na/newlook/defa3.htm)

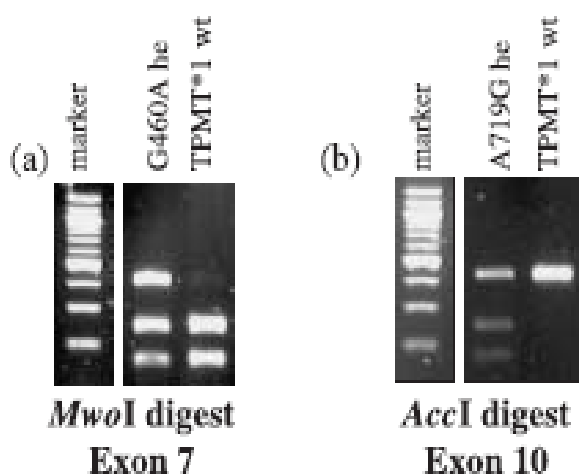
A pro A719G použili *AccI* (*Acinetobacter calcoaceticus*). Sekvence cílového místa štěpení je uvedena na obr. 16.

GTMKAC...
...CAKMTG

Obr.16 Sekvence cílového místa štěpení *AccI*
(www.thelabrat.com/restriction/AccI.shtml)

A – adenin, C – cytosin, G – guanin, T – thymin, M - pro adenin nebo cytosin,
K - pro guanin nebo thymin

Jako příklad použití této metody je uveden obr. 17, kde je znázorněn výsledek pro určení mutací G460A a A719G.



Obr. 17 a) G460A mutace v exonu 7 (Oender et al., 2006)

b) A719G mutace v exonu 10 (Oender et al., 2006)

Obr. 17 a) Vzorek pacienta heterozygota (he) je rozdělen do tří fragmentů, a to 172 bp, 246 bp a 418 bp. Vedle něj je znázorněn vzorek zdravého jedince (wt), který je rozdělen do dvou fragmentů, a to 172 bp a 246 bp.

Obr. 17 b) Vzorek pacienta heterozygota (he) je rozdělen do tří fragmentů, 151 bp, 250 bp a 401 bp, zatímco vzorek zdravého jedince (wt) zůstává nerozdělen.

U pacientů s přítomností jedné mutace (A719G) šlo o TPMT*3C, v přítomnosti obou mutací se jednalo o TPMT*3A (G460A, A719G).

4.2.2 AS – PCR (alelově specifická PCR)

Alelově specifická PCR je metoda, která je schopna odhalit jednonukleotidové záměny v sekvenci amplifikovaného DNA fragmentu.

Využívají se alelově–specifické primery, které jsou obvykle kratší, doporučené délky 13–18 nukleotidů.

Při AS-PCR primery plně komplementární amplifikují wild-type alelu a primery s 3´ mismatchy umožňují amplifikaci mutantních alel. Tato metoda slouží pro vyšetření mutace G238C, TPMT*2, v exonu 5 (Xin et al., 2009).

4.2.3 SSCP – PCR

(Single strand conformation polymorphism - konfirmační polymorfismus us jednořetězcové DNA)

Jde o jednoduchou a citlivou metodu k detekci mutací typu záměny jedné base na krátkých fragmentech DNA.

Získané DNA jednořetězcové fragmenty z PCR se různě pohybují při nenedenaturujících elektroforetických podmínkách. Jednořetězce lišící se sekvencí třeba jedinou basí vytvářejí různé sekundární struktury s různou elektroforetickou pohyblivostí, což umožňuje rozlišit polymorfní alely.

Tuto metodu ve své studii použili Spire-Vayron de la Moureyre et al. (1998). Provedli SSCP – PCR a po provedené elektroforéze byly vzorky s abnormálními výsledky sekvenovány automatickým sekvenátorem, aby se ověřila přítomnost mutace a určil se její konkrétní typ. Jako primery byly použity ty samé primery jako v SSCP-PCR reakci (obr.18).

Table 1 Local distribution and nature of the mutations identified on TPMT gene and analysed by PCR–SSCP in this study

	Position, nature ¹	Consequences	References
Promoter	← -168 T→G	None	Krynetski <i>et al.</i> , 1997; Spire <i>et al.</i> , 1998a
	← -91 A→G	None	Krynetski <i>et al.</i> , 1997; Spire <i>et al.</i> , 1998a
	← VNTR 3	-	Szumanski <i>et al.</i> , 1996
	← VNTR 4	-	Spire <i>et al.</i> , 1998a
	← VNTR 5a	-	Krynetski <i>et al.</i> , 1997; Spire <i>et al.</i> , 1998a
	← VNTR 5b	-	Spire <i>et al.</i> , 1998
	← VNTR 6	-	Spire <i>et al.</i> , 1998a
	← VNTR 7	-	Spire <i>et al.</i> , 1998a
← VNTR 8	-	Spire <i>et al.</i> , 1998a	
Exon 1	← -178 C→T	None	Spire <i>et al.</i> , 1998b
Exon 2			
Exon 3	← -30 T→A	None	Otterness <i>et al.</i> , 1997
Exon 4	← 146 T→C	49 Leu→Ser ³	Otterness <i>et al.</i> , 1997
Exon 5	← 238 G→C	80 Ala→Pro ²	Krynetski <i>et al.</i> , 1995
	← 292 G→T	98 Glu→Stop ²	Otterness <i>et al.</i> , 1997
	← 339 C→T	Silent	Otterness <i>et al.</i> , 1997
Exon 6			
Exon 7	← 460 G→A	154 Ala→Thr ²	Tai <i>et al.</i> , 1996; Szumanski <i>et al.</i> , 1996
	← 474 T→C	Silent	Szumanski <i>et al.</i> , 1996
Exon 8	← 539 A→T	180 Tyr→Phe ³	Otterness <i>et al.</i> , 1997
Exon 9			
Exon 10	← AG→AA	Splicing defect ²	Otterness <i>et al.</i> , 1996
	← 681 T→G	227 His→Glu ³	Spire <i>et al.</i> , 1998b
	← 719 A→G	240 Tyr→Cys ²	Tai <i>et al.</i> , 1996; Szumanski <i>et al.</i> , 1996
	← AATAAA	Polyadenylation site	Szumanski <i>et al.</i> , 1996

¹Nucleotides 5'-upstream from cDNA translation initiation codon and intronic nucleotides 5'-upstream from the corresponding exon are numbered negatively. ²Mutations responsible of loss of TPMT activity. ³Mutations suspected to be responsible of loss of TPMT activity. Dashed boxes represent ORF (open reading frame).

Obr. 18 Mutace identifikovány v TPMT genu metodou PCR – SSCP (Spire-Vayron de la Moureyre et al., 1998)

Na obrázku 18. je identifikováno 14 mutací v testované populaci. V oblasti promotoru byly určeny dvě mutace, které se vyskytly u všech testovaných jedinců. Zbytek tvoří VNTR oblasti. V exonu 1 (C178T) a v exonu 7 (T474C) byly zjištěny němé mutace. Nejvíce frekventované mutace byly G238C, G460A, A719G.

4.2.4 Real – time PCR

Real – time PCR metoda je nejpoužívanější metoda pro vyšetření genotypu TPMT. Kromě diagnostiky patogenů a studia genové exprese si našla uplatnění v klinické diagnostice pro genotypizační analýzu jako je např. genotypizace TPMT.

Reakce probíhá ve speciálním thermocykleru, LightCycleru (Roche, Německo) (Obr. 19). Umožňuje detekci fluorescence a monitorování postupu PCR reakce v reálném čase bez nutnosti použití elektroforézy jako u klasické PCR.



Obr. 19 LightCycler (Autorka – 27.4.2009)

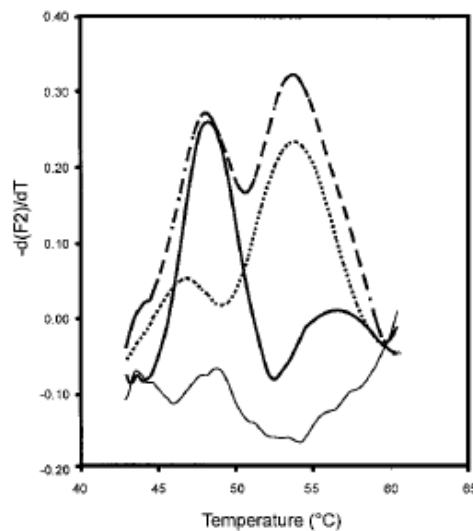
Pro detekci produktu se dají využít tři způsoby, pomocí specifických a nespecifických sond.

Nespecifické sondy představují interkalační látky jako např. ethidium bromid, SybrGreen aj. Menší úseky ds DNA, kterými mohou být i primery – dimery, nespecifické produkty reakce, se amplifikují a na ně se pak naváže interkaláční látka.

Častěji se používají sondy specifické. Sondy specifické představují krátký oligonukleotid hybridizující s PCR amplikonem. Mezi ně patří hydrolytické (TaqMan) sondy a hybridizační (FRET) sondy. Tyto sondy pracují na principu FRET přenosu. Jde o fluorescenčně rezonanční přenos energie na vzdálenosti závislý mezi excitovaným donorovým fluoroforem a jiným akceptorovým fluoroforem nebo nefluorescenčním quencherem, zhášedčem.

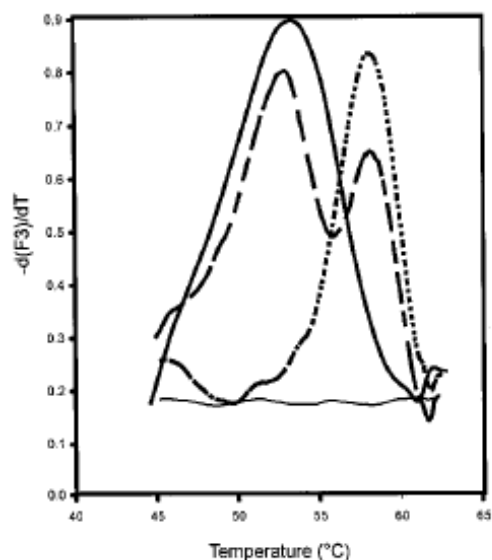
Hydrolytické sondy se používají u kvantifikace produktu.

U hybridizačních sond je donorový fluorofor na 3'konci jedné sondy a akceptorový fluorofor na 5'konci druhé sondy. Obě sondy se musí navázat na DNA v těsné blízkosti. Donor je excitován světlem ze zdroje a energie pomocí FRET přenosu je předána akceptorové sondě. Ta emituje fluorescenci. Pohybem Taq polymerázy a zvýšením teploty se sondy oddálí a FRET přenos je přerušen. V přítomnosti mutace je stabilita sondy snížena a pak také teplota potřebná k rozbití duplexu oligonukleotidová sonda-DNA je nižší než u DNA bez přítomnosti mutace. To se projeví ve výsledném profilu grafu křivky teploty tání, do nějž jsou požadovaná data převedena první derivací vztahující se k fluorescenčnímu signálu. Příkladem této metody jsou výsledky real – time PCR reakce provedené Schütz et al. na obr. 20, 21 a 22.



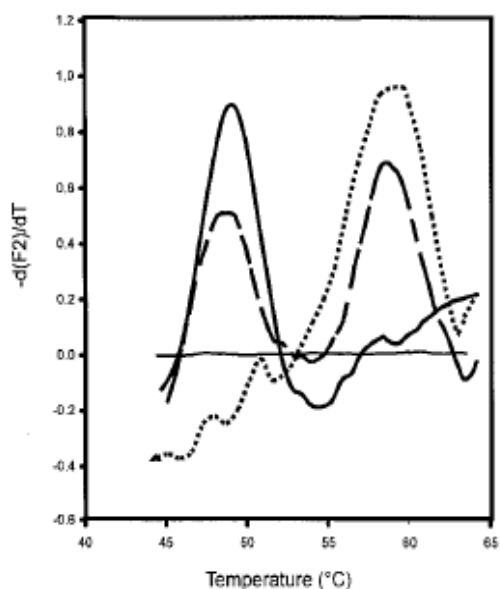
Obr. 20 Profil křivky teploty tání pro TPMT*3C (Schütz et al., 2000)

Heterozygot pacient je znázorněn čárkovanou linií, homozygot pacient plnou čárou a zdravý jedinec tečkovanou čárou. Teplota tání pro mutaci TPMT*3C byla stanovena na $T_m = 48,7 \text{ °C}$, teplota tání u zdravého jedince byla stanovena na $T_m = 53,3 \text{ °C}$.



Obr. 21 Profil křivky teploty tání pro TPMT*3B (Schutz et al., 2000)

Heterozygot pacient je znázorněn čárkovanou linií, homozygot pacient plnou čárou a zdravý jedinec tečkovanou čárou. Teplota tání pro mutaci TPMT*3B byla stanovena na $T_m = 53,9$ °C, teplota tání u zdravého jedince byla stanovena na $T_m = 61,5$ °C.



Obr. 22 Profil křivky teploty tání pro TPMT*2 (Schutz et al., 2000)

Heterozygot pacient je znázorněn čárkovanou linií, homozygot pacient plnou čárou a zdravý jedinec tečkovanou čárou. Teplota tání pro mutaci TPMT*2 byla stanovena na $T_m = 48,7$ °C, teplota tání u zdravého jedince byla stanovena na $T_m = 59$ °C.

Výraznou výhodou real – time PCR je, že není třeba provádět žádnou další analýzu po skončení PCR (např. elektroforézu).

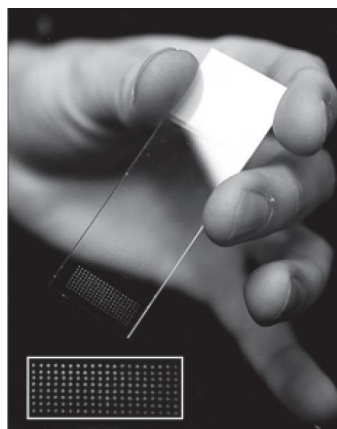
4.2.5 Čipová technologie

V současnosti výzkumné technologie vedou k miniaturizaci a automatizaci analýz (čipy, microarrays). DNA mikročipy jsou efektivně využívány pro studium genové exprese, sekvenci a hlavně pro detekci mutací a polymorfismů.

Princip fungování DNA čipů spočívá ve vzájemné reakci mezi DNA vzorkem a sekvenčně specifickými sondami, které jsou navázány na ploše, čipu. Na čipu může být navázáno dokonce několik stovek tisíců sond, které jsou specifické vůči určitým úsekům DNA. Analýza je založena na odlišné intenzitě signálu fluorescence vzniklého úplným nebo neúplným navázáním sondy a vzorku DNA pacienta (Gojová a Kozák, 2006).

Podle typu navázaných sond na povrch čipu lze tyto čipy rozdělit do dvou skupin. Jde o tzv. expresní čipy a mutačně specifické oligonukleotidové čipy (Gojová a Kozák, 2006). První skupina čipů obsahuje buď molekuly cDNA nebo oligonukleotidové sondy sekvenčně specifické pro každý gen. Druhou skupinu čipů tvoří uměle syntetizované oligonukleotidy o délce 25–70 bp, jejichž sekvence pochází z jednoho nebo několika analyzovaných genů. Jsou připravovány tak, aby byly komplementární k normálním nebo mutovaným sekvencím DNA, které mají být čipem analyzovány (Gojová a Kozák, 2006).

DNA čipy jsou vyráběny z materiálů s optimálními vlastnostmi tak, aby se DNA sondy snadno navázaly a hybridizovaly. Nejčastěji používaným materiálem pro výrobu DNA čipů je sklo (obr. 23) (Gojová a Kozák, 2006).



Obr. 23 DNA mikročip: Detail mikročipu je na obr. 26 vlevo dole (Gojová a Kozák, 2006)

Použití čipů ve své studii uvádějí Nasedkina T., V., et al. (2006). DNA extrahovali z leukocytů pomocí soupravy Qiagen a cílovou DNA připravili dvoukolovou nested multiplex PCR metodou (Nasedkina et al., 2006).

TPMT biočip obsahoval 12 oligonukleotidových sond seřazených do šesti sloupců. Každá sonda byla přítomna v duplikátu. Biočip byl schopen současně detekovat šest TPMT mutací, které vedou ke ztrátě katalytické aktivity enzymu. Schéma takového biočipu uvádím na obr. 24 (Nasedkina et al., 2006).

	1	2	3	4	5	6
A	G238	G292	G460	G644	T681	A719
A'	G238	G292	G460	G644	T681	A719
B	238C	292T	460A	644A	681G	719G
B'	238C	292T	460A	644A	681G	719G

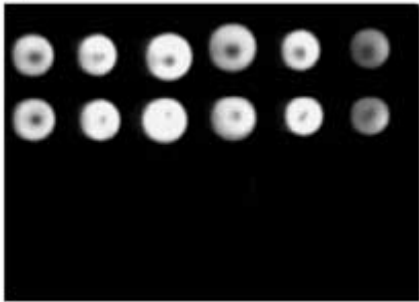
<i>Exon</i>	<i>SNP</i>	<i>Allele</i>
5	G238C	*2
4	G292T	*3D
7	G460A	*3B, *3A, *3D
10	G644T	*8
10	T681G	*7
10	A719G	*3C, *3A, *3D

Obr. 24 Schéma biočipu (Nasedkina et al., 2006).

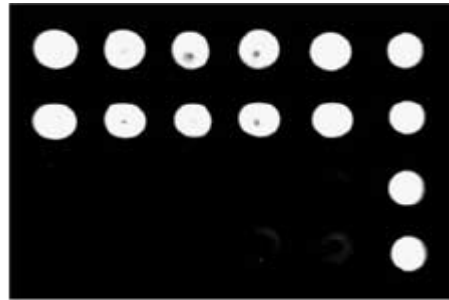
Každý sloupec od jedničky do šestky představuje sondu pro variabilní pozici. Řady A a A' ukazují zdravou sekvenci a řady B a B' obsahují mutantní sekvence. Součástí obrázku je tabulka ukazující mutace.

Výsledná analýza pak vypadá jako na obr. 25

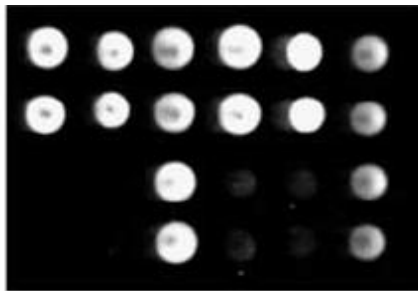
a) wild type



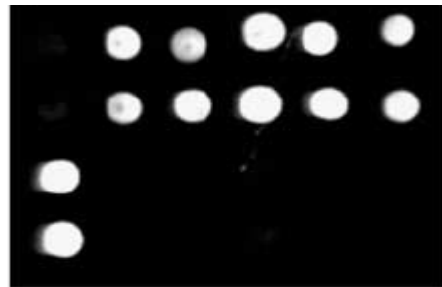
c) TPMT*3C



b) TPMT *3A



d) TPMT*2



Obr. 25 Analýza pacientů s různým zastoupením mutací (Nasedkina et al., 2006).

Ze vzájemného porovnání obr. 24 a obr. 25 vyplývá, že na obr. 25 a) se jedná o zdravého jedince, na obr. 25 b) jde o mutaci TPMT*3A, na obr. 25 c) jde o mutaci TPMT*3C a na posledním obrázku 25 d) se jedná o mutaci TPMT*2.

Běžně používané PCR metody (AS – PCR, RFLP - PCR, SSCP – PCR) vyžadují tzv. post PCR analýzy jako je elektroforéza u klasické PCR, restriční analýza u RFLP-PCR nebo sekvenování. U využití čipových metod stejně jako u real – time PCR tyto kroky odpadají.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5. Materiál a metodika

5.1 Použitý materiál

5.1.1 Přístroje

Genotypizace:

LightCycler 1.5	Roche, Německo
Centrifuga Microfuge 18	Beckman Coulter, USA
NanoDrop 1000	Spektrofotometr ThermoScientific, USA

Fenotypizace:

Termoblok	MajorScience Genius Dry Bath, Taiwan
Centrifuga	Thermo Scientific CL31R, England
Pipety	Biohit mLine, Finland
HPLC	Agilent 1200 Series, USA

5.1.2 Roztoky, chemikálie a kity

Genotypizace:

Qiamp DNA Mini kit :	Qiagen, Německo
Qiagen proteasa (proteinasa K)	
Lyzační pufr AL	
Eluční pufr AE	
Promývací pufr AW1	
Promývací pufr AW2	
Qiagen proteasa (proteinasa K)	
Ethanol 96%	
Kolonky se separační vrstvou	

LightCycler Master Mix:

Směs primerů a sond	TibMolBiol, Německo
FastStart kit	Roche, Německo
MgCl ₂ , 25 mM	Roche, Německo
Voda pro injectione	Braun, Německo

Fenotypizace:

6 - (methylthio)purin	Acros, Belgium
6 - thiopurin	Sigma, USA
S - adenosyl-L-methionin	
Methanol	
Dihydrogenfosforečnan sodný	
Hydroxid sodný	
Kyselina chlorovodíková	
Kyselina trichloroctová	
PBS (fosfátový pufr; Phosphate Buffered Saline)	

Mobilní fáze:

A: Na-fosfátový pufr 0,02M, pH=3,5
B: Methanol (MeOH) + Na-fosfátový pufr 0,02M, pH=3,5
Gradient: 0-8 min: 20-100% B; 8-9 min:100-20% B; 9-11 min: 20% B

Pomocné roztoky:

0,1M HCl
0,1M NaOH

Deproteinační činidlo: Kyselina trichloroctová (4M roztok ve 40% v/v kyselině octové)

5.1.3 Ostatní

Genotypizace:

Zkumavky, 1,5 ml	Eppendorf, Německo
Skleněné kapiláry pro real-time PCR	Roche, Německo

Jednokanálové pipety s nastavitelným objemem

Finnpipette Thermo

Electron Corporation, Finsko

Fenotypizace:

Parametry metody:

Systém: Shimadzu

Kolona: LiChroCART, Purospher STAR RP – 18e (4x250 mm, 5 µm)

Předkolona: Purospher RP-18e (4x4, 5 µm)

Nástřík: 30 µl

Průtok: 1,2 ml/min

Teplota na koloně: 30°C

Detektor: UV/VIS $\lambda=290$ nm pro 6-(methylthio)purin

Doba analýzy: 11 minut

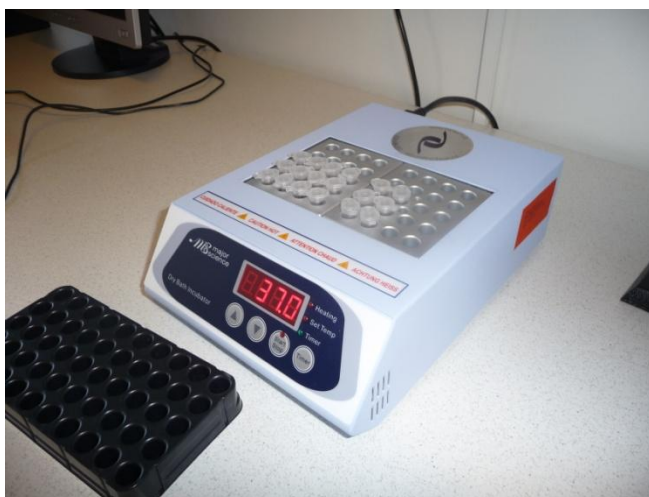
5.2 Použitá metodika

5.2.1 Fenotypizace TPMT

Fenotypizace TPMT byla provedena na Ústavu farmakologie, Univerzity Karlovy, Lékařské fakulty v Hradci Králové (Ing. Miloš Hroch). Aktivita TPMT se stanovila v lyzátu erytrocytů metodou HPLC.

Vzorky krve byly sbírány do Li-heparinizovaných zkumavek. Pro měření aktivity enzymu byl použit lyzát suspenze erytrocytů, který byl získán separací erytrocytů z plné krve centrifugací při 1500 g ($t=4^{\circ}\text{C}$) a následným cyklem zmražení-rozmražení.

Pro každého pacienta se měřila tříbodová časová křivka po 30 minutách inkubace, a proto každý vzorek krve byl připraven do třech vzorkovnic eppendorf. Erytrocyty byly promyty a resuspendovány v PBS v poměru 1:1. Suspenze erytrocytů byla v množství 100 μl . K suspenzi erytrocytů byl pak přidán 6-merkaptopurin (6 – MP, substrát TPMT), S – adenosyl – L – methionin (SAM, kofaktor) a dithiothreitol jako antioxidant pro protekci thiolových skupin. Takto připravené vzorky byly inkubovány při 37°C . Celkový čas inkubace byl 1,5 hodiny. (Obr. 26).



Obr. 26 Inkubace vzorků (autorka 1.12.08)

V časových intervalech 0,5hod, 1hod, 1,5hod se vzorky vyjmuly z inkubátoru, po dobu 5 minut se zchladily na -20°C , následně deproteinovaly 4M kyselinou trichloroctovou (Obr. 27) a centrifugovaly při 1200 g (20°C).



Obr. 27 Vzorky po deproteinaci (autorka 1.12.08)

Supernatant byl pak přenesen do chromatografických vialek, které byly vloženy do autosampleru kapalinového chromatografu (Obr. 28).



Obr. 28 Vložení vzorkovnic do analyzátoru (autorka 1.12.08)

Na kolonu MERCK Purosphere RP-18e bylo nastříknuto 30 μ l vzorku.

Pro separaci byla použita gradientová eluce se složením mobilních fází:

A: Na-fosfátový pufr 0,02M, pH=3,5

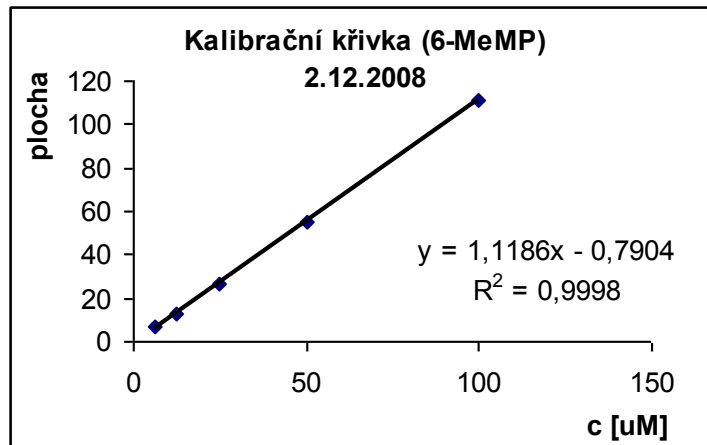
B: Methanol (MeOH) + Na-fosfátový pufr 0,02M, pH=3,5 (50:50% v/v)

Program gradientu: 0-8 min: 20-100% B; 8-9 min:100-20% B; 9-11 min

Průtok mobilní fáze byl 1,2 ml/min. Jako detektor byl použit UV/VIS detektor nastavený na 290 nm. Doba analýzy byla 11 minut a retenční čas 6 - MMP $t_r = 8,5$ min.

Ze směrnice křivky koncentrace 6 - MMP vs. čas byla zjištěna aktivita TPMT a po přepočtu vyjádřena jako koncentrace vzniklého 6 - MMP za 1 hod v 1 ml

suspenze erytrocytů. Normalizace výsledků byla provedena na hematokrit. Příklad kalibrační křivky pro stanovení 6-methylmerkaptopurinu je uveden na obrázku 29.



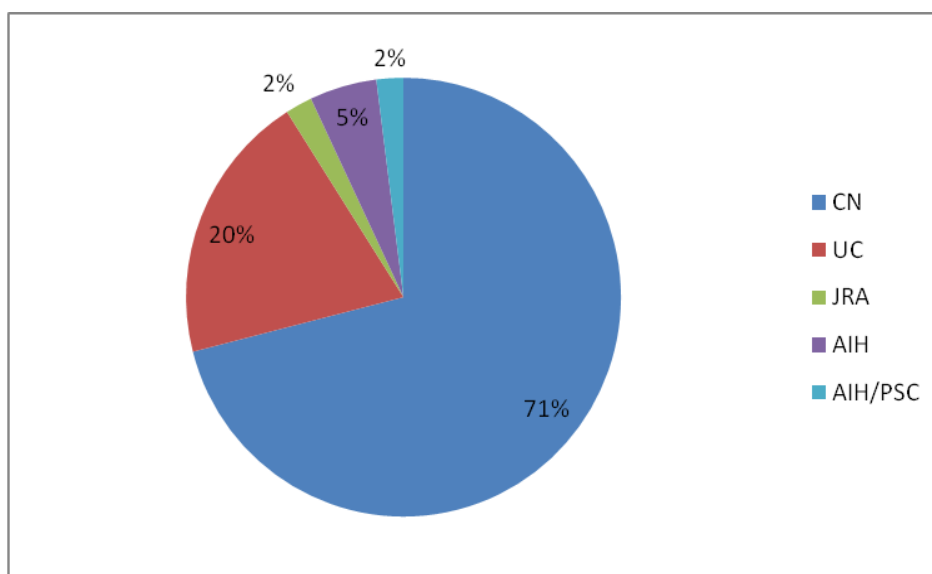
Obr. 29 Reprezentativní kalibrační křivka (2.12.2008)

5.2.2 Genotypizace TPMT

5.2.2.1 Charakteristika vyšetřovaného souboru pacientů

Bylo vyšetřeno 55 pacientů Dětské kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Vyšetření bylo provedeno na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

Vyšetřovaný soubor pacientů byl tvořen 27 dívkami a 28 chlapci v průměrném věku 16,7 roků. Větší část ze sledované skupiny zaujímali pacienti s Crohnovou chorobou, 71%. Druhou nejvíce zastoupenou skupinou byli pacienti s ulcerózní kolitidou, 20%. Menšinu sledované skupiny tvořili pacienti s juvenilní revmatoidní artritidou, autoimunitní hepatitidou, autoimunitní hepatitidou/primární sklerozující cholangitidou, 9%. Procentuální zastoupení jednotlivých onemocnění u pacientů je uvedeno na obr. 30.



Obr. 30 Přehled zastoupení jednotlivých onemocnění u sledované skupiny pacientů

CN - Crohnova choroba, UC – ulcerózní kolitida, JRA – juvenilní revmatoidní artritida, AIH – autoimunitní hepatitida, AIH/PSC – autoimunitní hepatitida/primární sklerozující cholangitida

Pacienti byli léčeni azathioprinem (AZA). AZA se používá k potlačení imunitních reakcí. Je podáván buď samostatně nebo v kombinaci s jinými léčivými, zejména kortikosteroidy. AZA je ordinován podle hmotnosti pacienta, a to v množství od 1 – 2 mg/kg. Dávka léčiva se pohybovala od 25 mg/den do 150 mg/den.

Účinek AZA se dostaví po týdnech či měsících užívání. V případě přecitlivělosti na 6 – MP se může předpokládat i přecitlivělost na AZA, proto je při jeho podávání nutná zvýšená opatrnost. Je nutné kontrolovat krevní obraz během prvních osmi týdnů každý týden, později je možné frekvenci kontrol snížit, ale doporučuje se provádět kontroly alespoň jednou za tři měsíce (<http://www.lf2.cuni.cz/Projekty/prusadna/newlook/defa3.htm>).

Z vyšetřované skupiny pacientů bylo 43% léčeno AZA již od začátku diagnózy. Zbývajících 57% má léčbu kombinovanou s jinými léky. U vyšetřované skupiny pacientů nebyla na AZA zaznamenána žádná negativní reakce.

Pouze u čtyř rodin uvedených pacientů byla zaznamenána pozitivní rodinná anamnéza, tzn. že v rodině se vyskytla Crohnova choroba nebo ulcerózní kolitida. Přestože není známa příčina Crohnovy choroby, patří mezi autoimunitní onemocnění. Sklon k tomuto onemocnění je výrazně geneticky ovlivněn.

Konkrétní informace o pacientech jsou shrnuty v tabulce 5.

Tab. 5. Přehled charakteristiky pacientů

Číslo pac.	Pohlaví (M – muž Ž – žena)	Rok narození	Dg.	Rodinná anamnéza (poz., neg.)
TPMT 1	Ž	1990	CN	Neg.
TPMT 2	M	1994	CN	Neg.
TPMT 3	Ž	1991	CN	Neg.
TPMT 4	Ž	1995	CN	Neg.
TPMT 5	M	1990	CN	Neg.
TPMT 6	Ž	1990	CN	Neg.
TPMT 7	M	1991	CN	Neg.
TPMT 8	Ž	1994	UC	Neg.
TPMT 9	M	1996	CN	Neg.
TPMT 10	M	1991	CN	Neg.
TPMT 11	Ž	1994	AIH	Neg.
TPMT 12	M	1989	CN	Neg.
TPMT 13	M	1995	UC	Neg.
TPMT 14	Ž	1990	CN	Neg.
TPMT 15	Ž	1991	UC	Neg.
TPMT 16	M	1992	CN	Neg.
TPMT 17	M	1997	UC	Neg.
TPMT 18	Ž	1993	CN	Neg.
TPMT19	Ž	1992	CN	Neg.
TPMT 20	M	1991	UC	Neg.
TPMT 21	Ž	1989	CN	Neg.
TPMT 22	M	1995	CN	Neg.
TPMT 23	Ž	1989	CN	Neg.
TPMT 24	M	1990	CN	Neg.
TPMT 25	Ž	1991	CN	Neg.
TPMT 26	Ž	1993	CN	Neg.
TPMT 27	M	1989	UC	Neg.
TPMT 28	Ž	1994	CN	Neg.
TPMT 29	M	1992	CN	Neg.
TPMT 30	M	1988	CN	Neg.

TPMT 31	Ž	1995	UC	Neg.
TPMT 32	M	1994	CN	Neg.
TPMT 33	Ž	1995	AIH	Neg.
TPMT 34	Ž	1997	CN	Neg.
TPMT 35	Ž	1990	CN	Neg.
TPMT 36	Ž	1989	CN	Neg.
TPMT 37	M	1991	CN	Poz.
TPMT 38	M	1995	UC	Neg.
TPMT 39	M	1995	CN	Poz.
TPMT 40	M	1994	CN	Neg.
TPMT 41	M	1992	CN	Neg.
TPMT 42	Ž	1992	CN	Neg.
TPMT 43	Ž	1995	CN	Neg.
TPMT 44	Ž	1992	UC	Poz.
TPMT 45	M	1990	CN	Neg.
TPMT 46	Ž	1992	AIH	Neg.
TPMT 47	Ž	1995	CN	Poz.
TPMT 48	M	1990	CN	Neg.
TPMT 49	M	1994	CN	Neg.
TPMT 50	M	1989	CN	Neg.
TPMT 51	M	1991	AIH/PSC	Neg.
TPMT 52	M	1997	CN	Neg.
TPMT 53	Ž	1993	UC	Neg.
TPMT 54	M	1992	UC	Neg.
TPMT 55	Ž	1990	JRA	Neg.

5.2.2.2 Izolace DNA

Jako biologický materiál byla použita nesrážlivá krev pacientů odebíraná do EDTA. Odebraný biologický materiál byl transportován do laboratoře a uchován při -20°C.

Izolace DNA byla provedena za použití soupravy QIAmp DNA Mini Kit firmy Qiagen (Německo). Vzorky plné nesrážlivé krve byly před izolací vytemperovány na teplotu místnosti (Obr.31).

Do 1,5 ml zkumavky bylo pipetováno 200 µl plné krve a ke vzorku přidáno 20 µl Qiagen proteasy (proteinasy K) a 200 µl AL pufru. Po přidání AL pufru byla směs 15 sekund homogenisována pomocí vortexu. Homogenní roztok byl inkubován po dobu 10 minut při 56°C. Následovalo přidání 200 µl 96% ethanolu a opět následovala homogenisace. Vzorek byl opatrně přelit do kolonky se sběrnou tubou bez smočení stěn kolonky. Následovalo odstředění 1 min při 8000 ot/min. Kolonka byla vyjmuta a přemístěna do nové 2 ml sběrné tuby. Tuba s filtrátem byla odstraněna. Na kolonku byl přidáno 500 µl AW1 pufru a opět proběhlo odstředění po dobu 1 min při 8000 ot/min. Následoval stejný krok jako předchozí. Byla vyjmuta kolonka a přemístěna do nové 2 ml sběrné tuby a tuba s filtrátem byla odstraněna. Na kolonku byl přidán AW2 pufr o objemu 500 µl a následovalo odstředění po dobu 3 min při 14000 ot/min. Kolonka byla vyjmuta a přenesena do sterilní 1,5 ml zkumavky. Na povrch zkumavky bylo nanášeno 150 µl AE pufru, který byl předem předeřtý na 70°C. Vzorky byly 1 min inkubovány při laboratorní teplotě a pak proběhlo odstředění 1 min při 8000 ot/min. Eluát byl důkladně zhomogenisován.

U vzorků izolátů byla změřena koncentrace a čistota. Koncentrace a čistota byla měřena spektrofotometricky na přístroji NanoDrop 1000 (Thermoscientific, USA). Takto připravené vzorky byly použity pro PCR reakci.



Obr. 31 Temperování vzorků v laboratoři FNHK UKBD (autorka 27.4.2009)

5.2.2.3 Amplifikace PCR produktů

Pro provedení PCR reakce bylo potřeba vytvořit reakční směs (20 µl), která byla přidána k templátové DNA. Pro vytvoření směsi byl použit LightCycler^R Fast - Start Kit od firmy Roche.

Tento kit obsahuje:

1a) LightCycler Fast - start Enzym

1b) LightCycler Fast - start reaction Mix HybProbe

Tato vialka obsahuje FastStart Taq DNA Polymerasu, směs reakčního pufru dNTP (dUTP místo dTTP), 10 mM MgCl₂.

2) MgCl₂ stock solution (25mM)

3) H₂O

Kit byl skladován při -15°C do -25°C.

Dále byla použita směs primerů a sond.. Složení primerů a sond je uvedeno v tabulce 6.

Tab. 6. Oligonukleotidové sekvence primerů a použité sondy pro TPMT

Amplifikovaný exon	Název	Sekvence (5´ - 3´)	pozice
Exon 10	Intron9 Forward primer	aatccctgatgtcattctcatagt	
	Exon10 Reverse primer	cacatcataatctcctctcc	
	TPMT*3C	LCR-tatAtctacttacagaaaagtaaa-PHO	Exon 10 (S)
Exon 7	Intron6 Forward primer	ctccacacccagggtccacacatt	
	Exon7 Reverse primer	gtatagtataactaaaaattaagacagctaac	
	TPMT*3B	ggcaactaatgCtcctctatcatcc-FL	Exon 7 (As)
Exon 5	Intron4 Forward primer	cctgcatgttcttgaaaccctatgaa	
	Exon5 Reverse primer	gcttgagtacagagaggctttgacctc	
	TPMT*2	LCR-ggtctgCaaacctgcataa-PHO	Exon 5 (AS)

Pozn. TPMT*3A obsahuje mutace TPMt*3B a TPMT*3C, proto zde není uvedena samostatně.

LCR: LC-RED 640, PHO: fosfát, FL: fluorescein, S: strand, AS:anti strand

Směs pro PCR reakci byla připravena rozmrazením vialky s reakční směsí, centrifugací obou vialek (reakční směs (1b) a Fast-start enzyme (1a)) a přepipetováním obsahu reakční směsi do vialky obsahující enzym. Směs byla jemně promíchána. Konečná směs pro PCR reakci byla připravena podle tab. 7a) a 7b)

Tab.7a) Příprava reakční PCR směsi pro vyšetření mutací *2, *3B, *3C v genu TPMT

Komponenta (Roche)	Objem (µl)	Zásobní koncentrace	Konečná koncentrace
H ₂ O	13,9		
MgCl ₂	1,6	25 mM	3mM
LightCycler Fast-start DNA Master HybProbe	2	10 x koncentrovaný	1x koncentrovaný

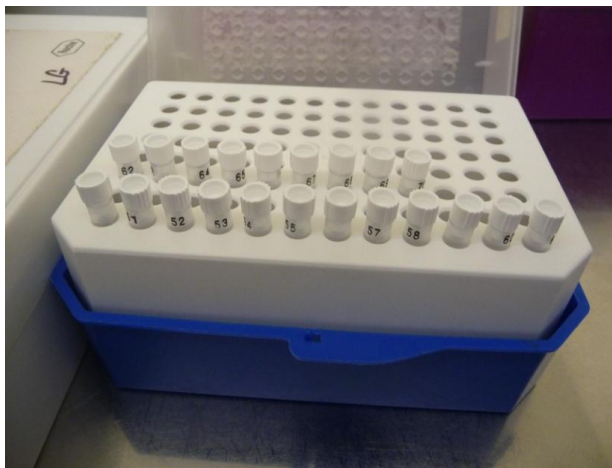
7b) Směs primerů a sond (Tib MolBiol)

HybProbe LC Red (5LC)/ fluorescein	Koncentrace v zásobním roztoku (µM)	Objem zásobního roztoku (µl)	Konečná koncentrace (µM)
Primer 1	10	1	0,50
Primer 2	10	1	0,50
Sonda 5LC	3	1	0,15
Sonda 3FL	3	1	0,15

Pipetován 1 µl směsi primerů a sond.

Na jednu reakci bylo pipetována 1,5 µl DNA (~ 50 ng) a 18,5 µl reakční směsi.

Na obrázku 32. a 33. jsou vidět kapiláry se směsí použité pro PCR (27.4.2009)



Obr. 32 Připravená reakční směs na PCR (autorka 27.4.2009)



Obr. 33 Připravené kapiláry do LightCycleru (autorka 27.4.2009)

Proces je propojen s počítačovým programem, kde se sledoval průběh reakce. Tento program pro LightCycler je uveden v tab. 8.

Tab. 8. Program pro reakci PCR pro LightCycler

Program	denaturace	cyklus			tání			zchlazení
	Před inkubace	kvantifikace			Křivka tání			
cyklus	1	45 - 60			1			1
segment	1	1	2	3	1	2	3	1
Teplota (°C)	95	95	60 (pro TPMT*2 55)	72	95	40	75	40
čas	10 min	10 s	10 s	15 s	30 s	2 min	0 s	30 s

6. Výsledky

6.1 Analýza alel

Bylo sledováno 55 pacientů Dětské kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové. Cílem bylo detekovat všechny tři mutace nacházející se na exonu 7 a 10 TPMT*3B a TPMT*3C v tomto pořadí a na exonu 5 TPMT*2 pomocí real time PCR metody.

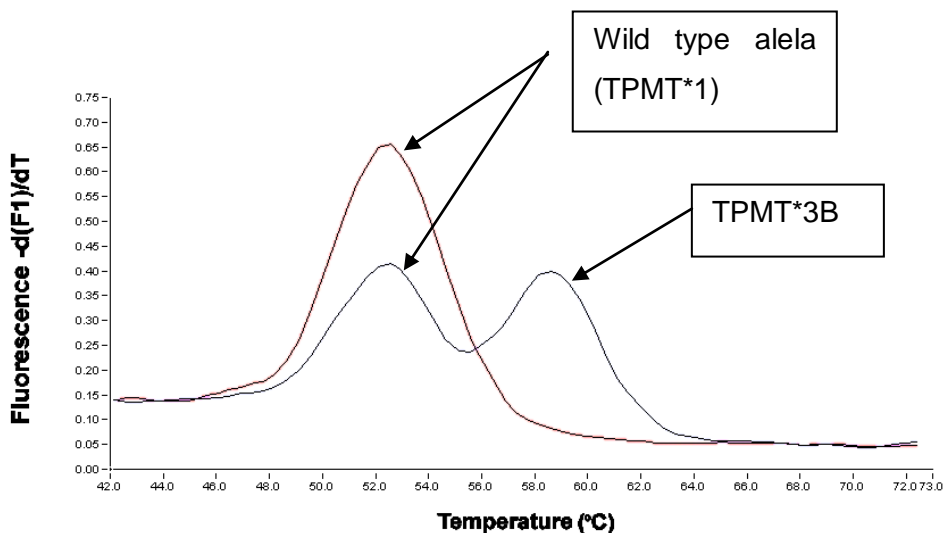
Na základě intenzity emise fluorescence a počtu cyklů byla získána amplifikační křivka. Analýza alel proběhla na základě rozdílné teploty tání hybridizačních sond. Na základě srovnání rozdílné teploty tání hybridizačních sond u jednotlivých pacientů jsme určili typ mutace.

V tabulce 9. jsou uvedeny předpokládané a získané průměrné teploty tání všech pozorovaných vzorků

Tab.9 Přehled předpokládaných a získaných průměrných teplot tání u pacientů

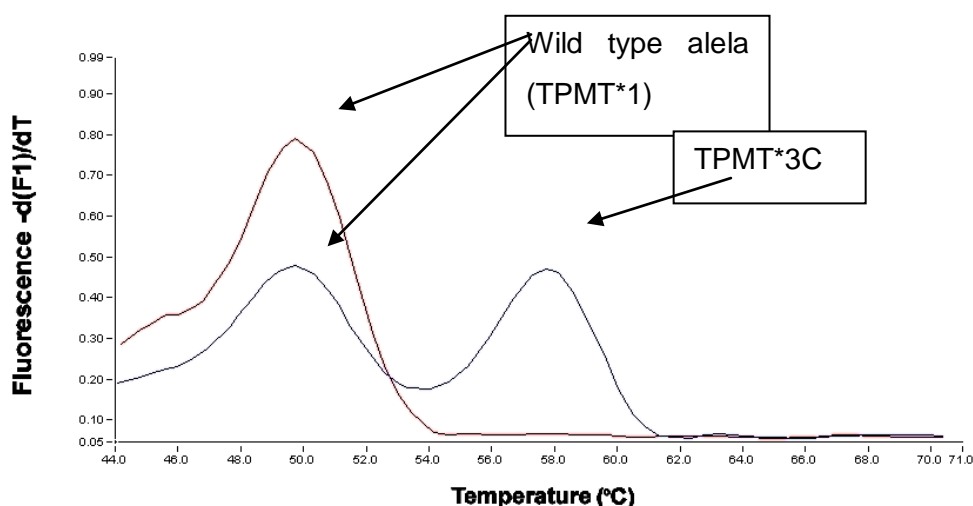
TPMT	Předpokládaná teplota tání wt (°C)	Předpokládaná teplota tání mutované alely (°C)	Pozorovaná teplota tání (°C) u wt	Pozorovaná teplota tání (°C) u mutované alely
TPMT*2	63	51	-	-
TPMT*3B	54	60	52	58
TPMT*3C	51	59	49	57

Na obrázku 34. jsou zobrazeny výsledné získané křivky.



34 a) Na obrázku je zobrazena křivka wild type alely ve srovnání s mutovanou alelou TPMT*3B, která byla detekována v kanálu 1.

Pro wild type alelu je typický jeden pík s průměrnou teplotou tání 52 °C, pro mutovanou alelu TPMT*3B (G460A) je typický pík při průměrné teplotě 58 °C. Pro zdravého jedince jsme získali jeden pík (wild type alela), pro homozygota pacienta jeden pík (TPMT*3B) a pro heterozygota pacienta dva píky (wild type alela a TPMT*3B).

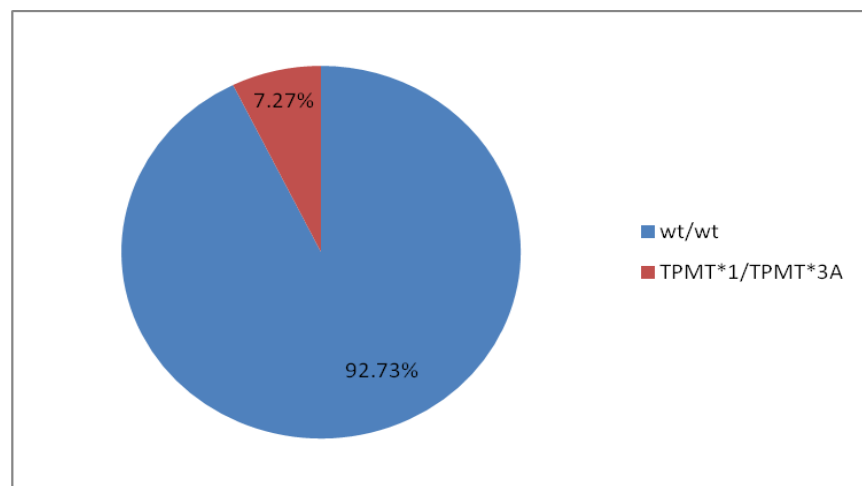


34 b). Na obrázku je zobrazena křivka wild type alely ve srovnání s mutovanou alelou TPMT*3C, která byla detekována v kanálu 1.

Pro wild type alelu je typický jeden pík s průměrnou teplotou tání 49 °C, pro mutovanou alelu TPMT*3C (A719G) je typický pík při prům. teplotě 57 °C.

Pro zdravého jedince jsme získali jeden pík (wild type alela), pro homozygota pacienta jeden pík (TPMT*3C) a pro heterozygota pacienta dva píky (wild type alela a TPMT*3C).

V našem případě nebyla prokázána mutace TPMT*2, proto také z tohoto důvodu zde není uveden graf popisující tuto mutaci. Z 55 pacientů jsme měli největší zastoupení genotypu wt/wt s oběma zdravými alelami (51 případů) a v 4 případech jsme se setkali s heterozygotními pacienty pro mutaci TPMT*3A (TPMT*3B a TPMT*3C). Na obrázku 35 je uveden graf, který popisuje získané výsledky v procentech.



Obr. 35 Procentuální zastoupení TPMT alel pro sledovanou skupinu jedinců
Z grafu je zřejmé, že ve sledované skupině převládá genotyp wt/wt s oběma zdravými alelami (92,73%), v menší míře byl zastoupen genotyp TPMT*1/TPMT*3A (7,27%).

6.3 Porovnání shody genotyp/fenotyp

Genotyp a fenotyp TPMT spolu úzce souvisí (kap. 4). V tabulce 10. je uveden přehled výsledků aktivit enzymu TPMT a genotypu TPMT.

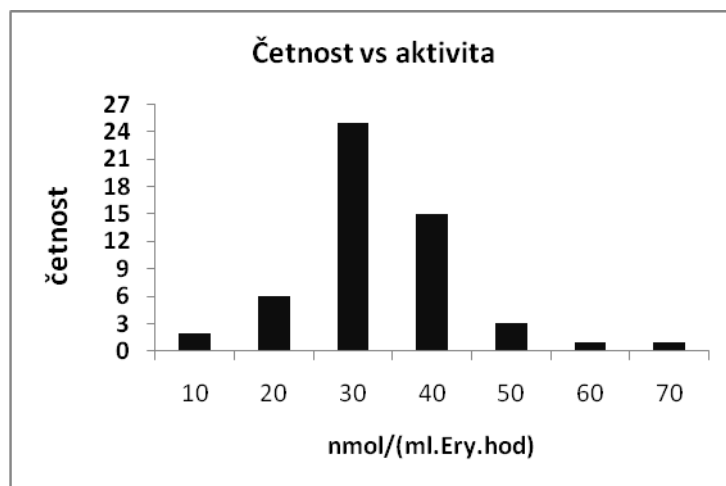
Tab. 10. Přehled aktivit a genotypu TPMT

Číslo pacienta.	Pohlaví (M – muž Ž – žena)	nmol/ml.Ery.hod Normalizována na hematokrit	TPMT
TPMT 1	Ž	41,0	wt/wt
TPMT 2	M	20,7	wt/wt
TPMT 3	Ž	27,6	wt/wt
TPMT 4	Ž	21,9	wt/wt
TPMT 5	M	14,4	TPMT*1/TPMT*3A
TPMT 6	Ž	30,4	wt/wt
TPMT 7	M	24,2	wt/wt
TPMT 8	Ž	27,4	wt/wt
TPMT 9	M	23,8	wt/wt
TPMT 10	M	21,8	wt/wt
TPMT 11	Ž	37,7	wt/wt
TPMT 12	M	31,2	wt/wt
TPMT 13	M	20,7	wt/wt
TPMT 14	Ž	15,1	wt/wt
TPMT 15	Ž	40,9	wt/wt
TPMT 16	M	30,7	wt/wt
TPMT 17	M	27,5	wt/wt
TPMT 18	Ž	38,4	wt/wt
TPMT19	Ž	33,6	wt/wt
TPMT 20	M	40	wt/wt
TPMT 21	Ž	27,2	wt/wt
TPMT 22	M	29,6	wt/wt
TPMT 23	Ž	32,6	wt/wt
TPMT 24	M	31,8	wt/wt
TPMT 25	Ž	7,7	TPMT*1/TPMT*3A
TPMT 26	Ž	29,9	wt/wt

TPMT 27	M	24,1	wt/wt
TPMT 28	Ž	6,2	TPMT*1/TPMT*3A
TPMT 29	M	23,6	wt/wt
TPMT 30	M	24,0	wt/wt
TPMT 31	Ž	66,1	wt/wt
TPMT 32	M	30,1	wt/wt
TPMT 33	Ž	34,8	wt/wt
TPMT 34	Ž	16,8	TPMT*1/TPMT*3A
TPMT 35	Ž	32,8	wt/wt
TPMT 36	Ž	27,3	wt/wt
TPMT 37	M	29,7	wt/wt
TPMT 38	M	12,5	wt/wt
TPMT 39	M	33,1	wt/wt
TPMT 40	M	23,2	wt/wt
TPMT 41	M	36,2	wt/wt
TPMT 42	Ž	25,9	wt/wt
TPMT 43	Ž	28,0	wt/wt
TPMT 44	Ž	26,6	wt/wt
TPMT 45	M	41,3	wt/wt
TPMT 46	Ž	35,5	wt/wt
TPMT 47	Ž	28,4	wt/wt
TPMT 48	M	30,0	wt/wt
TPMT 49	M	24,2	wt/wt
TPMT 50	M	19,7	wt/wt
TPMT 51	M	23,5	wt/wt
TPMT 52	M	57,5	wt/wt
TPMT 53	Ž	18,6	wt/wt
TPMT 54	M	31,5	wt/wt
TPMT 55	Ž	21,8	wt/wt

Tab.10. Hodnoty aktivity TPMT se pohybují v rozmezí 6,2 – 66,1 nmol/ml.Ery.Hod. Nižší hodnoty aktivity jsou spojeny s přítomností mutace v genu pro TPMT, vyšší hodnoty aktivity najdeme u genotypu wt/wt s oběma zdravými alelami.

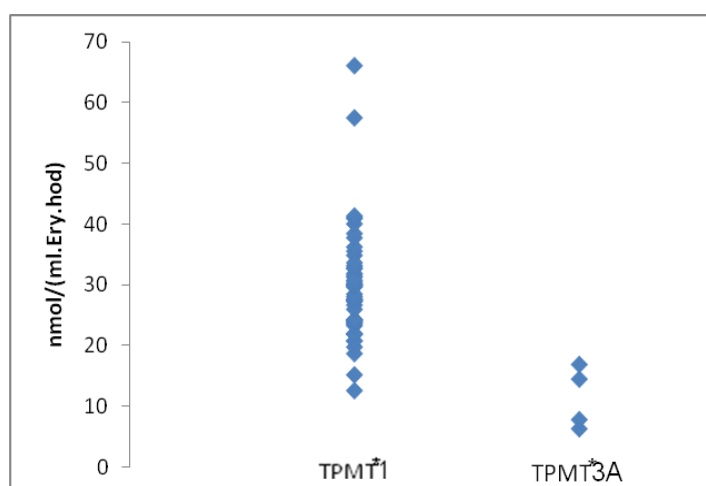
Na obr. 36 Je znázorněn histogram počtu pacientů a aktivita TPMT.



Obr. 36 Počet pacientů v závislosti na aktivitě

Z histogramu je zřejmé, že největší zastoupení pacientů ve sledované skupině je v rozmezí aktivity 20 – 30 nmol/ml.Ery. hod. Pro hodnotu aktivity větší než 60 nmol/ml.Ery.hod je zastoupen pouze jeden pacient, pro velmi nízké hodnoty aktivity v tomto případě jsou zastoupeny pouze dva případy.

Na obr. 37 je zobrazen graf, který ukazuje souvislost mezi aktivitou enzymu TPMT a genotypem TPMT.



Obr. 37 Závislost aktivity enzymu TPMT na genotypu TPMT

Obr.37 Počet zdravých jedinců (wt/wt genotyp) převažuje nad počtem pacientů heterozygotů (TPMT*1/TPMT*3A). Tento graf potvrzuje, že hodnoty aktivity TPMT (nmol/ml(ery.Hod)) jsou pro pacienty heterozygoty (TPMT*1/TPMT*3A) nižší ve srovnání se zdravými jedinci (wt/wt).

7. Diskuse

Genetické polymorfismy TPMT genu jsou důležitým faktorem zodpovědným za velké rozdíly v thiopurinové toxicitě a v účinnosti terapie thiopurinovými léčivy.

Pacienti s dědičně podmíněnou sníženou aktivitou enzymu TPMT, kteří jsou léčeni standardními dávkami thiopurinových léčiv, jsou v riziku rozvoje thiopurinové toxicity jako je např. myelosuprese. Na druhé straně u pacientů s výrazně zvýšenou aktivitou enzymu TPMT je riziko, že na léčbu standardními dávkami thiopurinových léčiv vůbec neodpoví nebo dojde k návratu onemocnění, kvůli kterému byla thiopurinová léčiva nasazena (Karas-Kuzelicki a Mlinarič-Rascan, 2009). Genotypizace TPMT tak představuje velký význam v klinické medicíně.

Výskyt těchto mutací v populaci je sporadický. Přibližně jeden pacient z 300 (0,3%) má aktivitu enzymu téměř nedetekovatelnou nebo příliš nízkou, 6% - 11% jedinců vykazují střední aktivitu a 89% - 94% sledovaných jedinců vykazují vysokou aktivitu TPMT (Seki et al., 2000; Schütz et al., 2000; Wusk et al., 2004).

Fakhoury et al. (2007) publikovali ve své studii, že 89% pacientů ze sledovaných skupin byli zdraví jedinci, 10,2% byli heterozygotní pacienti (TPMT*3A, TPMT*3C, TPMT*2) a 0,8% byli homozygoti (TPMT*3C). V další studii (n=191) 164 (86%) dobrovolníků byli zdraví jedinci, 26 jedinců (13,5%) heterozygotní pacienti (TPMT*3A, TPMT*3C, TPMT*2) a jeden z nich (0,5%) byl homozygotní pacient (TPMT*3A) (Spire-Vayron de la Moureyre et al., 1998).

70% známých mutací tvoří TPMT*3, z toho většina připadá na TPMT*3A (55%), 7% na TPMT*3B a 13% na TPMT*3C (Schütz et al., 2000).

V našem souboru pacientů bylo sledováno 55 dobrovolníků. 92,7 % (n=51) z nich představovali zdraví jedinci, 7,27 % (n=4) z nich byli heterozygotní pacienti (TPMT*3A). V této vyšetřované populaci se nevyskytoval žádný homozygotní pacient.

Pro určení genotypu enzymu TPMT se v současné době používají různé techniky. DNA je izolována z venózní krve a genotypizována PCR technikami, PCR-RFLP, PCR-SSCP, AS-PCR, real-time PCR. Zavádějí se mikročipové a čipové techniky.

PCR-RFLP ve své studii využili Oender et al. (2006) ke genotypizaci nejvíce se vyskytující mutace TPMT*3A. Byla sledována početná skupina pacientů (n=871). V jejich studii pacienti heterozygoti TPMT*3A představovali 6,81%, heterozygoti TPMT*3C představovali 0,23%, ostatní byli zdraví jedinci. Použitím PCR-RFLP dokázali takto početnou skupinu pacientů analyzovat v poměrně krátké době (Oender et al., 2006).

Xin et al. (2009) genotypizovali pacienty pro TPMT*3A, TPMT*3B a TPMT*3C metodou PCR - RFLP stejně jako Oender et al. (2006) a pro TPMT*2 použili AS - PCR. Pro fenotypizaci byla použita RP - HPLC metoda. Hodnoty aktivity byly naměřeny v rozmezí 13,04 – 68,25 U. 84% jedinců představovalo zdravou část populace a 16% jedinců byli heterozygoti. V této studii nebyl nalezen žádný homozygotní pacient. U heterozygotních pacientů byly naměřeny hodnoty aktivity 13,04 – 23,70 U. Vyšší hodnoty než 23,70 U odpovídaly zdravým jedincům.

Chrzanowska et al. (2006) analyzovali 87 pacientů a pro fenotypizaci byla použita RP-HPLC. Hodnoty aktivity byly v rozmezí 12,2 – 45,5 nmol 6 - mMP/g/Hb/h. Rozmezí hodnot pro heterozygoty se pohybovalo 12,2 – 20,6 nmol 6 - mMP/g/Hb/h a pro zdravé jedince 22,7 - 45,5 nmol 6 - mMP/g/Hb/h. Pro genotypizaci byly použity PCR-RFLP a AS-PCR. Zdraví jedinci byli zastoupeni v 88,5% a heterozygotní pacienti (TPMT*3A) v 11,5% (Chrzanowska et al., 2006).

Spire-Vayron de la Moureyre et al. (1998) použili pro genotypizaci PCR-SSCP pro její rychlost a jednoduchost a pro fenotypizaci použili RC. Průměrná naměřená hodnota aktivity byla 20,85 U ml⁻¹ RBC, hodnoty aktivity se pohybovaly od 0,3 – 50 U ml⁻¹ RBC. Hodnoty aktivity menší než 5 U ml⁻¹ RBC byly nalezeny u homozygotních pacientů, pro heterozygoty byly naměřeny hodnoty v rozmezí 5 – 20 U ml⁻¹ a pro zdravé jedince se hodnoty aktivity pohybovaly v rozmezí 10 – 50 U ml⁻¹. Došlo k překryvu hodnot pro heterozygoty a pro zdravé jedince (Spire-Vayron de la Moureyre et al., 1998).

Khalil N.M. a spol. (2005) využili ve svém výzkumu RP - HPLC. Bylo testováno 74 jedinců. 62 z nich byli pacienti s ALL a průměrná aktivita enzymu pro ně byla 33,3 ± 11,2 (rozmezí 11,4 – 55,4 nmol/g/Hb/h). Pro zdravé jedince byla průměrná hodnota aktivity 62,8 ± 7,7 (rozmezí 48,0 – 82,0 nmol/g/Hb/h). (Khalil et al., 2005).

Naše výsledky se shodují s předchozími studii. Výrazně vyšší hodnoty byly potvrzeny u zdravých jedinců jako v předchozích studiích. Hodnoty aktivit byly pro heterozygoty (TPMT*3A) byly: 6,2; 7,7; 14,4; 16,8 nmol/ml . Ery. Hod. Rozmezí pro zdravé jedince se pohybovalo 12,5 – 66,1 nmol/ml. Ery.hod.

Výskyt mutace v TPMT genu není příliš častý.

8. Závěry

Diplomová práce se věnuje genotypizaci a fenotypizaci TPMT. Bylo genotypizováno a fenotypizováno 55 pacientů z dětské kliniky ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové.

- 51 pacientů byli zdraví jedinci (TPMT*1), 4 pacienti byli prokázáni jako heterozygotní jedinci (TPMT*3A).
- TPMT aktivita pro zdravé jedince byla v rozmezí 12,5 – 66,1 nmol/ml. Ery.hod. Průměrná hodnota aktivity TPMT u zdravých jedinců byla 27,56 nmol/ml . Ery. Hod.
- Aktivita enzymu u heterozygotních pacientů měla hodnoty 6,2; 7,7; 14,4; 16,8 nmol/ml . Ery. Hod. Průměrná hodnota aktivity TPMT pro heterozygoty byla 11,28 nmol/ml . Ery. Hod.
- Hodnoty pro heterozygotní pacienty jsou nižší ve srovnání s hodnotami pro zdravé jedince, což se shoduje s předchozími studii.
- V případě mutace v genu pro enzym TPMT se nejčastěji setkáváme s TPMT*3A.
- Ze zjištěných fakt je tedy zřejmé, že nelze používat genotypizaci enzymu a fenotypizaci enzymu zvlášť. Oba tyto způsoby analýzy spolu úzce souvisí.

9. Seznam použitých zkratek

AIH	Autoimunitní hepatitida
AIH/PSC	Autoimunitní hepatitida/primární sklerozující cholangitida
AZA	Azathioprin
CD	Crohn's disease (Crohnova choroba)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (ethylendiamintetraoctová kyselina)
FL	Fluorescein
HPLC	High performance liquid chromatography (Vysokoučinná kapalinová chromatografie)
hTPMT	human thiopurine S-methyltransferase (lidská thiopurin S-methyltransferasa)
JRA	Juvenilní revmatoidní artritida
LCR	LC – RED 640
MeOH	Methanol
6-MP	6-merkaptopurin
6-MMP (6-MeMP)	6-methylmerkaptopurin
PCR-AS	Allelic specific PCR (Alelově specifická PCR)
PCR-RFLP	Restriction fragment length polymorphisms (Polymorfismus délky restričních fragmentů)
PCR-SSCP	Single strand conformation polymorfismus (Polymorfismus konformace jednořetězcové DNA)
PHO	Fosfát
RC	Radiochemická metoda
SAH	S-adenosyl-L-homocystein
SAM	S-adenosyl-L-methionin
6-TGN	6-thioguaninové nukleotidy
TPMT	Thiopurine S-methyltransferase (thiopurin S-methyltransferasa)
UC	Ulcerózní kolitida
wt	wild type

10. Seznam použité literatury

- Anglicheau, D., Sanquer, S., Lorient, M. A., Beaune, P., and Thervet, E. (2002). Thiopurine methyltransferase activity: new conditions for reversed-phase high-performance liquid chromatographic assay without extraction and genotypic-phenotypic correlation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 773, 119-127.
- *Brenda* [online]. 2009 [cit. 2009-07-20]. Enzyme Database - BRENDA. Dostupné z [www:<http://www.brendaenzymes.info/index.php4?page=sequences/seq.php4?ID=124783>](http://www.brendaenzymes.info/index.php4?page=sequences/seq.php4?ID=124783)
- *Brenda* [online]. 2009 [cit. 2009-07-20]. Enzyme Database - BRENDA. Dostupné z [www:<http://www.brendaenzymes.info/index.php4?page=sequences/seq.php4?ID=174812>](http://www.brendaenzymes.info/index.php4?page=sequences/seq.php4?ID=174812).
- *Brenda* [online]. 2009 [cit. 2009-07-20]. Enzyme Database - BRENDA. Dostupné z [www:<http://www.brendaenzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=2.1.1.67&Suchword=&organism%5B%5D=Homo+sapiens&show_tm=0>](http://www.brendaenzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=2.1.1.67&Suchword=&organism%5B%5D=Homo+sapiens&show_tm=0)
- *Brenda* [online]. 2009 [cit. 2009-07-20]. Enzyme Database - BRENDA. Dostupné z [www: <http://www.brenda-enzymes.info/Mol/reaction-popup.php4?id=43910&type=l&displayType=marvin>](http://www.brenda-enzymes.info/Mol/reaction-popup.php4?id=43910&type=l&displayType=marvin).
- Fakhoury, M., Andreu-Gallien, J., Mahr, A., Medard, Y., Azougagh, S., Vilmer, E., and Jacqz-Aigrain, E. (2007). Should TPMT genotype and activity be used to monitor 6-mercaptopurine treatment in children with acute lymphoblastic leukaemia? *J Clin Pharm Ther* 32, 633-639.
- *Farmaceutika* [online]. 2010 [cit. 2010-03-11]. AZAPRINE 25 MG. Dostupné z [www: <http://www.farmaceutika.info/azaprine-25-mg>](http://www.farmaceutika.info/azaprine-25-mg)
- Fessing, M. Y., Krynetski, E. Y., Zambetti, G. P., and Evans, W. E. (1998). Functional characterization of the human thiopurine S-methyltransferase (TPMT) gene promoter. *Eur J Biochem* 256, 510-517.

- Gardiner, S. J., Gearry, R. B., Barclay, M. L., and Begg, E. J. (2006). Two cases of thiopurine methyltransferase (TPMT) deficiency--a lucky save and a near miss with azathioprine. *Br J Clin Pharmacol* 62, 473-476.
- Hogarth, L. A., Redfern, C. P., Teodoridis, J. M., Hall, A. G., Anderson, H., Case, M. C., and Coulthard, S. A. (2008). The effect of thiopurine drugs on DNA methylation in relation to TPMT expression. *Biochem Pharmacol* 76, 1024-1035.
- Indjova, D., Shipkova, M., Atanasova, S., Niedmann, P. D., Armstrong, V. W., Svinarov, D., and Oellerich, M. (2003). Determination of thiopurine methyltransferase phenotype in isolated human erythrocytes using a new simple nonradioactive HPLC method. *Ther Drug Monit* 25, 637-644.
- Karas-Kuzelicki, N., Mlinaric-Rascan, I. (2009). Individualization of thiopurine therapy: thiopurine S-methyltransferase and beyond. *Pharmacogenomics* 10, 1309- 22
- Khalil, M. N., Erb, N., Khalil, P. N., Escherich, G., and Janka-Schaub, G. E. (2005). Interference free and simplified liquid chromatography-based determination of thiopurine S-methyltransferase activity in erythrocytes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 821, 105-111.
- KODÍČEK, M. S-adenosylmethionin. Z *Biochemické pojmy : výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2009-04-28]. Dostupné z [www: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=s-adenosylmethionin>](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=s-adenosylmethionin)
- Lennard, L. (2002). TPMT in the treatment of Crohn's disease with azathioprine. *Gut* 51, 143-146.
- MAZURA, I. et al. *Speciální metody molekulární biologie*. Praha : Univerzita v Praze Karolinum, 2001. 101 s.

- Menor, C., Fueyo, J. A., Escribano, O., Cara, C., Fernandez-Moreno, M. D., Roman, I. D., and Guijarro, L. G. (2001). Determination of thiopurine methyltransferase activity in human erythrocytes by high-performance liquid chromatography: comparison with the radiochemical method. *Ther Drug Monit* 23, 536-541.
- Nasedkina, T. V., Fedorova, O. E., Glotov, A. S., Chupova, N. V., Samochatova, E. V., Maiorova, O. A., Zemlyakova, V. V., Roudneva, A. E., Chudinov, A. V., Yurasov, R. A., et al. (2006). Rapid genotyping of common deficient thiopurine S-methyltransferase alleles using the DNA-microchip technique. *Eur J Hum Genet* 14, 991-998.
- Nishida, A., Kubota, T., Yamada, Y., Higashi, K., Kitamura, K., Nakahara, K., and Iga, T. (2002). Thiopurine S-methyltransferase activity in Japanese subjects: metabolic activity of 6-mercaptopurine 6-methylation in different TPMT genotypes. *Clin Chim Acta* 323, 147-150.
- Oender, K., Lanschuetzer, C. M., Laimer, M., Klausegger, A., Paulweber, B., Kofler, B., Hintner, H., and Bauer, J. W. (2006). Introducing a fast and simple PCR-RFLP analysis for the detection of mutant thiopurine S-methyltransferase alleles TPMT*3A and TPMT*3C. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 20, 396-400.
- Oliveira, B. M., Romanha, A. J., Alves, T. M., Viana, M. B., and Zani, C. L. (2004). An improved HPLC method for the quantitation of 6-mercaptopurine and its metabolites in red blood cells. *Braz J Med Biol Res* 37, 649-658.
- Oselin, K., Anier, K., Tamm, R., Kallassalu, K., and Maeorg, U. (2006). Determination of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) activity by comparing various normalization factors: reference values for Estonian population using HPLC-UV assay. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 834, 77-83.
- PECKA, M. *Laboratorní hematologie v přehledu: Fyziologie a patofyziologie krevní buňky*. Český Těšín : FINIDR s.r.o., 2006. 304 s.

- Peng, Y., Feng, Q., Wilk, D., Adjei, A. A., Salavaggione, O. E., Weinshilboum, R. M., and Yee, V. C. (2008). Structural basis of substrate recognition in thiopurine s-methyltransferase. *Biochemistry* 47, 6216-6225.
- *RFLP (délkový polymorfismus restrikčních fragmentů)* [online]. 2001 [cit. 2009-07-20]. UČEBNICE BIOCHEMIE. Dostupné z [www: <http://www.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-dna/newlook/defa3.htm>](http://www.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-dna/newlook/defa3.htm)
- Seki, T., Tanaka, T., and Nakamura, Y. (2000). Genomic structure and multiple single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of the thiopurine S-methyltransferase (TPMT) gene. *J Hum Genet* 45, 299-302.
- Slanař, O. (2005) Farmakogenetika v klinické praxi. *Farmakoterapie*. 3, s. 296 – 298
- Schütz, E., von Ahsen, N., and Oellerich, M. (2000). Genotyping of eight thiopurine methyltransferase mutations: three-color multiplexing, "two-color/shared" anchor, and fluorescence-quenching hybridization probe assays based on thermodynamic nearest-neighbor probe design. *Clin Chem* 46, 1728-1737.
- Spire-Vayron de la Moureyre, C., Debuysere, H., Mastain, B., Vinner, E., Marez, D., Lo Guidice, J. M., Chevalier, D., Brique, S., Motte, K., Colombel, J. F., et al. (1998). Genotypic and phenotypic analysis of the polymorphic thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT) in a European population. *Br J Pharmacol* 125, 879-887.
- Tai, H. L., Fessing, M. Y., Bonten, E. J., Yanishevsky, Y., d'Azzo, A., Krynetski, E. Y., and Evans, W. E. (1999). Enhanced proteasomal degradation of mutant human thiopurine S-methyltransferase (TPMT) in mammalian cells: mechanism for TPMT protein deficiency inherited by TPMT*2, TPMT*3A, TPMT*3B or TPMT*3C. *Pharmacogenetics* 9, 641-650.
- *TheLabRat* [online]. 2005 [cit. 2009-07-20]. Accl Restriction Enzyme. Dostupné z [www: <http://www.citace.com/generator.php?>](http://www.citace.com/generator.php?>).

- Wu, H., Horton, J. R., Battaile, K., Allali-Hassani, A., Martin, F., Zeng, H., Loppnau, P., Vedadi, M., Bochkarev, A., Plotnikov, A. N., and Cheng, X. (2007). Structural basis of allele variation of human thiopurine-S-methyltransferase. *Proteins* 67, 198-208.
- Xin, H. W., Xiong, H., Wu, X. C., Li, Q., Xiong, L., and Yu, A. R. (2009). Relationships between thiopurine S-methyltransferase polymorphism and azathioprine-related adverse drug reactions in Chinese renal transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol* 65, 249-255.