

Farmakogenetika v laboratorní praxi

P. Riedlová, R. Richterová

Úvod

Sledování vztahu mezi genetickou predispozicí jedince a variabilní odpovědí na podávané léky je hlavním předmětem zájmu odborníků z oblasti farmakogenetiky. „Ideální“ léčivo, vysoce efektivní a bezpečné pro všechny pacienty, neexistuje. Důvodem je genetická variabilita metabolismu, daná přítomností polymorfizmů v příslušných genech v kombinaci s negenetickými faktory zevního prostředí. Schopnost organismu vstřebávat, transportovat, transformovat a eliminovat léky nebo jejich metabolity je variabilní, a proto existují výrazné rozdíly ve velikosti léčebné dávky potřebné k dosažení požadovaného terapeutického účinku.

Nejobávánějším a nejzávažnějším problémem je možné riziko toxických a ojedinelé až život ohrožujících reakcí u pacientů s defektním cílovým genem. Naopak příčinou selhání léčby může být přítomnost polymorfizmů, zvyšujících aktivitu enzymů natolik, že standardní dávky léčiva neumožní požadovaný efekt. Individuální predikce terapeutické odpovědi a zároveň potenciálních projevů toxicity umožňuje navrhnout pro každého pacienta vhodnou medikaci, kdy je přihlédnuto nejen k projevům a průběhu onemocnění, ale také ke specifické genetické výbavě pacienta. V ideálním případě by farmakogenetické vyšetření mělo být provedeno před zahájením léčby, a již první dávky by tak mohly být nastaveny dle genetických predispozic.

Podle našich zkušeností je v současnosti nejžádanějším farmakogenetickým vyšetřením genotypizace genu *TPMT* před nasazením léčiv na bázi thiopurinů a genů *CYP2C9* a *VKORC1* před zahájením léčby antikoagulanciem warfarinem.

Thiopurin S-methyltransferáza (TPMT)

TPMT je enzym cytosolu, který katalyzuje S-methylaci aromatických a heterocyklických sulfhydrylových komponent thiopurinových léčiv - 6-thioguaninu, 6-merkaptopurinu a jeho imidazolového derivátu azathioprinu. Tyto látky jsou používány v medicíně jako protinádorová léčiva a imunosupresiva při terapii autoimunitních onemocnění, hematologických onemocnění u dětí, idiopatických střevních zánětů a při transplantacích. Thiopurinová léčiva jsou konvertována v organismu na účinné thioguaninové nukleotidy, které se zabudovávají

do nukleových kyselin a inhibují tak jejich transkripci. Cytotoxické a imunosupresivní účinky jsou dány také inhibicí de novo syntézy purinových nukleotidů. TPMT je klíčový enzym biodegradace thiopurinů, určující efekt léčiv a vznik vedlejších nežádoucích účinků při jejich odbourávání jako je myelosuprese, hepatotoxicita, neurotoxicita a záněty sliznic. Snížená aktivita TPMT je důsledkem přítomnosti známých polymorfizmů v kódující oblasti genu TPMT. V indoevropské populaci bylo popsáno několik funkčních polymorfizmů, z nichž mezi nejčastější deficitní alely patří TPMT*2, TPMT*3A a TPMT*3C, méně častá je alela TPMT*3B. Alela TPMT*2 je tvořena nukleotidovou záměnou G238C v exonu 5, TPMT*3C záměnou A719G v exonu 10. U TPMT*3A byly popsány dvě sekvenční varianty, G460A v exonu 7 a A719G v exonu 10.

V souboru 157 pacientů vyšetřených na našem pracovišti jsme sledovali výskyt výše popsaných deficitních alel. Vzorky DNA byly izolovány z leukocytů periferní krve a molekulárně genetická analýza byla založena na principu analýzy křivek teploty tání hybridizačních FRET sond na přístroji LightCycler (Roche). Specifickou teplotu tání sondy určuje peak, jež je negativním integrálem křivky tání (obr. 1). V souboru byly zastoupeny genotypy: wild type TPMT*1/*1 - 144x, TPMT*1/*2 - 1x, TPMT*1/*3A - 11x a TPMT*3A/*3A - 1x. Zjištěné genotypové frekvence v našem souboru se shodují s daty publikovanými pro indoevropskou populaci. Dle literárních údajů, skutečná aktivita enzymu TPMT zcela odpovídá genotypu a zejména u pacientů heterozygotních a homozygotních pro sledované polymorfizmy je riziko toxických reakcí významné. Protože nerovnoměrné rozložení aktivity TPMT v populaci způsobuje rozdíly v účinnosti léčby, je stanovení genotypu TPMT před začátkem léčby dobrým nástrojem pro určení vhodného dávkování léčiva.

Cytochrom P450 2C9 (CYP2C9)

Oxidativní metabolismus cizorodých látek a tedy mnoha léčiv je v jaterních buňkách uskutečňován cytochromovým systémem P450, jehož enzymy katalyzují příslušné hydroxylační reakce (obr. 2). Polymorfizmy cytochromálního izoenzymu CYP2C9 ovlivňují významně biotransformaci S warfarinu, který potlačením tvorby faktorů srážení krve snižuje riziko vzniku krevních sraženin. U indoevropské populace bylo zatím identifikováno celkem 132 polymorfizmů, z nichž většina nemá významnější vliv na účinnost warfarinu. Podstatný význam mají varianty CYP2C9*2 a CYP2C9*3. Polymorfizmus CYP2C9*2 (C430T) v kodónu 144 vede k záměně argininu za cystein a CYP2C9*3

(A1075C) v kodónu 359 k záměně isoleucinu za leucin. Frekvence alely v CYP2C9*2 v populaci se pohybuje v rozmezí 8 - 12,5% a frekvence alely CYP2C9*3 v rozmezí 3 - 8,5%.

Nižší dávkování warfarinu se uplatňuje u nositelů jedné nebo dvou popsanych polymorfních alel oproti nositelům wild type alely CYP2C9*1. Požadavek menších dávek warfarinu ve vztahu k polymorfizmu v genu CYP2C9 se projevuje již čtvrtý den léčby, při prvním měření INR. U nositelů variantních alel se tak doporučuje časté monitorování INR vzhledem k optimální dávce warfarinu během prvních tří týdnů léčby, aby se předešlo přílišnému antikoagulačnímu efektu a riziku krvácení.

Vitamin K epoxid reduktázový komplex 1 (VKORC1)

Také genu *VKORC1* se podle současných poznatků ve farmakogenetice připisuje velká pozornost v souvislosti s odbouráváním antikoagulačního léčiva warfarinu. Gen *VKORC1* je lokalizován na chromozomu 16p12-q21, má tři exony a kóduje podjednotku 1 transmembránového proteinu - vitamin K epoxid reduktázového komplexu, o velikosti 163 aminokyselin. Komplex VKOR recykluje vitamin K 2,3-epoxid na vitamin K hydrochinon, který je esenciálním kofaktorem posttranslační γ -karboxylace mnoha koagulačních faktorů (FII, FVII, FIX, FX ad.). Do dnešní doby bylo nalezeno 28 polymorfizmů v genu *VKORC1*, z nichž dva nejčastější, 1173 C>T lokalizovaný v prvním intronu a -1639 G>A v promotorové oblasti, vedou k rozdílné senzitivitě vůči warfarinu. U těchto dvou polymorfizmů však byla prokázána těsná vazba, a proto je zcela dostačující detekce jedné mutace. Výsledky studií publikované v odborné literatuře poukazují na to, že pacientům s 1639 GA genotypem hrozí 2,3 krát a pacientům s 1639 AA genotypem 10,5 krát vyšší riziko předávkování warfarinem.

V naší laboratoři bylo celkem bylo vyšetřeno 474 pacientů na polymorfizmus 1639 G>A. Vzorky DNA byly izolovány z leukocytů periferní krve standardní izolační metodou. Molekulárně genetická analýza byla zpočátku postavena na PCR-RFLP. Tato metoda je časově náročná a z toho důvodu byla zavedena metoda real-time PCR na přístroji Realplex (Eppendorf).

V souboru bylo zastoupeno 184 GG wild type homozygotů, 225 GA heterozygotů a 65 AA mutovaných homozygotů. Z uvedených údajů plyne, že frekvence alely G v české populaci je 0,625 a alely A je 0,375, což odpovídá údajům publikovaným pro indoevropskou populaci.

Dihydropyrimidindehydrogenáza (DPD)

DPD je klíčovým enzymem odbourávání protinádorového léčiva 5-fluorouracilu (5-FU) na neaktivní metabolity. Spolu s dalšími příbuznými fluoropyrimidinovými cytostatiky patří již několik desítek let mezi léčiva první volby při léčbě kolorektálních karcinomů, karcinomů žaludku, jater a pankreatu. Velmi často jsou také používány v kombinaci při léčbě nádorů hlavy, krku, jiných ORL lokalizací a nádorů prsu. Jedním z hlavních problémů současné léčby onkologických pacientů 5-fluorouracilem je vysoká rozmanitost odpovědi na podávané léčivo a nemožnost tuto reakci správně předpovědět.

Celkově je z podané dávky léčiva odbouráváno na neaktivní metabolity přibližně 80-95% a vlastní účinek je zprostředkován pouze 5% podané dávky, která je přeměňována na aktivní metabolity s cytotoxickým účinkem uplatňujícím se v protinádorové léčbě. Při deficienci DPD dochází ke kumulaci toxického léčiva, resp. jeho toxických metabolitů v organismu, což může vést k závažným a ojediněle až letálním toxickým reakcím. Defekty aktivity DPD jsou dány bodovými či sestřihovými mutacemi, velkými delecemi a inzercemi nebo sníženou expresí genu *DPYD*, která se může vyvinout až v důsledku léčby fluoropyrimidiny. Četnost mutací v genu kódujícím DPD je v běžné populaci udávána mezi 1-5,8%. K diagnostice nedostatečné aktivity enzymu DPD lze využít jak molekulárně genetické metody analýzy exprese a mutace genu, tak stále častěji diskutované nepřímé stanovení aktivity DPD analýzou koncentrací uracilu a dihydrouracilu v plazmě, resp. v moči různými chromatografickými technikami.

V rámci studie probíhající na našem pracovišti jsme se v první fázi zaměřili na detekci velkých intragenových přestaveb, zahrnujících celé exony, pomocí nedávno vyvinuté metody MLPA (Multiplex ligation dependent probe amplification). Principem této metody je multiplexová polymerázová řetězová reakce (PCR) používající jednoho páru univerzálních primerů k amplifikaci hybridizovaných a následně zligovaných sond. MLPA analýza (fragmentační analýza) je prováděna na automatickém sekvenátoru ABI Prism 3130 (Applied Biosystems) (obr.3).

Uridin difosfát-glukuronosyltransferáza 1A1 (UGT1A1)

Uridin difosfát-glukuronosyltransferáza je enzym, katalyzující glukuronidaci nekonjugovaného bilirubinu a také biotransformaci protinádorového léčiva irinotecanu na neaktivní a netoxické glukuronidy.

Irinotecan je semisyntetický derivát alkaloidu camptotecinu. Aktivací v organismu vzniká metabolit SN-38, jehož hlavním účinkem je inhibice topoizomerázy I. Jeho protinádorová aktivita je využívána především při léčbě kolorektálního karcinomu.

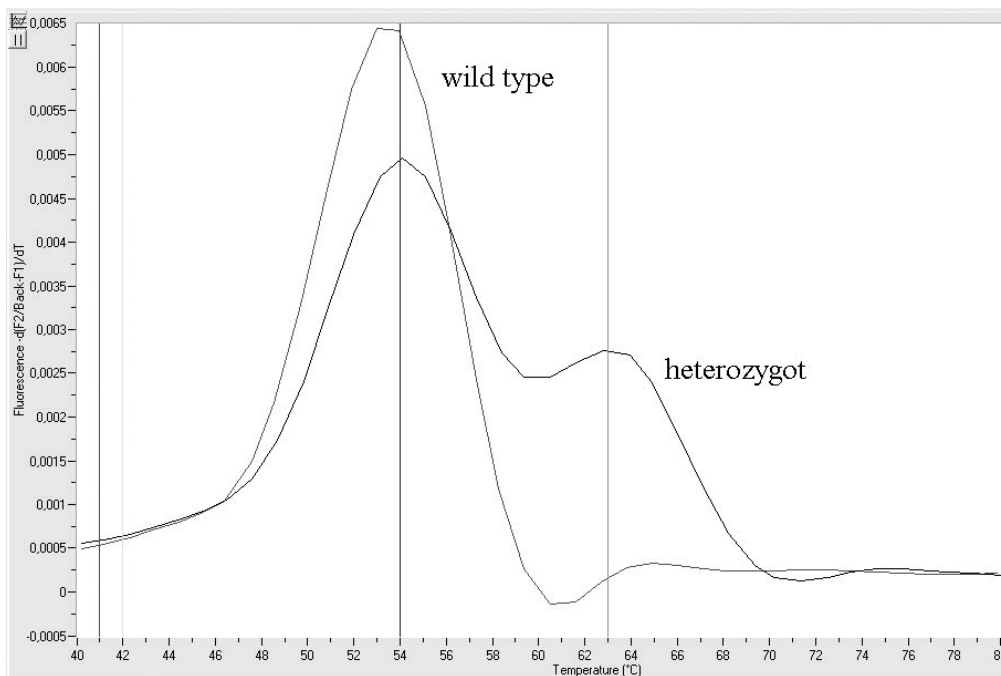
Nejčastější kauzální mutací, která má za následek snížení aktivity enzymu je inserce TA sekvence v promotoru *UGT1A1* genu. Promotor nemutovaného genu obsahuje 6TA opakování na obou alelách *UGT1A1* (genotyp 6TA/6TA). Pacienti se sníženou katalytickou aktivitou enzymu nesou na jedné případně na obou alelách genu inserci TA sekvence (genotyp 6TA/7TA resp. 7TA/7TA). Genotypem 7TA/7TA jsou charakterizováni pacienti s klinicky benigním Gilbertovým syndromem. Nevyžadující žádnou terapeutickou intervenci, v případě léčby irinotecanem však mohou být ohroženi toxickou reakcí na terapii (diarrhea, leukopenie, neutropenie atd.) již při podání standardních dávek léčiva.

Závěr

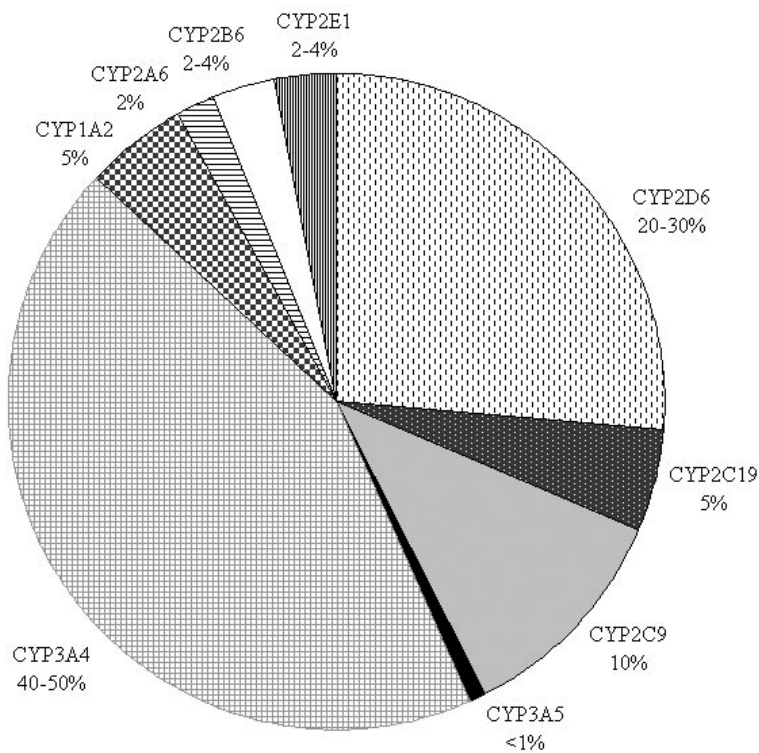
Rychlý rozvoj na poli farmakogenetiky nám přináší neustále další možnosti laboratorní diagnostiky v souvislosti s variabilitou lékové odpovědi. Zavedení a využití nových poznatků do laboratorní praxe však předchází mnoho náročných klinických a farmakogenetických studií, a proto otázka individualizace léčby je pořád otevřená.

Literatura

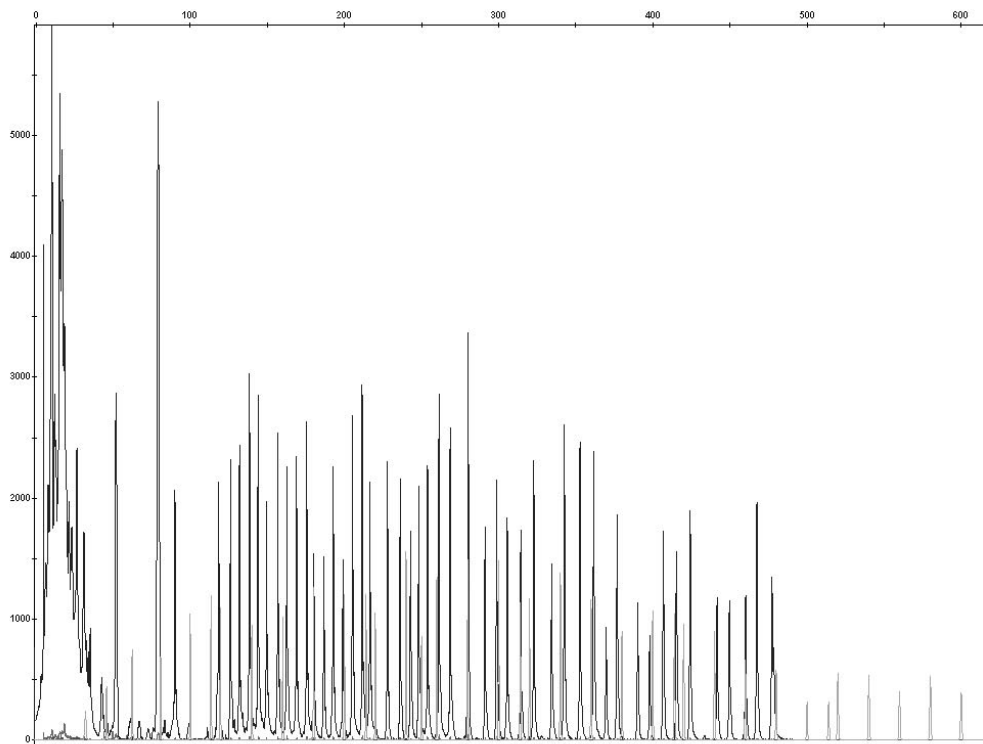
- 1) Licinio Julio and Wong Ma-li: Pharmacogenomics, The Search for Individualized Therapies, Wiley-VCH Verlag GmbH Weinheim, Germany 2002.
- 2) Schwab M., Schaffeler E., Marx C., Fischer C., Lang T., Behrens C., Gregor M., Eichelbaum M., Zanger U.M., Kaskas B.A.: Azathioprine therapy and adverse drug reactions in patients with inflammatory bowel disease: impact of thiopurine S-methyltransferase polymorphism. *Pharmacogenetics*. 2002 Aug, 12 (6): 429-436.
- 3) Sies Ch., Florkowski Ch., George P., Garry R., Barclay M., Harraway J., Pike L., Walmsley T.: Measurement of thiopurine methyl transferase activity guides dose-initiation and prevents toxicity from azathioprine. *Journal of the New Zealand Medical Association*. 2005 Feb, 118 (1210).
- 4) Kessler P: Farmakogenetika warfarinu. Doporučení pro klinickou praxi. 2006.
- 5) Borlak J., Thum T.: Identification of Major CYP2C9 and CYP2C19 Polymorphisms by Fluorescence Resonance Energy Transfer Analysis. *Clinical Chemistry*. 2002, 48 (9).
- 6) <http://www.mayoreferenceservices.org/communique/Cytochrome P450 Enzyme Genotyping: Optimizing Patient Care Through Pharmacogenetics>, 2005 Sep.
- 7) Yuan H-Y., Chen J-J., Michael Lee M.T., Wung J-Ch., Chen Y-F., Charng M-J., Lu M-J., Hung Ch-R., Wei Ch-Y., Chen Ch-H., Wu J-Y., Chen Y-T.: A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity. *Human Molecular genetics*. 2005 May, 14 (13): 1745-1751.
- 8) D'Andrea G., A'Ambrosio R.L., Di Perna P., Chetta M., Santacroce R., Brancaccio V., Grandone E., Margaglione M.: A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an inter-individual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood*. 2005 Jan, 105 (2): 645-649.
- 9) Kuilenburg van A.B.P., Haajes J., Richel D.J., Zoetekouw L., Lenthe H.V., Abreu De R.A., Maring J.G., Vreken P., Gennip van A.H.: Clinical Implications of Dihydropyrimidine Dehydrogenase (DPD) Deficiency in Patients with Severe 5-Fluorouracil-associated Toxicity: Identification of New Mutations in the DPD gene. *Clinical Cancer Research*. 2000 Dec, 6: 4705-4712.
- 10) Seck K., Riemer S., Kates R., Ullrich T., Lutz V., Harbeck N., Schmitt M., Kiechle M., Diasia R., Gross E.: Analysis of the DPYD Gene Implicated in 5-Fluorouracil Catabolism in a Cohort of Caucasian Individuals. *Clinical Cancer Research*. 2005 Aug, 11 (16): 5886-5892.
- 11) Tukey R.H., Strassburg Ch.P., Mackenzie P.I.: Pharmacogenomics of Human UDP-Glucuronosyltransferases and Irinotecan Toxicity. *Molecular Pharmacology*. 2002, 62 (3): 446-450.



Obr. 1 - G238C: Ukázka analýzy křivek teploty tání - detekce mutace G238C v genu TPMT (varianta wild type: $T_m = 54^\circ\text{C}$, mutovaný homozygot: $T_m = 63^\circ\text{C}$)



Obr.2: Podíl izoenzymů systému CYP450 na metabolismu cizorodých látek.



Obr.3: Ukázka fragmentační analýzy, gen DPYD.