

The background of the slide is a close-up photograph of several purple daisy-like flowers. The flowers have numerous thin, light purple petals radiating from a dark brown center. The lighting is soft, and the background is slightly blurred, focusing attention on the flowers.

TİOPÜRİN S-METİL TRANSFERAZ (TPMT)

Ahmet GENÇ

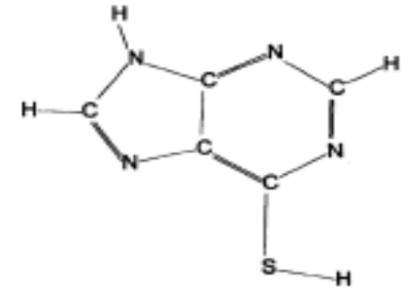
Tiopürin S-Metil Transferaz

(TPMT; EC 2.1.1.67)

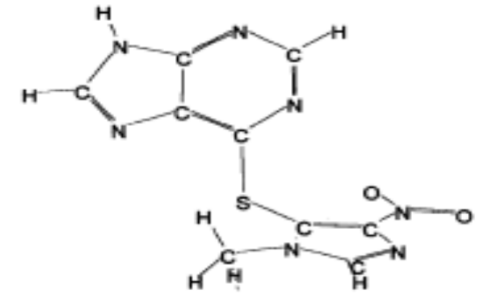
- Azatiopürinin (AZA), tioguanin ve 6-merkaptopürin (6MP) gibi aromatik ve heterosiklik sülfidril bileşiklerin metilasyonunu katalizleyen sitoplazmik bir enzimdir
- Normal bireylerin yaklaşık %89'u yüksek düzeyde aktiviteye sahip, geri kalan yaklaşık %11'i kısmi veya tümünden TPMT eksikliği vardır
- TPMT eksikliği olan bireyler 6-merkaptopürin (6MP) veya azatiopürin (AZA) gibi tiopürin ilaçlara tolerans gösterememekte ve hemopoeitik toksisite veya bazen ölümle sonuçlanmaktadır
- Bu nedenle bu ilaçlar uygulanmadan önce TPMT aktivitesinin bilinmesi klinisyen için önemlidir

Tiopürin İlaçlar-1

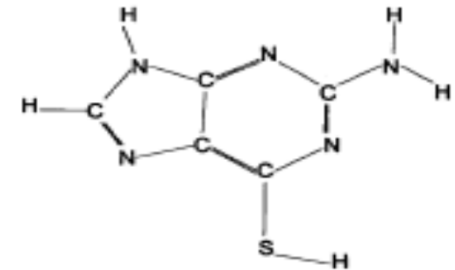
- Tiopürin ilaçlar (6-MP, AZA ve 6-TG):
 - lösemi tedavisinde **kemoterapik ajanlar**
 - IBD tedavisinde **immunosupresif ajanlar**,
 - otoimmün hastalıklarda ve
 - organ transplantasyonlarını takiben kullanılmakta
- Dermatoloji de:
 - İmmunobülüs
 - Lupus eritematozus
 - Ekzama
 - Fotodermatoz
 - Behçet hastalığında ...
- Romatolojide
 - SLE, skleroderma, dermatomikoz
- Gastroenteroloji
- Nöroloji



6-Mercaptopurine



Azathioprine



6-Thioguanine

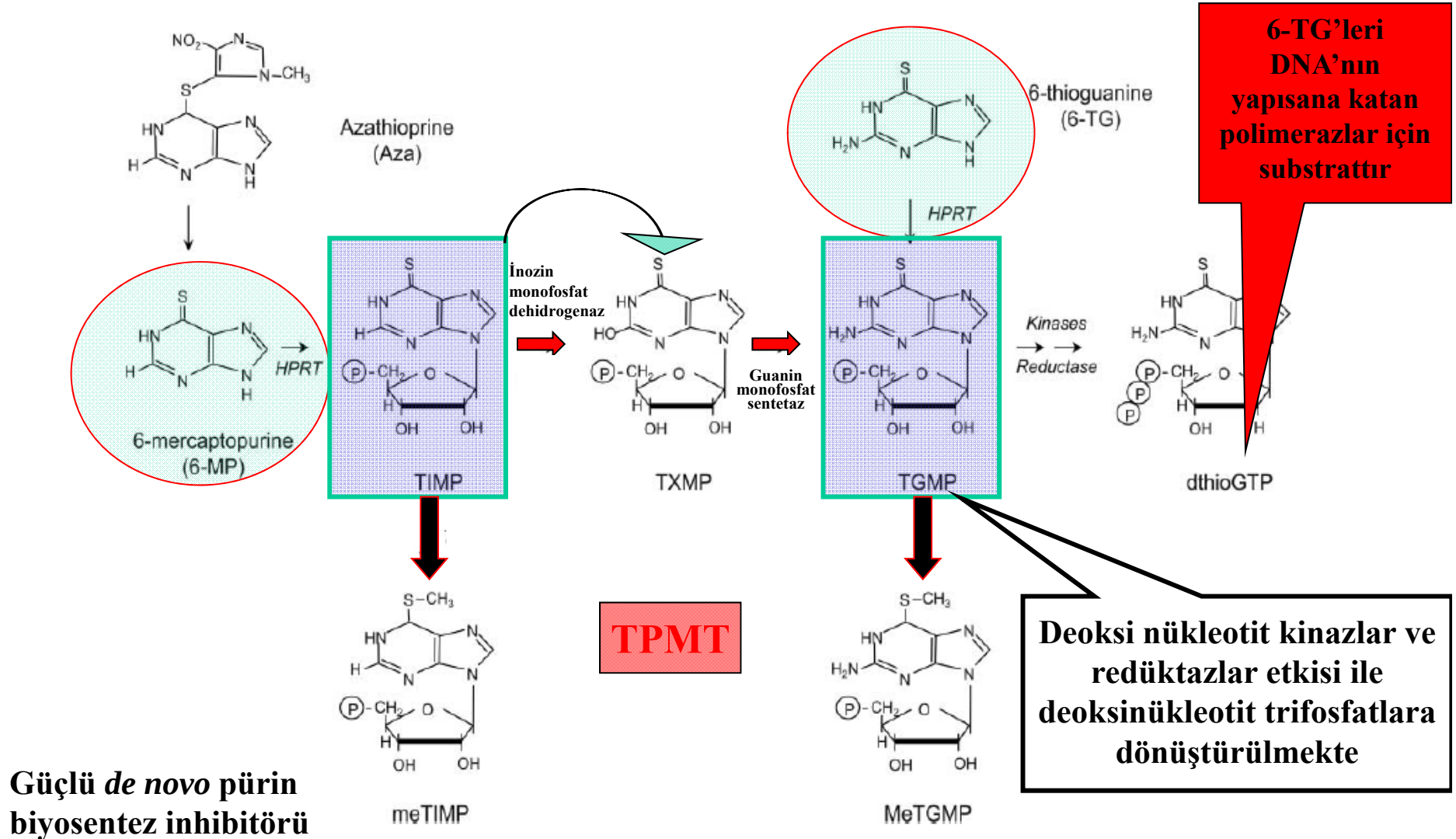
Tiopürin İlaçlar-2

- AZA ve 6-MP'nin etkisinin mekanizması tam olarak bilinmemekte:
 - DNA, RNA sentezi ve kromozomal replikasyonlarda etkili
 - T ve B lenfosit proliferasyonunu inhibe etmekte
 - NK hücrelerinin sitotoksitesinde etkili
- Yan etkileri:
 - Lökopeni, trombositopeni, anemi ve immünosupresyon
 - Bulantı, kusma, diare, hepatotoksiste, pankreatit, ilaç ateşi, fırsatçı infeksiyonlar, hipersensitivite reaksiyonu

Azatiopürin (AZA) Metabolizması

- AZA sindirim sisteminde hemen ve tamamen absorbe olmakta
- Alındıktan 2 saat sonra serumda pik yapmakta
- Tüm aktif metabolitlerinin yarıömrü yaklaşık 5 saat
- AZA çoğunlukla metabolize olmakta sadece ~%2'si değişmeden idrarla atılmakta
- Kan-beyin bariyerini geçmemekte

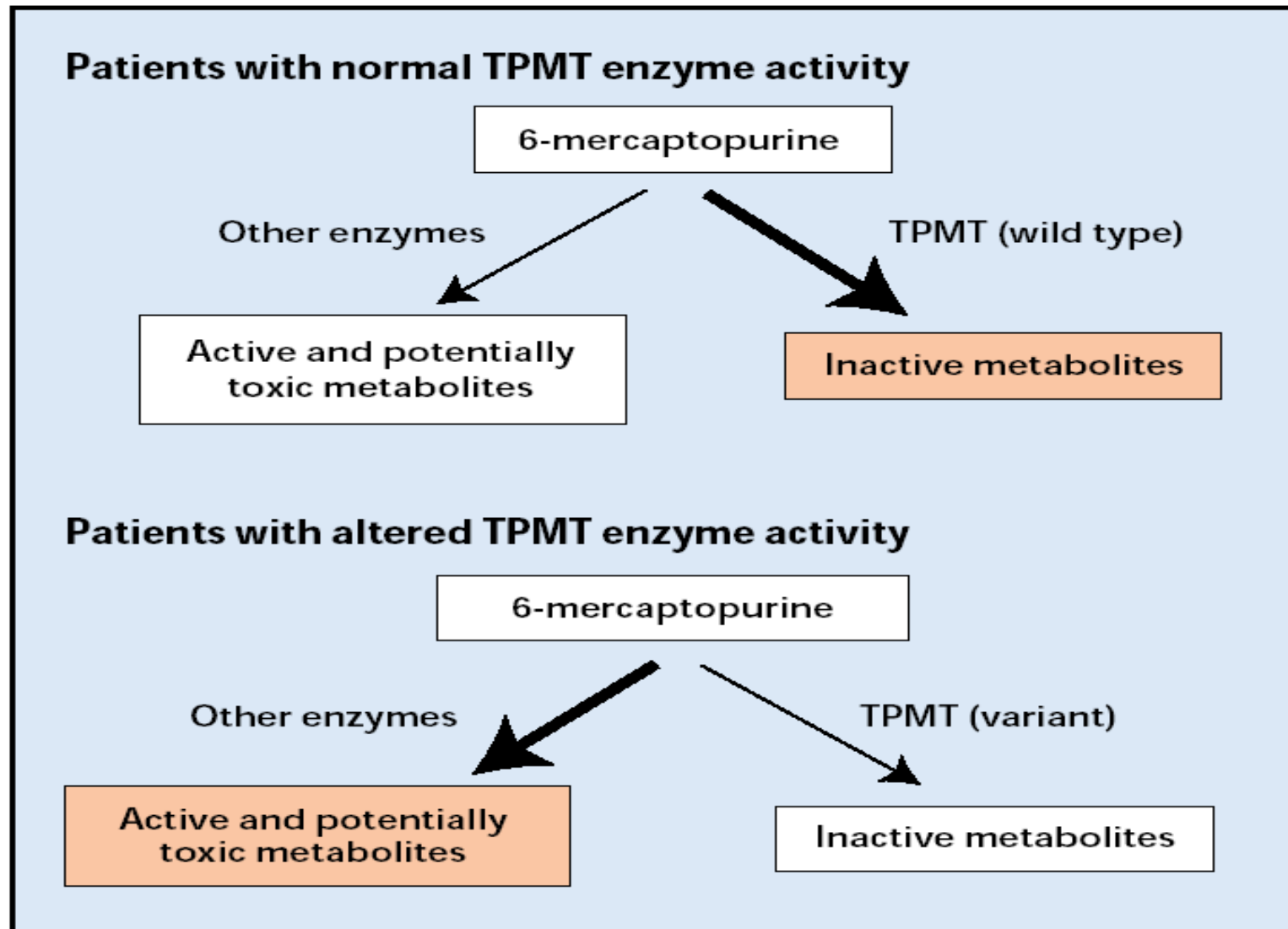
Tiopürinler DNA prekürsörleridir



Tiopürinler enzimatik olarak inaktive edilmektedir

1. Ksantin oksidaz (XO) 6-MP'ı 6-tioürik asite oksitlemektedir
2. TPMT ise 6-MP veya 6-TG'ni KC de metilasyonunu katalizleyerek inaktif metabolitlere dönüştürmektedir
3. Metillenmemiş TG metabolitleri toksik etki göstermektedir

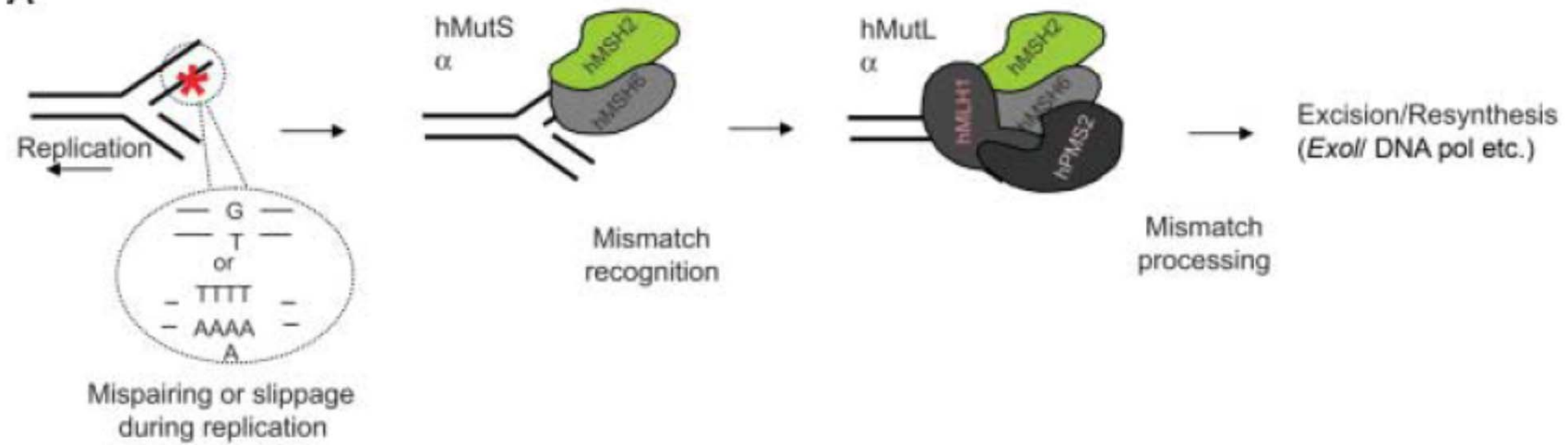
Azatiopürin Toksisitesi



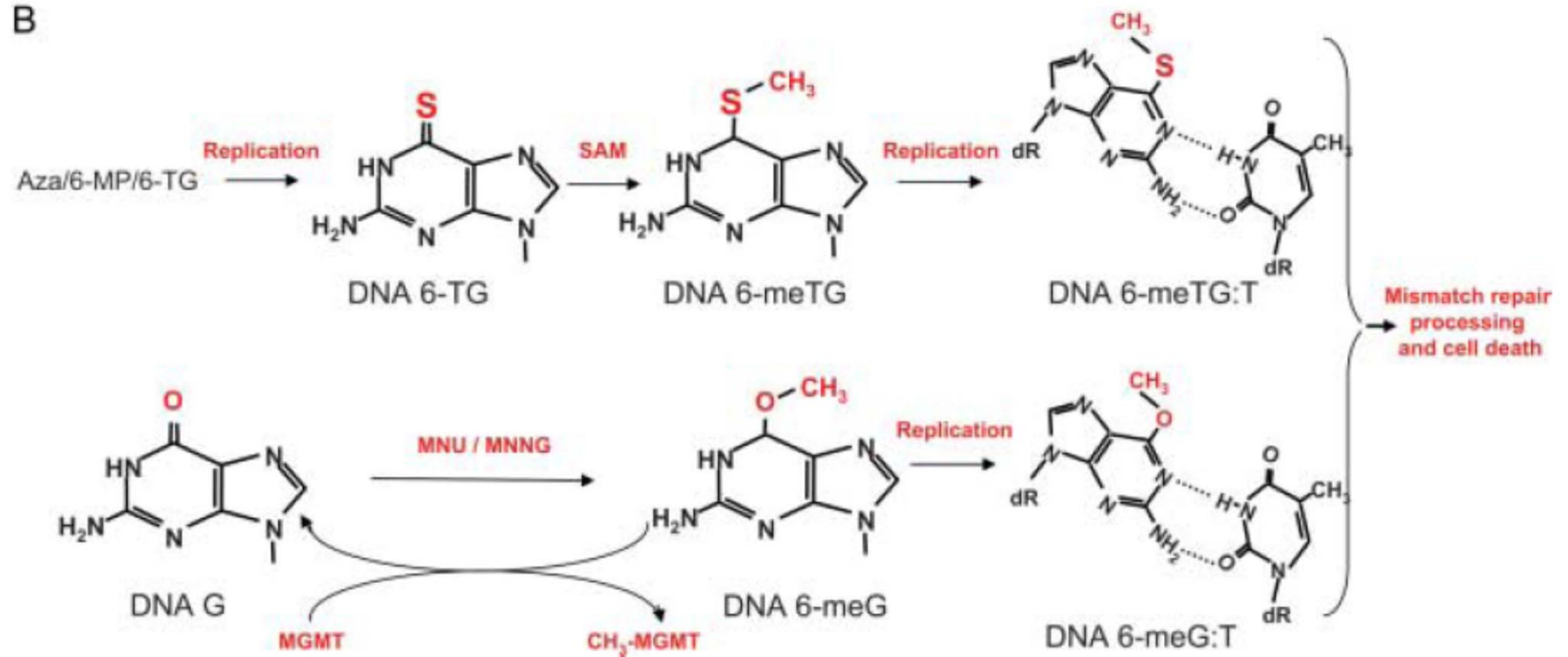
Tiopürinler hücreleri nasıl öldürür?

- Tiopürinler 50 yıldan fazla klinikte kullanılmasına rağmen terapötik mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir
- Aktive olmuş T hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etme yetenekleri immünosupresan etkilerine katkı sağlamaktadır
- 6-TG DNA modifikasyonu mismatch tamir (MMR) sistemi gerekmektedir
- DNA 6-TG in situ non-enzimatik metilasyonu (S-adenozilmetiyonin) geçirmektedir
- Replikasyon esnasında DNA 6-meTG bç T ile eşleşmekte
- 6-meTG:T bç ve O⁶-meG:T bç replikasyon hatalarına neden olmakta ve MMR sistemi devreye girmekte

A



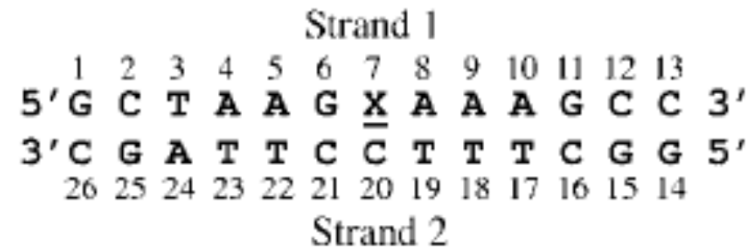
B



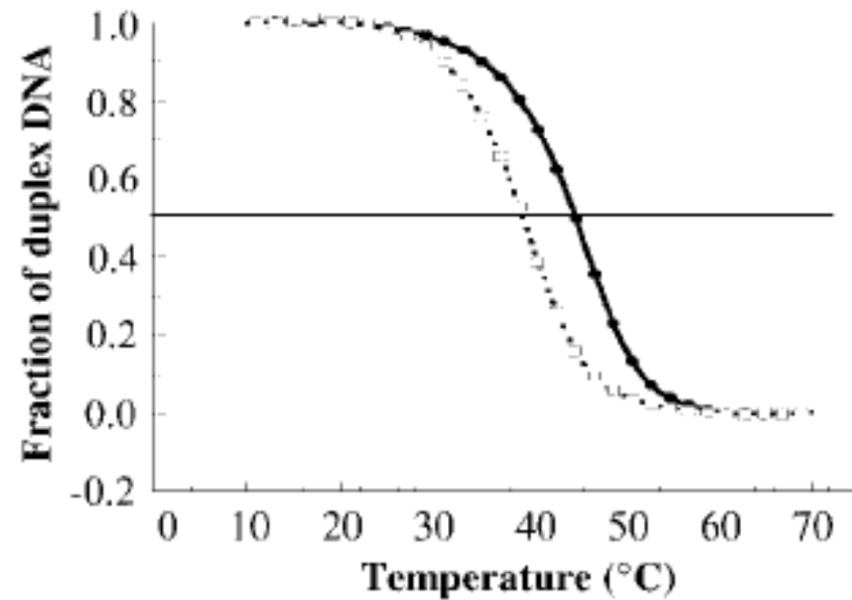
Tiopürinler hücreleri nasıl öldürür?

$X = \text{deoxythioguanosine}$

A



B



thioG-C duplex ($T_m = 39.4\text{ }^{\circ}\text{C}$)
 G-C duplex ($T_m = 45.0\text{ }^{\circ}\text{C}$)

A

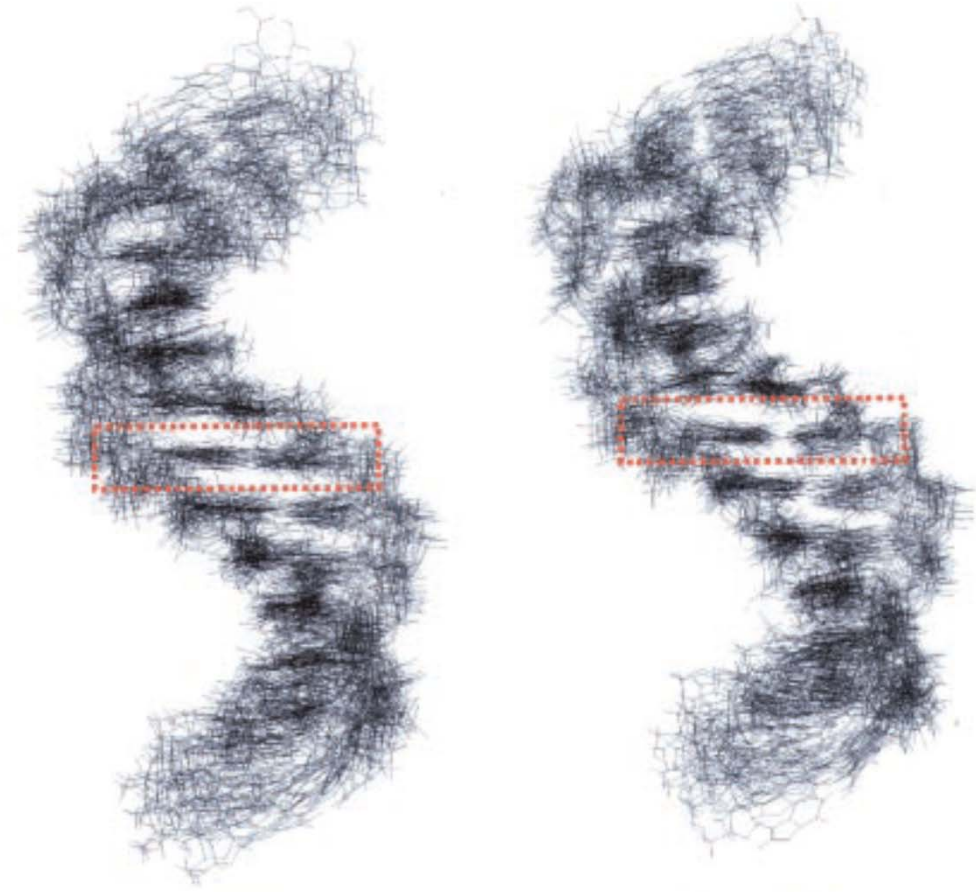
Proton Exchange Süresi

tioG7-C20 (8 ms)

G7-C20 (671 ms)  80 kat

tioG-C bç nin azalan stabilesi sonucunda;

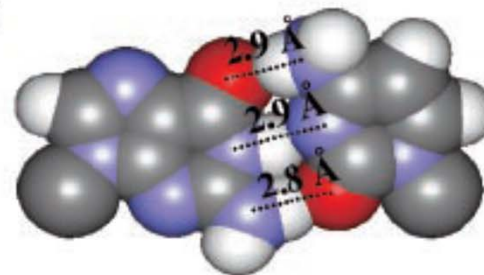
- spesifik DNA-processing enzim aktivitesini ve
- DNA protein etkileşimlerini etkilemektedir
- Ör: RNAaz H aktivitesi tioG-C yakınında inhibe olmakta
- Topo II, T4 DNA ligaz,...



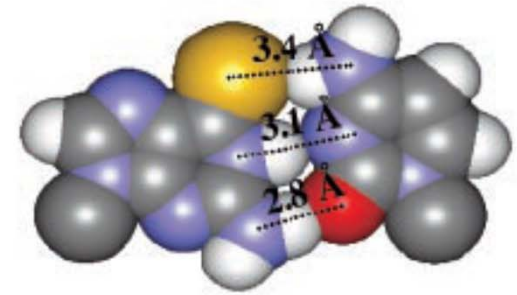
GC

thioGC

B



G7 - C20



thioG7 - C20

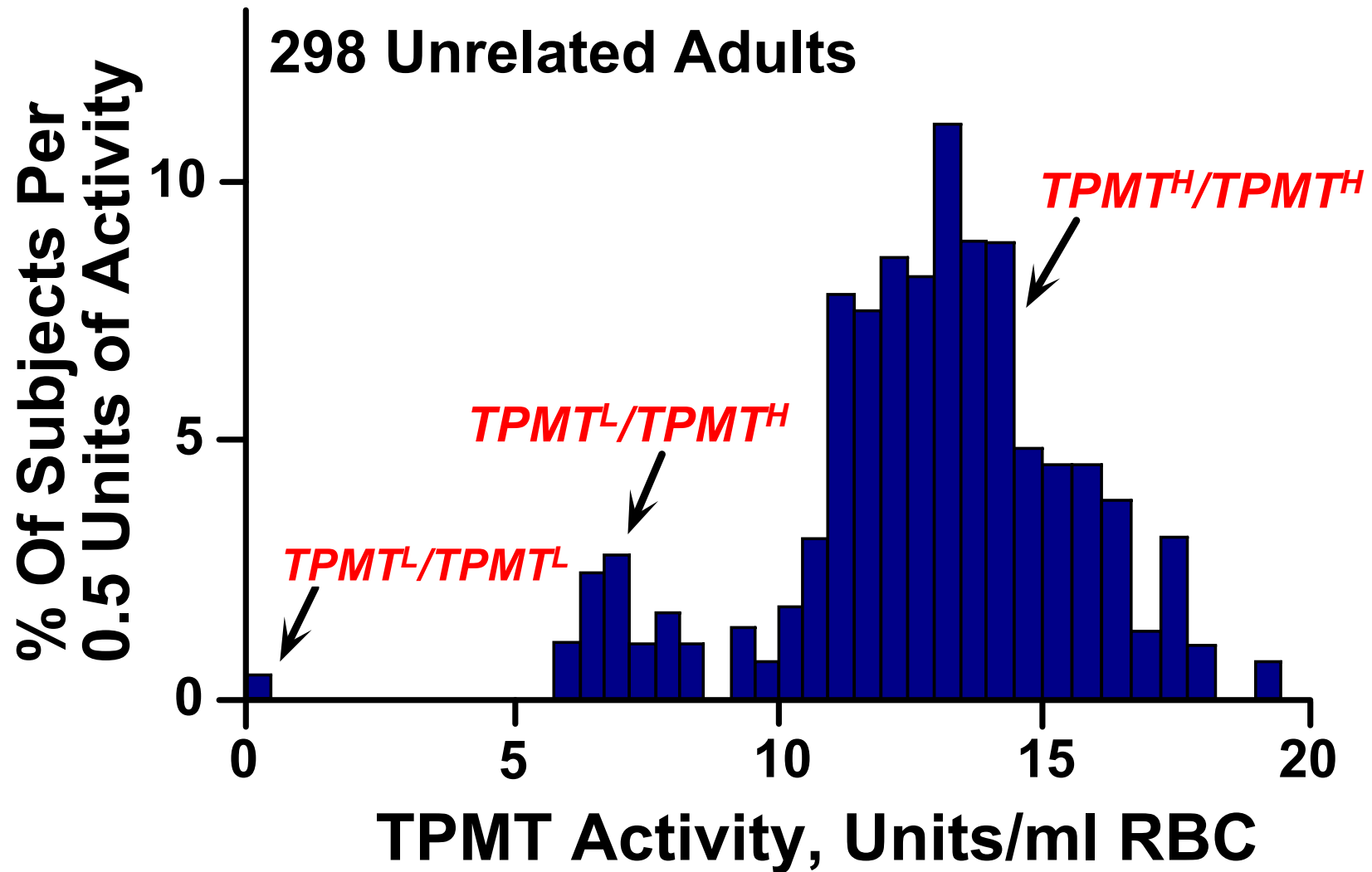
TPMT ?

- TPMT immünosupressif / sitotoksik tiopürin ilaçların metilasyonunu katalizleyen sitozolik bir enzimdir
- TPMT'nin doğal substratı ve rol oynadığı endojen bir metabolik yolu bilinmemekte
- Akciğer, KC, böbrek, lenfosit ve RBC ekspresse olur
- Tiopürinlere maruz kalındığında TPMT eksikliği ağır, fetal, tiopürinlerle indüklenen hematolojik toksisiteye neden olmaktadır

TPMT

- Otozomal kalıtım göstermekte
- Enzim aktivitesi:
 - Popülasyonun %0.3'ünde aktivite çok düşük veya hiç gözlenmez
 - Popülasyonun %11'inde orta TPMT aktivitesi
 - Popülasyonun %89'unda normal/yüksek TPMT aktivitesi gözlenmektedir

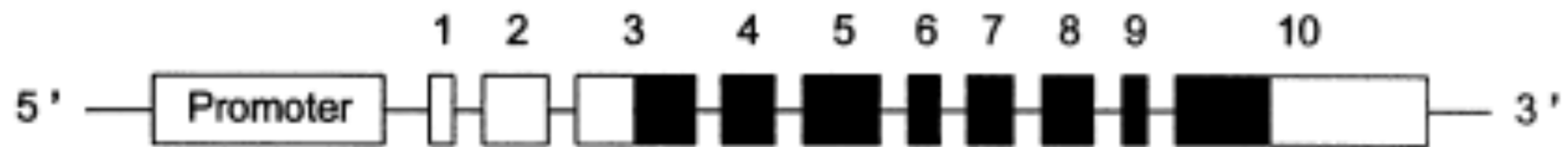
RBC TPMT



TPMT

- Ekzonlar, intronlar ile promotor bölgedeki nokta mutasyonları sonucunda oluşan değişik TPMT allelleri enzim aktivitesini değiştirmektedir
- İsimlendirme:
 - Wild tip TPMT*1
 - Mutant Alleller TPMT*2 –TPMT*21

İnsan TPMT Geni



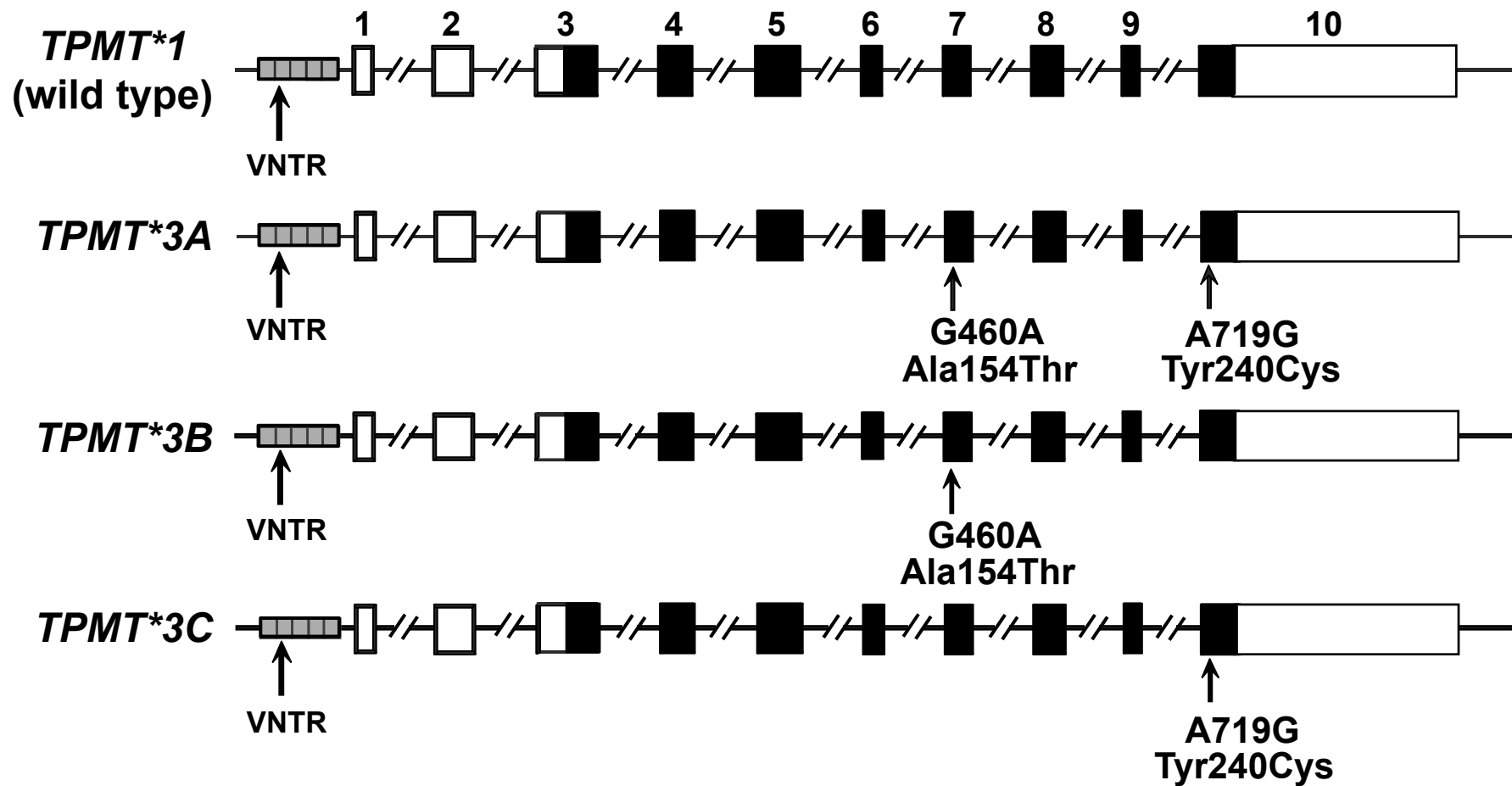
- 6p22.3

- 245 aa

- 34 kb

- 28 kDa

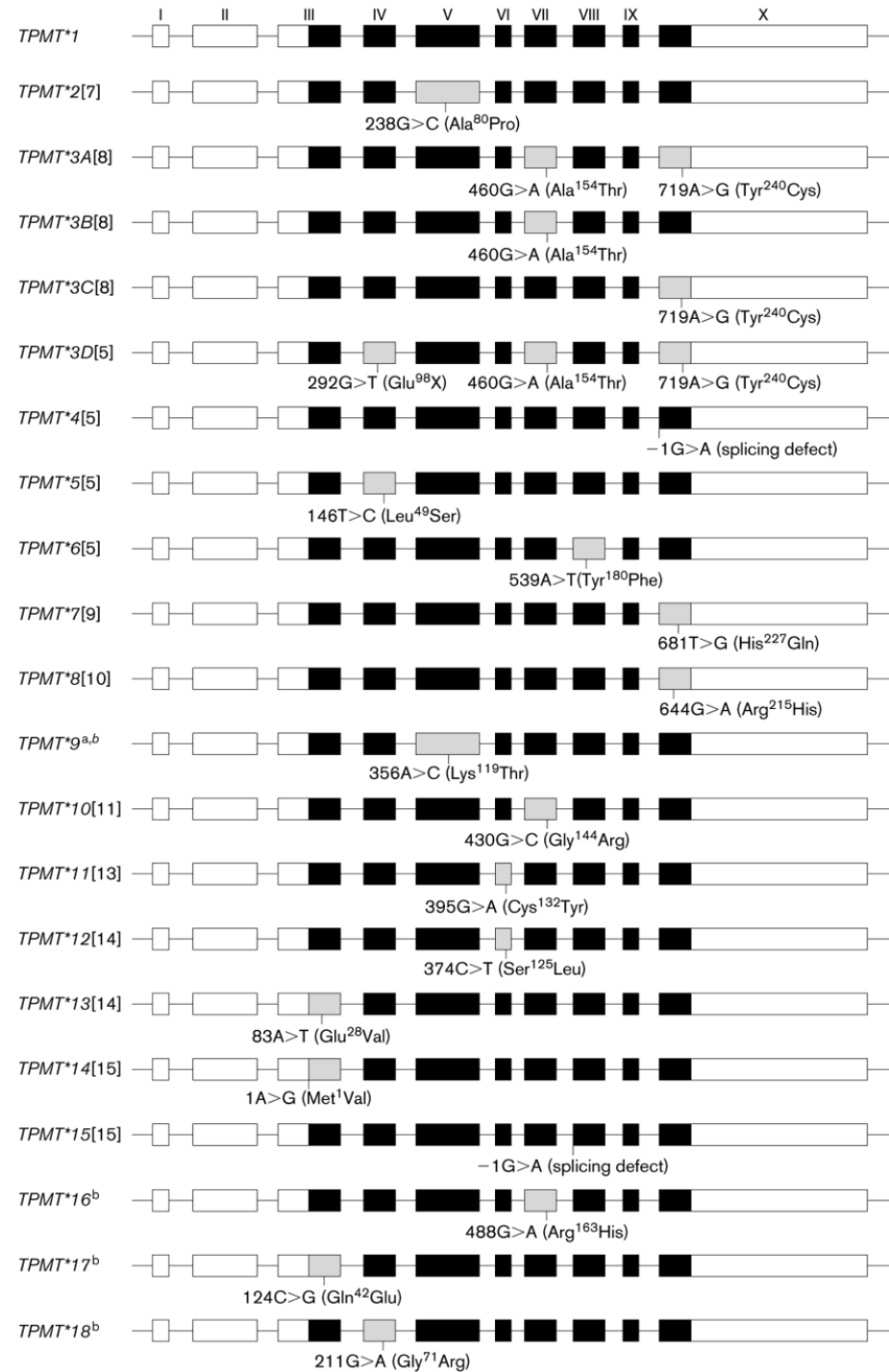
İnsan TPMT Alleleri



Çeşitli etnik popülasyonda TPMT allel sıklığı

Population	<i>n</i>	Allele frequency (%)		
		TPMT*2	TPMT*3A	TPMT*3C
Africans				
Kenyan	101	0	0	5.4
Ghanaian	217	0	0	7.6
African-Americans	248	0.4	0.8	2.4
Asians				
Chinese	192	0	0	2.3
Japanese	151	0	0	0.3
South-west Asians	99	0	1.0	0
South-east Asians	100	0	0	1.0
Taiwanese	249	0	0	0.6
Caucasians				
American	282	0.2	3.2	0.2
British	199	0.5	4.5	0.3
French	191	0.5	5.7	0.8
Italian	206	0.5	3.9	1.0
Saami-Norwegian	194	0	0	3.3
Norwegian	66	0	3.4	0.3
Swedish	800	0.1	3.8	0.4
Egyptians	200	0	0.3	1.3
Brazilians				
Euro-derived	81	0.6	1.8	1.8
Inter-ethnic admixture	204	0.8	2.0	2.5
Colombians (Mestizo)	140	0.7	7.1	0

TPMT Mutant Alleles



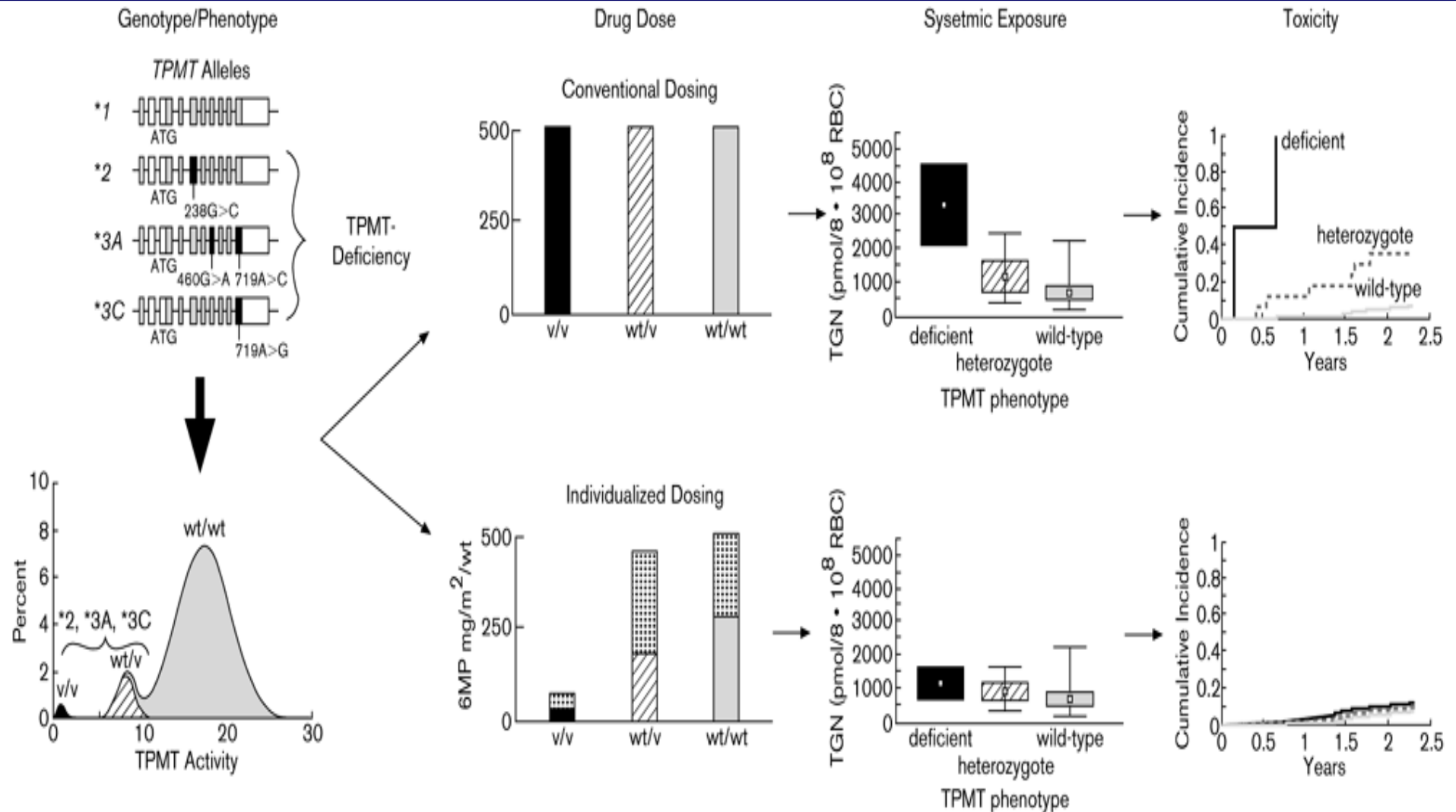
TPMT allele ^a	Amino acid change ^a	Activity ^a (% of WT)
*1	(wild-type)	100
*7	H227Q	98
*9	K119T	92
*19	K122T	
*8	R215H	82
*16	R163H	
*10	G144R	69
*13	E28V	61
*12	S125L	41
*17	Q42E	
*11	C132Y	36
*6	Y180F	36
*2	A80P	26
*3C	Y240C	17
*18	G71R	
*5	L49S	2.4
*3B	A154T	1.7
*3A	A154T + Y240C	1.6
*3D	E98STOP + A154T + Y240C	
*14	M1V	
*15	Deletion of 25 residues 140–165	

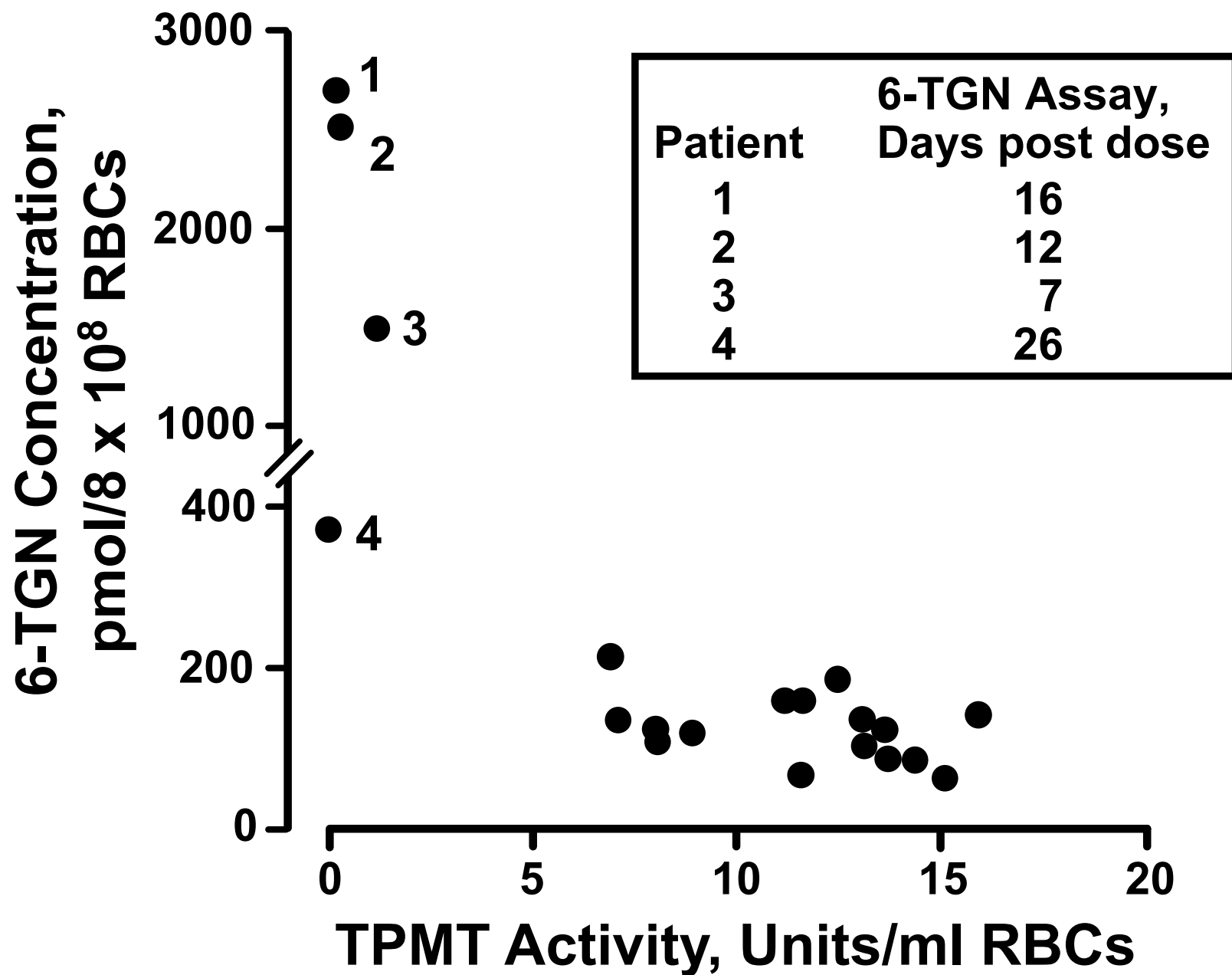
Occurrence of TPMT Polymorphisms

<u>Nucleotide</u>	<u>Sequence Change</u>	<u>Amino Acid Change</u>	<u>Frequency of Variant Allele</u>
70	C → T		0.006
I3(114)	T → A		0.094
I3(-100)	T → A		0.369
I4(35)	T → C		0.483
I4(94)	A → G		0.011
I4(96)	G → T		0.083
I4(113)	Ins/Del		0.011
339	C → T		0.005
I5(58)	C → T		0.467
I5(90)	C → T		0.011
I5(-127)	C → G		0.006
I5(-73)	C → T		0.006
I5(-54)	A → G		0.006
423	A → C		0.006
460*	G → A	Ala154Thr	0.044
474	T → C		0.267
719*	A → G	Tyr240Cys	0.083

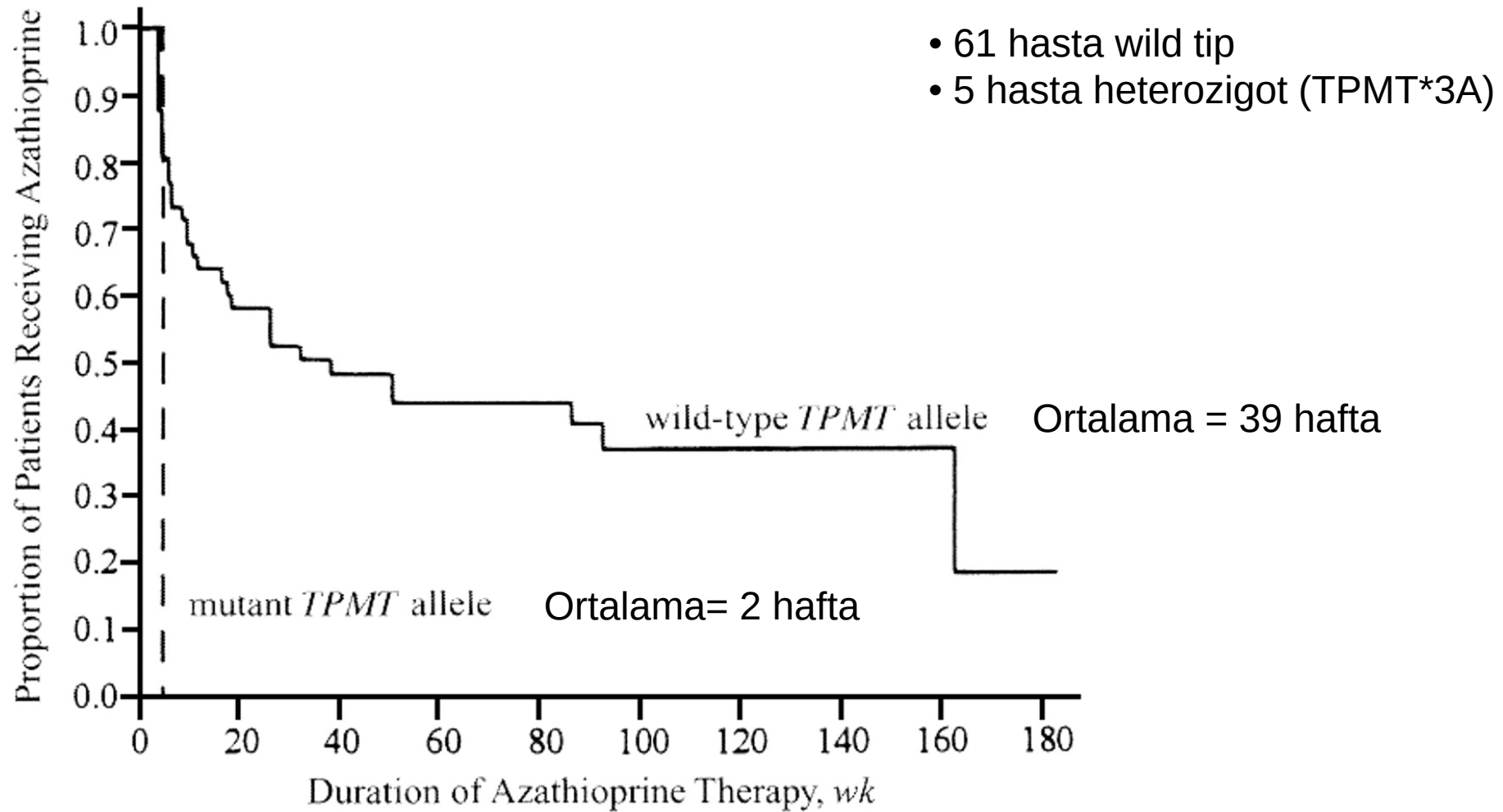
* Non-Synonymous cSNP

TPMT Polimorfizmleri ve Toksisite

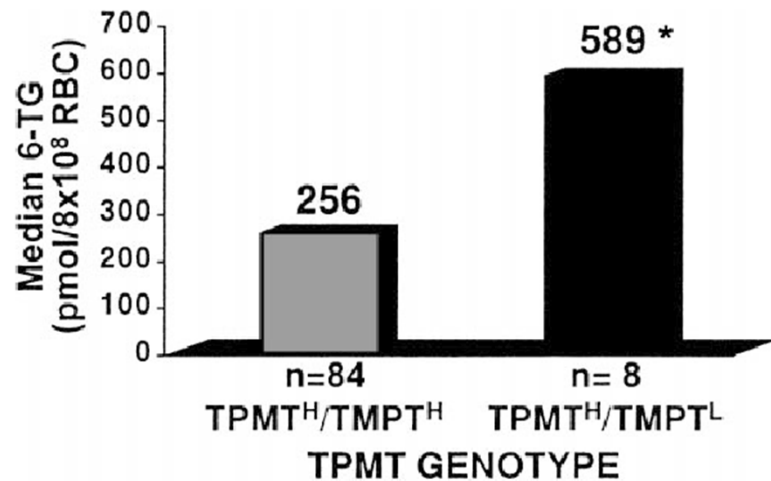




AZA Terapi Süresi ile *TPMT* Genotipi Arasındaki İlişki



6-TG ve Genotip Arasında Korelasyon



* P < 0.0001

- Düşük TPMT aktiviteye sahip (TPMT^H/TPMT^L) heterozigot 8 hasta
- Homozigot wild tip 84 hasta (TPMT^H/TPMT^H)
- TPMT heterozigotlarda RBC'lerde 6-TG konsantrasyonu belirgin şekilde yüksek bulunmuş

Genotip\Fenotip Korelasyonu

Phenotyping – HPLC

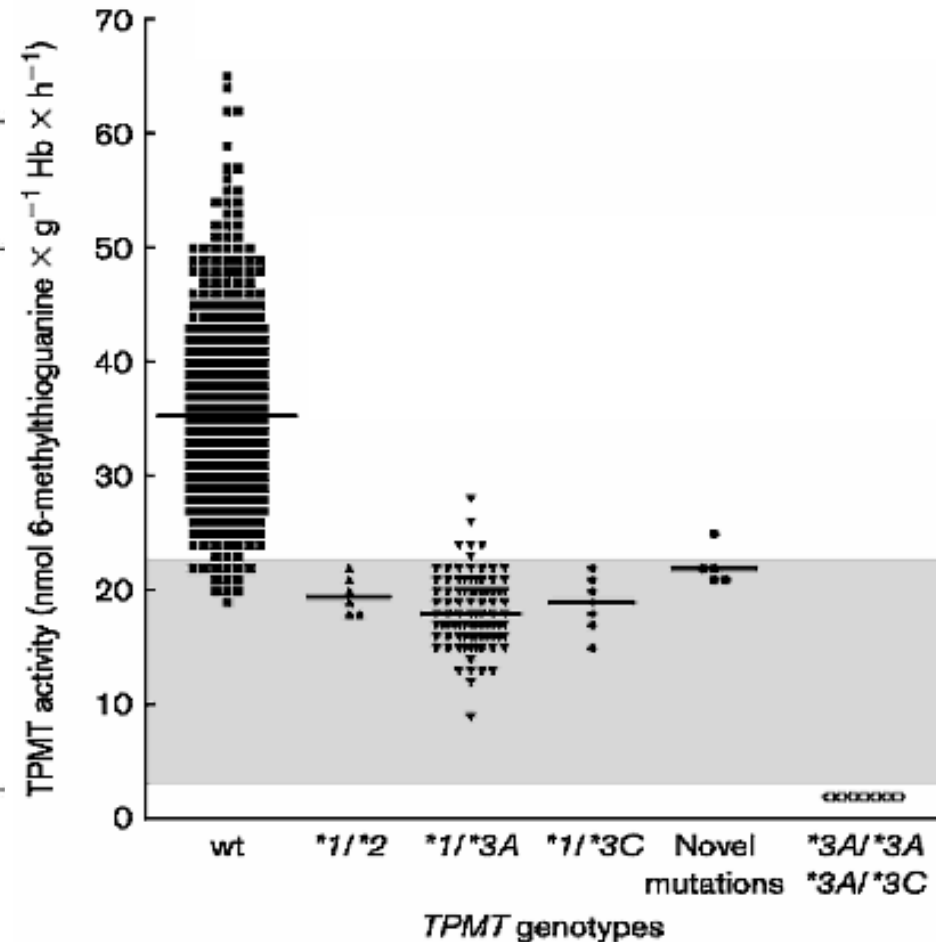
Schaeffeler et al. *Pharmacogenetics*. 2004. Genotyping – HPLC + Sequencing

Investigated the genotype-phenotype correlation of 1214 healthy blood donors to determine accuracy of genotyping in predicting TPMT phenotype.

Table 1 Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) genotypes in 1214 unrelated German-Caucasian blood donors

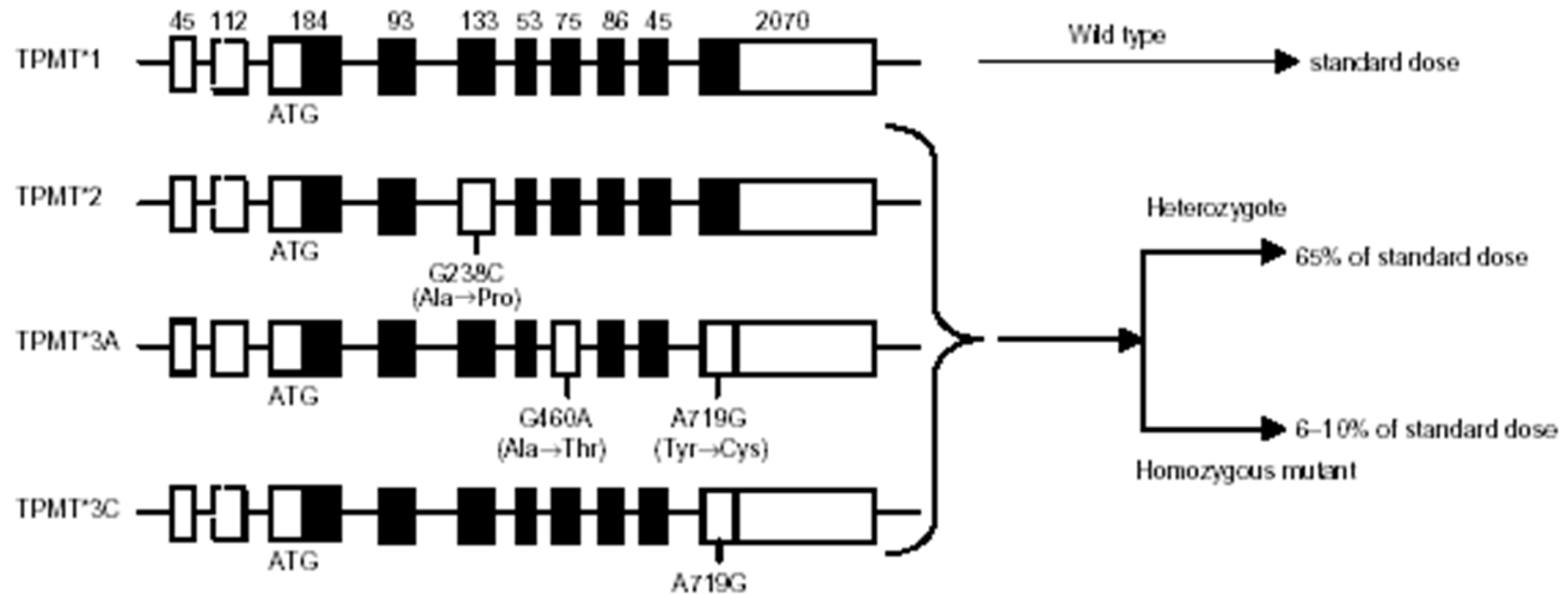
TPMT genotype ^a	Number	%	Median (range) activity (nmol 6-MTG $\times$ g ⁻¹ Hb $\times$ h ⁻¹)
*1/*1	1091	89.8	34 (19–65)
*1/*2	6	0.5	19.5 (18–22)
*1/*3A	98	8.0	18 (9–28)
*1/*3B	0	0	–
*1/*3C	7	0.6	19 (15–22)
*1/*3D	0	0	–
*3A/*3A	5	0.4	< 2
*3A/*3C	2	0.2	< 2
*1/*9 (A356C)	2	0.2	21, 25
*1/*16 (G488A)	1	0.1	22
*1/*18 (G211A)	1	0.1	21
*1/*17 (C124G)	1	0.1	22

^aAccording to the nomenclature of TPMT alleles [5,7–15], including the novel defined TPMT alleles from the present study.



Genotip Tayini Sonucunda

- DNA düzeyinde genotiplendirme hastaların tiopürin tedavisinde hematolojik toksisite riskini en aza indirgenmesi açısından önemlidir
- Moleküler tanı yöntemlerinin gelişmiş olmasına rağmen TPMT genotiplerinin rutinde kullanımı hala sınırlıdır

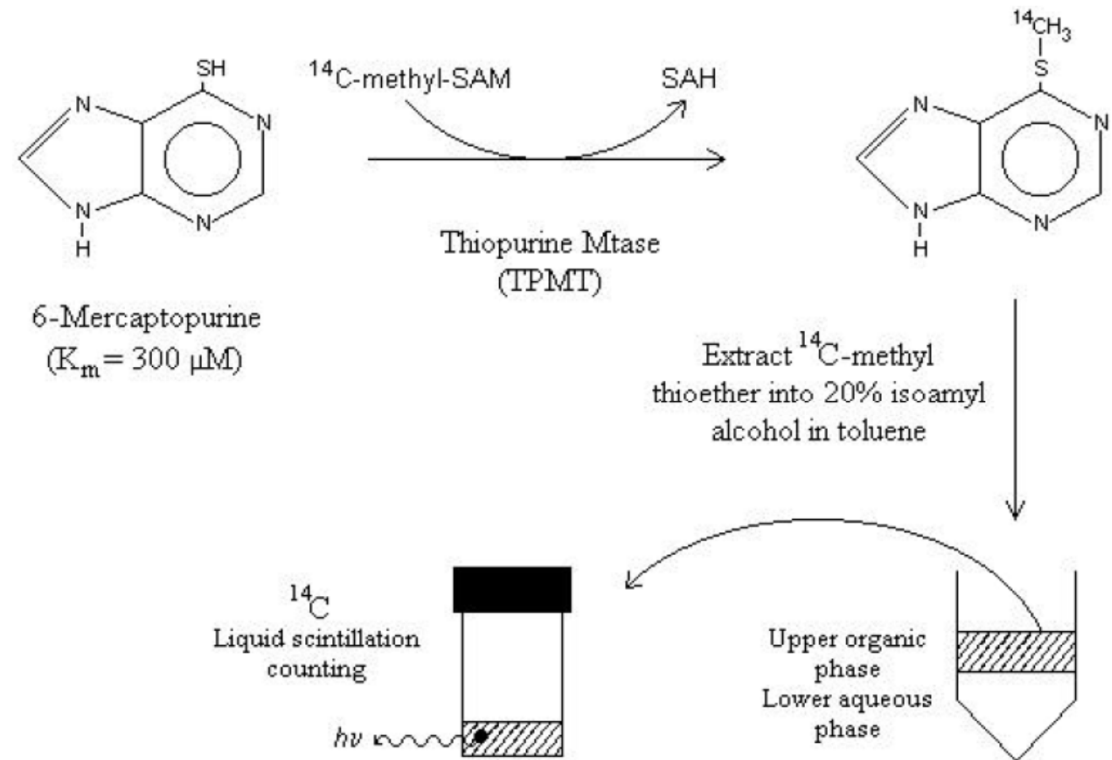


Genotype-specific 6-MP starting doses for childhood ALL

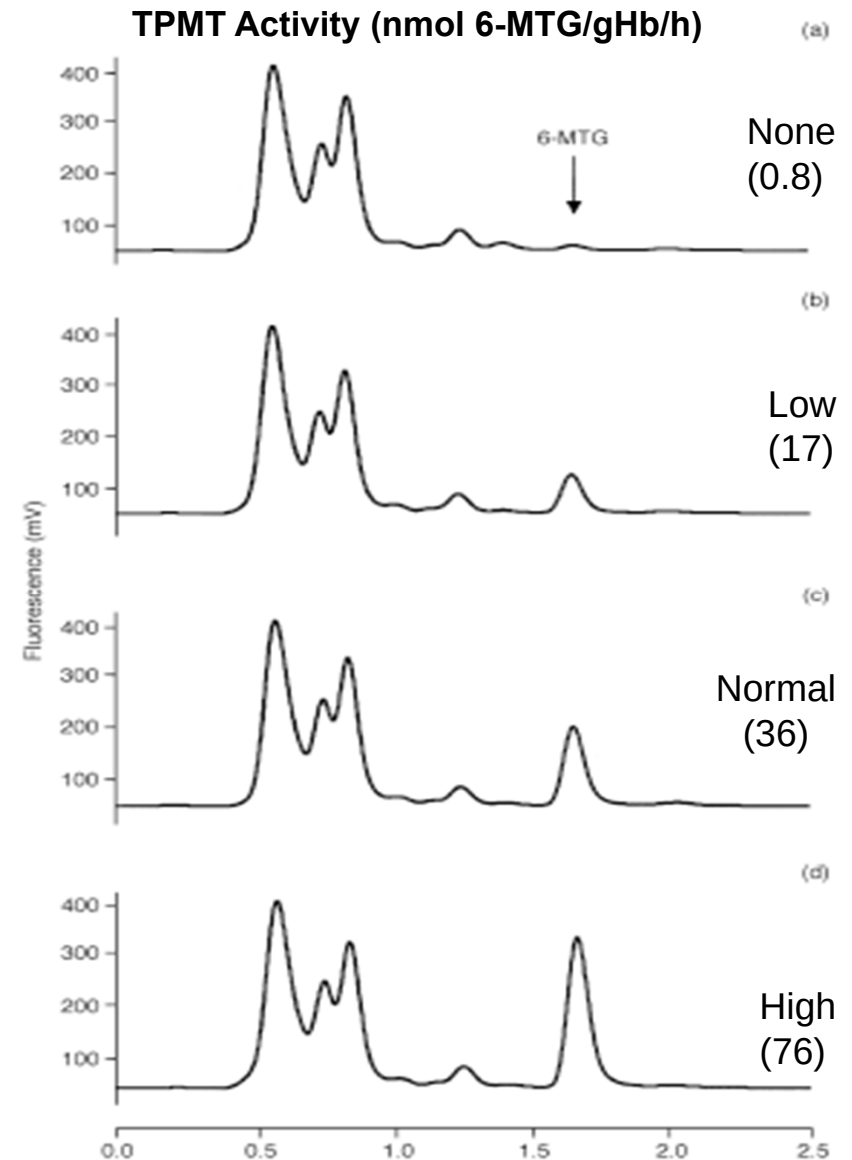
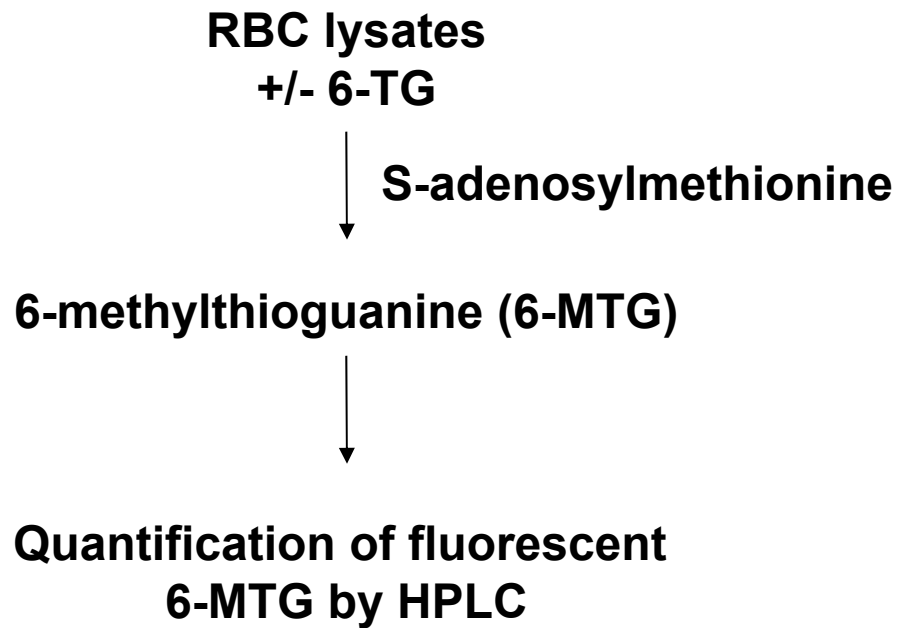
McLeod and Siva.
Pharmacogenomics. 2002

RBC TPMT Aktivitesi

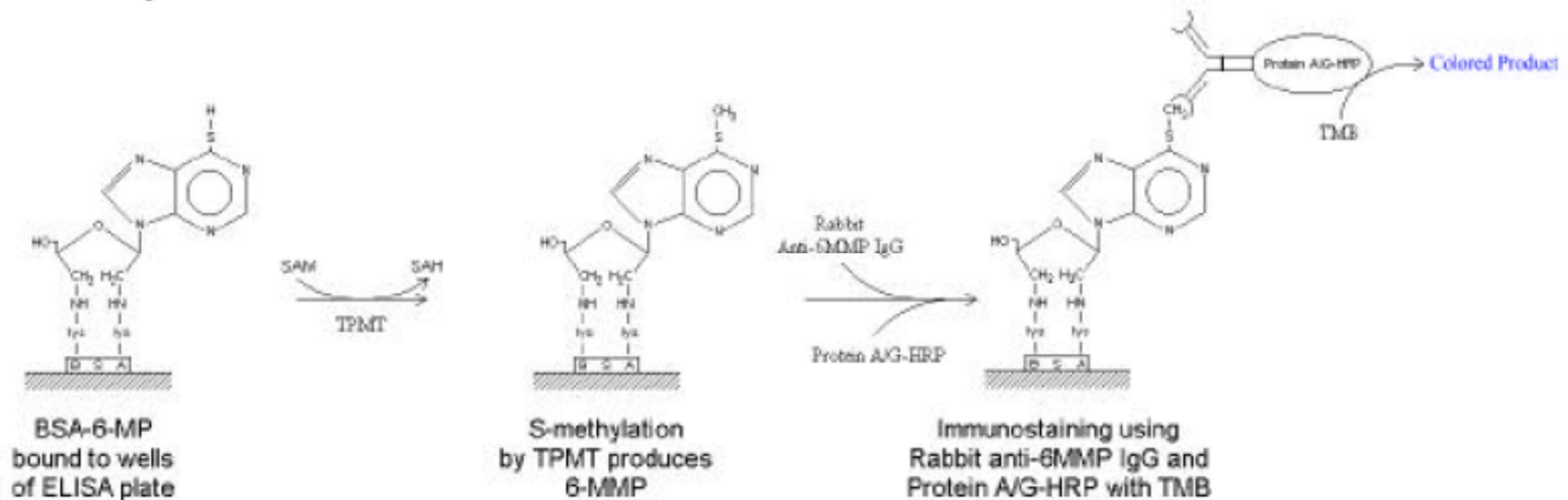
- TPMT aktivitesi için Gold Standart
- RBC'deki aktivite diğer dokulardaki aktivite ile korelasyon gösterir
- 30-60 gün içinde transfüzyon alan hastalarda RBC'deki TPMT aktivitesi **YANLIŞ ÖLÇÜLEBİLİR**



HPLC ile TPMT Aktivitesi Ölçümü



ELISA ile TPMT Aktivitesi Ölçümü



RIM ile TPMT Aktivitesi Ölçümü

Rapid Immunimigration (RIM) Cassette Assay for TPMT

- RBC lizat
- Substrat 6-MP
- SAM varlığında metillenmekte
- Düşük mobilizasyon sonucunda
- Membrana bağlı işaretli anti-6-MMP IgG

mor

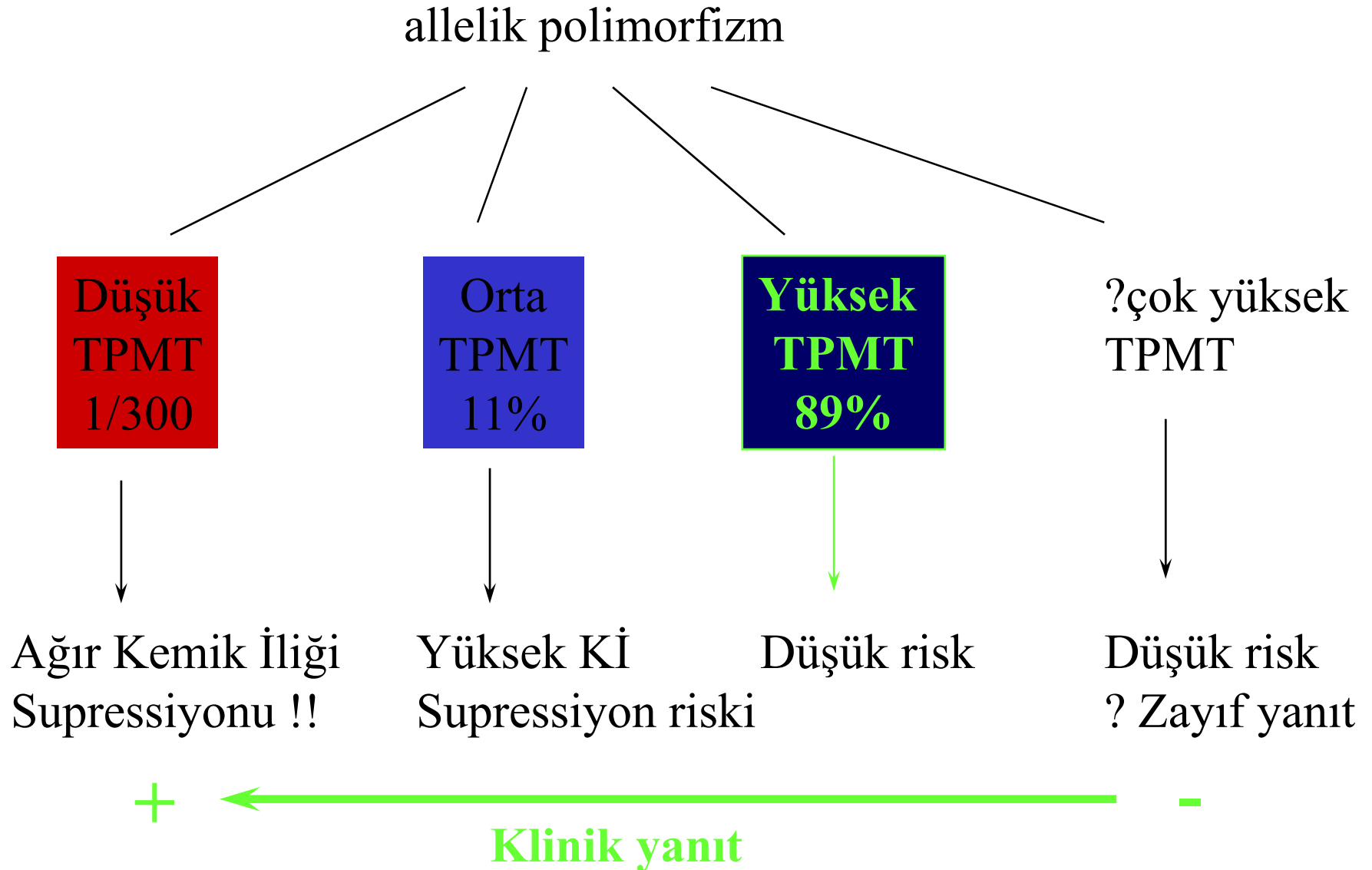
aktivite düşük

mor

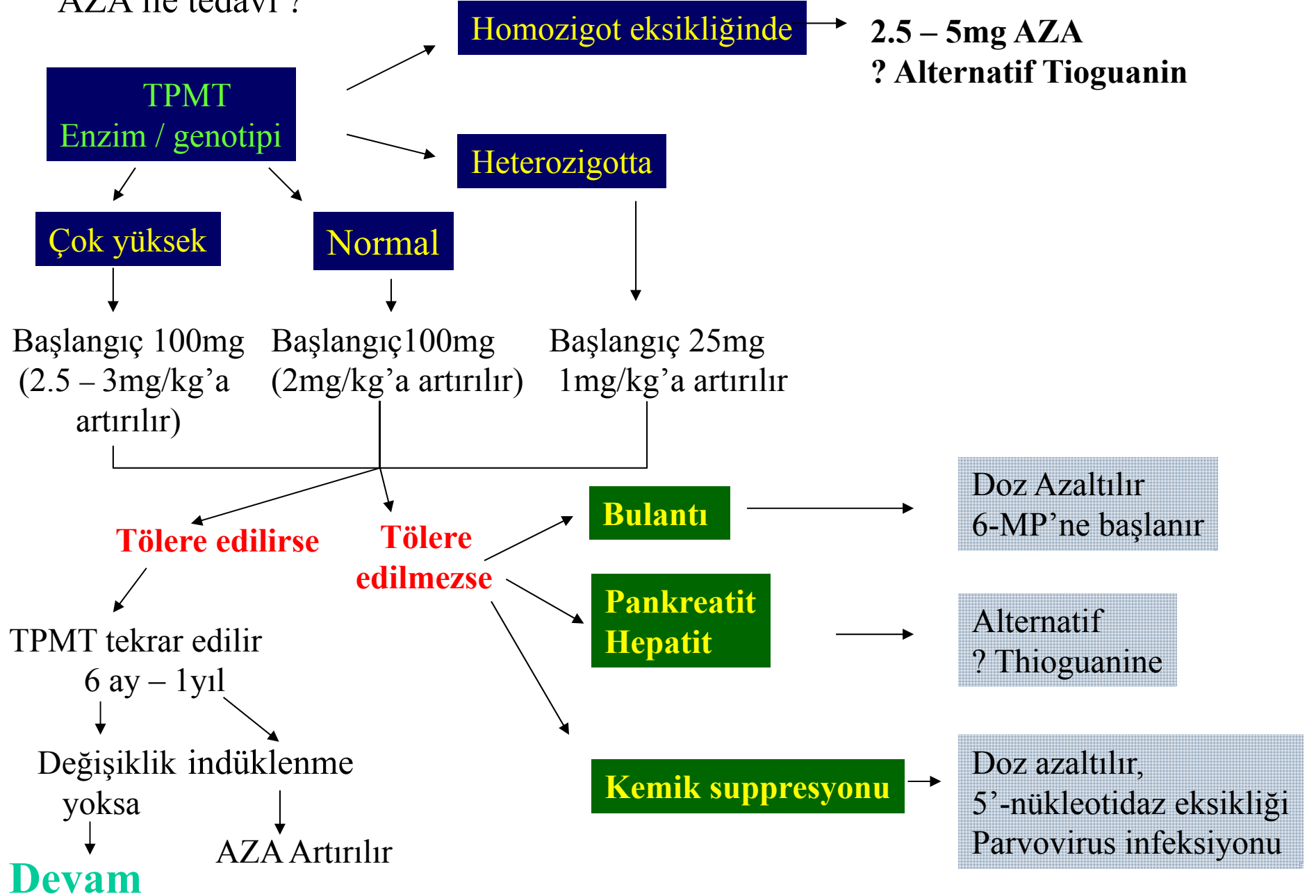
aktivite yüksek



TPMT (Tiopürin Metil Transferaz)



AZA ile tedavi ?



SONUÇ

- Tiopürine S-metiltransferaz (TPMT) AZA, 6-MP ve TG gibi tiopürin ilaçlarının metabolizmasında majör rol oynamaktadır
- TPMT aktivitesi polimorfiktir, %10'u heterozigot aktivite düşük ve 1/300'ünde aktivite çok düşük/yoktur
- Tiopürin ilaçların standart dozuyla tedavi olan hastalarda TPMT aktivitesi düşük veya yokluğunda hızla hematolojik toksisite gelişmektedir
- TPMT genotipleri eritrositlerde *in vivo* enzim aktivitesi ile korelasyon göstermekte
- TPMT genotiplerinin tespiti klinisyenler için güvenilir bir metottur (özellikle RBC fenotipinin tespit edilemediği yerlerde), TPMT eksikliği tespit edilen hastalarda düşük tiopürin ilaç dozuyla tedaviye başlamak toksisite riskini azaltmaktadır



Teşekkürler...