

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



TANJA VODIŠEK

**OVREDNOTENJE POLIMORFIZMA rs13171357 KOT NOVEGA
FARMAKOGENETSKEGA KAZALCA V SLOVENSKI POPULACIJI**

**CHARACTERISATION OF POLYMORPHISM rs13171357 AS A NEW
PHARMACOGENOMIC MARKER IN SLOVENE POPULATION**

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2014

Magistrsko naložko sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za klinični biokemijo pod mentorstvom doc. dr. Nataše Karas Kuželički, mag. farm.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici za pomoč pri izdelavi te naloge. Hvala tudi prijateljem in družini za podporo tekom študija, še posebej pa hvala Davidu za spodbudo in pomoč.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko naložko samostojno izdelala pod mentorstvom doc.dr. Nataše Karas Kuželički, mag. farm.

Tanja Vodišek

Vsebina

1	Uvod.....	1
1.1	Tiopurini	2
1.2	Metabolizem tiopurinov.....	4
1.3	Vpliv aktivnosti in genotipa TPMT na terapijo s tiopurini.....	7
1.4	Testiranje TPMT.....	9
1.5	Povezava med S-adenozil-L-metioninom (SAM) in TPMT.....	11
1.6	Potencialni farmakogenetski označevalec rs13171357.....	14
1.7	Asociacijska študija na celotnem genomu (GWAS).....	15
2	Namen dela	16
3	Materiali in metode	17
3.1	Preiskovanci.....	17
3.2	Reagenti in aparature	17
3.3	Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (rt-PCR)	18
3.4	TaqMan genotipizacija	19
3.5	Genotipizacija vzorcev z uporabo TaqMan tehnologije	21
3.6	Statistična analiza.....	22
3.6.1	Hardy-Weinbergovo ravnotežje.....	23
4	Rezultati in razprava	25
4.1	Statistična obdelava podatkov.....	30
4.1.1	Izračun Hardy-Weinbergovega ravnotežja	30
4.1.2	Porazdelitev aktivnosti TPMT v slovenski populaciji.....	31
4.1.3	Vpliv polimorfizma rs13171357 na aktivnost TPMT.....	32
4.1.4	Vpliv polimorfizma rs13171357 na aktivnost TPMT ob upoštevanju genotipa TPMT	34
4.1.5	Ugotovitve multiple linearne regresije	35
4.1.6	Primerjava naše populacije z drugimi.....	36
5	Sklep	39
5.1	Nadaljnje raziskave.....	39
6	Literatura.....	40
7	Priloge.....	44

Povzetek

Med zdravilne učinkovine iz skupine tiopurinov uvrščamo azatioprin, 6-merkaptopurin in 6-tiogvanin. Tiopurini so predzdravila, ki se do aktivne učinkovine metabolizirajo po kompleksni znotrajcelični poti. Pri tem sodeluje tudi encim tiopurin-S-metiltransferaza (TPMT), ki mu pripisujejo pomembno vlogo pri uspešnosti terapije s tiopurini, saj sodeluje pri njihovi deaktivaciji in posledično vpliva na njihovo toksičnost. En na 300 posameznikov ima nezaznavno aktivnost tega encima, 11% je heterozigotov za variantni alel z nizko aktivnostjo TPMT in zato izražajo srednjo aktivnost TPMT, 89% pa je homozigotov za alel divjega tipa z visoko aktivnostjo TPMT. Pri bolnikih z nizko aktivnostjo TPMT pogosto pride do resnih neželenih učinkov pri standardnih odmerkih tiopurinov. Čeprav genotip TPMT uvrščamo med klinično pomembne farmakogenetske kazalce, ki bi ga bilo potrebno določiti pri vsakem posamezniku pred aplikacijo tiopurinskega zdravila, se je potrebno zavedati, da skladnost med genotipom in aktivnostjo TPMT ni popolna. Na aktivnost TPMT namreč poleg njegovega genotipa vplivajo še drugi dejavniki. Eden izmed že znanih je kofaktor TPMT S-adenozil-L-metionin, asociacijska študija na celotnem genomu (GWAS) v estonski populaciji pa je pokazala, da nanjo vpliva tudi polimorfizem rs13171357, ki se nahaja v bližini gena SLC1A3.

Na osnovi rezultatov GWAS smo želeli potencial rs13171357 kot farmakogenetskega označevalca ovrednotiti v neodvisni populaciji. Zato smo v sklopu magistrske naloge izvedli pilotsko študijo na manjšem številu zdravih slovenskih preiskovancev z izmerjeno aktivnostjo TPMT. Želeli smo določiti pogostost rs13171357 genotipov v slovenski populaciji, ugotoviti ali se nahajajo v Hardy-Weinbergovem ravnotežju (HWE), ali se frekvence omenjenih genotipov ujemajo z do sedaj objavljenimi podatki različnih svetovnih populacij ter ali rs13171357 vpliva na aktivnost TPMT. Vzorce smo genotipizirali z uporabo TaqMan tehnologije ter rezultate statistično obdelali. Ugotovili smo, da je pogostost rs13171357 v slovenski populaciji razmeroma visoka (MAF = 30,2%), da je v HWE in da se frekvence genotipov rs13171357 naše populacije ne razlikujejo od večine svetovnih populacij. Presenetljivo pa v slovenski populaciji polimorfizem rs13171357 ne vpliva na aktivnost TPMT. Težava naše raziskave je bilo prenizko število preiskovancev v delu študije, ki je vrednotila vpliv rs13171357 na aktivnost TPMT (N=78), zato nismo uspeli dokazati vpliva polimorfizma rs13171357 na aktivnost TPMT.

Ključne besede: rs13171357, tiopurin-S-metiltransferaza, tiopurini, SLC1A3

Abstract

Azathioprine, 6-mercaptopurine and 6-tioguanine are prodrugs from the family of thiopurines that are transformed into active form in a complex intracellular pathway. An enzyme thiopurine-S-methyltransferase (TPMT), which takes part in this process, is believed to be relevant to the success of thiopurine treatment, since it influences the deactivation of thiopurines and consequently their toxicity. The activity of TPMT enzyme is undetectable in one of 300 individuals, intermediate in 11% of individuals that are heterozygous for a variant allele and high in 89% of individuals that are homozygous for the wild type allele. When treating patients whose TPMT activity is low with standard thiopurine dosages, severe side effects often occur. Although the TPMT genotype is an important pharmacogenetic marker, which should be determined in every individual prior to thiopurine treatment, the TPMT genotype to phenotype correlation is incomplete. Aside from its genotype, the TPMT activity is also modulated by other factors, such as TPMT cofactor S-adenosyl-L-methionine. Moreover, a genome-wide association study (GWAS) in the Estonian population showed that rs13171357 polymorphism, which lies in the vicinity of SLC1A3 gene, is also relevant.

Based on the aforementioned GWAS, we wanted to evaluate the potential of rs13171357 as a pharmacogenetic marker in an independent population. In the scope of this thesis, we have conducted a pilot study on healthy Slovenian subjects with known TPMT activity. Our goal was to determine the frequency of rs13171357 genotypes in the Slovenian population, to determine whether they are distributed according to the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), whether the frequencies of the aforementioned genotypes match those from various world populations and whether rs13171357 influences the TMPT activity. To achieve this, we have used the TaqMan technology to genotype the samples and various statistical procedures to evaluate the results. We have concluded that the frequency of rs13171357 in the Slovenian population is relatively high (MAF = 30.2%), that it falls within the HWE, and that the frequencies of rs13171357 genotypes do not differ from the frequencies in other world populations. Interestingly, in the Slovenian population rs13171357 polymorphism was not found to influence the TPMT activity. However, due to the low number of subjects included in the part of the study that evaluated when measuring the influence of rs13171357 on the TPMT activity (N=78), the latter statement cannot be definite. This is also the main drawback of our study.

Key words: rs13171357, thiopurine-S-methyltransferase, thiopurin, SLC1A3

Seznam okrajšav

5-MeTHF	5- metiltetrahidrofolat
5,10-MeTHF	5,10-metilentetrahidrofolat
6-MP	6-merkaptopurin
6-TG	6-tiogvanin
6-TGN	6-tiogvanozinski nukleotid
8-OHMP	8-hidroksimerkaptopurin
8-OHTG	8-hidroksitiogvanin
Ado	adenozin
ALL	akutna limfoblastna levkemija
AMP	adenozin-monofosfat
ANOVA	Analysis of Variance (analiza variance)
AO	aldehid oksidaza
ATP	adenozin-trifosfat
AZA	azatioprin
BFM	Berlin-Frankfurt-Münster
CBS	cistationin β -sintaza
Cys	cistein
dTGDP	deoksi-6-tiogvanozin-5'-difosfat
dTGTP	deoksi-6-tiogvanozin-5'-trifosfat
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EAAT1	ekscitatorni aminokislinski transporter 1
f_A	frekvenca alela A
f_G	frekvenca alela G
f_{AA}	frekvenca genotipa AA
f_{AG}	frekvenca genotipa AG
f_{GG}	frekvenca genotipa GG
FRET	Förster resonance energy transfer / Fluorescence resonance energy transfer
GLAST1	glutamat aspartatni transporter 1
Gly	glicin

GMPS	gvanozin monofosfat sintaza
GSH	glutation
GWAS	genome-wide association study (asociacijska študija na celotnem genomu)
HGPRT	hipoksantin-gvanin fosforiboziltransferaza
HWE	Hardy-Weinbergovo ravnotežje
Hyc	homocistein
IARC	International agency for research on cancer (mednarodna agencija za raziskovanje raka)
IMP	inozin-monofosfat
IMPDH	inozin-monofosfat dehidrogenaza
Ino	inozin
MAF	Minor allele frequency (frekvenca manj pogostega alela na nekem lokusu)
MAT	metionin-adenoziltransferaza
meMP	6-metilmerkaptopurin
Met	metionin
meTIN	metiltioinozin nukleotid
meTG	6-metiltiogvanin
meTGMP	6-metiltiogvanozin-5'-monofosfata
meTIMP	6-metiltioinozin-5'-monofostat
MMPR	metilmerkaptopurin ribozid
MS	metionin-sintaza
MTA	5'-metiltioadenozin
MTaza	metiltransferaza
MTHFR	5,10-metilentetrahidrofolat-reduktaza
NDPK	nukleozid difosfat kinaza
RFLP	Restriction fragment length polymorphism (polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov)
RR	ribonukleotid reduktaza
rt-PCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času
SAH	S-adenozilhomocistein
SAHH	S-adenozilhomocistein-hidrolaza
SAM	S-adenozil-L-metionin
Ser	serin

SLC	Solute carrier (prenašalci topljencev)
SNP	single nucleotide polymorphism (polimorfizem enega nukleotida)
TGDP	6-tiogvanozin-5'-difosfat
TGMP	6-tiogvanozin-5'-monofosfat
TGTP	6-tiogvanozin-5'-trifosfat
TGN	tiogvanin nukleotid
THF	tetrahidrofolat
TIMP	6-tioinozin-5'-monofosfat
TPMT	tiopurin-S-metiltransferaza
TU	tiosečna kislina
TX	tioksantin
TXMP	6-tioksantin-5'-monofosfat
XO	ksantin oksidaza

1 Uvod

Na metabolizem večine zdravilnih učinkovin ne vpliva samo en dejavnik, temveč kompleksni biološki sistemi, spol, starost, etnična in rasna pripadnost, zdravstveno stanje posameznika in zunanji dejavniki, zato posamezen farmakogenetski označevalce pogosto ne more dovolj zanesljivo napovedati bolnikovega odziva na terapijo oz. pojava neželenih učinkov. To je razlog, zakaj je potrebno odkrivati nove biološke označevalce ter izboljšati razumevanje delovanja kompleksnih sistemov človeškega telesa, hkrati pa omogočiti individualizacijo terapije za posameznega pacienta. Problem pomanjkljive individualizacije terapije je prisoten tudi pri terapiji akutne limfoblastne levkemije (ALL), ki je najpogostejše rakovo obolenje otrok. Nastane zaradi nenadzorovanega razmnoževanja in nepravilnega dozorevanja levkocitov; posledično se v kostnem mozgu kopičijo nezrele limfatične celice, hkrati pa je zavrt normalna hematopoeza. Po podatkih iz leta 2010 kar 80% otrok s pomočjo primerne terapije popolnoma ozdravi, žal pa ostalih 20% zaradi zapletov trpi za posledicami neželenih učinkov zdravil in relapsi ALL (1).

Terapija rakavih obolenj pogosto predvideva, da enak odmerek ustreza vsem pacientom, kar lahko vodi do neželenih učinkov zaradi za posameznika neustreznega odmerka (2). To lahko preprečimo z individualizirano terapijo, ki je ustreznejša za posameznega pacienta in tako izboljša učinkovitost zdravljenja ter zmanjša možnost toksičnosti, zaradi katere lahko pride do prekinitev zdravljenja, podaljšanja hospitalizacije ali celo smrti. Do neželenih učinkov pogosto pride zato, ker so rakave celice odporne na citotoksične zdravilne učinkovine zaradi spremenjenega metabolizma, mehanizmov apoptoze, popravljalnih mehanizmov DNA, zaradi sposobnosti črpanja zdravila iz celice ali zmanjšanega privzema zdravila v celico kot posledica odsotnosti oz. spremenjene strukture tarč. Pacienti se v tem primeru premalo ali sploh ne odzivajo na terapijo in zato lahko pride do relapsa. Če je odpornost prisotna že ob prvi aplikaciji zdravila, temu pravimo primarna odpornost, če pa se pojavi šele tekom terapije, gre za pridobljeno odpornost (2). Pridobljena odpornost je lahko posledica nastanka adaptirane ali mutirane tumorske celice, katera je manj- oz. neobčutljiva na delovanje zdravilne učinkovine in ima zato prednost za preživetje pred ostalimi rakavimi celicami (3). Da bi zmanjšali pogostost neželenih učinkov in možnost razvoja rezistence na posamezno zdravilno učinkovino, se uporabljajo različni protokoli za terapijo raka, tj. kombinacije različnih zdravilnih učinkovin, s čimer se poveča citotoksičnost za tumorske celice, ne pa toksičnosti za pacienta. Nekateri menijo,

da je lahko osnova za kombiniranje protitumornih zdravilnih učinkov in njihova značilnost, da delujejo na različne faze celičnega cikla. Poznamo fazno specifične, ciklično specifične in ciklično nespecifične zdravilne učinkovine (3). Fazno specifične zdravilne učinkovine delujejo citotoksično v določeni fazi celičnega podvojevanja. Sem uvrščamo vinka alkaloide, ki delujejo na celico v mitozi ter merkaptopurin, metotreksat, citarabin, hidroksikarbamid in fluorouracil, ki delujejo na S fazo celičnega cikla. Ciklično specifične učinkovine (npr. alkilirajoči agensi, daktinomicin, doksorubicin, cisplatin) delujejo na celico v vseh fazah celičnega cikla podvojevanja, ne pa tudi izven njega, ciklično nespecifične učinkovine (npr. bleomicin, nitrozourea) pa delujejo na celico ne glede na to ali je v stanju mirovanja ali ne.

Od leta 1984 se v Sloveniji za terapijo ALL pri otrocih uporablja Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) protokoli, zaradi katerih se je stopnja preživetja znatno povišala (4). Tak protokol zajema štiri stopnje zdravljenja, pri katerih se uporablja različna citotoksična zdravila. V zadnji fazi vzdrževalnega zdravljenja se uporablja kombinacija 6-merkaptopurina iz skupine tiopurinov in metotreksata, odmerke katerih se izračuna na osnovi telesne površine pacienta ter se kasneje prilagajajo glede na število levkocitov v periferni krvi (5). Zaradi takšnega načina določanja odmerkov pa pogosto prihaja do različnih neželenih učinkov, med katerimi je najresnejši supresija kostnega mozga, ki se pojavlja pri 1,4 – 5,0% (5) pacientov na terapiji s tiopurini. Resni neželeni učinki povzročijo prekinitev terapije, podaljšanje hospitalizacije in posledično povečajo nevarnost kasnejše ponovitve ALL (5).

1.1 Tiopurini

Med zdravilne učinkovine iz skupine tiopurinov (Slika 1) uvrščamo azatioprin (AZA), 6-merkaptopurin (6-MP) in 6-tiogvanin (6-TG). V Sloveniji registrirana zdravila s tiopurini so: Imuran® (50 mg AZA), ki je indiciran za vrsto avtoimunih bolezni, kot so hud revmatoidni artritis, sistemski lupus eritematozus, avtoimuni kronični aktivni hepatitis idr., Puri-Nethol® (50 mg 6-MP), ki je indiciran za akutno limfoblastno levkemijo, akutno mieloblastno levkemijo in kronično granulocitno levkemijo, ter Lanvis® (40 mg 6-TG), ki je indiciran za enake bolezni kot Puri-Nethol® (6). V drugih državah se AZA in tudi 6-MP uporablja pri terapiji nemalignih imunoloških obolenjih, 6-MP in 6-TG pa pri malignih obolenjih, kjer se skoraj vedno uporablja kot ena izmed učinkov v skupini večih

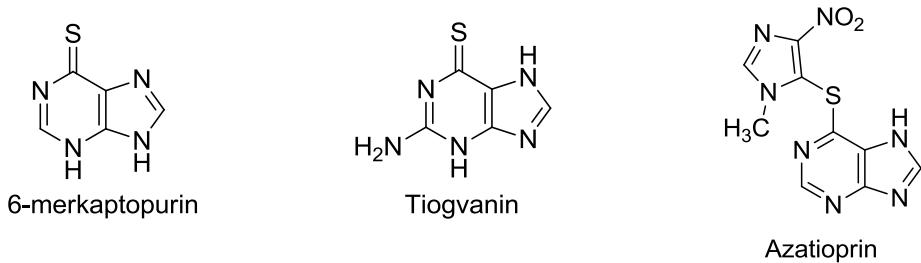
mielosupresivnih zdravil (Preglednica I) (7). Tako 6-MP in 6-TG spadata med najpomembnejše in najpogosteje uporabljene zdravilne učinkovine za zdravljenje ALL (1). 6-MP se ponavadi uporablja v vzdrževalni terapiji, 6-TG pa v intenzivni fazi zdravljenja (8). Veljata za enako učinkovita, čeprav nekatere študije kažejo večjo učinkovitost 6-TG; ker pa pride pri terapiji s 6-TG večkrat do toksičnih učinkov, je 6-MP prva izbira pri zdravljenju ALL (8). Tiopurini se običajno aplicirajo peroralno vsak dan vsaj nekaj mesecev. Ker pa imajo te zdravilne učinkovine ozek terapevtski indeks, pogosto povzročijo resne neželene učinke, kot so mielosupresija, pankreatitis, hepatotoksičnost, pojav malignih tvorb in dovzetnost za infekcije (9).

Preglednica I: Indikacije za uporabo tiopurinov (10).

Indikacije tiopurinov	Tiopurine sta 1951 leta odkrila Gertrude Elion in George Hitchings, ki sta leta 1988 prejela Nobelovo nagrado za fiziologijo ali medicino za razvoj zdravil za zdravljenje raka in preprečitve transplantacijske zavnitve (11). Da bi povečali učinkovitost 6-MP, so poskušali preprečiti oksidacijo in hidrolizo njegove sulfhidrilne skupine z dodajanjem različnih zaščitnih skupin in tako jim je leta 1957 uspelo sintetizirali AZA (12). AZA je predzravilo 6-MP, ki se v aktivno obliko pretvori z neencimsko odcepitvijo imidazolnega obroča s purinskega dela.
Otroška akutna limfatična levkemija	
Akutna nelimfatična levkemija pri odraslih	
Akutna limfatična levkemija pri odraslih	
Otroška akutna mieloidna levkemija	
Otroški ne-Hodgkinov limfom	
Crohnova bolezen	
Ulcerativni kolitis	
Po transplantaciji čvrstih organov	
Avtoimuni hepatitis	
Revmatoidni artritis	
Sistemski lupus eritematosus	
Psoriaza	
Hud otroški atopični dermatitis	
Kronična vnetna črevesna bolezen	

Tiopurine uvrščamo med fazno specifične zdravilne učinkovine, saj zavirajo celični cikel v S fazi (3). Imajo dvojni mehanizem delovanja: prvi je sproženje apoptoze celice zaradi vgradnje 6-tiogvanozinskih nukleotidov (6-TGN) v DNA ali RNA, drugi način pa je inhibicija *de novo* sinteze purinov z metiliranimi metaboliti (5). Prvi mehanizem je posledica dejstva, da imajo tiopurini podobno strukturo kot endogeni purini in zato delujejo kot antimetaboliti, kar pomeni, da se namesto njih vežejo v nastajajočo verigo DNA ali RNA. Drugi mehanizem pa je posledica tega, da je purinski obroč osnova za nastanek dveh od štirih nukleinskih baz: adenina in gvanina. Ker s tiopurini inhibiramo sintezo teh dveh baz, posledično zaustavimo sintezo DNA in zato delitev celice. To pride

še posebej do izraza npr. pri limfocitih, ker spadajo med hitro deleče se celice, ki nimajo mehanizma »recikliranja« nukleotidov iz razpadlih molekul DNA in RNA (13).



Slika 1: Strukturne formule tiopurinov.

Kot že rečeno, sta 6-MP in 6-TG najpogosteje uporabljeni zdravilni učinkovini za zdravljenja ALL (1). Pred vpeljavo terapije s tiopurini leta 1953, so ALL pri otrocih zdravili z metotreksatom in steroidi. Takrat je bila mediana preživetja otrok po diagnozi ALL doba treh do štirih mesecev, samo 30% otrok pa je živelo do enega leta po diagnozi; po dodatku 6-MP k terapiji so mediano preživetja podaljšali na 12 mesecev, nekaj otrok pa je ostalo v remisiji več let (12).

Ker so imunoblasti, ki se tvorijo pri imunskega odgovora, podobni levkemičnim limfocitom, so leta 1958 raziskali, če tiopurini delujejo imunosupresivno ter ugotovili, da je AZA najučinkovitejši med njimi. Tako je AZA skupaj s prednizolonom leta 1962 omogočil prvo presaditev ledvic, kjer donor in pacient nista bila enojajčna dvojčka (12). AZA je torej eden izmed najstarejših imunosupresivov in se še danes uporablja pri transplantaciji čvrstih organov, hematoloških malignih obolenjih ter avtoimunih boleznih kot so avtoimuna hemolitična anemija, revmatoidni artritis, kronični hepatitis, sistemski lupus eritematosus in kronična vnetna črevesna bolezen (13). Mednarodna agencija za raziskovanje raka (IARC) pa je AZA uvrstila v prvo skupino humanih karcinogenov, ker so ugotovili, da imajo pacienti, ki so jemali AZA po transplantaciji organa, večjo verjetnost da zbolijo za ne-Hodgkingovim limfomom, skvamoznim kožnim rakom, rakom hepatobiliarnega sistema in da razvijejo mezenhimske tumorje (14).

1.2 Metabolizem tiopurinov

Tiopurini so predzdravila, kar pomeni, da se v aktivno obliko pretvorijo v telesu. Po absorbciji se AZA v zunajceličnem prostoru v 90% pretvori v 6-MP z neencimsko redukcijo s pomočjo sulfhidrilnih derivatov kot sta glutation in cistein (9). V

zunajceličnem prostoru pa se 6-MP in 6-TG v veliki meri pretvorita do neaktivnih metabolitov, in sicer z encimoma ksantin-oksidazo (XO) in aldehid-oksidazo (AO) (Slika 2). Pri reakciji s XO nastaneta neaktivna tioksantin (TX) in 6-tiosečna kislina (6-TU), ki se izločita preko ledvic, AO pa 6-MP in 6-TG pretvori do prav tako neaktivnih hidroksiliranih metabolitov 8-hidroksimerkaptopurina (8-OHMP) in 8-hidroksiogvanina (8-OHTG) (1).

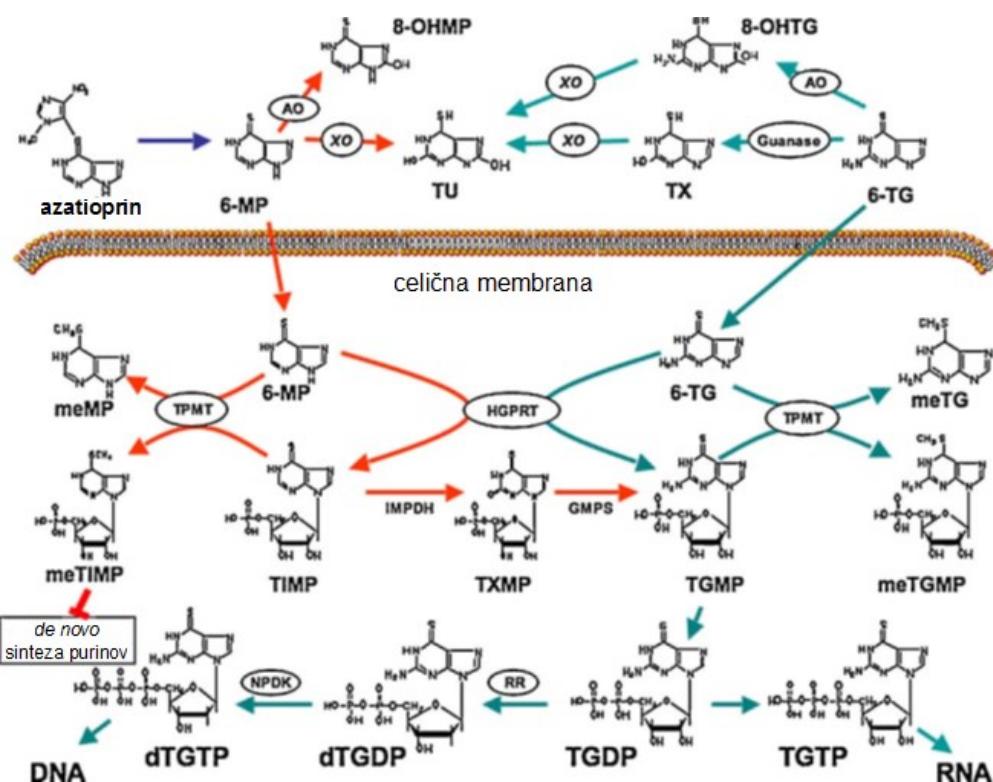
6-MP se smatra za predzdravilo zato, ker se njegova pretvorba do aktivnih učinkovin nadaljuje v dveh kompleksnih znotrajceličnih metabolnih poteh. V prvi se s hipokstantingvanin fosforiboziltransferazo (HPRT) pretvori v 6-tioinozin-5'-monofosfat (TIMP), ki se nato z inozin-monofosfat dehidrogenazo (IMPDH) pretvori v 6-tioksantin-5'-monofosfat (TXMP), nato pa z gvanozinmonofosfat-sintazo (GMPS) v 6-tiogvanozin-5'-monofostat (TGMP) (1). Tu se srečata metabolni poti 6-MP in 6-TG, saj se tudi 6-TG z encimom HPRT z adicijo riboze-5-fosfata pretvarja v TGMP. TGMP se nato s pomočjo dveh kinaz fosforilira do 6-tiogvanozin-5'-trifosfata (TGTP), ki se vgradi v RNA ali pa se z ribonukleotid reduktazo (RR) reducira do deoksi-6-tiogvanozin-5'-trifosfata (dTGDP) in nato fosforilira z nukleozid difosfat kinazo (NDPK) do dTGTP, ki se vgrajuje v DNA limfocitov in tako deluje citotoksično in inhibira znotrajcelično signalizacijo, kar lahko vodi v apoptozo celice (1).

Po drugi metabolni poti se 6-MP enako kot v prvi pretvori v TIMP, nato pa se metilira s tiopurin-S-metiltransferazo (TPMT) do neaktivnega 6-MMP ali pa do 6-metiltioinozin-5'-monofostata (MeTIMP), ki je močan inhibitor *de novo* sinteze purinov (1). To je predvidoma razlog imunosupresivnega delovanja tiopurinov, saj zaustavi proliferacijo limfocitov (9). S-metiliranje 6-MP v 6-MMP in 6-TG v 6-metiltiogvanin (6-MTG) z encimom TPMT predstavlja glavno deaktivacijsko pot v hematopoetskem tkivu in ima največji vpliv na biološko uporabnost citotoksičnih 6-TGN (5). Opisana metabolna pot tiopurinov je prikazana na Sliki 2.

Tudi 6-TG se kot 6-MP v zunajceličnem prostoru z encimi AO, OX in gvanazo pretvori v neaktivne metabolite, znotraj celice pa se prav tako s TPMT presnavlja do neaktivne oblike 6-metiltiogvanina (6-MTG) in do 6-metiltiogvanin-5'-monofosfata (MeTGMP), ki izraža zelo nizko citotoksičnost - neprimerljivo z MeTIMP (15). Vendar se metabolni poti 6-MP in 6-TG v večih pogledih razlikujeta. 6-TG se v aktivno učinkovino pretvori le po eni poti, tj. s pomočjo HPRT do TGMP in naprej do citotoksičnih TGTP in dTGTP. Torej ker pri presnovi 6-TG ni aktivnega sekundarnega metabolita, kot je pri 6-MP MeTIMP, ki zavira *de novo* sintezo purinov, ima 6-TG le en mehanizem delovanja. Glavna

razlika v metabolizmu med 6-MP in 6-TG je, da je pot 6-MP do 6-TGN daljša, ker se mora 6-MP na svoji poti najprej pretvoriti v TIMP, ki pa je glavni substrat za TPMT. To je razlog, da so klinične študije pokazale višje koncentracije 6-TGN v hemolizatu eritrocitov pri pacientih na terapiji s 6-TG kot pri tistih s 6-MP (15).

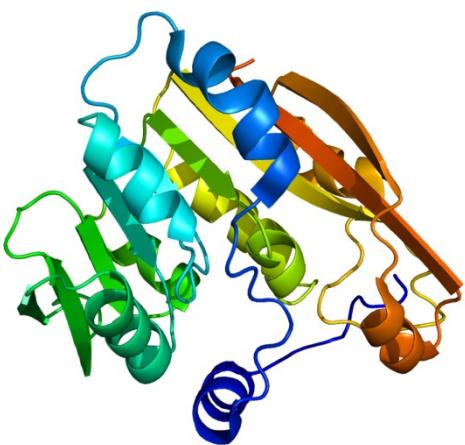
TPMT torej pretvori 6-MP in 6-TG do različnih metabolitov, ki imajo različno stopnjo citotoksičnosti. Kot omenjeno, sta metabolita 6-MeMP in 6-MeTG neaktivna, MeTIMP je inhibitor *de novo* sinteze purinov, MeTGMP pa ima 12-krat nižjo učinkovitost od MeTIMP, torej zanemarljivo (15). Študije so pokazale, da ima zato TPMT različen prispevek k učinkovitosti 6-MP in 6-TG. Ena izmed njih je z indukcijo TPMT dokazala 4,4-kratno zvišanje občutljivosti na 6-MP na račun povišane koncentracije MeTIMP, čeprav se je raven 6-TGN znižala, medtem ko se je pri 6-TG občutljivost celic znižala 1,6-krat, saj se je znižal nivo 6-TGN, povišal pa skoraj neaktivni MeTGMP (15).



Slika 2: Metabolizem tiopurinov(1). Okrajšave: AO: aldehid oksidaza, XO: ksantin oksidaza, 8-OHMP: 8-hidroksimerkaptopurin, TU: tiosečna kislina, TX: tioksantin, 8-OHTG: 8-hidroksitiogvanin, TPMT: tiopurin-S-metiltransferaza, meMP: 6-metilmekaptopurin, meTIMP: 6-metiltioinozin-5'-monofosfat, TIMP: 6-tioinozin-5'-monofosfat, IMPDH: inozin-monofosfat dehidrogenaza, HGPRT: hipoksantin-gvanin fosforiboziltransferaza, TXMP: 6-tioksantin-5'-monofosfat, GMPS: gvanozinmonofosfat-sintaza, TGMP: 6-tiogvanozin-5'-monofosfat, meTG: metiliogvanin, meTGMP: 6-metiliogvanozin-5'-monofosfat, TGTP: 6-tiogvanozin-5'-trifosfat, TGDP: 6-tiogvanozin-5'-difosfat, dTGDP: deoksi-6-tiogvanozin-5'-difosfat, dTGTP: deoksi-6-tiogvanozin-5'-trifosfat.

1.3 Vpliv aktivnosti in genotipa TPMT na terapijo s tiopurini

Na farmakokinetiko in toksičnost tiopurinov vplivajo tudi genetski polimorfizmi oz. aktivnost TPMT in tako igrajo pomembno vlogo pri uspešnosti terapije. Pacienti z nizko aktivnostjo TPMT imajo namreč večjo možnost za resne neželene učinke pri standardni terapiji s tiopurini, medtem ko je pri pacientih z visoko aktivnostjo TPMT takšno zdravljenje neučinkovito. En izmed 300 posameznikov ima nezaznavno aktivnost tega encima, 11% je heterozigotov za variantni alel z nizko aktivnostjo, kar pomeni, da izražajo srednjo aktivnost TPMT, 89% pa je homozigotov za alel divjega tipa z visoko aktivnostjo TPMT (16). Vendar skladnost med genotipom in fenotipom TPMT ni 100%. Tega se je še posebej potrebno zavedati pri pacientih z nizko ali srednjo aktivnostjo TPMT. Zaradi tega genotip TPMT uvrščamo med klinično pomembne farmakogenetske kazalce, ki bi ga bilo potrebno določiti pri vsakem posamezniku pred aplikacijo tiopurinskega zdravila.



Slika 3: Proteinska struktura encima TPMT (17). Encim je sestavljen iz zaporedja 245 aminokislin. Sestoji iz ene domene, ki ima devet β struktur.

TPMT je citoplazmatski encim, ki katalizira S-metilacijo sulfhidrilnih skupin na aromatskih in heterocikličnih molekulah. Njegova endogena funkcija je še neznana. Substrati za TPMT so tiopurini, njihov sekundarni metabolit TIMP in produkt oksidacije tiopurinskega obroča 8-OHMP. Inhibitorji TPMT pa so derivati benzojske kislina, kot sta salicilna kislina in 5-aminosalicilat, ki je metabolit sulfasalazina ter mesalazina, ki se lahko uporablja sočasno s 6-MP ali z AZA pri imunosupresivnih obolenjih (16).

Gen za TPMT leži na kromosому 6p22.3; njegov divji tip označimo s *TPMT*1* (18). Poznamo preko 35 variant TPMT alelov, ki kodirajo za encime z različno stopnjo aktivnosti (16). Izmed njih jih 16 kodira za TPMT z znižano aktivnostjo (*TPMT*2, *3A, *3B, *3C, *3D, *4, *5, *6, *11 – 16, *21 in *25*) (9). Kar 95% podedovane nezadostne aktivnosti TPMT pripisujejo alejom *TPMT*3C, TPMT*3A* in *TPMT*2* (19). Na frekvence teh polimorfizmov vpliva etnična pripadnost. Tako je npr. frekvenca TPMT variantnih alelov 10% pri Kavkazijcih, 2% pri južnih Azijcih, 4,7% pri Kitajcih in 10,9% pri Kenijcih (18). Najpogostejši variantni alel pri Kavkazijcih je *TPMT*3A*, ki ima frekvenco 5% in eden od 300 Kavkazijcev je zanj homozigot ter ima zato nezadostno delovanje encima. *TPMT*3A* je edini mutiran alel, ki

so ga našli pri južnih Azijcih, niso pa ga našli pri Kitajcih in Kenijcih, ki imajo edini mutiran alel *TPMT*3C* (18). Nasprotno je *TPMT*3C* pogost mutiran alel v afriški populaciji, medtem ko pa pri afriških Američanah okoli 50% mutiranih alelov predstavlja *TPMT*3A* in 50% *TPMT*3C* (16).

V kavkazijski populaciji je pri okoli 90% posameznikov prisoten divji tip TPMT, ki ima visoko aktivnost, 7 – 10% je heterozigotov s srednjo aktivnostjo, eden od 300 posameznikov pa je mutiran homozigot in ima nizko aktivnost TPMT (20). Znižana aktivnost TPMT je posledica mutacije na genu za TPMT. Najpogostejši izmed teh mutacij sta 460G > A in 719A > G, ki se ponavadi podedujeta skupaj kot alel *TPMT*3A* (20). Zaradi mutacije *gena TPMT* pride do razlik v aminokislinski strukturi encima, kar vodi v destabilizacijo nativne strukture in napačnega zvitja proteina, ki ga celica posledično razgradi (19).

Tako kot genotip, se tudi fenotip TPMT razlikuje med različnimi etničnimi populacijami. Npr. Kavkazijci imajo višjo aktivnost TPMT kot severnoameriška črnska populacija, avtohtoni norveški Saami pa imajo višjo aktivnost od Kavkazijcev. V vseh teh populacijah je porazdelitev aktivnosti trimodalna, temu pa ni tako pri Azijcih, kjer je porazdeljena bimodalno in v korejski populaciji, kjer je porazdelitev unimodalna (16). Aktivnost TPMT je povezana tudi s starostjo, saj imajo zdravi otroci višjo aktivnost kot odrasli in mlajši otroci višjo od starejših otrok, najvišjo pa imajo novorojenčki (16).

Neželeni učinki so odvisni od odmerka tiopurina, zato so pogostejši pri terapiji ALL s 6-MP in 6-TG, kjer se uporablja višji odmerki, kot pri imunosupresijski terapiji z AZA (16). Bolniki z ALL, ki so homozigoti ali heterozigoti za alele *TPMT*2*, *TPMT*3A* ali *TPMT*3C*, imajo nižjo aktivnost encima TPMT in se bolj odzovejo na terapijo s tiopurini, imajo pa pri standardnih odmerkih zdravila večjo možnost za neželene učinke, kot so mielosupresija, infekcije, stomatitis in pojav sekundarnih tumorjev, zaradi večje koncentracije citotoksičnih metabolitov TGN, ki se kopijo v zdravih celicah (20). Zato so bile postavljene smernice za prilagajanje odmerkov glede na TPMT genotip. Homozigotni pacienti z nizko aktivnostjo TPMT bodo pri standardnih odmerkih zagotovo razvili življensko ogrožajočo mielosupresijo, zato potrebujejo znižanje na 10% standardnega odmerka, medtem ko heterozigotni bolniki potrebujejo znižanje na 30 – 70% (21, 7). Vendar le 30 – 60% heterozigotov ne prenese običajnega odmerka zdravila, kar pomeni, da ostali pacienti prejemajo nižji odmerek kot ga tolerirajo in zato terapija za njih ni optimalna (7, 16). Vendar se v roku dveh do štirih tednov odmerek prilagodi glede na

izmerjene metabolite, torej se pri teh pacientih zviša (7). Težja pa je določitev odmerka za homozigotne osebe z divjim tipom TPMT alela, ki so ponavadi uvrščene v skupino z visoko aktivnostjo TPMT, čeprav v resnici izražajo širok razpon aktivnosti (21).

1.4 Testiranje TPMT

Testiranje TPMT je eden izmed redkih farmakogenetskih testov, ki se je uveljavil v klinični praksi (22). Tako v ZDA kot v Zahodni Evropi je priporočeno pred začetkom terapije s tiopurini, v Evropi le-to že postaja rutinska klinična praksa. To pa ne velja za Slovenijo, saj se tovrstni testi izvedejo le v primeru hujših zapletov pri terapiji s tiopurini. TPMT testiranje pred terapijo z AZA v Veliki Britaniji izvedejo v 67% primerov, po svetu pa v 43% (16). Glavni namen farmakogenetskih testov je povišati število pacientov, ki se na terapijo odzivajo dobro in zmanjšati število neželenih učinkov. Kadar pacientom, ki jemljejo tiopurine, ne prilagodimo odmerka gleda na njihovo sposobnost metaboliziranja, obstaja nevarnost pojava resnih neželenih učinkov kot so mielosupresija, pankreatitis, hepatotoksičnost, povišana koncentracija transaminaz, pojav malignih tvorb in dovzetnost za infekcije. Da bi jih preprečili, lahko testiramo pacientovo TPMT in na osnovi tega določimo zanje primeren odmerek tiopurina ali najdemo alternativno zdravilo. Uvedba testiranja TPMT je povečala število dobrih kliničnih izidov, čeprav je jasno, da pojav neželenih učinkov ni odvisen samo od TPMT. Če pacient spada v skupino z visoko aktivnostjo TPMT, mu predpišemo višje terapevtske odmerke in s tem zagotovimo učinkovito terapijo, če pa ugotovimo, da je pacient homozigot ali da ima zelo nizko aktivnost TPMT, zanj terapija s tiopurini zaradi velike verjetnosti levkopenije ni najprimernejša, zato se ji izognemo oz. predpišemo zelo nizek odmerek zdravila. Žal testiranje TPMT ne predvidi vseh primerov levkopenije, ki je najpogostejši in najresnejši toksični učinek na kostni mozeg pri terapiji s tiopurini in lahko vodi do sepse ali celo v smrt; prav tako ne more napovedati preobčutljivosti na tiopurine, ki lahko povzroči pankreatitis (9). Zaskrbljujoč je podatek, da ima 70% pacientov, ki doživijo neželene učinke terapije, normalno aktivnost TPMT (23).

TPMT lahko testiramo na dva načina: v eritrocitih lahko izmerimo aktivnost TPMT (določimo fenotip) ali pa na DNA izolirani iz levkocitov določimo genotip TPMT na osnovi katerega nato predvidimo aktivnost encima (9). Pacienti so na osnovi rezultatov razvrščeni v tri skupine:

1. v skupino z normalno oz. visoko aktivnostjo TPMT (imajo dva funkcionalna alela aktivnega gena),
2. v skupino s srednjo aktivnostjo TPMT (heterozigoti z enim variantnim aleлом) ali
3. v skupino z nizko aktivnostjo oz. brez aktivnosti TPMT (homozigoti z dvema variantnima aleloma) (9).

TPMT testiranje se v ZDA in Veliki Britaniji priporoča pred začetkom terapije s tiopurini, za otroke in mlade odrasle z levkemijo pa je pred začetkom zdravljenja obvezno, saj omogoča preprečitev hudih neželenih učinkov s prilagoditvijo odmerka in agresivno terapijo za paciente z visoko aktivnostjo TPMT (16). Kljub temu to priporočilo ni vsesplošno sprejeto zaradi težav pri interpretaciji rezultatov.

Pod vprašaj se postavlja učinkovitost testiranja TPMT, ker je občutljivost genotipizacije pri določanju nizke oz. srednje aktivnosti TPMT, med 70,33% in 86,15%, specifičnost genotipizacije pa 100% (23). Vseeno pa lahko pri pacientih na osnovi testiranja TPMT izboljšamo učinkovitost terapije, preprečimo neželene učinke ter jim med terapijo omogočimo boljšo kvaliteto življenja in s tem tudi preprečimo stroške zdravljenja, ki bi nastali ob morebitnih zapletih terapije.

Različne študije so pokazale med 76 in 99% ujemanje med genotipom in fenotipom TPMT, ki pa je nižje pri heterozigotih, in sicer samo 50% (23, 24, 25, 26, 27). Zaradi visokih stroškov ni v navadi, da bi za posameznega pacienta določali tako genotip kot fenotip TPMT, zato je potrebno pretehtati, s katerim testom bomo dobili bolj točne rezultate. Oba testa imata tako pozitivne kot negativne strani. Pozitivna stran določanja fenotipa TPMT je, da dobimo oceno trenutne aktivnosti TPMT. Le-to pa lahko nekateri dejavniki spremenijo: npr. interakcije med zdravili, transfuzija krvi ali uremija. V tem primeru nam da boljši rezultat testiranje genotipa, na katerega ti faktorji ne vplivajo. Vendar divji tip genotipa ne izključuje možnosti nezadostne aktivnosti TPMT, saj nanjo vplivajo še drugi dejavniki, poleg tega večina laboratorijskih določil samo najpogostejše variantne alele in zato lahko spregleda redke ali neznane mutacije (23). Z genotipizacijo tudi ne zaznamo velikih razlik v aktivnosti TPMT med homozigoti za divji tip, ki so lahko kar štirikratne (5). Iz teh razlogov nekateri dajejo prednost določanju fenotipa, ker da podatek o trenutnem metabolizmu TPMT (9). Pri otrocih z ALL na aktivnost TPMT vplivajo z boleznijsko in terapijsko povezani dejavniki, zato so za pravilno določitev fenotipa TPMT potrebne meritve pri konstantnih pogojih in pri standardnem odmerjanju med določeno fazo terapije (16). Te spremembe se pri bolnikih z IBD ne pojavijo, saj so pri njih

izmerjene aktivnosti TPMT tako pred kot med terapijo enake. Za bolnike, ki se že zdravijo s tiopurini, je primernejša genotipizacija, saj lahko pri njih pride do indukcije TPMT in posledično do povišanja aktivnosti za 30 – 35% (5). Niti genotip niti fenotip sama po sebi ne moreta 100% identificirati posameznikov z nezadostno aktivnostjo TPMT. Večja verjetnost, da takšnega pacienta uvrstimo v razred srednje aktivnosti TPMT, obstaja pri določanju fenotipa kot pri določanju genotipa (16). Primerjava obeh testov je namreč pokazala, da bi z določitvijo fenotipa kar 11% posameznikov z nezadostno aktivnostjo TPMT uvrstili v skupino s srednjo aktivnostjo. Več raziskav je pokazalo, da je testiranje TPMT pred začetkom terapije cenovno učinkovito, saj stane hospitalizacija pacienta s pomanjkljivo aktivnostjo encima zaradi zapletov pri terapiji kar 400-krat več kot en test aktivnosti TPMT (16). Stroški testa pri ostalih pacientih pa se nadoknadijo z izboljšano terapijo in kvaliteto življenja.

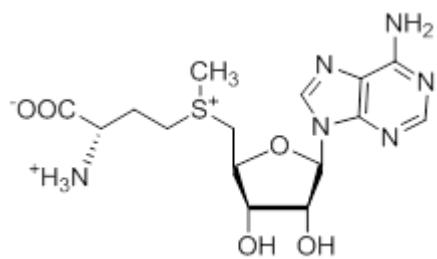
Vsem pacientom na terapiji s tiopurini je potrebno redno preverjati krvno sliko, priporočljivo pa je tudi določanje koncentracije metabolitov, ki omogoča optimizacijo odmerka, preveri adherenco pacienta in identificira bolnike neodzivne na terapijo. Koncentracija metabolitov tiopurinov se v večini laboratorijskem merenju v ekstrahiranih eritrocitih z metodo HPLC. Merijo 6-TG, ki vključuje 6-TG, 6-tiogvanozin in 6-TGN ter 4-amino-5-(metiltio)karbonilimidazol (AMTCI), ki vključuje meMP, metilmerekaptoperin ribozid (MMPR) in metiltioinositin nukleotid (meTIN) (9). Težava teh testov je, da ciljna koncentracija 6-TGN za optimalno terapijo ni jasno določena in da koncentracije 6-TGN ali meMP niso neposredno povezane z neželenimi učinki. Ciljne koncentracije metabolitov torej služijo le kot smernice, ki ustrezajo večini pacientov, ne pa vsem. Rutinsko preverjanje metabolitov je pri pacientih, ki se na terapijo dobro odzivajo in jemljejo primeren odmerek zdravila, nesmiselno (9). Kljub temu da je razmerje med ceno in koristnostjo slabše in da so možne napake zaradi napačne interpretacije rezultatov, se je testiranje metabolitov v praksi dobro uveljavilo (9).

1.5 Povezava med S-adenozil-L-metioninom (SAM) in TPMT

Eden izmed potencialno klinično uporabnih modulatorjev aktivnosti TPMT je S-adenozil-L-metionin (SAM). SAM je v vseh celicah prisoten metabolit, ki ima pomembno vlogo kot prekurzor pri treh reakcijskih poteh: metilaciji, aminopropilaciji in transsulfuraciji. Kot donor metilne skupine sodeluje pri več kot stotih različnih reakcijah

(28), ki jih katalizirajo metiltransferaze, ki prenašajo metilno skupino na kisikove, dušikove in žveplove atome molekul. Tako deluje tudi v reakciji S-metiliranja tiopurinov, ki jo katalizira TPMT. Da lahko te reakcije potekajo normalno, celice potrebujejo zadostno količino SAM, koliko ga je na razpolago pa je odvisno od količine metionina, ki ga zaužijemo s hrano in od količine *de novo* sintetiziranega metionina iz metiltetrahidrofolata

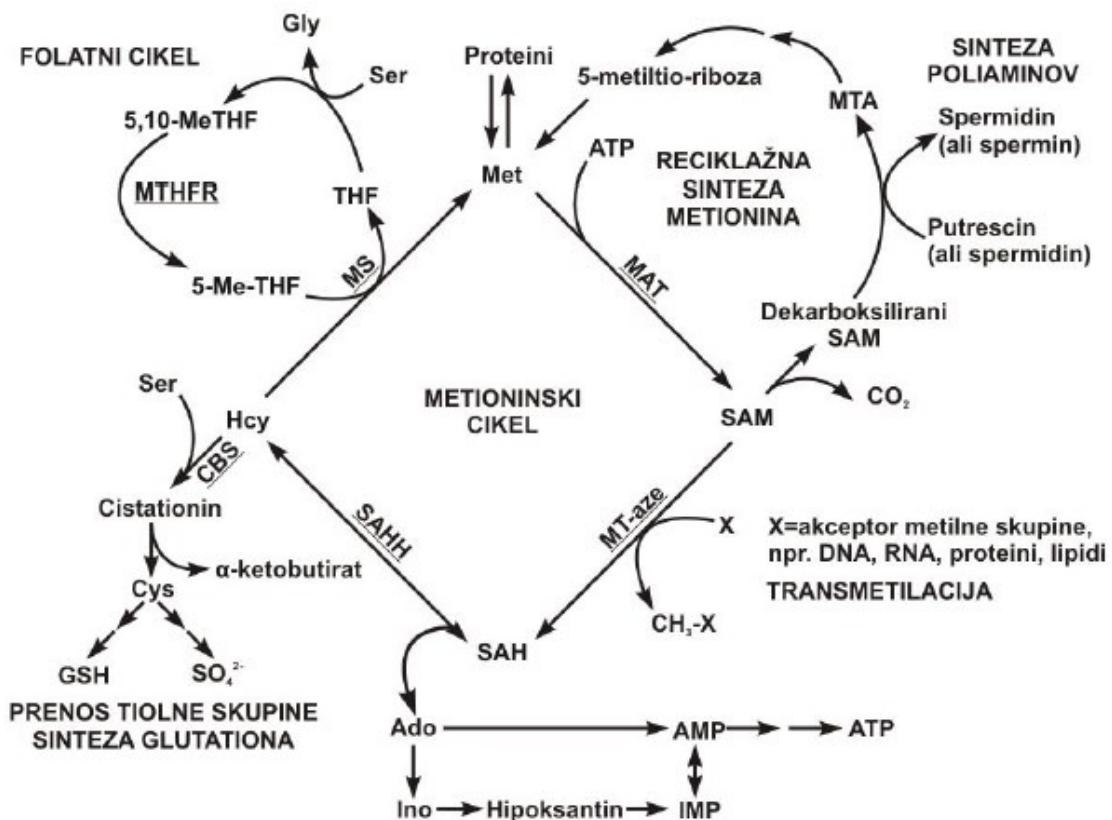
in vitamina B-12 (28).



Slika 4: S-adenozil-L-metionin (SAM). SAM je sestavljen iz dveh delov: adenozin trifosfata in esencialne aminokisline metionina. Iz teh dveh molekul se sintetizira s pomočjo encima metionin-adenoziltransferaze (MAT). Je nestabilna molekula, ima pa več stabilnih soli (toluendisulfonat, 1,4-butandisulfonat), ki se lahko uporablajo pri zdravljenju depresije, osteoartritisa in jetrnih bolezni (27).

Raziskave so pokazale, da je SAM potencialni biokemijski označevalec za napoved učinkovitosti terapije s tiopurini, saj je odgovoren za stabilizacijo encima TPMT in posledično prispeva k deaktivaciji tiopurinov, kar vodi v nižjo citotoksičnost (21). Nihanje fiziološke koncentracije SAM in sorodnih metabolitov namreč vplivajo na aktivnost TPMT v celičnih linijah in eritrocitih zdravih preiskovancev (21). Pri posameznikih z divjim tipom TPMT*1 in visoko koncentracijo SAM so določili višjo aktivnost TPMT, kot pri posameznikih z divjim tipom in nizko koncentracijo SAM. In vitro študije so pokazale, da se aktivnost TPMT reverzibilno zniža, če je v mediju, kjer rastejo celice, znižana koncentracija L-metionina (21). Z inhibicijo določenih komponent metabolizma L-metionina, so pokazali, da je za posttranslacijsko stabilizacijo TPMT odgovoren SAM, kar je najbolj očitno pri posameznikih z divjim tipom TPMT*1 in mutiranim TPMT*3C genotipom.

SAM je torej pomemben modulator aktivnosti TPMT in posledično vlica na toksičnost tiopurinov. V celični liniji akutne limfocitne levkemije so dokazali, da ob dodatku SAM ($10 - 50 \mu\text{M}$) rešimo celice pred citotoksičnim učinkom 6-MP ($5 \mu\text{M}$), ker zakasnimo apoptozo (29). Dokazali so, da MeTIMP inducira inhibicijo *de novo* sinteze purinov, kar vpliva na koncentracijo znotrajceličnega ATP in posledično na koncentracijo SAM, ki deluje kot pozitivni modulator aktivnosti TPMT (29). To vodi v povečano stopnjo pretvorbe 6-MP v njegovo neaktivno obliko meMP in posledično zmanjšano količino nastalega TIMP, iz katerega nastanejo citotoksični 6-TGN in MeTIMP (Slika 2).



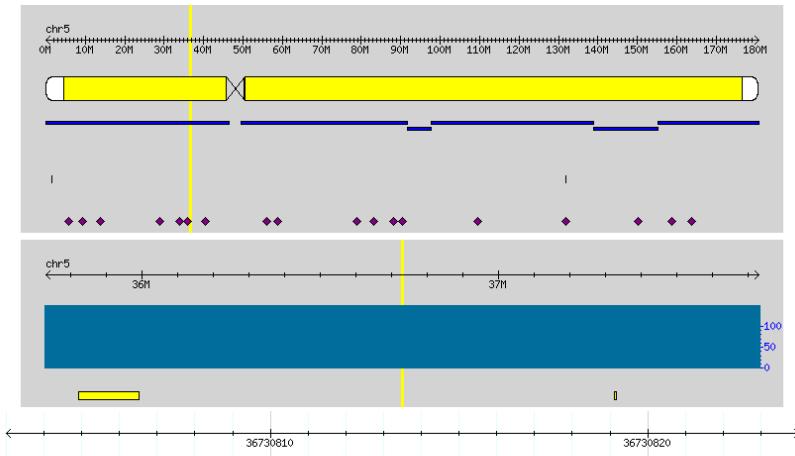
Slika 5: Metioninski cikel in znotrajcelična presnova SAM (5). Metioninski cikel je tesno povezan s folatnim ciklom, reciklažno sintezo metionina, sintezo glutationa in poliaminov ter sintezo purinskih nukleozidov in nukleotidov. SAM ima v celici vlogo kosubstrata za od SAM odvisne metiltransferaze (MTaze), ki katalizirajo reakcije transmetilacije. Pri tem nastaja S-adenozilhomocistein (SAH), ki se v metioninskem ciklu preko homocisteina (Hcy) in metionina (Met) ponovno pretvori v SAM.

Okrajšave: **5-MeTHF:** 5-metiltetrahidrofolat; **5,10-MeTHF:** 5,10-metilentetrahidrofolat; **Ado:** adenozin; **AMP:** adenozin-monofosfat; **ATP:** adenozin-trifosfat; **CBS:** cistationin β -sintaza; **Cys:** cistein; **Gly:** glicin; **GSH:** glutation; **IMP:** inozin- monofosfat; **Ino:** inozin; **MAT:** metionin-adenoziltransferaza; **MS:** metionin-sintaza; **MTA:** 5'-metiltioadenozin; **MTHFR:** 5,10-metilentetrahidrofolat-reduktaza; **SAH:** S-adenozilhomocistein; **SAHH:** S-adenozilhomocistein-hidrolaza; **Ser:** serin; **THF:** tetrahidrofolat .

Molekularne študije so pokazale, da nesinonimne substitucije aminokislin v mutirani TPMT izoformi povzročijo prekinitev znotrajceličnih van der Waalsovih vezi, zato je podvržena proteasomski rezgradnji proteinov; le to pa lahko delno prepreči SAM, ki z vezavo na aktivno mesto TPMT stabilizira njegovo 3D strukturo (29). Znižana aktivnost TPMT pa korelira tudi z mutirano obliko nizko aktivne MTHFR, ki omeji sintezo SAM (29). Retrospektivna študija je pokazala, da imajo ALL bolniki s hkratnimi mutacijami na genu *TPMT* in *MTHFR* veliko večjo verjetnost za pojav hematotoksičnosti, stomatitisa in infekcij (20).

1.6 Potencialni farmakogenetski označevalec rs13171357

Rs13171357 se nahaja v bližini gena SLC1A3 in znotraj nekodirajočega gena z neznanou funkcijo CTD-2353F22.1.



Slika 6: Položaj rs13171357 na kromosому 5. V zgornjem delu slike je z rumeno vertikalno črto prikazano kje na kromosomu 5 se nahaja rs13171357, v spodnjem delu slike pa je to območje povečano (32).

SLC1A3 spada v družino genov SLC1 (prenašalci topljencev 1), ki vključuje pet visoko afinitetnih transporterjev za glutamat (SLC1A1, SLC1A2, SLC1A3, SLC1A6 in SLC1A7) in dva transporterja za nevtralne amino kisline SLC1A4 in SLC1A5, kot so alanin, serin, cistein in treonin (30). Njihova vloga je vzdrževanje primerne koncentracije glutamata v glutaminergični sinaptični špranji in varovanje nevronov pred ekscitotksičnostjo zaradi glutamata (31). Mutacije v genu SLC1A3 povezujejo z epizodno ataksijo, konvulzijami, migreno in hemiplegijo (31).

Gen SLC1A3 leži na kromosому 5p13 (Slika 6), vsebuje 10 eskonov in je dolg vsaj 85 kb (31). Kodira za protein GLAST (glutamat aspartatni transporter) imenovan tudi EAAT1 (ekscitatorni aminokislinski transporter 1), ki je visoko afinitetni transporter glutamata v glia celicah. Izraža se v celotnem centralnem živčnem sistemu, najbolj v astrocitih in Bergmanovi glii v cerebellumu, najdemo pa ga tudi druge, npr. v retini v Mullerjevih celicah, kjer je odgovoren za prenos signalov med fotoreceptorji in bipolarnimi celicami (30). GLAST transportira glutamat oz. aspartat v celico proti koncentracijskemu gradientu. Omogoči namreč kotransport aminokisline s tremi Na^+ in enim H^+ v celico in transport enega K^+ iz nje (30).

1.7 Asociacijska študija na celotnem genomu (GWAS)

GWAS je epidemiološka raziskava pogostih genetskih variacij na človeškem genomu, ki se izvede z namenom povezave določenega fenotipa (ponavadi je to bolezen) z določenim haplotipom oz. alelom. Cilj GWAS je identifikacija alelov, ki nastopajo skupaj z določeno značilnostjo (npr. boleznijo, izražanjem encima...). Pri tem ne določajo zaporedja celotnih genov, temveč markerske polimorfizme razporejene vzdolž celega genoma, ki se nahajajo v velikem številu različnih genov. Te študije ponavadi primerjajo DNA posameznikov iz kontrolne skupine s skupino z določenim fenotipom, ki nas zanima (npr. oboleli za določeno boleznijo). Posameznikom iz obeh skupin odvzamejo DNA, in jo analizirajo s pomočjo SNP mikromrež. Napredek v tehnologiji je omogočil, da lahko na posamezni DNA določijo preko milijon SNP (33). Po določitvi SNP preverijo, če med skupinama obstajajo razlike ter sklepajo na povezano med variacijami DNA in fenotipom. Če je torej nek alel pogosteji pri posameznikih z boleznijo, ta SNP povežejo z njo. Vendar gre samo za predvideno povezano, saj brez biokemijskih raziskav ne moremo vedeti kakšna je konkretna povezava med aleлом in polimorfizmom.

Prva uspešna GWAS je bila objavljena leta 2005 in je našla dva SNP, katerih alelna frekvanca je bila značilno drugačna pri pacientih s starostno odvisno degeneracijo makule kot pri zdravih posameznikih. Do leta 2010 je bilo opravljenih okoli 600 GWAS, ki so raziskale okoli 150 različnih bolezni in drugih fenotipov in našle skoraj 800 z njimi povezanih SNP (33).

Z GWAS je mogoče preveriti na stotisoče SNP pri velikem številu preiskovancev, zato predstavljajo prelomnico pri študijah genetskega vpliva na kompleksne značilnosti (33). S tem so mišljene predvsem bolezni, ki jih ne povzroča samo en gen, temveč so rezultat mnogih genetskih in okoljskih dejavnikov hkrati, pri čemer ima vsak posamezen le majhen učinek (33). Z GWAS so ugotovili, da lahko nekatere SNP povežemo z geni, za katere prej nismo videli povezave za določen fenotip (33). To opravičuje našo hipotezo, da na aktivnost TPMT vpliva SNP rs13171357, ki leži v bližini gena SLC1A3, za katerega še ni bila raziskana in dokazana povezava s TPMT. Vendar le-ta ni izključena, še posebej zaradi dejstva, da endogena funkcija TPMT ni znana.

2 NAMEN DELA

Čeprav genotip TPMT predstavlja standardni farmakogenetski kazalec v terapiji s tiopurini, pa polimorfizmi v genu za encim TPMT pri nekaterih bolnikih ne morejo dovolj zanesljivo napovedati encimske aktivnosti TPMT in posledično bolnikovega odziva na terapijo oz. pojava neželenih učinkov. Zato je potrebno odkrivati nove dejavnike, ki vplivajo na aktivnost TPMT. Izhodišče za magistrsko naložbo je asociacijska študija na celotnem genomu (GWAS) v estonski populaciji, ki je bila skupni projekt naše fakultete in Estonskega genomskega centra Univerze v Tartu v Estoniji. Študija je bila izvedena na 793 estonskih prostovoljcih, donorjih Estonske genske banke. Njeni rezultati so pokazali, da na aktivnost TPMT vpliva polimorfizem rs13171357 v bližini gena SLC1A3. Ugotovili so, da imajo posamezniki z GG genotipom nižjo aktivnost TPMT kot tisti z AG in AA genotipi. Ker je povezavo med polimorfizmom rs13171357 in aktivnostjo TPMT potrebno potrditi tudi na neodvisni populaciji, bomo raziskali, če ta vpliv obstaja tudi v slovenski populaciji.

Z metodo TaqMan genotipizacije bomo določili polimorfizem rs13171357 na 204 vzorcih DNA zdravih Slovencev. Nato bomo z uporabo statističnih testov izvedli pilotsko študijo na tistih vzorcih, ki že imajo izmerjeno TPMT aktivnost in tako ugotovili morebitno povezavo med rs13171357 in aktivnostjo encima TPMT. Poleg tega bomo ugotovili ali je polimorfizem rs13171357 v slovenski populaciji dovolj pogost ter ali se nahaja v Hardy-Weinbergovem ravnotežju. Tako bomo ugotovili, če lahko rs13171357 uporabimo kot farmakogenetski označevalec za napoved odziva na terapijo s tiopurini.

3 Materiali in metode

3.1 Preiskovanci

Genotip rs13171357 smo določali na 204 DNA vzorcih. DNA, ki smo jo uporabili, je bila predhodno izolirana iz polne krvi zdravih slovenskih prostovoljcev s povprečno starostjo $21,7 \pm 1,6$ let. Med vzorci s podatki o starosti je bilo 56,8% moških in 43,2% žensk. Za ugotavljanje vpliva rs13171357 na aktivnost TPMT smo uporabili vzorce z že izmerjeno aktivnostjo TPMT ($N = 78$). 74 vzorcev, ki je imelo hkrati določen genotip rs13171357, genotip TPMT, aktivnosti TPMT, spol in starost, pa smo uporabili v delu študije, ki je z metodo linearne multiple regresije ugotavljala vpliv rs13171357 na aktivnost TPMT. Tem vzorcem sta bila genotip TPMT in aktivnost TPMT določena za namen predhodne raziskave (34).

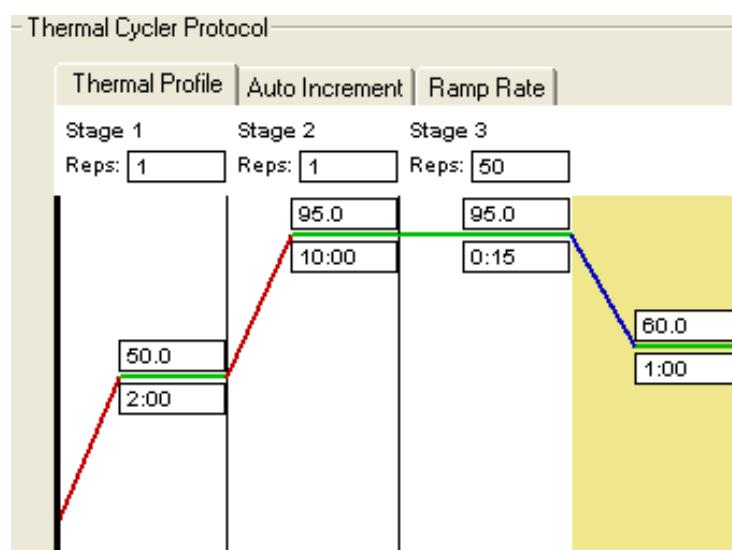
3.2 Reagenti in aparature

1. Reagenti:
 - Vnaprej pripravljena reakcijska zmes (Master Mix) (Solis BioDyne)
 - TaqMan sonde (Applied Biosystems)
 - Avtoklavirana ultračista voda
2. Aparature in pribor:
 - Abi Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems)
 - Avtoklav SHP (Steriltechnik AG)
 - Centrifuga Centric 322A (Tehnica Železniki)
 - Komora DNA/RNA UV-cleaner UVC/T-M-AR
 - Vortex Biosan FLV-2400N Combi-Spin
 - Polavtomatske pipete Eppendorf Research
 - $10 \mu\text{l}$ in $300 \mu\text{l}$ avtoklavirani nastavki za pipete Eppendorf Tips
 - 0,2 ml Eppendorfove epruvete
 - Strip osmih nanizanih 0,2 ml Eppendorfovih epruvet MicroAmp in pokrovčki zanje

3.3 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (rt-PCR)

Naše vzorce smo genotipizirali z metodo verižna reakcija s polimerazo v realnem času (rt-PCR), imenovano tudi kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (qPCR), kjer smo za detekcijo uporabili hidrolizirajoče sonde TaqMan. V osnovi je rt-PCR, tako kot PCR, *in vitro* metoda za encimsko sintezo nukleinskih kislin, s katero lahko v kratkem času sintetiziramo veliko število kopij želenega odseka DNA. Za analizo zadostuje že zelo majhna količina vzorca. Reakcijsko zmes sestavlja: vzorec DNA, ki predstavlja matrico, dva oligonukleotidna začetnika, s katerima omejimo in definiramo željen odsek DNA, deoksinukleotidtrifosfati, ki predstavljajo gradnike za nove verige DNA, Mg^{2+} ioni, ki so kofaktor DNA polimeraze, reakcijski pufer in termostabilna DNA-polimeraza. Najpogosteje se uporablja Taq DNA-polimeraza, ki je izolirana iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus* (35).

Tehnika rt-PCR se od klasičnega PCR razlikuje po načinu detekcije pomnožene DNA. Pri klasičnem PCR po končani reakciji količino pomnoženega produkta določimo z elektroforezo na agaroznem gelu. Rt-PCR pa v tem pogledu predstavlja nadgradnjo PCR, saj omogoča merjenje količine nastalega produkta v vsakem ciklu med reakcijo (36). Pomnoževanje in detekcija torej poteka sočasno. To nam omogočijo barvila, ki se vežejo na DNA ali s fluoroforji označene sonde, katerih fluorescenčni signal je proporcionalen količini pomnožene DNA.



Slika 7: Prikaz štirih stopenj rt-PCR na aparatu Abi Prism 7000.

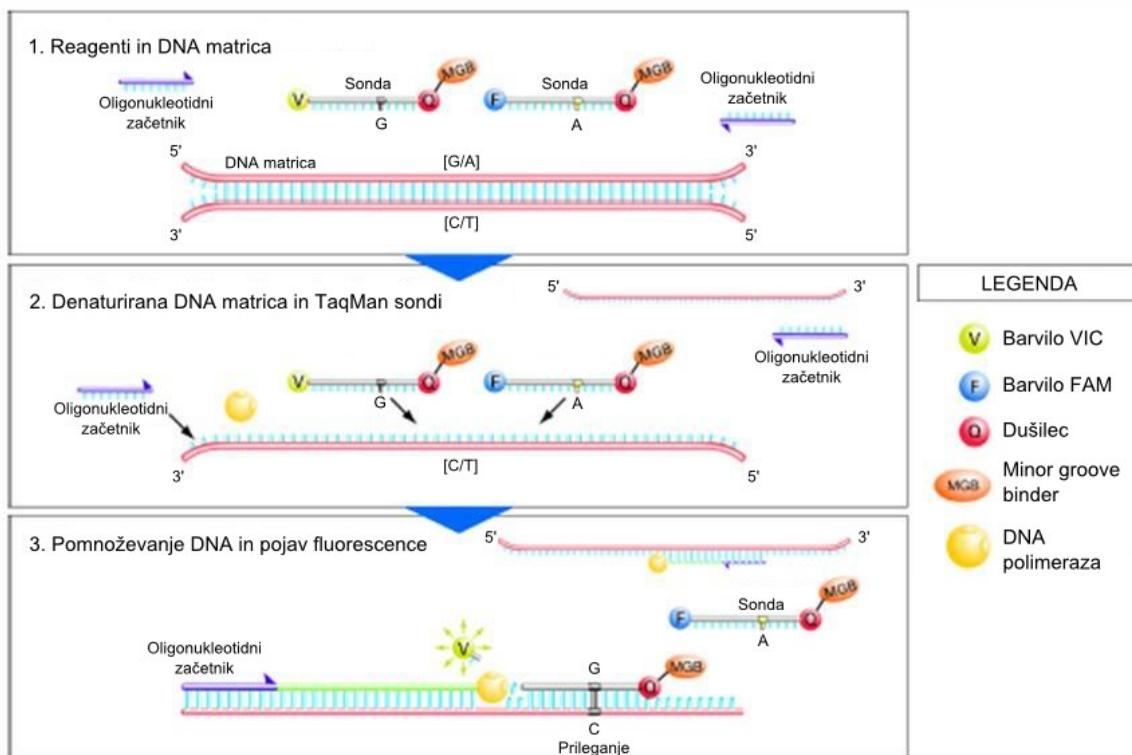
Za našo analizo smo uporabili aparat Abi Prism 7000, ki ima kapaciteto 96 vzorcev. Abi Prism 7000 je analizo izvedel v štirih stopnjah: prva stopnja reakcije je potekala dve minuti pri 50 °C, druga stopnja je trajala 10 minut pri 95 °C, kjer se je aktivirala DNA polimeraza, tretja stopnja je potekala 15 sekund pri 95 °C kjer se je DNA denaturirala do enojnih verig in četrta stopnja eno minuto pri 60 °C, kjer je prišlo do pripenjanje oligonukleotidnih začetnikov in sinteze nove verige ob matrici (Slika 7). Tretja in četrta stopnja sta se ponovili 50 oz. 60 ciklov. Število ciklov je odvisno od specifičnega primera in ga lahko z namenom izboljšanja izida reakcije spremojamo.

3.4 TaqMan genotipizacija

Kot rečeno, je prednost rt-PCR v zmožnosti detekcije količine DNA že med reakcijo pomnoževanja. To nam omogočajo tehnologije, ki lahko detektirajo fluorescenco produkta reakcije na več načinov. Ločimo nespecifični način detekcije z barvilom (SYBR Green I in Eva Green TM) in specifični način z označenimi sondami (hidrolizirajoče sonde (TaqMan, MGB) in hibridizacijske sonde (molekularna svetila, ScorpionsTM, CycliconsTM, FRET tehnologija, EclipseTM)) (36). Nespecifični način detekcije poteka na osnovi vezave barvil v nastajajočo dvojno vijačnico in posledičnem povečanju fluorescence, specifični način pa temelji na FRET tehnologiji (Förster resonance energy transfer / Fluorescence resonance energy transfer) (36). FRET opisuje fizikalni pojav od razdalje odvisnega prenosa energije med dvema barviloma oz. kromoforoma: donorski kromofor (reporter) v svojem vzbujenem stanju prenese energijo na akceptorski kromofor (dušilec) in zato ne pride do emisije fotona (36). Ker je FRET zelo občutljiv že na kratke razdalje, fluorescence ne zaznamo, dokler je sonda cela. Ko pa se dušilec loči od reporterja, ta začne fluorescirati.

FRET tehnologija je osnova tudi za TaqMan hidrolizirajoče sonde, ki smo jih uporabili pri naši genotipizaciji. Sonda TaqMan sestoji iz dveh različnih fluoroforov: dušilca, ki je ponavadi barvilo daljše valovne dolžine, npr. rdeče, in reporterja, ki je ponavadi barvilo krajše valovne dolžine, npr. zeleno (37). Ko se pri visoki temperaturi DNA denaturira, se sonda veže na matrico. Dušilec je pripet na 3' koncu sonde in duši fluorescenco reporterja, ki je pripet na 5' koncu sonde (38). Po ohladitvi reakcijske zmesi DNA-polimeraza prične dodajati oligonukleotide in zaradi svoje ekszonukleazne aktivnosti odstrani TaqMan sondu z matrico. Sonda tako razпадa na dušilec in reporter, kar slednjemu omogoči fluorescentno

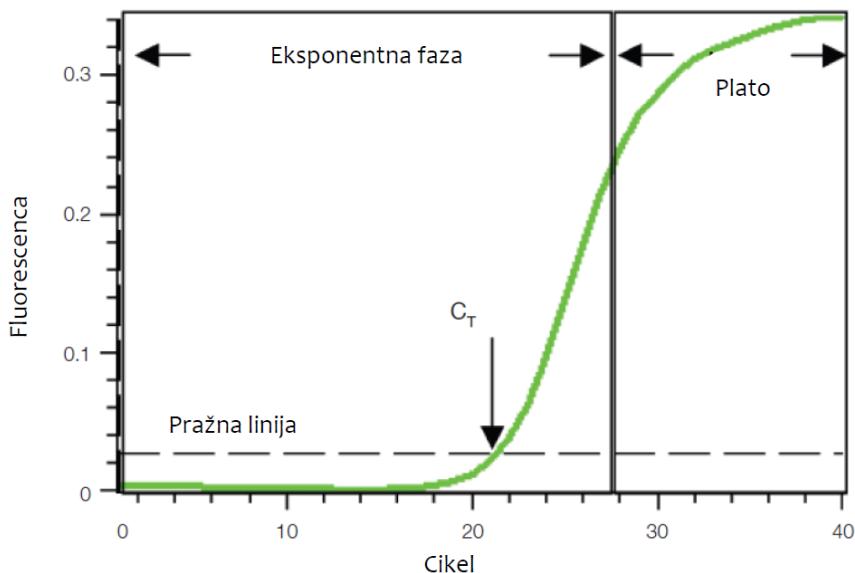
sevanje, ki ga pri določeni valovni dolžini zazna detektor. Jakost fluorescentnega signala je odvisna od začetne količine tarčne molekule in števila ciklov reakcije PCR. Več kot poteče ciklov, več je pomnožene matrične DNA in zato je tudi več mest za vezavo sond in posledično pride do večje fluorescence.



Slika 8: Prikaz delovanja sond TaqMan (39). 1) Prikazani so matrična DNA, začetna oligonukleotida ter TaqMan sondi z barvilom VIC oz. FAM. S črko V in F sta označena reporterja, s črko Q pa dušilec (quencher); 2) Po denaturaciji se na enoverižno DNA, glede na ustreznost zaporedja, veže VIC ali FAM sonda 3) DNA-polimeraza dodaja nukleotide in odstranjuje TaqMan sondu, kar povzroči razpad sonde. Reporter se oddalji od dušilca, kar mu omogoči fluoresciranje.

Rezultat rt-PCR metode je graf, ki ima na abscisi prikazano število ciklov pomnoževanja DNA, na ordinati pa stopnjo sondine fluorescence, ki je proporcionalna količini pomnožene DNA. Krivulja je sigmoidne oblike in je sestavljena iz treh delov: začetnega dela, eksponentnega oz. linearnega dela in platoja (Slika 9) (36). Začetni del sega do pražne fluorescence (C_T), od koder dalje lahko natančno izmerimo fluorescenco (37). S C_T je torej označen cikel, v katerem fluorescenci preseže pražno linijo. Tu se začne eksponentni del, med katerim se v vsakem ciklu količina DNA podvoji. Ko začne

primanjkovati sestavin za pomnoževanje DNA, se reakcija upočasni in preide v fazo platoja.



Slika 9: Primer grafa pridobljenega z metodo rt-PCR s TaqMan sondami (37). Prikazani so trije deli krivulje: začetni del, eksponentni oz. linearni del in plato. Na tem grafu je fluorescencija nekje do 17. cikla prenizka, da bi jo zaznali, nato pa prične koncentracija produkta eksponentno naraščati. Sčasoma nastane dovolj DNA, da je fluorescenčni signal zaznaven. Cikel, v katerem se to zgodi, označimo s C_T (threshold cycle) in je odvisen predvsem od začetne količine matrične DNA. Če imamo torej na začetku veliko količino matrične DNA, bo za dosego C_T potrebnih manj ciklov pomnoževanja, če pa imamo majhno količino matrične DNA, bomo dosegli C_T pri višjih ciklih.

3.5 Genotipizacija vzorcev z uporabo TaqMan tehnologije

Najprej smo izhodne DNA vzorce razredčili do ustrezone koncentracije $4 \mu\text{g}/\text{ml}$, ki jo predpisuje proizvajalec reagentov in aparature (Applied Biosystems). 65 Eppendorfovih epruvet z izhodnimi raztopinami je bilo na videz praznih, zato smo vanje dodali po $20 \mu\text{l}$ vode, da bi v njej raztoplili DNA, ki je morebiti ostala na steni epruvete. Teh raztopin ob pripravi na genotipizacijo seveda nismo ponovno redčili, saj je bila koncentracija morebiti prisotne DNA že tako nizka. To dodajanje vode v epruvete, kjer na videz ni bilo več raztopine DNA, se je izkazalo za smiselno, saj je genotipizacija uspela kar pri 56 vzorcih.

Najprej smo si pripravili ustrezone potrebščine in aparature, iz hladilnika smo prinesli DNA vzorce, iz zamrzovalnika pa Mastermix, TaqMan sonde in avtoklavirano ultračisto vodo, ter jih odmrznili. Vzorce smo na analizo pripravili v brezprašni komori. Najprej smo pripravili reakcijsko zmes: v Eppendorfovo epruveto smo odpipetirali $20 \mu\text{l}$ Mastermixa,

2,5 µl TaqMan sond in 32,5 µl avtoklavirane ultračiste vode, kar je zadostovalo za 10 vzorcev. Zmes smo dobro premešali na vorteksu. V stojalo smo si pripravili ustrezeno število v strip nanizanih Eppendorfovih epruvet, ki so namenjene za aparatom Abi Prism 7000. V vsako posamezno epruveto smo odpipetirali 5,5 µl prej pripravljene zmesi Mastermixa, sond in vode. V vsako epruveto smo dodali 4,5 µl posameznega DNA vzorca s koncentracijo 4 µg/ml, razen v vsako deseto epruveto, ki je predstavljala slepo raztopino in zato ni vsebovala DNA vzorca. Končni volumen v vsaki epruveti z DNA vzorcem je torej znašal 10 µl in je vseboval 2 µl Mastermixa, 0,25 µl TaqMan sond, 3,25 µl avtoklavirane ultračiste vode in 4,5 µl DNA vzorca. Tako pripravljene vzorce smo centrifugirali, odstranili morebitne zračne mehurčke, ki bi motili meritve, in epruvete vstavili v aparatom Abi Prism 7000.

Preglednica II: Reakcijska zmes za rt-PCR reakcijo.

Reagent	Količina [µl]
Mastermix	2,00
TaqMan sonde	0,25
Voda	3,25
DNA vzorec	4,50

3.6 Statistična analiza

Za statistično obdelavo naših rezultatov smo uporabili 2 x 5 Fisherjev natančni test neodvisnosti, Shapiro-Wilk test, ANOVA test, t-test za neodvisna vzorca s predvideno homogeno varianco in test multiple linearne regresije. Fisherjev natančni test neodvisnosti smo izvedli s pomočjo spletnega programa SISA (40), ostale teste pa s programom SPSS (IBM SPSS Statistics, version 21). Fisherjev natančni test neodvisnosti smo uporabili zato, da smo preverili, če je naša populacija v Hardy-Weinbergovem ravnotežju (HWE), Shapiro-Wilk test smo uporabili, da smo potrdili normalno porazdelitev aktivnosti TPMT v slovenski populaciji, ANOVA test smo uporabili, da smo preverili odvisnost aktivnosti TPMT od vseh treh genotipov rs13171357, in t-test za neodvisna vzorca s predvideno homogeno varianco zato, da smo preverili odvisnost aktivnosti TPMT od AG in GG.

genotipov rs13171357. Z multiplo linearno regresijo pa smo preverili, v kolikšni meri posamezne spremenljivke vplivajo na aktivnost TPMT.

3.6.1 Hardy-Weinbergovo ravnotežje

Hardy-Weinbergovo ravnotežje (tudi načelo, pravilo, zakon) je statistični test, ki se uporablja v populacijski genetiki. Leta 1908 sta ga predstavila angleški matematik Godfrey Harold Hardy in nemški zdravnik Wilhelm Weinberg. Model ima pet osnovnih predpostavk (41):

1. imamo veliko populacijo,
2. ni pretoka genov med populacijami, zaradi migracije ali prenosa gamet,
3. mutacije so zanemarljive,
4. posamezniki se naključno parijo,
5. naravna selekcija nima vpliva na populacijo.

Če torej veljajo te predpostavke, bosta genotip in alelna frekvenca v tej populaciji iz generacije v generacijo ostali nespremenjeni in za takšno populacijo pravimo, da je v HWE. Ta model lahko uporabimo tudi pri genotipu posameznega gena, kar smo storili v našem primeru.

HWE ima dve osnovni enačbi. S prvo izračunamo alelno frekvenco, ki velja za gen z dvema aleloma:

$$p + q = 1$$

z drugo enačbo pa izračunamo frekvenco genotipa:

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1.$$

Alelno frekvenco izračunamo po naslednjih enačbah:

$$f_A = \frac{n_A}{2N} \quad \text{in} \quad f_a = \frac{n_a}{2N}, \quad \text{kjer je}$$

f_A – frekvenca alela A v populaciji,

f_a – frekvenca alela a v populaciji,

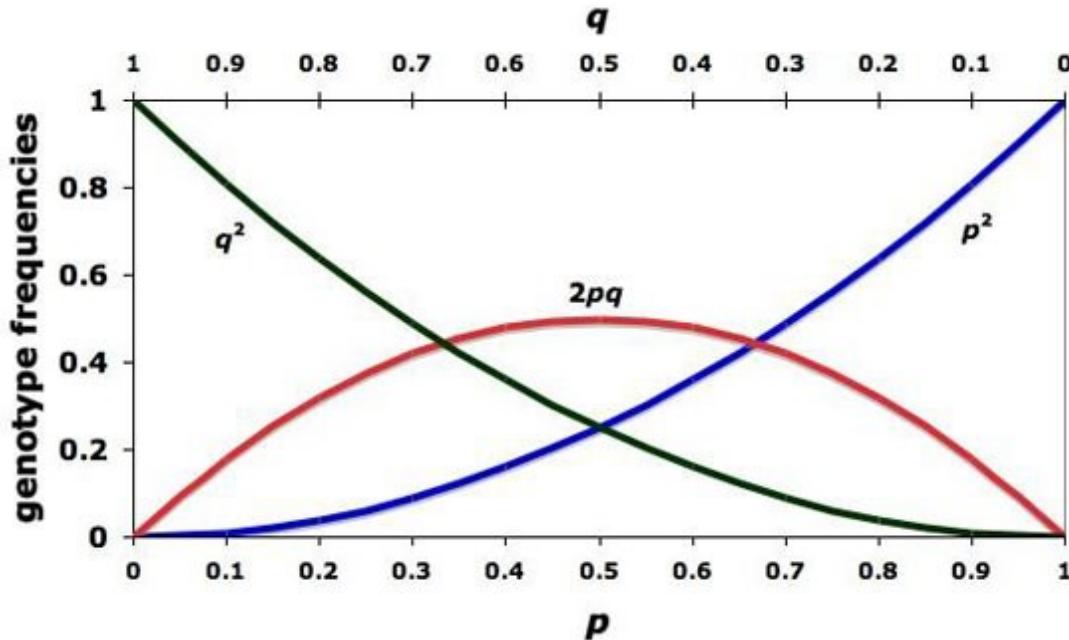
n_A – število alelov A med posamezniki z genotipom AA in AG ($n_A = 2n_{AA} + n_{Aa}$),

n_a – število alelov a med posamezniki z genotipom aa ($n_a = 2n_{aa} + n_{Aa}$)

N – število vseh preiskovancev.

V razširjeni obliki se enačbi torej glasita:

$$f_A = \frac{2n_{AA} + n_{Aa}}{2N} \quad \text{in} \quad f_a = \frac{2n_{aa} + n_{Aa}}{2N}$$



Slika 10: Hardy-Weinbergovo ravnotežje. Graf prikazuje frekvence alelov A in a na abscisi in frekvenco genotipov AA, Aa in aa na ordinati. V diploidnih organizmih ima nek lokus dva alela: npr. A in a, torej ima tri možne genotipe: AA, Aa in aa. Če rečemo, da je $p = A$ in $q = a$, lahko genotipsko frekvenco izračunamo s pomočjo enačbe $(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$ (41).

4 Rezultati in razprava

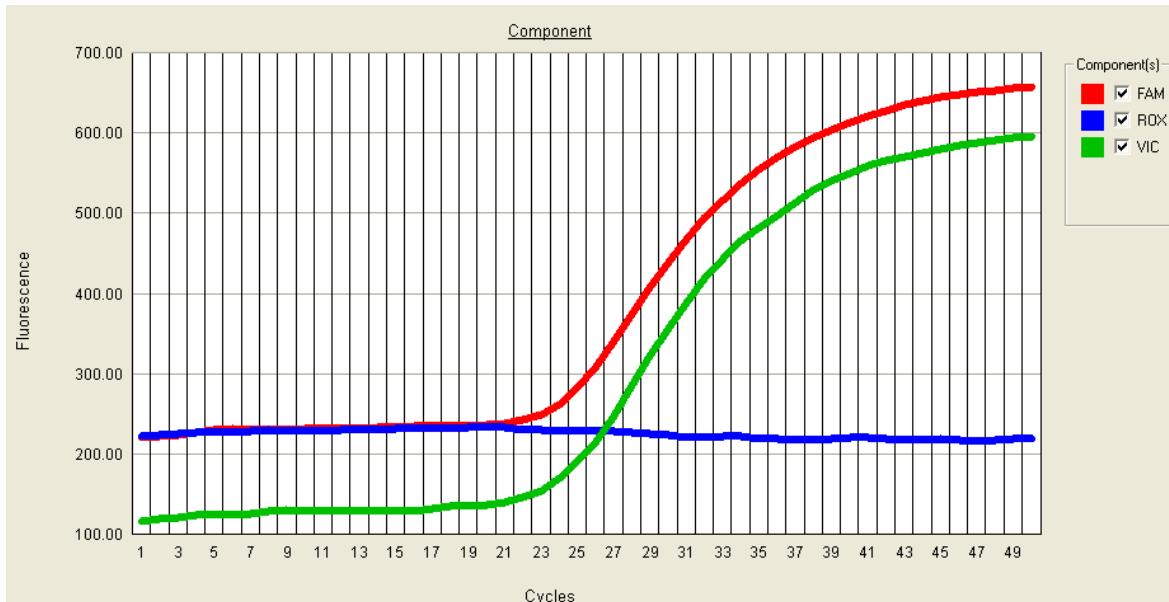
Izmed 194 genotipiziranih vzorcev je imelo 17 preiskovancev genotip AA, 83 genotip AG in 94 genotip GG. Frekvence genotipov rs13171357 v slovenski populaciji so torej za genotip AA 8,76%, za AG 42,78% za GG pa 48,46%. Te frekvence so v HWE.

Preglednica III: Frekvenci alelov A (f_A) in G (f_G) ter frekvence genotipov AA (f_{AA}), AG (f_{AG}) in GG (f_{GG}) za rs13171357 v populaciji zdravih Slovencev.

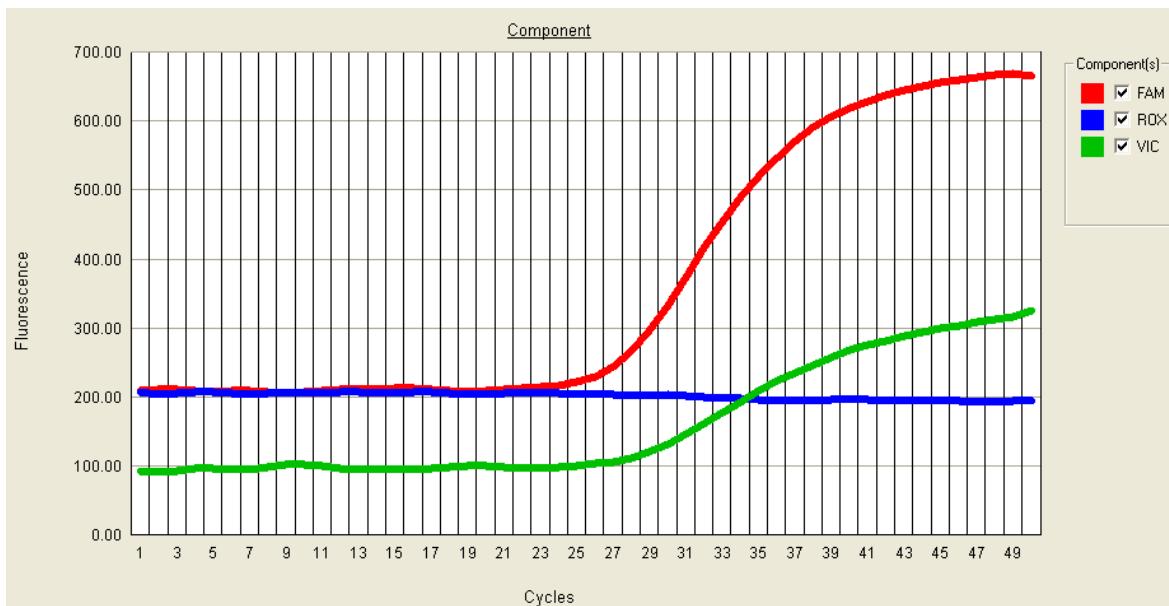
Frekvence alelov oz. genotipov rs13171357	f_A	f_G	f_{AA}	f_{AG}	f_{GG}
	30,2%	69,8%	8,76%	42,78%	48,46%

Za genotipizacijo smo uporabili dve sondi, ki sta se razlikovali v tem, da je bila ena komplementarna divjemu alelu rs13171357, druga pa mutiranemu. Prva se je torej vezala na zaporedje polimorfizma z bazo G (divji alel), druga pa na zaporedje polimorfizma z bazo A (mutiran alel). Ker je bila vsaka sonda označena z drugačnim barvilkom, smo za vsak DNA vzorec dobili graf s krivuljama VIC in FAM. VIC krivulja je prikazala fluorescenco sonde vezane na variantni alel A, FAM pa fluorescenco sonde vezane na variantni alel G. Vsak graf smo natančno preučili in na osnovi njega določili polimorfizem vzorca. Če je prešla v eksponentno fazo samo krivulja FAM, je šlo za genotip GG, če je prešla v eksponentno fazo samo krivulja VIC, smo določili genotip AA, če pa sta v eksponentno fazo prešli obe krivulji, je bil genotip vzorca AG (Slike 11 do 13). Kadar je bil rezultat dvoumen, smo vzorec ponovno analizirali (Sliki 14 in 15).

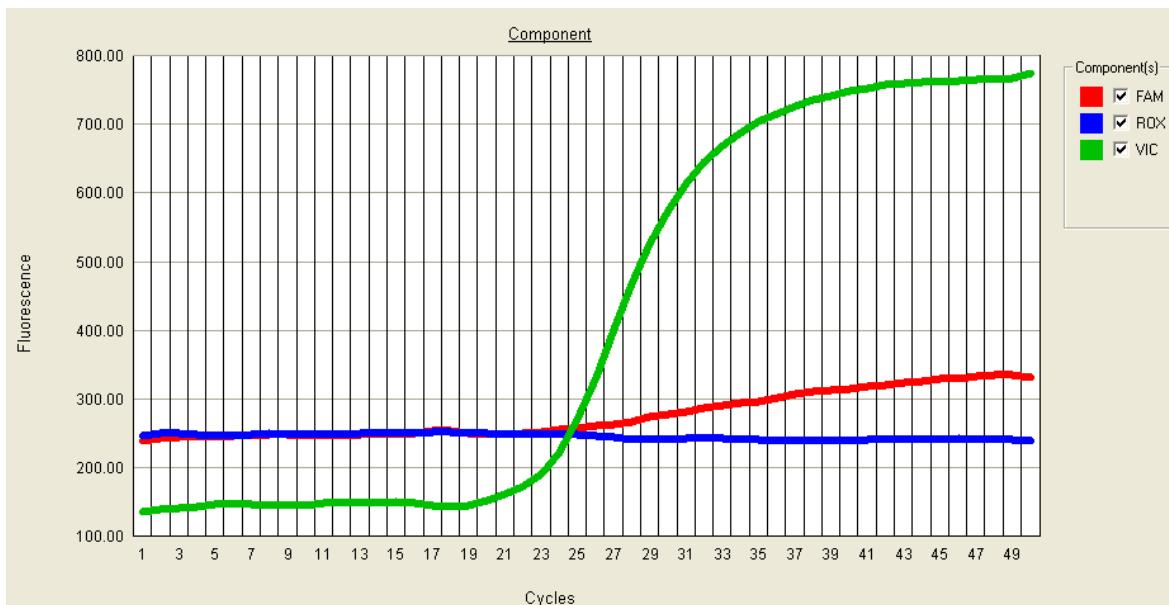
V vseh spodnjih grafih vidimo tudi krivuljo ROX, katere fluorescenza je čez celotno reakcijo enaka. Daje jo inertno referenčno barvilo, ki je bilo dodano zaradi normalizacije nihanj v fluorescenci, ki niso povezana z rt-PCR metodo in da bi dobili stabilno bazno linijo za rt-PCR.



Slika 11: Graf za vzorec 28 pri 50 ciklih. Ker sta prešli v eksponentno fazo obe krivulji, je genotip vzorca AG.

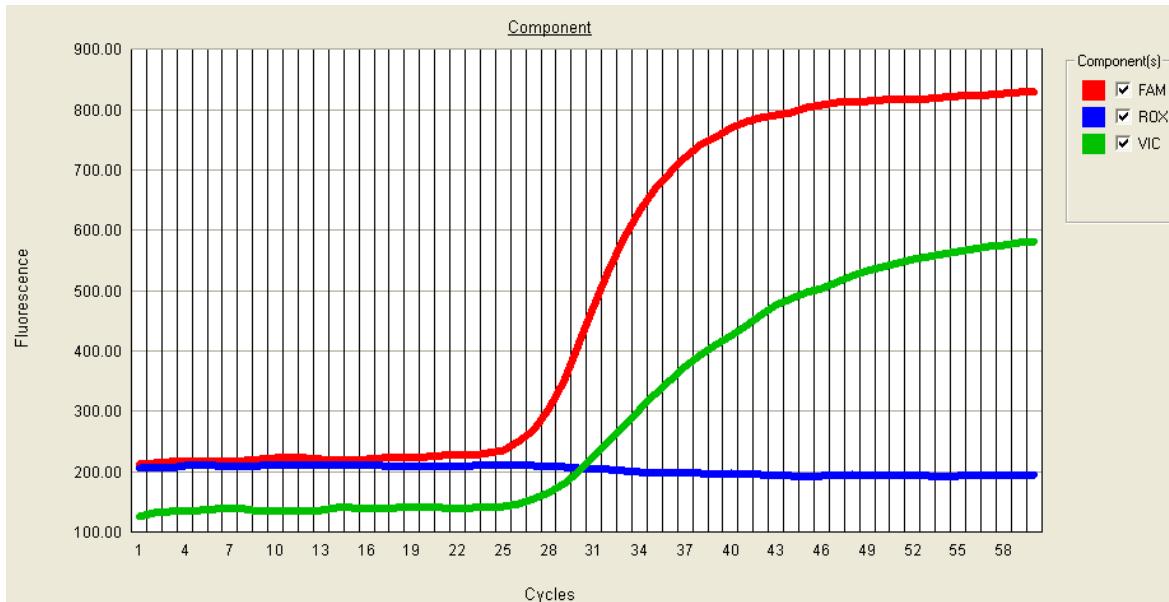


Slika 12: Graf za vzorec 160 pri 50 ciklih. Ker se je krivulja FAM dvignila do visoke fluorescence, krivulja VIC pa do nizke, je genotip vzorca GG. Dvig krivulje VIC nas pri interpretaciji rezultata ne moti, ker se je pričel kasneje kot pri krivulji FAM in ker bi se pri genotipu AG krivulji morali dvigovati vzporedno.

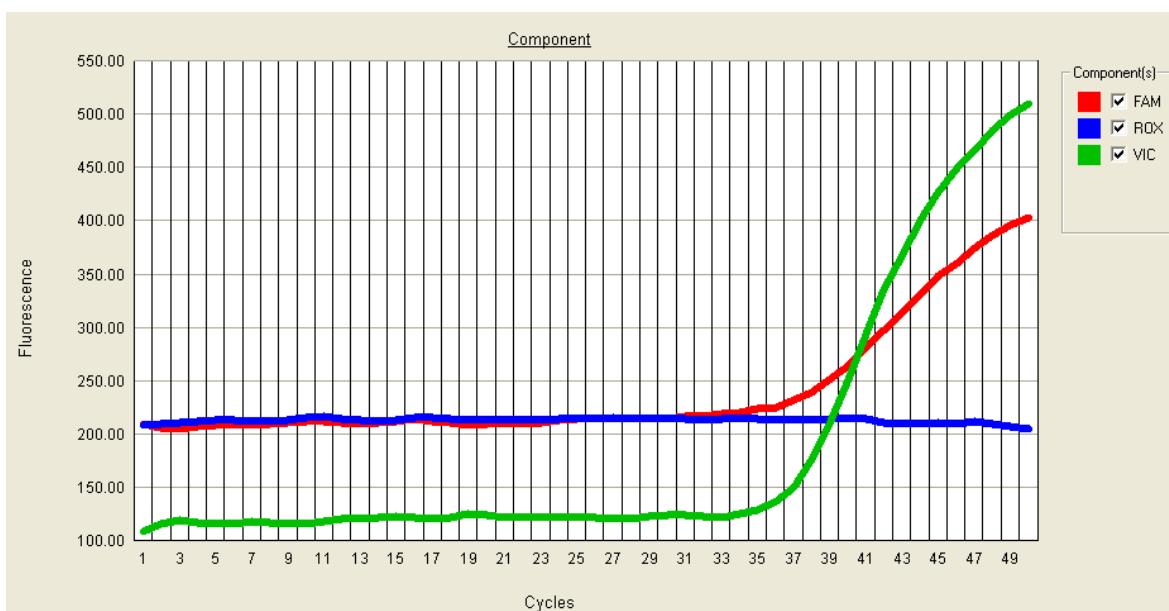


Slika 13: Graf za vzorec 48 pri 50 ciklih. Ker je prešla v eksponentno fazo samo krivulja VIC, je genotip vzorca AA.

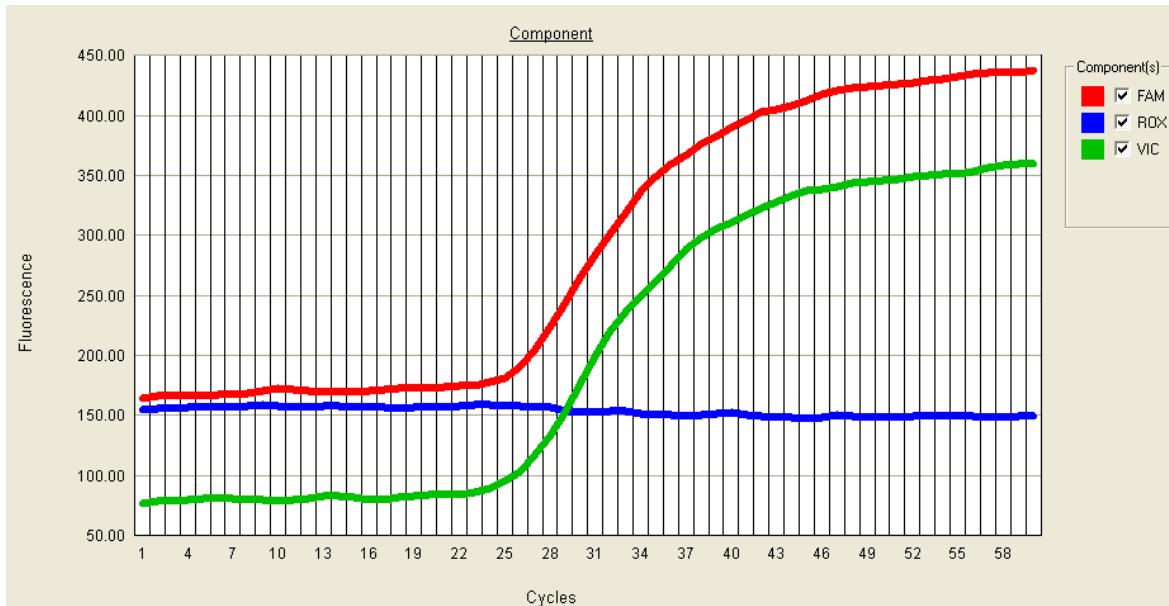
Za interpretacijo rezultatov je pomembna oblika krivulje. Če smo dobili krivuljo z dolgo bazno linijo in z zelo položnim eksponentnim delom, je to pomenilo, da smo imeli v našem vzorcu prenizko koncentracijo DNA in je zato prišlo do pomnoževanja šele pri višjem številu ciklov. Takšna krivulja nam ni dala zanesljivega rezultata, zato je bilo poskus potrebno ponoviti. Glede na značilnost našega vzorca smo ocenili ali bomo poskus ponovili pri enakih ali pri spremenjenih pogojih (npr. pri višjem številu ciklov pomnoževanja ali z višjo koncentracijo vzorca). Če pa krivulja sploh ni imela eksponentnega dela, je to pomenilo, da ni prišlo do pomnoževanja DNA, ker je bilo v vzorcu bodisi premalo DNA bodisi nič.



Slika 14: Graf za vzorec 156 pri 50 ciklih. To je primer nejasnega rezultata, saj smo v dvomu, če gre za GG ali AG genotip. Za genotip GG je krivulja VIC dvignjena do previsoke fluorescence, za genotip AG pa do prenizke glede na fluorescenco krivulje FAM. Potek krivulj pri genotipu AG mora biti vsaj približno vzporeden. V primeru takšnega rezultata smo vzorec analizirali ponovno, dokler nismo dobili nedvoumnega rezultata. Vzorcu 156 smo pri ponovni analizi pri 60 ciklih določili genotip GG.



Slika 15: Graf za vzorec 87 pri 50 ciklih. Glede na ta graf bi lahko predvidevali, da je genotip vzorca 87 AA. Ker se je krivulja VIC pričela dvigovati pozno in ker nas je motil previsok dvig krivulje FAM, smo analizo ponovili pri 60 ciklih. Rezultat ponovitve je prikazan na sliki 16.



Slika 16: Graf za vzorec 87 pri 60 ciklih. Na tem grafu lahko z gotovostjo določimo genotip AG. Ker sta se rezultata za isti vzorec pri 50 in 60 ciklih razlikovala, smo se odločili ponovno analizirati vzorce, ki so pri 50 ciklih dali dvoumen rezultat in katerih krivulje so se pričele dvigovati pozno. Tako kot vzorec 87 smo tudi te ponovili pri 60 ciklih.

Analizirali smo 204 vzorce DNA zdravih Slovencev, polimorfizem pa smo uspeli določiti na 194 vzorcih, kar predstavlja 95,1% vseh vzorcev. 175 vzorcev nam je uspelo genotipizirati v prvem poskusu, 19 vzorcev z eno ali večkratnimi ponovitvami, na 10 vzorcih pa nam genotipizacija žal ni uspela. Za vzorce, ki nam jih ni uspelo genotipizirati v prvem poskusu, smo analizo ponovili pri enakih pogojih ali pa prilagodili pripravo vzorca oz. metodo samo. Za ponovitev poskusa smo, enako kot pri prvem poskusu, uporabili redčitev vzorcev DNA s koncentracijo $4 \mu\text{g/ml}$, razen seveda pri izhodnih vzorcih, ki smo jim dodali vodo – teh nismo več dodatno redčili. Vse ponovitve smo izvedli pri 60 ciklih namesto pri 50, kot pri prvotnem poskusu. 16 vzorcev nam je uspelo genotipizirati s prvo ponovitvijo in enega z drugo. Pri vzorcih, ki jim na ta način nismo uspeli določiti polimorfizma, smo za analizo uporabili redčitev z višjo koncentracijo DNA. Kljub tem spremembam metode nam ni uspelo genotipizirati 10 vzorcev, med katerimi je bilo kar 9 takih, ki smo jim dodali vodo v prazno Eppendorfovo epruveto z izhodno DNA. V teh primerih na stenah epruvete očitno ni bilo več nobene molekule DNA, saj smo vse vzorce ponovili tolikokrat (enega izmed njih smo ponovili kar štirikrat), dokler smo imeli na razpolago dovolj velike količine vzorca.

4.1 Statistična obdelava podatkov

4.1.1 Izračun Hardy-Weinbergovega ravnotežja

Iz rezultatov genotipizacije rs13171357 naših 194 preiskovancev je razvidno, da ima 17 oseb genotip AA, 83 oseb genotip AG in 94 oseb genotip GG. Te podatke smo uporabili za izračun alelnih frekvenc in frekvenc genotipov, nato pa smo preverili, če je naša populacija v HWE.

Najprej smo izračunali frekvenci alelov A in G:

$$f_A = \frac{2n_{AA} + n_{AG}}{2N} = \frac{2 \times 17 + 83}{2 \times 194} = 0,302 = 30,2\%$$

$$f_G = \frac{2n_{GG} + n_{AG}}{2N} = \frac{2 \times 94 + 83}{2 \times 194} = 0,698 = 69,8\%$$

$$0,302 + 0,698 = 1$$

Na osnovi frekvenc alelov smo nato izračunali pričakovano stanje frekvenc genotipov s pomočjo enačbe:

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1,$$

kjer je p pričakovana frekvenca alela A in q pričakovana frekvenca alela G.

Vsek člen smo pomnožili še s številom vseh preiskovancev in dobili naše pričakovano stanje frekvenc genotipov:

$$f_{AA} = p^2 \times N = 0,302^2 \times 194 = 17,7$$

$$f_{AG} = 2pq \times N = 2 \times 0,302 \times 0,698 \times 194 = 81,8$$

$$f_{GG} = q^2 \times N = 0,698^2 \times 194 = 94,5$$

Preglednica IV: Opaženo in pričakovano stanje genotipov naših 194 preiskovancev.
Opaženo stanje so rezultati naših genotipizacij, pričakovano stanje pa smo izračunali s pomočjo enačbe HWE.

Genotip	Opaženo stanje	Pričakovano stanje
AA	17	17,7
AG	83	81,8
GG	94	94,5

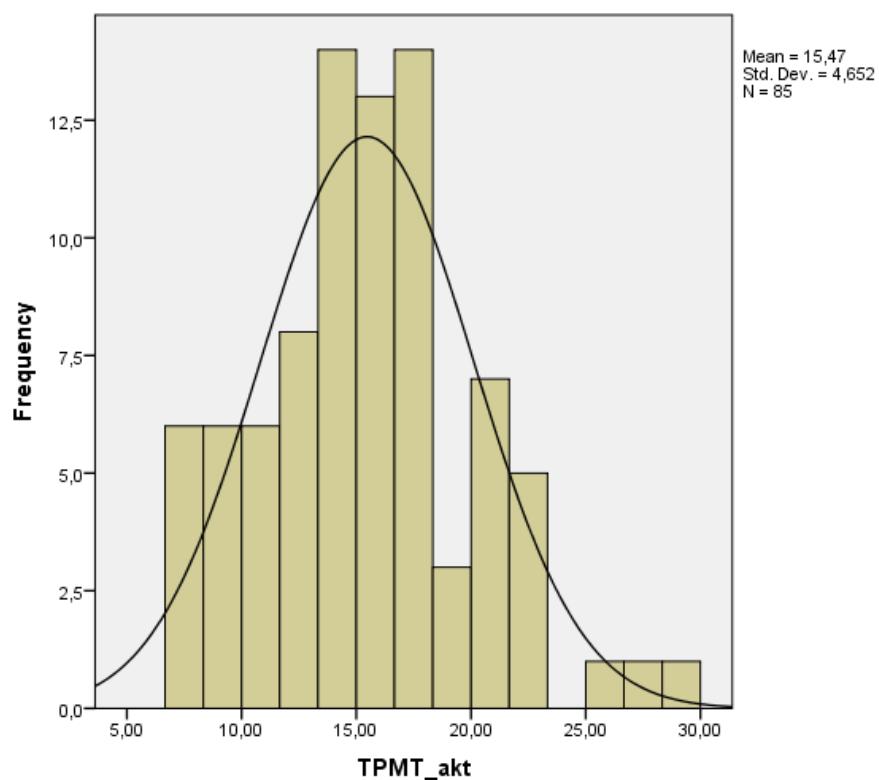
Uporabili smo 2×5 Fisherjev natančni test neodvisnosti, da bi preverili ali so razlike med opazovanimi in pričakovanimi frekvencami genotipov statistično značilno različne oz.

če je naša populacija v HWE. Rezultat testa je p-vrednost, ki znaša 0,24635. Ker je torej $p > 0,05$, so omenjene razlike statistično neznačilne, zato je naša populacija v HWE.

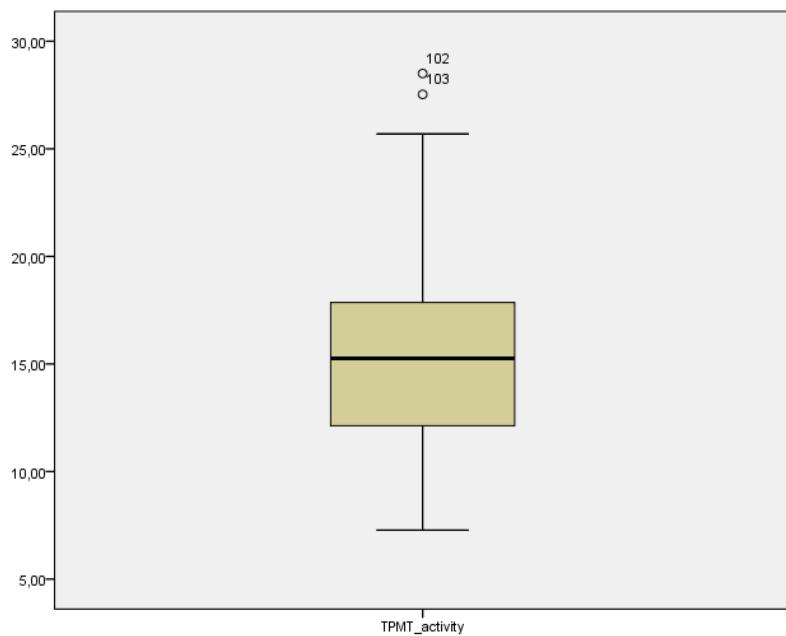
4.1.2 Porazdelitev aktivnosti TPMT v slovenski populaciji

Za namen naše raziskave smo za kontrolno skupino Slovencev, pri katerih smo določili polimorfizem rs13171357, potrebovali tudi podatke o aktivnosti TPMT. Le-ta je bila izmerjena z metodo HPLC za namen predhodne raziskave (34).

Porazdelitev aktivnosti TPMT v slovenski populaciji smo analizirali s Shapiro-Wilk testom, v katerega smo vključili 85 posameznikov. Ničelno hipotezo – da je aktivnosti TPMT v slovenski populaciji normalno porazdeljena – nismo zavrgli, ker je izračunana p-vrednost ($p = 0,117$) večja od 0,05. Ker gre za normalno porazdelitev, smo lahko za ugotavljanje vpliva rs13171357 na aktivnost TPMT uporabili parametrične teste, kot sta t-test za neodvisna vzorca in ANOVA (analiza variance).



Slika 17: Histogram prikazuje frekvence posameznih razredov aktivnosti TPMT. Vrednosti so v tej populaciji normalno porazdeljene, prisoten pa je pozitiven koeficient simetrije.



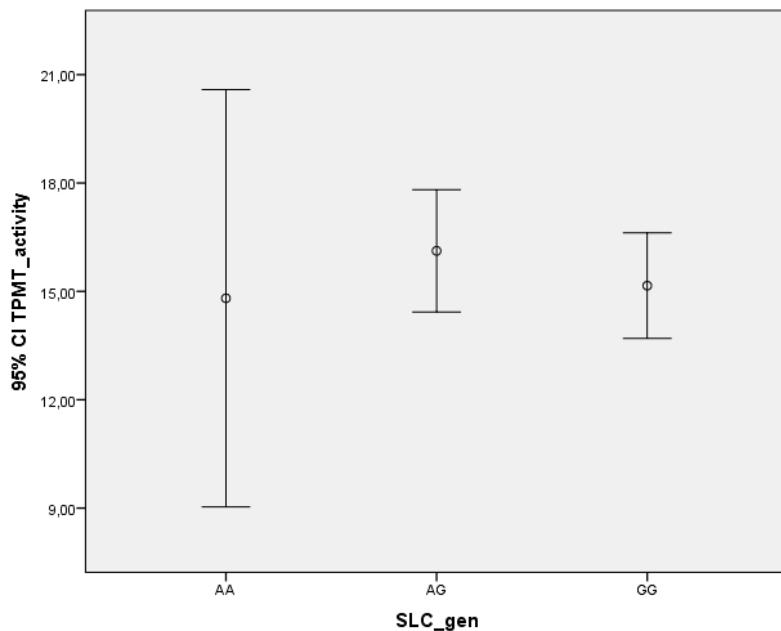
Slika 18: Kvartilni diagram za aktivnost TPMT. Minimum je pri vrednosti 7,28 nmol/g Hb/h, mediana/Q2 je 15,26 nmol/g Hb/h in maksimum 28,50 nmol/g Hb/h. Kvartilni razmik (Q3 – Q1) znaša 5,83 nmol/g Hb/h. Na grafu sta označena tudi dva osamelca: vzorca 102 (aktivnost 28,50 nmol/g Hb/h) in 103 (27,53 nmol/g Hb/h).

4.1.3 Vpliv polimorfizma rs13171357 na aktivnost TPMT

Ker je bil namen naše raziskave preveriti vpliv polimorfizma rs13171357 na aktivnost encima TPMT, smo te podatke primerjali s pomočjo statističnih testov. V teste smo vključili tako vzorce z nemutiranim kot tiste z mutiranim genotipom TPMT ($N = 78$). Najprej smo izvedli test ANOVA. V našem primeru smo tri različne genotipe rs13171357 (AA, AG in GG) primerjali glede na povprečno aktivnost TPMT znotraj posamezne skupine, da bi ugotovili, če katera izmed njih kaže nižjo oz. višjo aktivnost encima. Ker test ni pokazal značilne razlike v aktivnosti TPMT glede na genotipe rs13171357 ($p = 0,635$), smo prišli do zaključka, da polimorfizem rs13171357 ne vpliva na aktivnost TPMT v preiskovani populaciji.

Preglednica V: Podatki o povprečju aktivnosti TPMT za posamezen genotip rs13171357.

Genotip rs13171357	N	Povprečje aktivnosti TPMT [nmol/g Hb/h]	Standardna deviacija	Standardna napaka	95% interval zaupanja povprečja	
					Spodnja meja	Zgornja meja
AA	6	14,8083	5,50373	2,24689	9,0325	20,5841
AG	37	16,1222	5,07822	0,83485	14,4290	17,8153
GG	35	15,1583	4,25438	0,71912	13,6969	16,6197
skupaj	78	15,5886	4,72063	0,53451	14,5243	16,6529



Slika 19: Graf prikazuje povprečne vrednosti aktivnosti TPMT za vsak polimorfizem rs13171357. Daljice predstavljajo 95% intervale zaupanja, krogi na njih pa povprečne vrednosti aktivnosti TPMT za posamezen genotip. Povprečna vrednost aktivnosti TPMT za genotip AA je torej 14,8083 nmol/g Hb/h, za AG 16,1222 nmol/g Hb/h in za GG 15,1583 nmol/g Hb/h.

Nato smo izvedli še t-test za neodvisna vzorca s predvideno homogeno varianco, kjer smo povprečno aktivnost TPMT primerjali le med dvema skupinama: med posamezniki s polimorfizmom AG in polimorfizmom GG. Preiskovance z genotipom AA smo v tem testu zanemarili, ker jih je bilo samo šest. Najprej smo z Levenovim testom preverili homogenost varianc aktivnosti TPMT. Ničelna hipoteza tega testa je bila, da sta varianci

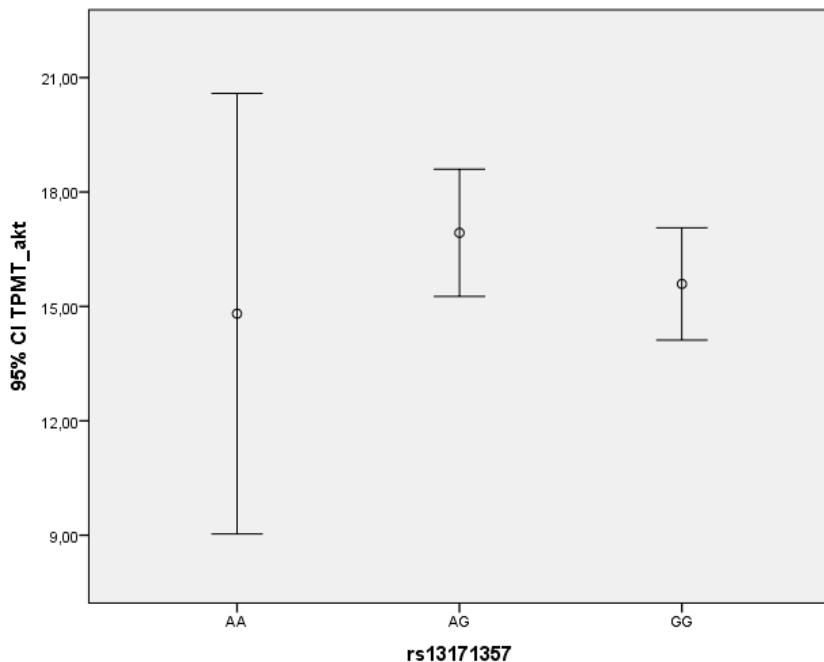
aktivnosti TPMT za genotip AG in GG enaki. Ker je bila naša p-vrednost 0,429, te hipoteze nismo mogli zavrniti in zato smo lahko izvedli t-test za neodvisna vzorca ob predvidevanju homogenosti varianc. Uporabili smo dvosmerni test (angl. two-tailed), saj je možno odstopanje od povprečja aktivnosti TPMT v obe smeri. Ničelna hipoteza t-testa je bila, da sta povprečji aktivnosti TPMT enaki. Ker je bila p-vrednost večja od 0,05 ($p = 0,387$), hipoteze nismo mogli zavreči, torej smo tudi tokrat ugotovili, da med preiskovanci z genotipom AG in GG ni značilne razlike v aktivnosti TPMT.

Pri naši raziskavi smo se še posebej osredotočili na primerjavo slovenske z estonsko populacijo, saj so Estonci izvedli GWAS študijo in z metodo genotipizacije z DNA čipi potrdili vpliv rs13171357 na aktivnost TPMT. Ugotovili smo, da se alelne frekvence rs13171357 slovenske populacije ne razlikujejo značilno od frekvenc estonskih (preglednica VII), nismo pa mogli potrditi vpliva genotipa rs13171357 na aktivnost TPMT. Morda so vzrok nam neznane razlike med Slovenci in Estonci, morda pa tudi prenizko število preiskovancev v naši raziskavi.

4.1.4 Vpliv polimorfizma rs13171357 na aktivnost TPMT ob upoštevanju genotipa TPMT

Genotip TPMT ima zelo visoko napovedno vrednost za aktivnost encima TPMT, zato ga pri ugotavljanju vpliva rs13171357 na aktivnost TPMT ne moremo zanemariti. Zaradi tega smo preverili, ali ima rs13171357 vpliv na aktivnost TPMT znotraj različnih genotipskih skupin za TPMT. Genotip TPMT je bil določen z metodo PCR-RFLP za namen predhodne študije (34). Ker smo imeli premajhno število vzorcev z mutiranim genotipom TPMT (sedem vzorcev), smo izvedli test ANOVA samo s tistimi vzorci, ki so imeli divji genotip TPMT ($N = 71$). Ta analiza je dala podobne rezultate kot predhodna, v katero smo vključili tudi vzorce z mutirano TPMT, tj. da genotip rs13171357 ne vpliva na aktivnost TPMT ($p = 0,369$).

Nadalje nas je zanimalo, če morda obstaja korelacija med genotipom rs13171357 in aktivnostjo TPMT samo pri vzorcih z mutiranim genotipom TPMT. Ker je bilo za analizo primernih vzorcev samo sedem, smo jih analizirali le informativno. Izvedli smo t-test za neodvisna vzorca, saj so izmed teh sedmih vzorcev imeli štirje genotip rs13171357 AG in trije genotip GG. Tudi tu smo izvedli dvosmerni test in predvidevali homogenost varianc aktivnosti TPMT. Ta test ravno tako ni pokazal značilne razlike v aktivnosti TPMT med posamezniki z genotipom AG in GG ($p = 0,670$).



Slika 20: Graf prikazuje povprečne vrednosti aktivnosti TPMT za vsak polimorfizem rs13171357. Vključeni so samo vzorci z divjim genotipom TPMT. Povprečna aktivnost TPMT za genotip AA znaša 14,8083 nmol/g Hb/h, za genotip AG 16,9297 nmol/g Hb/h, za genotip GG pa 15,5881 nmol/g Hb/h.

4.1.5 Ugotovitve multiple linearne regresije

Multipla linearna regresija nam omogoča ugotavljanje vpliva neodvisne spremenljivke ali spremenljivk na odvisno spremenljivko, ob upoštevanju sovpliva vseh neodvisnih spremenljivk v modelu. S pomočjo multiple linearne regresije smo preverili, v kolikšni meri na aktivnost TPMT vplivajo genotip TPMT, spol in starost preiskovancev ter genotip rs13171357. Ker ima rs13171357 tri možne genotipe, ki spadajo pod kategorične podatke, smo morali uporabiti neprave (angl. dummy) spremenljivke, pri čemer smo za referenčnega določili genotip AA. Naš model ni bil najboljši, saj smo imeli premajhno število preiskovancev ($N= 74$). Gledali smo vrednosti prilagojenih (angl. adjusted) R^2 , ki nam povedo, kolikšen delež variabilnosti aktivnosti TPMT razložijo določene spremenljivke. Tako nam genotip TPMT razloži 13,4% variabilnosti aktivnosti TPMT, genotip TPMT skupaj s spolom in starostjo preiskovancev prispeva k 19,5% variabilnosti aktivnosti TPMT, ko pa tem spremenljivkam dodamo še genotip rs13171357, se vpliv na variabilnost aktivnosti TPMT nekoliko zniža, tj. na 17,8%.

Ti rezultati potrjujejo dejstvo, da na aktivnost TPMT značilno vplivajo genotip TPMT, spol (moški imajo višjo aktivnost TPMT od žensk) in starost (otroci imajo višjo aktivnost od odraslih); ker pa so vsi naši preiskovanci stari med 20 in 31 let, je prispevek starosti v modelu minimalen. Tudi model linearne multiple regresije ni pokazal statistično značilnega vpliva rs13171357 na aktivnost TPMT (genotip rs13171357 AG ima $p = 0,542$, genotip GG pa $p = 0,712$).

Preglednica VI: Spremenljivke v modelu multiple linearne regresije za napovedovanje aktivnosti TPMT. Nestandardizirani koeficient B pove, za koliko se spremeni aktivnost TPMT merjena v nmol/g Hb/h, če povečamo posamezno odvisno spremenljivko za eno enoto, standardizirani koeficient β pa za koliko standardnih odklonov aktivnosti TPMT se spremeni aktivnost TPMT, če povečamo posamezno odvisno spremenljivko za vrednost njenega standardnega odklona. Prednost standardiziranih koeficientov β je v tem, da za primerjavo vpliva na odvisno spremenljivko ne potrebujejo enot in tako nazorneje prikažejo njihov vpliv.

Model	Nestandardizirani koeficient B	95% interval zaupanja za B	Standardizirani koeficient β	p vrednost
TPMT genotip (divji tip vs. mutiran)	-5,333	-8,764 – -1,901	-0,339	0,003
Spol	-2,533	-4,572 – -0,495	-0,271	0,016
Starost [leta]	-0,177	-0,755 – 0,400	-0,065	0,542
rs13171357 genotip AG	1,209	-2,557 – 4,975	0,130	0,542
rs13171357 genotip GG	0,692	-3,032 – 4,415	0,075	0,712

4.1.6 Primerjava naše populacije z drugimi

Podatke o polimorfizmu rs13171357 v populacijah po svetu smo pridobili iz dveh podatkovnih baz (NCBI - National Center for Biotechnology Information (42) in Ensembl (43)) in jih uporabili za primerjavo z našimi rezultati genotipizacije slovenske populacije. Polimorfizme teh populacij smo primerjali s slovensko populacijo z 2×5 Fisherjevim natančnim testom neodvisnosti. Za ta test smo potrebovali število alelov A in G, ki smo ju izračunali iz števila preiskovancev in alelne frekvence alelov A in G. S Fisherjevim natančnim testom neodvisnosti smo nato primerjali število alelov A in G v slovenski populaciji s številom alelov v ostalih populacijah. Rezultat testa je p-vrednost, ki jo moramo primerjati z vrednostjo 0,05. Velja namreč, da če je $p > 0,05$, med populacijama

ni značilne razlike, če pa je $p < 0,05$ pa velja obratno, torej da med populacijama je značilna razlika.

Ko smo slovensko populacijo primerjali s populacijami, za katere smo podatke pridobili na NCBI, smo ugotovili, da se le-ta glede na genotip rs13171357 značilno razlikuje le od zahodnoafriške populacije (Preglednica VII). Statistična primerjava s populacijami iz baze Ensembl pa je značilno razliko pokazala z afriškimi populacijami (izjema so Kenijci, ki pa so na meji) ter s Portoričani in z Mehici na Los Angelesu (Preglednica VIII).

Preglednica VII: Podatki iz baze NCBI za genotip rs13171357 v različnih populacijah in p-vrednosti za alelne frekvence teh populacij v primerjavi s slovensko, izračunane z 2 x 5 Fisherjevim natančnim testom neodvisnosti.

Populacija	Število alelov	f_A	f_G	Število alelov A	Število alelov G	p glede na Slovence
Slovenci	388	0,302	0,698	117	271	/
Estonci	1586	0,34	0,66	539	1047	0,20583
Severni Američani	120	0,225	0,775	27	93	0,0817
Vzhodnoazijci	120	0,283	0,717	34	86	0,73307
Zahodni Afričani	118	0,051	0,949	6	112	0

Preglednica VIII: Podatki iz baze Ensembl za genotip rs13171357 v različnih populacijah in p-vrednosti za alelne frekvence teh populacij v primerjavi s slovensko, izračunane z 2 x 5 Fisherjevim natančnim testom neodvisnosti.

Populacija	f_A	f_G	f_{AA}	f_{AG}	f_{GG}	Število alelov	p glede na Slovence
Slovenci	0,302	0,698	0,091	0,421	0,488	117(A) 271(G)	/
EVROPEJCI	0,278	0,722	0,077	0,404	0,520	211(A) 547(G)	0,40842
Prebivalci Utaha z evropskim poreklom	0,265	0,735	0,082	0,365	0,553	45(A) 125(G)	0,41807
Finci	0,328	0,672	0,097	0,462	0,441	61(A) 125(G)	0,56313

Britanci	0,270	0,730	0,101	0,337	0,562	48(A) 130(G)	0,48599
Španci	0,250	0,750	/	0,500	0,500	7(A) 21(G)	0,52237
Italijani iz Toskane	0,255	0,745	0,041	0,429	0,531	50(A) 146(G)	0,24664
AMERIČANI	0,414	0,586	0,171	0,486	0,343	150(A) 212(G)	0,00136
Kolumbijci	0,342	0,658	0,133	0,417	0,450	41(A) 79(G)	0,43037
Mehičani iz Los Angelesa	0,447	0,553	0,167	0,561	0,273	59(A) 73(G)	0,00284
Portoričani	0,455	0,545	0,218	0,473	0,309	50(A) 60(G)	0,00407
VZHODNOAZIJCI	0,322	0,678	0,115	0,413	0,472	184(A) 388(G)	0,52414
Han Kitajci iz Pekinga	0,289	0,711	0,082	0,412	0,505	56(A) 138(G)	0,77360
Južni Han Kitajci	0,345	0,655	0,140	0,410	0,450	69(A) 131(G)	0,30365
Japonci iz Tokija	0,331	0,669	0,124	0,416	0,461	59(A) 119(G)	0,49440
AFRIČANI	0,132	0,868	0,020	0,224	0,756	65(A) 427(G)	0
Američani afriškega porekla	0,148	0,852	0,016	0,262	0,721	18(A) 104(G)	0,00061
Kenijci	0,191	0,809	0,031	0,320	0,649	37(A) 157(G)	0,00514
Nigerijci	0,057	0,943	0,011	0,091	0,898	10(A) 166(G)	0

5 Sklep

V naši raziskavi smo preučevali polimorfizem rs13171357 kot potencialni farmakogenetski marker za terapijo s tiopurini v zdravi slovenski populaciji. Zanimalo nas je, če je polimorfizem rs13171357 v HWE ter če so frekvence alelov naše populacije primerljive s frekvencami populacij po svetu. Zanimalo nas je tudi, če ima genotip rs13171357 vpliv na aktivnost encima TPMT. Uspešno smo genotipizirali 194 vzorcev, kar predstavlja 95,1% od vseh analiziranih vzorcev iz kontrolne skupine.

Ugotovili smo sledeče:

- ❖ Frekvence genotipov rs13171357 v slovenski populaciji so: AA 8,76%, AG 42,78%, GG 48,46%.
- ❖ Frekvence genotipov rs13171357 naše populacije smo primerjali s frekvencami ostalih populacij. Podatke zanje smo pridobili iz baz NCBI in Ensembl. Ugotovili smo, da se naše frekvence od večine svetovnih populacij ne razlikujejo značilno; izjeme so Portoričani, Mehičani iz Los Angeleza, zahodnoafriške populacije in afriške populacije (izjema so Kenijci, ki so na meji).
- ❖ Polimorfizem rs13171357 v slovenski populaciji je v HWE ravnotežju ($p = 0,24635$).
- ❖ Polimorfizem rs13171357 ne vpliva na aktivnost TPMT ($p = 0,635$). To velja tako za vzorce z divjim genotipom TPMT kot za tiste z mutiranim.

5.1 Nadaljnje raziskave

Težava naše raziskave je bila v tem, da je imelo le 78 analiziranih vzorcev hkrati določen polimorfizem rs13171357 in aktivnost TPMT. Zaradi premajhne populacije ne moremo zagotovo trditi, da genotip rs13171357 ne vpliva na aktivnost TPMT. Da bomo lahko potrdili oz. ovrgli vpliv genotipa rs13171357 na aktivnost TPMT, bo v prihodnosti treba določiti ta polimorfizem na večji populaciji zdravih Slovencev. Določiti ga bo potrebno tudi pri bolnikih z akutno limfoblastno levkemijo, ki so prejemali tiopurinsko terapijo, da bomo lahko ugotovili, če ima ta polimorfizem morda vpliv na stranske učinke pri terapiji s tiopurini. Potrebna je tudi študija na celičnih linijah, ki bo morda povedala kaj več o mehanizmu delovanja TPMT v odvisnosti od genotipa rs13171357.

6 Literatura

1. Kambiz Fotoohi A, Coulthard SA, Albertoni F: Thiopurines: Factors influencing toxicity and response. *Biomedical Pharmacology* 2010; 79: 1211 – 1220.
2. Duffy MJ, Crown J: A personalized approach to cancer treatment: how biomarkers can help. *Clin Chem* 2008, 54(11): 1770-9.
3. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ: *Rang and Dale's Pharmacology*. 6. Izdaja, Churchill Livingstone, Edinburg, 2007: 731-732.
4. Avčin S, Prelog T, Kavčič M, Kitanovski L, Anžič J, Benedik Dolničar M, Rajič V, Zadravec Zaletel L, Debeljak M, Jazbec J: History of treatment and long-term outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia in Slovenia. *Memo* 2011; 4: 178–183.
5. Lorbek G: Ugotavljanje vpliva S-adenozilmethionina na aktivnost tiopurin-S-metiltransferaze v eritrocitih zdravih preiskovancev, diplomska naloga na UL FFA, Ljubljana 2010.
6. Centralna baza zdravil, (Imuran®, Lanvis®, Puri-Nethol®) URL: [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/Search/\\$searchForm?SearchView](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/Search/$searchForm?SearchView), nazadnje dostopano 4. 4. 2014.
7. Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ, Schmiegelow K, Pui CH, Yee SW, Stein CM, Carrillo M, Evans WE, Klein TE: Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for Thiopurine Methyltransferase Genotype and Thiopurine Dosing. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2011; 89 (3): 387 – 391.
8. Vora A, Mitchell CD, Lennard L, Kinsey SE, Lilleyman J, Richards SM: Toxicity and efficacy of 6-thioguanine versus 6-mercaptopurine in childhood lymphoblastic leukaemia: a randomised trial. *Lancet* 2006; 368: 1339–48.
9. Benkov K, Lu Y, Patel A, Rahhal R, Russell G, Teitelbaum J: Role of Thiopurine Metabolite Testing and Thiopurine Methyltransferase Determination in Pediatric IBD. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2013; 56 (3): 333 – 340.
10. Sahasranaman S, Howard D, Roy S: Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines. *Eur J Clin Pharmacol* 2008; 64:753–767.
11. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1988. Nobelprize.org, The Official Web Site of the Nobel Prize. URL: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1988/, nazadnje dostopano 17. 3. 2014.

12. Elion GB: The purine path to chemotherapy. *Bioscience Reports* 1989; 9(5): 513.
13. Maltzman JS, Koretzky GA: Azathioprine: old drug, new actions. *Journal of Clinical Investigation* 2003, 111 (8); 1122-1124.
14. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Some antineoplastic and immunosuppressive agents, WHO IARC 1981; volume 26: 47-67.
15. Karim H, Ghalali A, Lafolie P, Vitols S, Fotoohi AK: Differential role of thiopurine methyltransferase in the cytotoxic effects of 6-mercaptopurine and 6-thioguanine on human leukemia cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2013; 437: 280–286.
16. Lennard L: Implementation of TPMT testing. *BJCP*, doi: 10.1111/bcp.12226.
17. RCSB Protein Data Bank. Crystal Structure of Thiopurine S-methyltransferase. URL: <http://www.pdb.org/pdb/results/results.do?qrId=AE3CD084&tabtoshow=Current>, nazadnje dostopano 7. 2. 2014.
18. OMIM®, Online Mendelian Inheritance in Man, (Thiopurine S-methyltransferase, *187680). URL: <http://omim.org/entry/187680>, nazadnje dostopano 6. 2. 2014.
19. Wu H, Horton JR, Battaile K, Allali-Hassani A, Martin F, Zeng H, Loppnau P, Vedadi M, Bochkarev A, Plotnikov AN, Chen X: Structural Basis of Allele Variation of Human Thiopurine-S-Methyltransferase. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 2007; 67:198–208.
20. Karas Kuželički N, Jazbec J, Milek M, Mlinarič Raščan I: Heterozygosity at the TPMT gene locus, augmented by mutated MTHFR gene, predisposes to 6-MP related toxicities in childhood ALL patients. *Leukemia* 2009; 23: 971–974.
21. Milek M, Šmid A, Tamm R, Karas Kuželički N, Metspalu A, Mlinarič Raščan I: Post-translational stabilization of thiopurine S-methyltransferase by S-adenosyl-L-methionine reveals regulation of TPMT*1 and *3C allozymes. *Biochemical Pharmacology* 2012; 83: 969-976.
22. Thompson AJ, Newman WG, Elliott RA, Roberts SA, Tricker K, Payne K: The Cost-Effectiveness of a Pharmacogenetic Test: A Trial-Based Evaluation of TPMT Genotyping for Azathioprine. *Value in Health* 2014; 17 (1): 22–33.
23. Booth RA, Ansari MT, Loit E, Tricco AC, Weeks L, Doucette S, Skidmore B, Sears M, Sy R, Karsh J: Assessment of Thiopurine S-Methyltransferase Activity in Patients Prescribed Thiopurines: A Systematic Review. *Ann Intern Med.* 2011; 154: 814-823.

24. Karas Kuželički N, Mlinarič Raščan I: Individualization of thiopurine therapy; thiopurine S-methyltransferase and beyond. *Pharmacogenomics* 2009; 10: 1309-1322.
25. Egmond R van, Chin P, Zhang M, Sies CW, Barclay ML: High TPMT enzyme activity does not explain drug resistance due to preferential 6-methylmercaptopurine production in patients on thiopurine treatment. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2012; 35: 1181-1189.
26. Hindorf U, Appell ML: Genotyping should be considered the primary choice for pre-treatment evaluation of thiopurine methyltranferase function. *Journal of Chron's and Colitis* 2012; 6: 655-659.
27. Schaeffeler E, Fischer C, Brockmeier D, Wernet D, Moerike K, Eichelbaum M, Zanger UM, Schwab M: Comprehensive analysis of thiopurine S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in a large population of German-Caucasians and identification of novel TPMT variants. *Pharmacogenetics* 2004; 14 (7): 407-417.
28. Bottiglieri T, S-adenosil-L-methionine (SAMe): from the bench to the bedside – molecular basisi of a pleiotrophic molecule. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2002; 76: 1151S- 7S.
29. Milek M, Karas Kuželički N, Šmid A, Mlinarič Raščan I: S-adenosylmethionine regulates thiopurine methyltransferase activity and decreases 6-mercaptopurine cytotoxicity in MOLT lymphoblasts. *Biochemical Pharmacology* 2009; 77: 1845 – 1853.
30. Kanai Y, Hediger MA: The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 2004; 447:469–479.
31. OMIM®, Online Mendelian Inheritance in Man, (Solute Carrier Family 1 (Glial High Affinity Glutamate Transporter), Member 3, SLC1A3, *600111). URL: <http://omim.org/entry/600111>, nazadnje dostopano 29. 1. 2014.
32. International HapMap Project (rs13171357). URL: http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/gbrowse/hapmap3r3_B36/#search, nazadnje dostopano 6. 2. 2014.
33. Manolio TA: Genomewide Association Studies and Assessment of the Risk of Disease. *N Engl J Med* 2010; 363: 166-76.

34. Milek M, Murn J, Jakšić Ž, Lukač Bajalo J, Jazbec J, Mlinarič Raščan I. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: genotype to phenotype, correlation in the Slovenian population. *Pharmacology* 2006; 77 (3): 105-114.
35. Hevir N: Ugotavljanje pogostosti alelov tiopurin-6-metiltransferaze pri levkemičnih bolnikih. Diplomska naloga, Ljubljana 2006.
36. Borut Štrukelj, Janko Kos, *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*. Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo, 2007: 56-57.
37. Grof A: Polimorfizem rs2364723 v genu za Nrf2: potencialni farmakogenetski označevalec pri terapiji s 6-merkaptopurinom, Ljubljana 2013: 25-26.
38. Real-Time PCR, Applications Guide. Bio-Rad Laboratories 2006: 12. URL: <http://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-guide-bio-rad.pdf>, nazadnje dostopano 7. 2. 2014.
39. DNA Vision, TaqMan Assays. URL: <http://www.dnavision.com/taqman-genotyping-assays.php>, nazadnje dostopano 7. 2. 2014.
40. Simple Interactive Statistical Analysis. URL: <http://www.quantitativeskills.com/sisa/>, nazadnje dostopano 7. 2. 2014.
41. Andrews CA: The Hardy-Weinberg Principle. *Nature Education Knowledge*; 3 (10): 65.
42. NCBI, National Center for Biotechnology Information, (SNP, rs13171357). URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=13171357, nazadnje dostopano 5. 1. 2014.
43. Ensemble, Population genetics, rs13171357 SNP. URL: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=5:36694556-36695556;v=rs13171357;vdb=variation;vf=9387805#_, nazadnje dostopano 5. 1. 2014.

7 Priloge

Preglednica IX: Podatki o analiziranih DNA vzorcih: spol, starost, polimorfizem rs13171357, TPMT genotip in aktivnost TPMT. Prazna polja pri spolu, starosti, TPMT genotipu in aktivnosti pomenijo, da nimamo podatkov. Okrajšave: wt - divji tip TPMT, mt - mutiran TPMT genotip.

vzorec	opomba	spol	Starost [leta]	rs13171357 genotip	TPMT genotip	TPMT aktivnost [nmol/g Hb/h]
2				GG		
3				GG		
4				AG		
5				GG		
6				GG		
7				GG		
8				GG		
9				AG		
10				GG		
11				AA		
12				GG		
13				GG		
14				AA		
15				GG		
16				AA		
17				GG		
18				AG		
19				AG		
20				GG		
21				AG		
22				AG		
23				GG		
24				AG		
26				GG		
27				GG		

28				AG		
29				AA		
30				GG		
31				AG		
32				AG		
33				AG		
34				AG		
35				GG		
36				GG		
37				AG		
38				AG		
39				GG		
40				AG		
42				GG		
43				GG		
44				AG		
45				GG		
46				GG		
47				AG		
48				AA		
49				AG		
50				GG		
51				AA		
52				GG		
53				AG		
54				GG		
55				AG		
56				GG		
57				GG		
58				GG		
59				AG		
60				AG		

61				GG		
62				GG		
63				GG		
64				AG		
65				GG		
66				GG		
67				AG		
68				AG		
69				AG		
70				GG		
71				AG		
72				GG		
74				AA		
75				GG		
76				AG		
77				AG		
78				GG		
79	ni uspel					
80				AA		
81	zmanjkalo					
82				AG		
83				GG		
84	zmanjkalo					
85				AG		
86				AG		
87				AG		
88				GG		
89				GG		
90				AA		
91	zmanjkalo					
92		Ž	21	GG	wt	22,64
93				AG		

94		M	21	GG	wt	15,67
95		Ž	21	AG	wt	17,84
96		M	21	GG	wt	22,61
97		M	21	GG	wt	13,33
98				AG		
99		M	21	AG	wt	15,72
100		Ž	21	AG	mt	8,2
101		M	21	GG	wt	21,17
102		M	20	AG	wt	28,5
103		M	21	AG	wt	27,53
104		Ž	21	GG	mt	7,87
105		Ž	22	GG	mt	8,84
106		Ž	21	AG	mt	7,74
108		M	22	GG	wt	22,33
109		Ž	21	GG	wt	17,34
110		M	23	GG	wt	17,86
111		Ž	21	AG	wt	17,05
112	zmanjkalo	Ž	24		wt	14,47
113	zmanjkalo					
114		M	21	AA	wt	21,02
116		M	21	GG	wt	15,57
117		M	21	GG	wt	12,14
118		M	21	AG	wt	14,22
119		M	21	GG	wt	21,62
120		M	21	AG	wt	15,38
121	zmanjkalo	Ž	21		mt	9,82
122		Ž	21	GG	wt	13,73
123		Ž	21	AA	wt	8,23
125		Ž	21	GG	wt	15,26
126		Ž	21	GG	wt	11,91
127		Ž	21	GG	wt	11,64
128		Ž	21	GG	wt	13,69

129		Ž	22	AG	wt	12
130				GG		
131				GG		
132				AG		
134				GG		
135				AG		
136				AG		
137				AA		
138				GG		
139				GG		
140				AG		
141				GG		
142				GG		
144				GG		
145				GG		
146				GG		
147				AG		
148				GG		
149				AG		
151		Ž	20	GG	wt	12,13
152		Ž	21	GG	wt	19,44
153		Ž	21	GG	wt	14,21
154				AG	wt	13,52
155		Ž		AG	wt	21,08
156		Ž	21	GG	wt	15,89
157				AA		
158		Ž	21	AG	wt	13,6
159		M	22	AG	wt	22,06
160		Ž	22	GG	wt	17,84
161		Ž	24	AG	wt	16,45
162		Ž	22	GG	wt	16,55
163	zmanjkalo	Ž	22		wt	20,28

164	zmanjkalo	M	22		wt	18,18
165		M		AG	wt	17,76
166		M		AG	wt	25,69
167				AG		
168				AG		
169				GG		
170				GG		
171				AG		
172				GG		
173				GG		
175				GG		
176				AG		
177				GG		
178				AG		
179		M	21	GG	wt	14,68
180		M	21	AG	wt	19,97
181		M	22	AG	mt	8,41
182		M	20	AG	wt	17,73
183		M	21	GG	wt	22,13
185		M	21	GG	wt	14,36
186		M	21	GG	wt	7,28
187		M	27	AG	wt	17,1
188		M	21	AG	wt	20,9
189		M	24	AA	wt	19,33
190		M	22	AG	wt	17,93
192		M	24	GG	wt	12,55
193		M	21	GG	wt	12,84
194		M	21	GG	wt	16,59
195		M	20	AG	wt	11,63
196		M	22	AG	wt	11,91
197				GG		
198	ni uspel	M	21		wt	11,6

199		Ž	22	AG	wt	15,47
200		M	23	GG	wt	8,03
201		M	23	GG	mt	15,01
202		Ž	21	AG	wt	9,3
203		M	22	AG	wt	15,36
204		M	21	AA	wt	14,11
205		M	22	AG	wt	18,04
206		M	21	GG	wt	11,39
207		M	21	AG	wt	17,7
208		M	23	AG	wt	14,78
209		M	21	AG	wt	17,29
210		M	21	AG	wt	21,09
212		Ž	28	AG	wt	10,14
213	ni uspel	Ž	21		wt	11,21
214		Ž	21	AG	wt	8,89
215		M	21	AG	wt	15,05
216		Ž	22	AA	wt	17,7
217		Ž	31	GG	wt	14,4
218		Ž	21	AG	mt	13,49
219		Ž	21	AA	wt	8,46