



# Laboratoriemedicin

Godkänt datum

## DNA-TPMT-genotyp

### Bakgrund

Läkemedel metaboliseras av speciella enzymer i kroppen. Om generna som kodar för dessa enzymer innehåller någon variant kan enzymernas aktivitet förändras, vilket ibland kan få ödesdigra konsekvenser för den behandlade patienten.

Tiopurin metyltransferas (TPMT) metaboliserar tiopuriner, vilka framförallt används för behandling av inflammatorisk tarmsjukdom och barnleukemi (Lindqvist Appell et al. 2015). De bäst studerade TPMT-varianterna är TPMT \*2, \*3A, \*3B, \*3C och \*4 (Nguyen et al. 2011). De vanligast förekommande TPMT-varianterna, \*3A och \*3C (Tamm et al. 2017), förekommer i ca 4% av den europeiska populationen. \*2 förekommer inte lika frekvent och \*4 är sällsynt bland européer. TPMT-varianterna har associerats med ökad risk för myelosuppression vid behandling med tiopuriner. Heterozygota bärare kan drabbas av moderat till svår myelosuppression och bör därför ges lägre doser av tiopuriner. Homozygota patienter har en hög risk för myelosuppression, vilken kan leda till livshotande tillstånd, som t.ex. sepsis. Sådana individer bör inte behandlas med tiopuriner, alternativt bör dosen sänkas minst 10-falt (Nguyen et al. 2011).

### Svar/Tolkning/Bedömning

Tolkning av analysresultaten görs enligt Tabell 1.

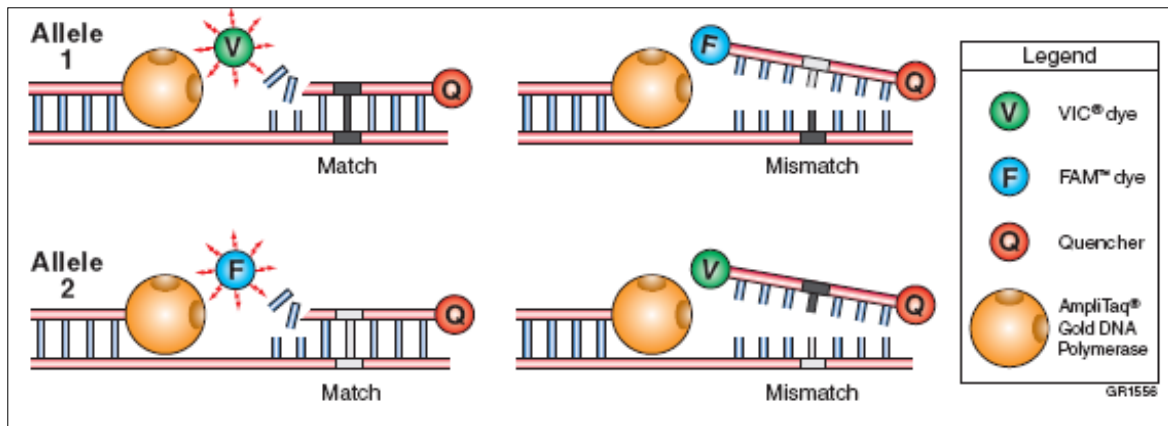
Tabell 1. Tolkning av mutationsanalyserna.

TPMT genotyp	Kommentar
c.238G>C	
G/G	TPMT *1/*1. Normal enzymaktivitet.

G/C	TPMT *1/*2. Nedsatt TPMT-enzymaktivitet.	
C/C	TPMT *2/*2. Mycket låg eller ingen enzymaktivitet.	
<b>c.460G&gt;A</b>		
G/G	TPMT *1/*1. Normal enzymaktivitet.	
G/A	TPMT *1/*3B. Nedsatt TPMT-enzymaktivitet.	
A/A	TPMT *3B/*3B. Mycket låg eller ingen enzymaktivitet	
<b>c.719A&gt;G</b>		
A/A	TPMT *1/*1. Normal enzymaktivitet.	
A/G	TPMT *1/*3C. Nedsatt TPMT-enzymaktivitet.	
G/G	TPMT *3C/*3C. Mycket låg eller ingen enzymaktivitet.	
<b>Kombination av c.460G&gt;A och c.719A&gt;G</b>		
<b>c.460G&gt;A</b>	<b>c.719A&gt;G</b>	
G/G	A/A	TPMT *1/*1. Normal enzymaktivitet.
G/A	A/G	TPMT *1/*3A. Nedsatt TPMT-enzymaktivitet.
A/A	G/G	TPMT *3A/*3A. Mycket låg eller ingen enzymaktivitet.

## Metodik/mätprincip

Metoden bygger på en PCR-reaktion där en specifik del av det genomiska DNA:t amplifieras. Dessutom ingår en hybridisering med en TaqMan-probe som är komplementär till det sekvensavsnitt där den aktuella punktmutationen finns. Två olika prober finns – en för WT-allelen och en för den muterade allelen.



**Fig. 1.** TaqMan-principen.

Proberna binder mellan inbindningsställena för forward- och revers-primer på DNA-templet och är märkta med olika fluorescerande ”reporter”-färg för respektive allel (VIC<sup>TM</sup> eller FAM<sup>TM</sup>). I motsatt ände av proben finns en quencher som släcker fluorescensen hos en intakt probe. Under PCR-reaktionen, i extensionssteget, degraderar Taq DNA-polymeraset proben, vilket gör att reporterfärgen frigörs och fluorescensen, som avges kan mätas (**Fig. 1.**).

## Interferenser och felkällor

Om DNA provet innehåller kontamination som t.ex. inhibitorer ger detta förändrad signal och ett omprov får göras. Principiellt kan andra homologa DNA sekvenser hybridisera med primers och ge felaktig information. Detta har eliminerats i den initiala optimeringen av metoden och sedermera validerats. Ospecifik priming ger upphov till låg eller felaktig genotypclustering i mjukvaran och kan t.ex. förekomma om någon annan närliggande variant än den undersökta förekommer i ett prov. Sådan interferens kan kontrolleras med Sangersekvensering.

## Mätområde

Metoden påvisar homozygoti för wild type (wt) genotyp, heterozygoti, samt homozygoti för variant genotyp. Amplikonet begränsas av forward och reverse primers samt detekteras med reporter 1 respektive reporter 2.

## Detektionsgräns

10 ng patient-DNA används i reaktionen. Varken nedre eller övre detektionsgräns har fastställts, men mindre mängd DNA bör inte användas.

## Spårbarhet

Samtliga primers och prober är spårbara till dessa sekvenser.

Gen	Allel-nomenklatur	HGVS -nomenklatur	dbSNP rs-nr	NCBI Referenssekvens
TPMT	*2	c.238G>C	rs1800462	NG_012137.3 NM_000367.5 NP_000358.1
TPMT	*3A	c.460G>A och c.719A>G	rs1800460 resp. rs1142345	NG_012137.3 NM_000367.5 NP_000358.1
TPMT	*3B	c.460G>A	rs1800460	NG_012137.3 NM_000367.5 NP_000358.1
TPMT	*3C	c.719A>G	rs1142345	NG_012137.3 NM_000367.5 NP_000358.1

## Riktighet

Metodens riktighet är säkerställd mot referenssekvens samt genom jämförelse av 20 olika prover mot andra laboratorier med full samstämmighet (se 13698930 Validering av alleldiskriminering av DPYD och TPMT på QuantStudio 7).

## Referenslitteratur

Lindqvist Appell M, Almer S, Mårtensson L-G, Peterson C (2015) Nyttan av farmakogenetik för en mer individualiserad behandling. *Läkartidningen* 112, 1-5.

Nguyen CM, Mendes MAS, Ma JD (2011) Thiopurine methyltransferase (TPMT) genotyping to predict myelosuppression risk. *PLOS Curr* 15;3:RRN1236.

Tamm R, Mägi R, Tremmel R, Winter S, Mihailov E, Smid A, Mörnicke A, Klein K, Schrappe M, Stanulla M, Houlston R, Weinshilboum R, Mlinaric Rascan I, Metspalu A, Milani L, Schwab M, Schaeffeler E. (2017) Polymorphic variation in *TPMT* is the principal determinant of TPMT phenotype: a meta-analysis of three genome-wide association studies. *Clin Pharmacol Ther* 101, 684-695.