

Algemene achtergrondtekst Farmacogenetica – Nudixhydrolase 15 (NUDT15)

Laatst gewijzigd: 5 november 2018

Begrippen in de farmacogenetica

Het **genotype** is de erfelijke informatie over een bepaalde eigenschap van een individu. Deze informatie bevindt zich in de genen, in het DNA dat bestaat uit nucleotiden. Het deel van het DNA met informatie voor één specifieke erfelijke eigenschap wordt **gen** genoemd. Het DNA is verdeeld in chromosomen die meestal in paren voorkomen. Dit betekent dat een individu van de meeste genen twee exemplaren (twee **allelen**) bezit. Elk allel is gelegen op één van de chromosomen van een chromosomenpaar.

Het **fenotype** geeft aan wat de uiteindelijke verschijningsvorm van een bepaald genotype is. Dit kan de functionaliteit van een eiwit (bijvoorbeeld het enzym of de receptor) betreffen, maar ook de verschijningsvorm van een ziekte. Het fenotype vloeit voort uit het genotype dat men bezit, de mate van expressie van het desbetreffende gen en de combinatie met omgevingsfactoren bijvoorbeeld comedicaatie, voeding en ziekte toestanden.

Van DNA dat codeert voor een eiwit kunnen variaties bestaan in de bevolking. Variaties kunnen er toe leiden dat allelen coderen voor niet of minder actieve eiwitten. De eenvoudigste vorm van variaties zijn '**single-nucleotide polymorphisms**' (**SNP's**), waarbij een bepaald deel van een gen slechts in één nucleotide verschilt. Als een genvariant bij ten minste 1% van de bevolking voorkomt, spreekt men van een genetisch **polymorfisme**.

Wildtype is de benaming voor het meest voorkomende actieve allel. Voor een bepaald allel kan sprake zijn van verschillende polymorfismen.

Metabolisme van thiopurines

Thiopurines (azathioprine, 6-mercaptopurine en tioguanine) zijn inactieve prodrugs, die in het lichaam omgezet worden in de actieve metabolieten: de thioguaninenucleotiden (zie figuur 1). Van deze thioguaninenucleotiden zijn de trifosfaatvormen de volledig geactiveerde metabolieten. 6-Thiodeoxyguanosinetrifosfaat (6-thio-dGTP) wordt ingebouwd in DNA leidend tot cytotoxiciteit. 6-Thioguanosinetrifosfaat (6-thio-GTP) draagt bij aan de cytotoxiciteit en immunosuppressie doordat het wordt ingebouwd in RNA en door remming van het enzym Rac1 in T-cellen. De Rac1-remming leidt tot een verminderde respons van deze immuuncellen.

NUDT15 draait de volledige activatie van de thiopurines terug door 6-thio(deoxy)guanosinetrifosfaat om te zetten in 6-thio(deoxy)guanosinemonofosfaat (6-thio-dGMP en 6-thio-GMP) (zie het rechterdeel van figuur 1). Het vermindert op deze wijze de werking en toxiciteit van de thiopurines.

NUDT15 ('nucleoside diphosphate-linked moiety X-type motif 15' of nudixhydroxylase 15) is lid van een familie van enzymen die verbindingen hydrolyseren met de algemene structuur van een nucleosidedifosfaat gebonden aan een andere eenheid X (in het geval van NUDT15 een thiogroep). Het enzym wordt ook wel MTH2 (mutatorT homolog2) genoemd. Dit naar aanleiding van een eerdere naam, die de groep enzymen kreeg omdat ze geïdentificeerd werden als eiwitten gecodeerd door genen, waarvan mutanten in bacteriën de mutagene werking en toxiciteit van cytotoxische purines en pyrimidines verhogen.

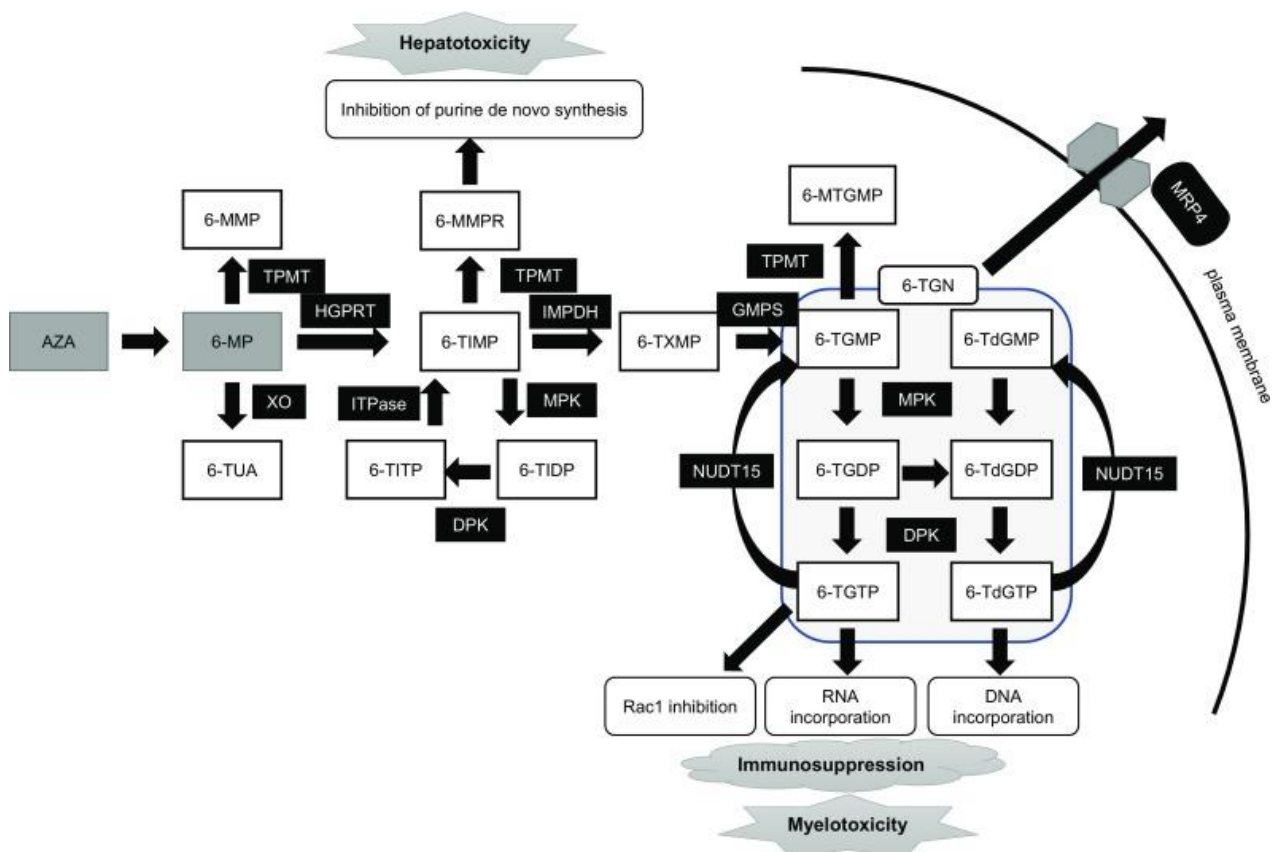
De absorptie van alle drie de thiopurines is incompleet en variabel.

Veranderde metabole capaciteit en klinische gevolgen

Variaties in het gen dat codeert voor het NUDT15-enzym kunnen leiden tot een verlaagde of afwezige functionaliteit. Er zijn aanwijzingen dat deze afname van functionaliteit wordt veroorzaakt door een combinatie van een lagere enzymactiviteit en een lagere stabiliteit van de resulterende enzymvarianten.

Op basis van de aanwezige metabole capaciteit van het gecodeerde NUDT15-enzym kan de populatie in drie fenotypes opgedeeld worden:

1. **poor metabolizer (PM)**, sterk verlaagde of afwezige metabole capaciteit (2 allelen met een verminderde of afwezige functionaliteit);
2. **intermediate metabolizer (IM)**, verlaagde metabole capaciteit (1 allel met normale activiteit en 1 allel met verminderde of afwezige functionaliteit);
3. **extensive metabolizer (EM)**, 'normale' metabole capaciteit (2 allelen met normale activiteit);



Figuur 1. Schematische weergave van het metabolisme van azathioprine- en 6-mercaptopurine. Tioguanine wordt door HGPRT direct omgezet in 6-thioGMP (6-TGMP, linksboven in het grote lichtgrijze vierkant). De grijze rechthoeken geven geneesmiddelen aan: AZA = azathioprine, 6-MP = mercaptopurine. De witte rechthoeken geven metabolieten aan: 6-MMP = 6-methylmercaptopurine, 8-OHMP = 8-hydroxy-6-mercaptopurine, 6-TUA = 6-thiourinezuur (6-thiouric acid), 6-MMPR = 6-methylmercaptopurineribonucleotide, 6-TIMP = 6-thioinosinemonofosfaat, 6-TIDP = 6-thioinosinedifosfaat, 6-TITP = 6-thioinosinetrifosfaat, 6-TXMP = 6-thioxanthosinemonofosfaat, 6-TGMP = 6-thioguanosinemonofosfaat, 6-TGDP = 6-thioguanosinedifosfaat, 6-TGTP = 6-thioguanosinetrifosfaat, 6-TdGMP = 6-thiodeoxyguanosinemonofosfaat, 6-TdGDP = 6-thiodeoxyguanosinedifosfaat, 6-TdGTP = 6-thiodeoxyguanosinetrifosfaat, 6-MTGMP = 6-methylthioguanosinemonofosfaat, 6-TGN = 6-thioguaninenucleotides. De zwarte rechthoeken geven enzymen of transporters aan: XO = xanthineoxidase, TPMT = thiopurine-S-methyltransferase, HGPRT = hypoxanthinefosforibosyltransferase, IMPDH = inosinemonofosfaatdehydrogenase, GMPS = guanosinemonofosfaatsynthetase, MPK = monofosfaatkinase, DPK = difosfaatkinase, ITPase = inosinetrifosfaatpyrofosfatase, MRP4 = multi-drug resistance-associated protein 4. (Afkomstig uit: Kakuta et al., 2018)

Binnen de groepen IM en EM bestaat ook nog een grote variatie in de metabole capaciteit. Tabel 1 geeft een overzicht van de verschillende allelen en de functionaliteit van de resulterende enzymen.

Met name het PM-fenotype leidt tot een sterke verhoging van de cellulaire concentratie van de actieve metabolieten (6-thio-dGTP en 6-thio-GTP), waardoor bij normale thiopurinedosering vrijwel altijd ernstige bijwerkingen als leukopenie optreden. Een aanpassing van de standaarddosis of de keuze voor een ander geneesmiddel is in dit geval nodig. Bij IM is het risico op leukopenie ook verhoogd, maar ontwikkelt meer dan de helft van de patiënten die starten met een normale dosis geen leukopenie.

Omdat het genotype slechts voor een deel de metabole capaciteit bepaalt, zijn adviezen voor dosisaanpassing op basis van het genotype niet meer dan een handvat om de gewenste plasmaconcentratie te bereiken. Voor stoffen waarvoor monitoring gebruikelijk is, kan therapeutische drug monitoring (TDM) nuttig zijn om de dosering te optimaliseren. Voor thiopurines bestaat TDM uit bepaling van concentraties van thioguaninenucleotiden in erythrocyten. Voor patiënten met een NUDT15-variant levert bepaling van de concentraties van het totaal aan thioguaninenucleotiden echter geen informatie. De NUDT15-varianten veranderen de verhouding tussen de thioguaninenucleotidtrifosfaten en de thioguaninenucleotidemonofosfaten zonder de totale hoeveelheid thioguaninenucleotiden te veranderen. Patiënten met een NUDT15-variant ontwikkelen daarom toxiciteit binnen het voor patiënten zonder NUDT15-variant vastgestelde therapeutische gebied. Het therapeutische gebied voor patiënten met een of meer NUDT15-varianten is niet vastgesteld. De huidige beschikbare TDM is dus niet zinvol.

voor patiënten met een NUDT15-variant. De dosering kan alleen worden aangepast op basis van toxiciteit (monitoring van het bloedbeeld) en effectiviteit.

Genotypering

Bij genotypering wordt het genotype vastgesteld. Het geeft aan welke allelen van het gen voor NUDT15 het geteste individu bezit. Veel allelen hebben een naam die bestaat uit een ster (*) en een nummer. Een voorbeeld van een mogelijk NUDT15-genotype is NUDT15 *1/*2. Niet alle ontdekte allelen zijn al opgenomen in deze standaardnomenclatuur. Daarom wordt een deel van de allelen nog aangegeven met het nucleotidenummer gevolgd door de nucleotideverandering (of met het aminozuurnummer voorafgegaan door het symbool van het aminozuur in het wild type eiwit en gevolgd door het symbool van het aminozuur in de variant).

Voor NUDT15 zijn meer dan 10 verschillende allelvarianten geïdentificeerd/beschreven in de literatuur [1-3]. Deze zijn in tabel 1 weergegeven, ook de functionaliteit is hierin opgenomen. Voor de variant 415C>T (allel *2 en *3) bestaat de meeste onderbouwing dat deze tot een volledig disfunctioneel enzym leidt. Voor 416G>A (*4), 52G>A (*5) en 36_37insGGAGTC (*2 en *6) is *in vitro* een afname van de functionaliteit met 75-100% waargenomen, waarbij er aanwijzingen zijn dat de verlaging voor 36_37insGGAGTC (*2 en *6) het sterkst is [3]. *In vitro* werd geen significant verschil gevonden tussen heterozygoten van *2 tot en met *6 [3]. *In vivo* verhoogde ook *1/*5 het risico voor thiopurine-geïnduceerde leukopenie, terwijl voor *1/*6 een numeriek iets sterkere verhoging van het risico werd gevonden dan voor *1/*5 (significantie niet getest per genotype) [5].

Bij genotypering wordt meestal gescreend op slechts de meest voorkomende allelvarianten. Hierdoor kan het voorkomen dat minder vaak voorkomende varianten gemist worden en het allel ten onrechte als wildtype getypeerd wordt.

In de meeste bevolkingsgroepen zijn *2 en/of *3 de meest voorkomende allelen. Omdat het genotype *3/*6 heel weinig voorkomt ten opzichte van *1/*2 (0-3,4% van de frequentie van *1/*2), heeft een patiënt met zowel het polymorfisme 415C>T als het polymorfisme 36_37insGGAGTC in de regel het genotype *1/*2. Bij Europeanen en Afrikanen komen NUDT15-genvarianten zeer weinig voor en worden alleen *3, *6 en Gly17_Val18del gevonden [1,6].

NB: In bevolkingsgroepen waarin *2 wordt gevonden (Oost-Aziatisch, Amerikaans en Latijns-Amerikaans), heeft een patiënt met zowel het polymorfisme 415C>T als het polymorfisme 36_37insGGAGTC in 96,7-100% van de gevallen het genotype *1/*2 en slechts in 0-3,3% van de gevallen het genotype *3/*6. Omdat de getolereerde dosis veel lager en het risico op thiopurine-geïnduceerde leukopenie veel hoger is in het geval van *3/*6 dan in het geval van *1/*2, dient het uitvoerend laboratorium in eerste instantie het bepaalde genotype aan de zorgverlener te rapporteren als waarschijnlijk *1/*2, mogelijk *3/*6. De zorgverlener kan hier dan rekening mee houden door bijvoorbeeld het bepalen van het bloedbeeld te vervroegen als de patiënt als IM wordt gedoseerd of door de patiënt aanvankelijk als PM te doseren en vervolgens de dosering te verhogen op basis van het bloedbeeld. Om welk genotype/fenotype het gaat, kan pas worden vastgesteld als de door de patiënt getolereerde dosis bekend is (*3/*6 en PM als de getolereerde dosis het dichtst in de buurt ligt van 10% van de door patiënten zonder genvariant getolereerde dosis en *1/*2 en IM als de getolereerde dosis het dichtst in de buurt ligt van 50% van de door patiënten zonder genvariant getolereerde dosis).

Tabel 1. Overzicht van de gebruikte notaties en metabole activiteit voor de wildtype en variant NUDT15-allelen [1,2,3,4]

Notaties voor de variant en het bijbehorende polymorfisme				Functionaliteit
sternotatie	aminozuurwijziging	nucleotidewijziging	rs-nummer	
*1	-	-	-	normaal
*2	Arg139Cys en Val18_Val19insGlyVal	415C>T en 36_37insGGAGTC	116855232 en 554405994	afwezig
*3	Arg139Cys	415C>T	116855232	afwezig
*4	Arg139His	416G>A	147390019	sterk verlaagd
*5	Val18Ile	52G>A	186364861	sterk verlaagd
*6	Val18_Val19insGlyVal	36_37insGGAGTC	554405994	sterk verlaagd
-	Arg34Thr			sterk verlaagd
-	Lys35Glu			verlaagd
-	Gly17_Val18del			sterk verlaagd
-	Met1Thr			onbekend
-	Arg10Trp			onbekend
-	Gly47Arg			onbekend

Omdat er geen duidelijk verschil werd gevonden in de mate waarin verschillende variantallelen het risico op thiopurine-geïnduceerde leukopenie verhogen, wordt er bij de indeling van de genotypes op basis van de voorspelde fenotypes geen onderscheid gemaakt tussen de verschillende variantallelen (zie tabel 2).

Tabel 2. Verband tussen het NUDT15-genotype en het voorspelde NUDT15-fenotype

genotype	fenotype
volledig functioneel allel / volledig functioneel allel	extensive metaboliser (EM)
volledig functioneel allel / verminderd of niet-functioneel allel	intermediate metaboliser (IM)
verminderd of niet-functioneel allel / verminderd of niet-functioneel allel	poor metaboliser (PM)

Fenotypering

Bij fenotypering wordt het fenotype vastgesteld, dit houdt in: het meten of schatten van de activiteit van het NUDT15-enzym. Voor NUDT15 is er echter geen andere goede fenotyperingsmethode dan het bepalen van de maximaal door de patiënt getolereerde thiopurinedosis.

Normaal bestaat therapeutisch drug monitoring voor thiopurines uit bepaling van de concentraties van thioguaninenucleotiden in erythrocyten. Voor patiënten met een NUDT15-variant levert bepaling van de concentraties van het totaal aan thioguaninenucleotiden echter geen informatie. De NUDT15-varianten veranderen de verhouding tussen de thioguaninenucleotidtrifosfaten en de thioguaninenucleotidemonofosfaten zonder de totale hoeveelheid thioguaninenucleotiden te veranderen. Patiënten met een NUDT15-variant ontwikkelen daarom toxiciteit binnen het voor patiënten zonder NUDT15-variant vastgestelde therapeutisch gebied. Het therapeutisch gebied voor patiënten met een of meer NUDT15-varianten is niet vastgesteld. De huidige beschikbare TDM is dus niet zinvol voor patiënten met een NUDT15-variant.

Een fenotyperingsmethode die wel mogelijk is voor NUDT15 is het meten van de hoeveelheid in DNA ingebouwde thioguanine (DNA-TG) [7]. Deze fenotyperingsmethode heeft echter nog prospectieve validatie nodig. Op dit moment is dit daarom ook geen betrouwbare fenotyperingsmethode.

Bij het direct meten van de enzymactiviteit van NUDT15 wordt de vrijgekomen hoeveelheid pyrofosfaat gemeten [3]. Omdat pyrofosfaat *in vivo* van vele bronnen afkomstig kan zijn, kan deze meting alleen *in vitro* met gezuiverd enzym worden uitgevoerd. Toepassing in (cellen van) patiënten is niet mogelijk.

Fenotypering van NUDT15 in patiënten is daarom op dit moment alleen mogelijk door het bepalen van de maximaal getolereerde thiopurinedosis.

Etnische variatie in prevalentie fenotypes en allelfrequentie

De frequentie van voorkomen van de verschillende NUDT15-allelen alsmede van de verschillende fenotypes kent een sterke variatie tussen bevolkingsgroepen.

NUDT15-varianten komen vaak voor bij patiënten van Oost-Aziatische, Zuid-Aziatische of (Latijns-)Amerikaanse afkomst. De meest voorkomende allelen in deze bevolkingsgroepen zijn *2 en/of *3.

NUDT15-varianten komen weinig voor bij patiënten van Europese of Afrikaanse afkomst. In deze bevolkingsgroepen zijn alleen de allelen *3, *6 en Gly17_Val18del gevonden. Er zijn geen prevalentiegegevens bepaald voor de Nederlandse bevolking.

Gevonden fenotype- en allelfrequenties per bevolkingsgroep zijn weergegeven in tabel 3.

Tabel 3. Etnische variatie in prevalentie genotypes en allelfrequentie [3,6]

	prevalentie genotype (%)											allelfrequentie (%)						
	PM				IM							EM	*2	*3	*4	*5	*6	G17_V18 del
bevolkingsgroep	*2/ *3	*2/ *5	*3/ *3	*3/ *6	*1/ *2	*1/ *3	*1/ *4	*1/ *5	*1/ *6	*1/ G17_V18 del	*1/*	1						
Europees	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,6	0,5	98,5		0,0	0,2	0,0	0,0	0,3	0,3
Oost-Aziatisch	1,0	0,2	0,6	0,2	5,8	9,7	0,2	2,6	2,4	0,0	77,4		3,5	6,1	0,1	1,4	1,3	0,0
Zuid-Aziatisch	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	12,6	0,0	0,2	0,4	0,1	86,4		0,0	6,7	0,0	0,1	0,2	0,1
Afrikaans	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,3	0,1	99,4		0,0	0,1	0,0	0,0	0,2	0,1
Amerikaans	0,6	0,0	0,0	0,0	6,7	0,9	1,5	0,0	0,3		90,0		3,7	0,8	0,8	0,0	0,2	
Latijns-Amerikaans	0,0	0,0	0,6	0,0	5,7	2,5	3,8	0,0	0,0	0,0	87,4		2,9	1,9	1,9	0,0	0,0	0,0

Literatuur

1. Kakuta Y et al. Pharmacogenetics of thiopurines for inflammatory bowel disease in East Asia: prospects for clinical application of NUDT15 genotyping. *J Gastroenterol* 2018;53:172-80. PubMed PMID: 29192347.
2. <https://www.pharmgkb.org/>, geraadpleegd op 12 juni 2018
3. Moriyama T et al. NUDT15 polymorphisms alter thiopurine metabolism and hematopoietic toxicity. *Nat Genet* 2016;48:367-73. PubMed PMID: 26878724.
4. Zhu Y et al. Combination of common and novel rare NUDT15 variants improves predictive sensitivity of thiopurine-induced leukopenia in children with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2018 Mar 8 [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 29519865.
5. Chao K et al. Combined detection of NUDT15 variants could highly predict thiopurine-induced leukopenia in Chinese patients with inflammatory bowel disease: a multicenter analysis. *Inflamm Bowel Dis* 2017;23:1592-9. PubMed PMID: 28570428.
6. Moriyama T et al. Novel variants in NUDT15 and thiopurine intolerance in children with acute lymphoblastic leukemia from diverse ancestry. *Blood* 2017;130:1209-1212. PubMed PMID: 28659275.
7. Nielsen SN et al. Measures of 6-mercaptopurine and methotrexate maintenance therapy intensity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol* 2016;78:983-994. PubMed PMID: 27600880.