

ความแปรผันของจีนและการทำงานของเอนไซม์ไรโอพิวรีนเมทิลทรานสเฟอเรสใน  
ผู้ป่วยเด็กที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวแบบเฉียบพลัน

นางสาววรรณ ชนลาภานนท์

ศูนย์วิทยุทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยา

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546


ISBN 974-17-3846-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 01235867

GENETIC POLYMORPHISM AND THIOPURINE METHYLTRANSFERASE ACTIVITY IN ACUTE  
LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA CHILDREN

Miss Wanna Tanalapanon



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Pharmacy in Pharmacology

Department of Pharmacology

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2003

ISBN 974-17-3846-3

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude and appreciation to my advisor, Associated Professor Pompen Pramyothin, Ph.D for this valuable guidance and kind concern throughout this research study which enable me to accomplish this thesis.

I also would like to express my sincere gratitude to the committee members: Associated Professor Mayuree Tantisira, Ph.D Associated Professor Issarang Nuchprayoon, Ph.D , Assistant Professor Suradech Hongeng, Ph.D, Associated Professor . Chandhanee Itthipanichpong, for their worthy comments and suggestions.

I would like to thanks all members in Pharmacology. The special thanks are also extended to everyone in Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for their helps and friendly relationship.

I would like to express my appreciation to the Unit Serum Research, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Department of Pediatric Hematology/ Oncology, King Chulalongkorn Memorial hospital and Ramathibodi hospital, as well as Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, for providing laboratory facilities.

This study was supported partly the Graduate School, Chulalongkorn University.

Finally, I would like to give all my heart to my family, my lovely mother and father, for their endless love, understanding and encouragement throughout my life. Both of them are always in support of me.





วรรณ รัตนากานนท์ : ความแปรผันของยีนและการทำงานของเอนไซม์ไรโอพิวรีนเมทิลทรานสเฟอเรสในผู้ป่วยเด็กที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวแบบเฉียบพลัน. (GENETIC POLYMORPHISM AND THIOPURIN METHYLTRANSFERASE ACTIVITY IN ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA CHILDREN) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: รศ.ดร. พรเพ็ญ เปรมโยธิน อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รศ. นพ. ดร. อิศรางค์ นุชประสูตร, 62 หน้า ISBN: 974-17-3846-3

เอนไซม์ไรโอพิวรีนเมทิลทรานสเฟอเรส (TPMT, EC 2.1.1.67) เป็นเอนไซม์ที่พบอยู่ในส่วนไซโตพลาสซึมของเซลล์ กระตุ้นปฏิกิริยาเมทิลเลชันของสารประกอบอะโรมาติก และเฮเทอโรไซคลิก ซัลโฟคริล เช่น 6-เมอแคปโตพิวรีน สมรรถนะของเอนไซม์ไรโอพิวรีนเมทิลทรานสเฟอเรส ถูกควบคุมโดยความแปรผันของยีน ซึ่งสัมพันธ์กับผลการรักษาและการเกิดพิษของยาที่แตกต่างกันในแต่ละบุคคล จากการศึกษาสมรรถนะของเอนไซม์ไรโอพิวรีนเมทิลทรานสเฟอเรส ในกลุ่มชนผิวขาว พบการกระจายของประชากรเป็น 3 กลุ่ม อย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังพบความหลากหลายของ mutant alleles ระหว่างเชื้อชาติ ทั้งการกระจายและลักษณะรูปแบบ ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาความแปรผันของยีนและการทำงานของเอนไซม์ไรโอพิวรีนเมทิลทรานสเฟอเรสของผู้ป่วยเด็กที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวแบบเฉียบพลัน จำนวน 90 คน ทำการวัดสมรรถนะของเอนไซม์ไรโอพิวรีนเมทิลทรานสเฟอเรสในเม็ดเลือดแดงโดยใช้เทคนิค HPLC ตรวจวัด mutant alleles รูปแบบ TPMT\*2, TPMT\*3A, TPMT\*3C โดยใช้ PCR-RFLP พบการกระจายของสมรรถนะเอนไซม์ไรโอพิวรีนเมทิลทรานสเฟอเรส เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มี สมรรถนะสูงและปานกลาง ร้อยละ 93.33 และ 6.67 ตามลำดับ รูปแบบการเกิด mutant alleles พบเพียงชนิดเดียว คือ TPMT\*3C เพศ ไม่มีผลต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไรโอพิวรีนเมทิลทรานสเฟอเรสในทางตรงกันข้าม การได้รับยา 6-เมอแคปโตพิวรีนมีผลเพิ่มสมรรถนะของเอนไซม์ไรโอพิวรีนเมทิลทรานสเฟอเรส

ภาควิชา เกษษวิทยา  
สาขาวิชา เกษษวิทยา  
ปีการศึกษา 2546

ลายมือชื่อนิติกร..... วรรณ รัตนากานนท์  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... พรเพ็ญ เปรมโยธิน  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... อิศรางค์ นุชประสูตร

##4476609333 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEY WORD: THIOPURINE METHYLTRANSFERASE/ PHARMACOGENETICS  
POLYMORPHISM/ 6-MERCAPTOPURINE/ ACUTE LYMPHOBLASTIC  
LEUKEMIA

WANNA TANALAPANON: GENETIC POLYMORPHISM AND THIOPURINE  
METHYLTRANSFERASE ACTIVITY IN ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA  
CHILDREN. THESIS ADVISOR: ASSOC.PROF.PRONPEN PRAMYOTHIN, Ph.D  
THESIS COADVISOR : ASSOC.PROF.ISSARANG NUCHPRAYOON, Ph.D, 62 pp  
ISBN 974-17-3846-3

Thiopurine methyltransferase (TPMT, EC.2.1.1.67) is a cytoplasmic enzyme that catalyzes the S-methylation of aromatic and heterocyclic sulfhydryl compounds such as 6-mercaptopurine. TPMT activity is regulated by a common genetic polymorphism that is associated with large individual variation in thiopurine toxicity and efficacy. Population studied has shown trimodal of frequency distribution TPMT activity in Caucasian. However, the mutant alleles of TPMT have interethnic variability with different frequency and pattern among various ethnic population. In the present investigation, genetic polymorphism and thiopurine methyltransferase activity were studied in 90 children of acute lymphoblastic leukemia. The erythrocyte thiopurine methyltransferase activity was measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) technique. The mutant alleles, TPMT\*2, TPMT\*3A, and TPMT\*3C, were detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). TPMT activity has shown bimodal frequency distribution with the high and intermediate metabolizers of 93.33% and 6.67% respectively. The mutant allele was found only TPMT\*3C. Gender had no effect on TPMT activity, however receiving 6-MP increased TPMT activity.

Department Pharmacology

Field of study Pharmacology

Academic year 2003

Student's signature..... 

Advisor's signature..... 

Co-advisor's signature..... 

## CONTENTS

	Page
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	viii
LIST OF FIGURES.....	ix
LIST OF ABBREVIATIONS.....	x
CHAPTER	
I        INTRODUCTION.....	1
II       LITERATURE REVIEW.....	3
Pharmacogenetic.....	3
Pharmacogenetics and chemotherapy.....	5
Thiopurine methyltransferase .....	8
6-mercaptopurine.....	17
III      MATERIALS AND METHODS.....	21
IV      RESULTS.....	38
V      DISCUSSION AND CONCLUSION.....	47
REFERENCES.....	52
APPENDICES.....	55
Acute lymphoblastic leukemia.....	56
Protocal of ALL.....	58
VITA.....	62



## LIST OF FIGURES

Figure	Page
1 Genetic polymorphism of thiopurine methyltransferase.....	7
2 Human red blood cell (RBC) TPMT activity in 2609 clinical samples.....	9
3 Allele variants at the human TPMT locus.....	11
4 Correlation of RBC with kidney TPMT activity.....	12
5 Correlation between erythrocyte and leukemic blast cell TPMT activity.....	12
6 Correlation of hepatic and erythrocyte activities of TPMT.....	13
7 Linear regression of thiopurine methyltransferase (TPMT) values measured by the chromatographic (TPMTHPLC) and radiometric (TPMTRC) assays.....	13
8 Relationship between RBC TPMT activity and RBC 6-TGN concentrations.....	15
9 Metabolism of 6-mercaptopurine.....	18
10 The polymerase chain reaction.....	33
11 PCR product of G238C.....	34
12 PCR product of G460A.....	35
13 PCR product of A719G.....	36
14 Representative chromatograms of blank red blood cell lysate .....	38
15 Representative chromatograms of 6-MMP.....	39
16 Representative chromatograms of 6-MMP in red blood cell lysate.....	39
17 Standard curve of 6-MMP concentrations.....	40
18 Frequency distribution histograms of erythrocyte TPMT activity.....	43
19 Probit plot erythrocyte TPMT activity.....	44
20 Histogram shown TPMT activity of male and female.....	45
21 Histogram shown TPMT activity of receiving and not receiving 6-MP.....	46
22 PCR-RFLP of TPMT mutant alleles.....	47
23 TPMT activity of each genotype.....	48



## LIST OF TABLES

Table	Page
1 Ethnic variation in TPMT alleles.....	16
2 Characteristic of subjects.....	21
3 The value of %RSD and %Bias of LOQ.....	40
4 The value of Precision (%RSD).....	41
5 The value of Accuracy (%Bias).....	41
6 The value of %Absolution Recovery.....	42
7 Comparison of red blood cell TPMT activity between male and female.....	45
8 Comparison of red blood cell TPMT activity between receiving and not receiving 6-MP.....	46
9 Mutant alleles was detected in children with ALL.....	47
10 Relationship between TPMT genotype and activity (phenotype).....	48

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## LIST OF ABBREVIATIONS

%	= percent
°C	= degree celcius
μ	= microliter
DNA	= deoxyribonucleic acid
SNPs	= single nucleotide polymorphism
A	= adenine
G	= guanine
C	= cytosine
T	= thymine
TPMT	= thiopurine methyltransferase
6-MP	= 6-mercaptopurine
ALL	= acute lymphoblastic leukemia
ORF	= open reading frame
WBC	= white blood cell
RBC	= red blood cell
cDNAs	= complementary deoxyribonucleic acid
HPLC	= high-performance liquid chromatography
nmol	= nanomole
pmol	= pikomole
ng	= nanogram
mg	= milligram
SAM	= S-adenosyl-L-methionine
TGNs	= 6-thioguanine nucleotides

PCR	= polymerase chain reaction
RFLP	= restriction fragment length polymorphism
6-TG	= 6-thioguanine
RNA	= ribonucleic acid
HGPRT	= hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase
XO	= xanthine oxidase
6-MMP	= 6-methylmercaptopurine
DMSO	= dimethylsulfoxide
DTT	= dithiothreitol
LOD	= limit of detection
LOQ	= limit of quantification
%RSD	= % relative standard deviation
dNTPs	= deoxynucleoside triphosphates
pRBC	= pack red blood cell

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย