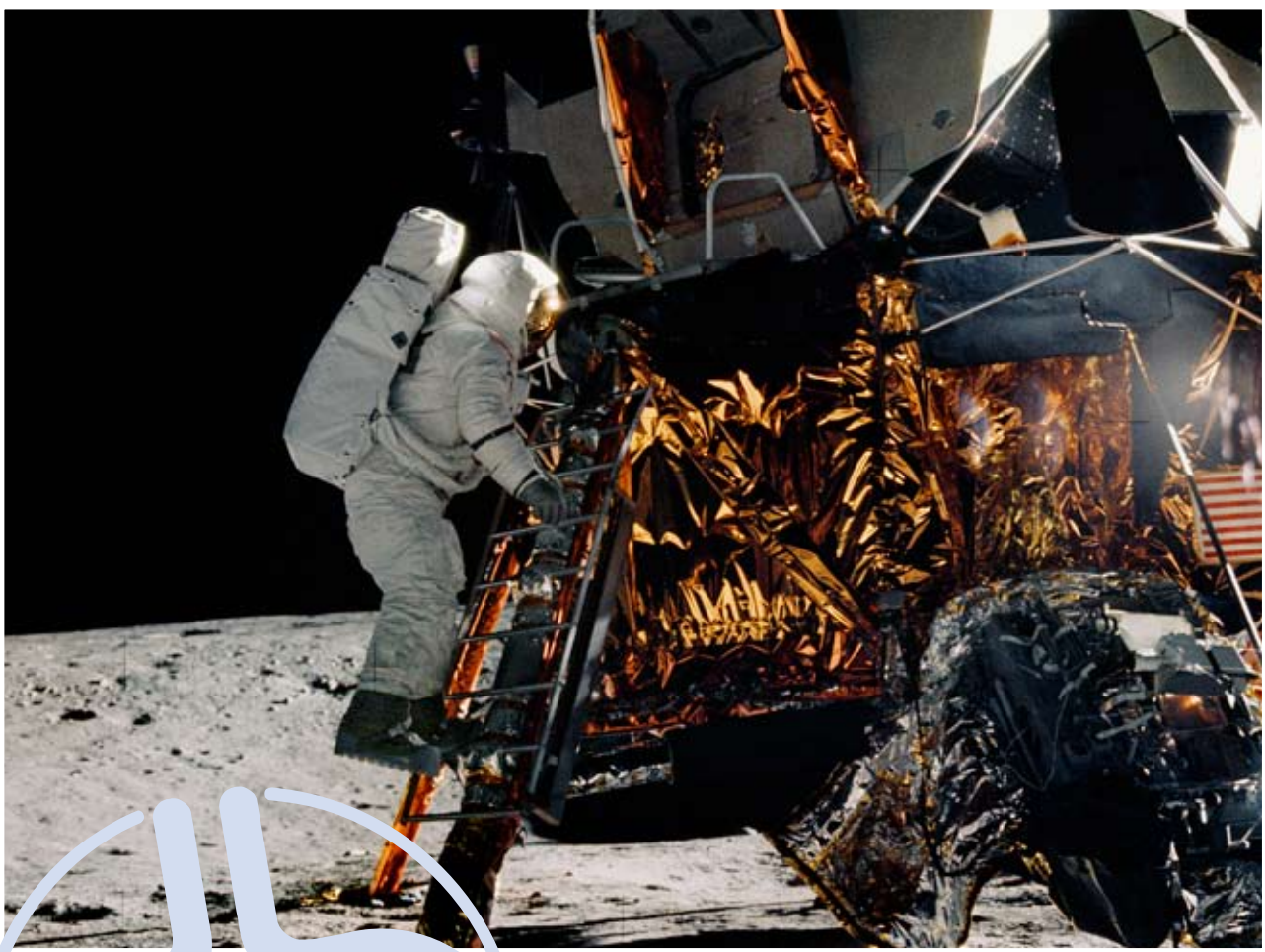


PULMO *Script*

Officieel orgaan van de NVALT

Jaargang 22, nummer 1, maart 2011



In dit nummer:

- Vera Bonta Prijs 2011
- Manifest Stichting Rookpreventie Jeugd
- Wasog Maastricht

Metabolic and genetic aspects of thiopurine metabolism

Samenvatting proefschrift Jaap A. Bakker

Datum : 27 oktober 2010

Plaats: Universiteit Maastricht

Thiopurine medicatie wordt frequent voorgeschreven voor de behandeling van (auto) immuun ziekten. Na de introductie van deze verbindingen in het midden van de jaren vijftig van de vorige eeuw zijn ze onderwerp geweest van een groot aantal klinische en laboratorium studies. Het metabolisme van purines wordt daarna op een drietal hoofdlijnen verder uitgewerkt: de purine de novo synthese (PDNS), de interconversie en de route die de afbraak en hergebruik van purines beschrijft. De complexiteit van deze processen weerspiegelt het belang van purines voor het voortbestaan van een organisme. Dit is de reden waarom de intracellulaire concentraties van purines (en pyrimidines) sterk worden gereguleerd.

Door de opkomst van het moleculair genetisch onderzoek gedurende de laatste decennia is er een keur aan genetische informatie beschikbaar gekomen, wat ondermeer heeft geleid tot de snelle ontplooiing van de pharmacogenetica. Dit heeft geresulteerd in de kennis dat enzymen betrokken bij het purine metabolisme eveneens verantwoordelijk zijn voor de activering en afbraak van de niet natuurlijk voorkomende purine analogen die gebruikt worden in de medicamenteuze behandeling van verschillende (auto)immuun stoornissen. Daar thiopurines ook via dit metabolisme worden verwerkt, mag het duidelijk zijn dat veranderingen in de activiteit van de betrokken enzymen, veroorzaakt door genetische variaties, consequenties zullen hebben voor de effectiviteit van de behandeling met thiopurines.

Een tweetal enzymen die betrokken zijn bij het thiopurine metabolisme worden in dit proefschrift in het bijzonder behandeld: thiopurine-S-methyltransferase (TPMT) en inosine triphosphatase (ITPase). De effecten van veranderingen in de mate van expressie van deze enzymen worden besproken

in relatie tot thiopurines. In het laatste deel van de introductie wordt kort ingegaan op de werking van thiopurines en hoe andere medicijnen de effectiviteit van thiopurines beïnvloeden. De selectiviteit van TPMT voor verschillende thiopurine componenten werd onderzocht. In experimenten met humaan recombinant TPMT (hrTPMT) en radioactief gelabeld SAM als methyl donor kon worden aangetoond dat de methylgroep werd overgedragen op de verschillende substraten. Als echter het lysaat van humane erythrocyten als enzymbron werd gebruikt dan bleek er geen overdracht te zijn de methylgroep op 6-TIMP, terwijl dit wel het geval was bij incubatie met 6-mercaptopurine (6-MP) en 6-thioguanine (6-TG). Incubatie van MOLT-3 cellen met 6-MP en 6-thioinosine (6-TI) toonde aan dat er 6-methyl-thioinosinemonofosfaat (6-MTIMP) werd gevormd. Indien de incubatie werd herhaald met 6-methylmercaptopurine (6-MMP) als substraat dan kon er geen 6-MTIMP worden aangetoond. Deze resultaten schetsen de noodzaak voor verder onderzoek wat betreft het metabolisme van thiopurines. De ontwikkeling van een methode voor de bepaling van thiopurine metabolieten in lichaamsvloeistoffen met behulp van zogeheten ultra performance vloeistof chromatografie (UPLC) gecombineerd met tandem massaspectrometrie is hierbij een hulpmiddel. Met behulp deze geavanceerde analyse methode was het mogelijk om (gemethyleerde) thiopurine metabolieten te meten in concentraties tot minimaal 50 nmol/l. De duplicerbaarheid van de analyse voor de verschillende componenten was zeer acceptabel. Voor de thiopurine metabolieten bedroeg de reproduceerbaarheid in plasma 4 – 7%. Voor het lage concentratiegebied werd in urine een reproduceerbaarheid gevonden van >15%. De klinische validatie werd verricht door het analyseren van monsters van patiënten die 6-MP of AZA gebruikten: in urine en plasma waren 6-MP en 6-TU duidelijk aantoonbaar. De andere componenten waren

wel aantoonbaar, de concentraties lagen echter beneden de limiet voor kwantificering (LOQ) zoals deze bepaald was voor de methode.

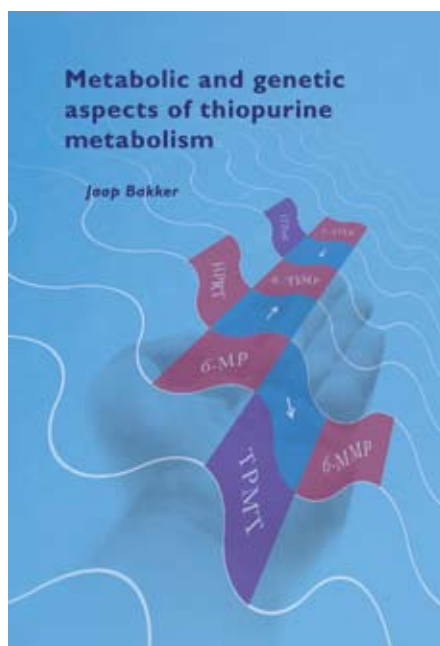
De klinische relevantie van de bepaling van TPMT in het kader van de medicamenteuze behandeling met thiopurines wordt geaccentueerd door een casus betreffende een patiënte die behandeld wordt voor Colitis Ulcerosa (UC). Vijf weken na start van de behandeling met Azathioprine (AZA), een pro-drug van 6-MP, ontwikkelde de patiënte een ernstige leucopenie en bloedarmoede (anemie). Bij opname in het ziekenhuis rees de verdenking van een overgevoeligheidsreactie (ADR) welke toegeschreven kan worden aan het gebruik van AZA. Hierop werd de medicatie gestopt. De activiteitsmeting van TPMT in rode bloedcellen (erythrocyten) werd aangevraagd en deze bleek verlaagd te zijn. Verder moleculair biologisch onderzoek toonde de aanwezigheid aan van een TPMT activiteit verlagend polymorfisme in heterozygote vorm, het zogenoemde *1/*3C genotype. Na 4 weken was de patiënte hersteld van de ADR en werd de behandeling voortgezet met mesalazine, een niet aan purines verwant medicijn.

Een ander enzym dat betrokken is bij het metabolisme van thiopurines is inosine triphosphatase (ITPase). Een methode wordt beschreven voor de activiteitsmeting van ITPase in erythrocyten, met behulp van vloeistof chromatografie gekoppeld aan UV-detectie. De methode werd verder geoptimaliseerd voor de meting van de ITPase activiteit in bloed spots (DBS). Alhoewel de methode bruikbaar is voor meting van ITPase activiteit in DBS, kwam naar voren dat de stabiliteit van het enzym onvoldoende was voor een betrouwbare meting. Op basis van deze resultaten wordt de meting van de ITPase activiteit uitgevoerd in een erythrocyten lysaat.

De associatie tussen *ITPA* polymorfismen en ADR bij thiopurine gebruik is onder-

werp van een voortdurende discussie. Genotype gerelateerde referentie waarden voor ITPase in erythrocyten lysaat werden bepaald. De specificiteit van ITPase voor de substraten ITP en thio-ITP werden vastgesteld, zowel voor het normale genotype als voor de 2 meest voorkomende *ITPA* polymorfismen. De effectiviteit van het enzym was voor beide substraten vergelijkbaar, onder de standaard condities waaronder de meting van het enzym plaatsvindt. De binding van het substraat bleek in de geteste genotypen vergelijkbaar. De snelheid waarmee het enzym de pyrofosfaat groep van het substraat afsplitst bleek in het geval van de aanwezigheid van het c.94C>A polymorfisme echter sterk vertraagd. Uit deze resultaten kan worden geconcludeerd dat voor het ontstaan van ADR onder thiopurine gebruik bij patiënten met een *ITPA* polymorfisme mogelijk andere (epigenetische) factoren een rol zullen spelen.

In een kleine studie werd een associatie tussen *ITPA* polymorfismen en de klinische evolutie van patiënten met de pulmonaire vorm van Langerhans' cel histiocytose (PLCH) gevonden. Uit deze studie komt naar voren dat patiënten die drager zijn van een ITPase activiteit verlagend polymorfisme een slechtere prognose heb-



ben dan PLCH patiënten met het normale (wild type) genotype. De oorzaak van deze bevinding is momenteel nog onduidelijk. Het is mogelijk dat de 'housekeeping' functie van het *ITPA* gecompromitteerd is in

patiënten met een ITPase activiteit verlagend polymorfisme.

Het belang van farmacogenetische diagnostiek bij de behandeling met thiopurines wordt nog onvoldoende onderkend. Het aantal patiënten met een polymorfisme in een van de genen betrokken bij het thiopurine metabolisme in de door ons onderzochte populatie van patiënten met een interstitiële longaandoening bleek hoger te zijn dan in de controle populatie. Door voor de start van de behandeling de enzymactiviteit te bepalen van de betrokken enzymen, en in het geval van een verlaagde activiteit additioneel de genotypering van de betrokken genen uit te voeren, kan een adverse reactie op de therapie in veel gevallen worden voorkomen. Door als laboratorium een snelle doorlooptijd te garanderen hoeft dit niet te leiden tot een grote vertraging in de start van de behandeling. In veel gevallen leidt de adverse reactie na start van de thiopurine behandeling tot een ziekenhuisopname. De kosten hiervan liggen vele malen hoger dan de kosten die gepaard gaan met de farmacogenetische diagnostiek.

Het volledige proefschrift is in te zien via: <http://www.ildcare.eu/index.php?id=481>