

Samenvatting

Samenvatting

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. De algemene introductie in hoofdstuk 1 beschrijft in het kort wat purines en pyrimidines zijn en welke niet natuurlijke analogen als medicijn tegen een scala van (auto)immuun stoornissen worden gebruikt. 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. Om deze reden worden de intracellulaire concentraties van purines (en pyrimidines) sterk 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 natuurlijke voorkomende purine analogen die gebruikt worden in de medicamenteuze behandeling van verschillende (auto)immuun stoornissen. Daar thiopurines ook door 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.

In hoofdstuk 2 wordt stil gestaan bij de selectiviteit van TPMT voor verschillende thiopurine componenten. 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 daarentegen 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-methyl-mercaptopurine (6-MMP) als substraat dan kon er geen 6-MTIMP worden aangetoond. Deze resultaten geven aanleiding om verder onderzoek te initiëren om het metabolisme van thiopurines op te helderen.

Hoofdstuk 3 beschrijft 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. Met behulp van stabiele isotoop gelabelde interne standaarden was het mogelijk om (gemethyleerde) thiopurine metabolieten te meten in concentraties tot minimaal 50 nmol/l. De dupliceerbaarheid van de analyse voor de verschillende componenten was zeer acceptabel. Instabiliteit van 6-MP en 6-TG in de monstermatrix, mogelijk als gevolg van oxidatie, maakte het nagenoeg onmogelijk om de reproduceerbaarheid voor deze componenten in urine vast te stellen. Voor de gemethyleerde 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 de casus beschreven in hoofdstuk 4. Het betreft 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). In hoofdstuk 5 wordt de methode 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 onderwerp van een voortdurende discussie. In hoofdstuk 6 ligt het zwaartepunt op het ITPase en de kinetische eigenschappen van het enzym. 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.

Hoofdstuk 7 beschrijft de resultaten van een studie die betrekking heeft op de associatie tussen *ITPA* polymorfismen en de klinische evolutie van patiënten met de pulmonaire vorm van Langerhans' cel histiocytose (PLCH). Uit deze studie komt naar voren dat patiënten die drager zijn van een ITPase activiteit verlagend polymorfisme een slechtere prognose hebben 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.

De belangrijkste bevindingen beschreven in dit proefschrift worden bediscussieerd in hoofdstuk 8 en de hieruit voortkomende mogelijkheden voor toekomstig onderzoek worden besproken. Ondanks het continue voortschrijdende inzicht aangaande het metabolisme van TPMT en ITPase blijven er nog veel vragen open. Door continuering van het onderzoek langs twee hoofdlijnen kunnen mogelijk in de toekomst verdere antwoorden verkregen worden. Een eerste onderzoekslijn dient zich te richten op de biologische functie van ITPase, zowel onder normale omstandigheden als in relatie tot ziekte. Het verwerven van verder inzicht in het metabolisme van thiopurines is het thema van de tweede onderzoekslijn. Met name dient te worden onderzocht hoe thiopurines worden opgenomen in de darm en hoe ontstekingen van het darmweefsel dit proces beïnvloeden.