

Metabolic and genetic aspects of thiopurine metabolism

Citation for published version (APA):

Bakker, J. A. (2010). *Metabolic and genetic aspects of thiopurine metabolism*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20101027jb>

Document status and date:

Published: 01/01/2010

DOI:

[10.26481/dis.20101027jb](https://doi.org/10.26481/dis.20101027jb)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Summary

Thiopurines are frequently used in the treatment of patients suffering from (auto)immune diseases. Since their introduction in the mid fifties of the 20th century the way these compounds exert their therapeutic action has been the subject of many clinical and laboratory studies. In chapter 1 the reader is introduced into this topic. After a brief introduction on purines and pyrimidines and the importance of synthetic analogues of these compounds, the metabolism of purines is described. As is outlined purine metabolism can be divided into 3 main parts: purine *de novo* synthesis (PDNS), interconversion and the degradation-salvage pathway. The complexity of these pathways reflects the importance of these compounds in life, by tight regulation mechanisms the intracellular concentrations of purines are kept in balance. Modern molecular genetic methods, generating vast amounts of genetic information, have opened the field of pharmacogenetics and it was shown that several enzymes involved in purine metabolism are essential in the handling of synthetic purine analogues, used as therapeutics in a variety of diseases. Thiopurines are metabolized by the enzymes from the purine pathways and it is apparent that alterations in the activity of these enzymes by genetic polymorphisms may influence the efficacy of thiopurine therapy. This thesis focuses on two enzymes involved: thiopurine-S-methyltransferase (TPMT) and inosine triphosphatase (ITPase). The effects of alterations in the expression of these enzymes are discussed in relation to thiopurine metabolism. The therapeutic targets of thiopurines and drug/drug interactions influencing thiopurine efficacy are briefly mentioned.

The selectivity of TPMT to thiopurine compounds is still puzzling. This topic is addressed in chapter 2. Experiments using human recombinant TPMT (hrTPMT) and (methyl-¹⁴C)-S-adenosylmethionine (SAM) confirmed the transfer of the methyl group from SAM to the different substrates. In human erythrocyte lysates this was seen with 6-MP and 6-TG, but not with 6-TIMP. In contrast, using MOLT-3 cells, we were able to confirm the formation of 6-Methyl-TIMP from 6-MP and 6-thioinosine (6-TI). The thionucleotide profile in MOLT-3 lysates after incubation with 6-methyl-MP showed no formation of 6-Methyl-TIMP. Further investigations are warranted to elucidate the way thiopurine compounds are metabolized in human cells.

Chapter 3 describes the development and application of a method to determine thiopurine metabolites in body fluids, using ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry. Using stable isotope labeled internal standards (methylated) thiopurines and metabolites could be detected in urine and plasma in concentrations down to 50 nanomolar. Intra assay variations were within acceptable limits for the compounds measured. Instability of 6-MP and 6-TG, most probably due to oxidation, made it nearly impossible to establish inter assay variation for these compounds. For methylated thiopurines inter assay variations ranged from 4-7% in plasma. In urine the low concentration range intra assay variations were >15%. The method was further validated by analyzing samples from patients on thiopurine

therapy. In urine and plasma 6-MP and 6-thiouric acid (6-TU) were readily detectable. The other compounds were only found in trace amounts, below the limit of quantification (LOQ) of the method.

The relevance of measuring TPMT before starting thiopurine therapy is emphasized by the clinical history of the case presented in chapter 4. The patient was treated for refractory Ulcerative Colitis (UC). Within 5 weeks after starting Azathioprine (AZA), a prodrug of 6-MP, the patient developed severe leucopenia and anemia. After admission to the hospital an adverse drug reaction caused by AZA was suspected and AZA was stopped immediately. TPMT activity was measured in erythrocytes and was found decreased. Molecular analysis revealed a $*1/*3C$ TPMT genotype, associated with a decreased TPMT activity. After 4 weeks the patient recovered and treatment was continued with mesalazine.

A second enzyme involved in (thio)purine metabolism is inosine triphosphatase (ITPase). In chapter 5 the method for the measurement of ITPase activity in erythrocytes is described, using liquid chromatography with UV-detection. The method was optimized for measuring ITPase activity in dried blood spots (DBS). Although the method was applicable for the measurement in DBS and decreased activities could easily be detected, the stability of the enzyme was poor. It was therefore concluded that ITPase activity measurement in DBS is not reliable. Therefore the use of fresh erythrocyte lysates for the measurement of ITPase activity is required.

The debate on *ITPA* polymorphisms and ADR during thiopurine therapy is still ongoing. In chapter 6, the focus is on the enzyme ITPase and its kinetic properties. Genotype associated reference values for ITPase in erythrocytes were established. The specificity of ITPase for the substrates ITP and thio-ITP was determined, both for the wild type genotype as for the activity lowering polymorphisms. Surprisingly the binding of the substrates was comparable for the genotypes tested, however, the velocity of pyrophosphohydrolysis was greatly decreased when the c.94C>A polymorphism was present. The efficiency of ITPase for both substrates was found to be comparable under the assay conditions. From these results it appears that other (epigenetic) factors may be responsible for the occurrence of ADR during thiopurine therapy in the presence of *ITPA* polymorphisms.

Chapter 7 describes a pilot study in which the association between *ITPA* polymorphisms and clinical outcome in patients with pulmonary Langerhans' cell histiocytosis is evaluated. Interestingly, patients with a with an ITPase activity lowering polymorphism were found to have a more unfavorable outcome compared to the patients with a wild type genotype. The cause of this phenomenon is unclear: possibly the house keeping function of *ITPA* is compromised in patients with a decreased ITPase activity.

Finally, the major findings of this thesis are discussed in chapter 8 and the suggestions for future research are given. Although the knowledge on TPMT and ITPase is expanding continually, still many questions have to be answered. To answer some of these questions future research needs to follow two lines: one will be focused on the

biological function of ITPase in health and disease. The other line will focus on the handling of thiopurines by the organism, especially the way thiopurines are absorbed by the intestinal tract and how inflammation is influencing this process.

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.

