

Nederlandse samenvatting.

HUMAAN IMMUNODEFICIËNTIEVIRUS

Het Humaan immunodeficiëntievirus (HIV) is een enkelstrengs ribonucleïnezuur (RNA)-virus dat specifiek CD4⁺ T-helper lymfocyten, macrofagen en dendritische cellen infecteert. Na binding van een oppervlakte-eiwit op de HIV celmembraan met de CD4 receptor en één van de co-receptoren CCR5 of CXCR4 op deze gastheercellen, fuseren beide celmembranen met elkaar en komt de inhoud van de HIV-cel in het cytoplasma van de gastheercel. Het HIV gebruikt daar het enzym 'reverse transcriptase' en de nucleotiden van de gastheercel om van de enkele RNA-streng een dubbele deoxyribonucleïnezuur (DNA)-streng te maken. Dit DNA wordt via het HIV-enzym 'integrase' in het DNA van de gastheer ingebouwd. Via het nucleotide-metabolisme van de gastheer worden vervolgens van dit ingebouwde DNA nieuwe RNA-moleculen afgeschreven, welke na translatie nieuwe HIV-eiwitten leveren. Deze HIV-eiwitten worden in een deel van de celwand van de gastheercel weer verpakt tot nieuwe HIV-partikels, die nieuwe gastheercellen kunnen infecteren. Onbehandelde HIV-infectie leidt tot een vermindering van CD4⁺ T-cel lymfocyten en uiteindelijk tot immuundeficiëntie, Acquired Immune Deficiency Syndrome; AIDS genoemd. Zonder behandeling leidt dit ziektebeeld tot het overlijden van de patiënt. De medicatie die wordt gebruikt om HIV te remmen, combinatie anti-retrovirale therapie (cART) genoemd, is in de laatste tientallen jaren steeds effectiever geworden. cART kan de virusreplicatie onderdrukken en zorgen voor (gedeeltelijk) herstel van het immuunsysteem. Er zijn meerdere stappen in de HIV-replicatie cyclus die een aangrijpingspunt vormen voor de medicatie. In een cART regime zitten altijd meerdere middelen uit verschillende klassen medicatie die op verschillende van deze aangrijpingspunten werken. De huidige richtlijnen schrijven allen een combinatie van minimaal 3 middelen voor, waarin twee NRTIs worden gecombineerd met of een niet-nucleoside reverse-transcriptase remmer (NNRTI), een protease remmer (PI) of een integrase remmer. Hoewel de huidige therapie de laatste jaren zeer sterk verbeterd is qua effectiviteit, kunnen we HIV nog altijd niet genezen en moet een patiënt de rest van zijn leven cART blijven gebruiken. Zoals bij vrijwel alle medicatie treden ook bij cART gebruik frequent bijwerkingen op, waarvan we, behoudens middels de genetische marker HLA-B*57:01 voor abacavir, niet kunnen voorspellen welke patiënt ze krijgt en hoe ernstig deze zullen zijn.

ITPASE

De replicatie van HIV en de werking van de NRTIs zijn afhankelijk van het nucleotide metabolisme van de gastheercel. De nucleotiden, adenine en guanine (purines) en cytosine en thymine (pyrimidines), zijn de bouwstenen van DNA. Deze nucleotiden zijn uitgebreid onderzocht en van hun nucleotide-5'-trifosfaat vorm is bekend dat ze betrokken zijn bij

de energielevering voor verschillende processen in de menselijke cel, signalen doorgeven binnen de cellen, betrokken zijn bij de vorming van polysachariden en onderdelen zijn van verschillende co-enzymen die belangrijk zijn voor oxidatie-reductie reacties. Naast deze 4 nucleotiden, zijn er nog andere nucleobasen, zoals xanthine en hypoxanthine, waarvan de laatste de base is om de nucleoside inosine te vormen. Deze nucleobasen worden gevormd binnen de metabole paden van het purine nucleotide mechanisme, maar ook bij oxidatieve stress en deaminatie. De rol van xanthine en hypoxanthine, ook wel 'non-canonische' nucleosiden genoemd, is minder uitgebreid onderzocht dan van de 'canonische' nucleosiden. Wel is bekend dat ze zowel gunstige als schadelijke effecten kunnen hebben. Inosine trifosfaat pyrofosfohydrotase (ITPase) is een enzym dat inosine-5'-trifosfaat (ITP) defosforyleert naar inosine-5'-monofosfaat (IMP). Dit enzym wordt gecodeerd door het gen *ITPA*. Verschillende single nucleotide polymorfismen (SNPs) zijn bekend binnen dit gen, waarvan meerdere SNPs leiden tot een verminderde activiteit van het enzym ITPase. Zo leidt homozygoot dragerschap voor SNP 94C>A tot nagenoeg volledige ITPase deficiëntie, terwijl heterozygote dragers van deze SNP nog 23% restactiviteit hebben. De SNP 124+21A>C leidt in homozygote dragers tot 30% en in heterozygote dragers tot 60% ITPase restactiviteit. Deze verschillende SNPs komen wereldwijd in wisselende frequenties voor bij verschillende populaties. Er is uitgebreid onderzoek gedaan naar de invloed van deze SNPs op bijwerkingen van purine analogen zoals azathioprine dat gebruikt wordt in de behandeling van inflammatoire darmziekten, mercaptopurine voor acute lymfoblastaire leukemie en ribavirine voor hepatitis C (HCV). Voor de eerstgenoemde middelen zijn de uitkomsten van de onderzoeken niet eenduidig. Voor ribavirine is echter aangetoond dat dragerschap van een SNP in het *ITPA* gen, leidend tot een vermindering van de activiteit van ITPase, beschermt tegen de bijwerking hemolytische anemie. In cART voor HIV worden purine analogen gebruikt als nucleoside/nucleotide reverse-transcriptase remmers (NRTIs) zoals abacavir, tenofovir en didanosine.

Dit proefschrift beschrijft de resultaten van onderzoek naar het enzym ITPase als mogelijke biomarker voor het voorspellen van bijwerkingen tijdens de behandeling met ribavirine voor HCV en cART voor HIV en wordt hierin vergeleken met het *ITPA* gen.

ITPASE ALS BIOMARKER VOOR BIJWERKINGEN

In **hoofdstuk 2** wordt beschreven dat de ITPase activiteit een betere biomarker is dan het *ITPA* genotype voor het voorspellen van anemie en hemoglobine daling tijdens de behandeling van HCV met ribavirine. In alle in dit proefschrift beschreven onderzoeken wordt een verlaagde ITPase activiteit gedefinieerd als <4 mmol IMP vorming per mmol hemoglobine per uur (<4 mmol IMP/mmol Hb/uur), omdat dit de laagste waarde is van het 95%

betrouwbaarheidsinterval van de waarde van ITPase activiteit bij mensen met een *ITPA* genotype zonder SNPs (die geacht worden een normale ITPase activiteit te hebben). Uit deze studie, die 106 patiënten bevat, blijkt dat een verlaagde ITPase activiteit geassocieerd is met een minder laag hemoglobine, minder grote hemoglobine daling en minder frequent voor komen van anemie (bloedarmoede). Ook patiënten met een van beide hierboven genoemde SNPs in het *ITPA* gen blijken een significant minder laag hemoglobine en een mindere hemoglobine daling te hebben, maar het voorkomen van anemie is alleen verminderd in de patiënten met de SNP 94C>A vergeleken met patiënten zonder SNP in hun genotype (wildtype; wt/wt). Een mogelijke verklaring hiervoor is dat de SNP 124+21A>C in het *ITPA* gen minder strikt geassocieerd is met een verminderde ITPase activiteit dan eerder werd aangenomen. De patiënten met deze SNP hebben namelijk ITPase activiteiten variërend van sterk verlaagde tot normale waarden; 38% heeft een normale ITPase activiteit. Tot slot blijkt dat zowel de ITPase activiteit als het *ITPA* genotype geen invloed hebben op de effectiviteit van de HCV behandeling.

In **hoofdstuk 3** worden de resultaten beschreven van het onderzoek naar de aanwezigheid van het enzym ITPase in witte bloedcellen (leukocyten) van 59 HIV-patiënten vergeleken met een controle groep van 50 niet-HIV geïnfecteerde mensen. Het enzym ITPase blijkt in alle leukocyten subsets van HIV-patiënten, behalve de monocyten, minder vaak aanwezig te zijn dan in de leukocyten subsets van de controle groep. De cellen die wel ITPase bevatten, hebben bij de HIV-patiënten een minder sterke mate van expressie vergeleken met de cellen van de individuen in de controle groep. Deze verlaging van de aanwezigheid van ITPase is niet gerelateerd aan het *ITPA* genotype, want de verdeling van de genotypes is in HIV-patiënten hetzelfde als in de niet-HIV geïnfecteerde mensen. De resultaten van dit onderzoek sluiten aan bij eerder onderzoek, waarin ook in rode bloedcellen (erythrocyten) van HIV-patiënten een verlaagde ITPase activiteit werd gevonden ten opzichte van een controle populatie.

Naar aanleiding van bovenstaande bevindingen [1] ITPase activiteit lijkt een betere voorspeller te zijn van bijwerkingen tijdens therapie met een purine analoog voor HCV en 2] de ITPase activiteit is verlaagd in zowel erythrocyten als leukocyten van HIV-patiënten), werden de studies gedaan die worden beschreven in **hoofdstukken 4, 5 en 6**. In analogie van HCV, blijkt voor het voorspellen van bijwerkingen tijdens behandeling met de purine analogen abacavir en tenofovir in cART voor HIV de ITPase activiteit ook een betere maat dan het *ITPA* genotype. Didanosine is ook een purine analoog, maar omdat bij het gebruik hiervan geen relatie met ITPase activiteit en *ITPA* genotype is gevonden en dit middel tegenwoordig bijna niet meer gebruikt wordt, worden deze resultaten hier niet apart besproken.

Tenofovir

In **hoofdstuk 4** worden de resultaten beschreven van een retrospectieve studie in een populatie van 393 HIV-geïnfekteerde patiënten die behandeld werden met cART. De bijwerkingen worden gegroepeerd in de categorieën maag/darmklachten, neurologische klachten, nefrotoxiciteit, huidafwijkingen en leverproblemen. Bijwerkingen ten tijde van het gebruik van de verschillende cART regimes worden vergeleken tussen patiënten met een verlaagde en patiënten met een normale ITPase activiteit. Ook wordt deze vergelijking gemaakt tussen patiënten met een of meerdere van de SNPs c.94C>A en c.124+21A>C in het *ITPA* gen en de patiënten zonder SNPs in dit gen (wt/wt). De patiënten met een verlaagde ITPase activiteit hebben minder bijwerkingen dan de patiënten met een normale ITPase activiteit tijdens de behandeling met een cART regime dat tenofovir bevat. Dit geldt ook voor patiënten met SNPs in het *ITPA* gen (c.94C>A en/of c.124+21A>C) vergeleken met patiënten met het wildtype (wt/wt) *ITPA* genotype. Maar als gekeken wordt naar afzonderlijke bijwerkingen, dan is een verlaagde ITPase activiteit alleen geassocieerd met minder nierschade (nefrotoxiciteit) tijdens behandeling met tenofovir en kan deze associatie niet worden aangetoond voor het *ITPA* genotype. In het vervolgonderzoek (beschreven in **hoofdstuk 5**), vergelijken we HIV-patiënten die tenofovir gebruikten met nefrotoxiciteit tijdens therapie (26 patiënten) met 55 gematchte patiënten zonder nefrotoxiciteit. In deze studie worden de resultaten uit **hoofdstuk 4** bevestigd. Patiënten met nefrotoxiciteit hebben significant vaker een normale ITPase activiteit dan patiënten zonder nefrotoxiciteit. Dit verschil wordt niet gevonden als de verschillende *ITPA* genotypes met elkaar worden vergeleken. Wel is het hebben van een normale ITPase activiteit geassocieerd met een beter herstel van de nierfunctie na het staken van tenofovir.

Abacavir

Voor abacavir zijn de resultaten, beschreven in **hoofdstuk 4 en 6** minder eenduidig dan voor tenofovir. De bijwerkingen waarvoor een verminderde ITPase activiteit bij tenofovir beschermend lijkt te zijn (maag/darmklachten, neurologische klachten, nefrotoxiciteit, huidafwijkingen en leverproblemen), komen juist vaker voor bij de patiënten met een verminderde ITPase activiteit tijdens therapie met abacavir. Echter na correctie voor de factoren: duur van cART, duur van purine therapie en duur van het huidige cART regime, is dit verschil niet significant meer. Het *ITPA* genotype is niet geassocieerd met deze bijwerkingen tijdens therapie met abacavir.

In **hoofdstuk 6** blijkt dat het hebben van een verlaagde ITPase activiteit ook voor HIV-patiënten die abacavir gebruiken op een andere wijze gunstiger is, omdat zij minder vaak een metabole bijwerking (diabetes mellitus, hypertensie en dyslipidemie) blijken te hebben dan de patiënten met een normale ITPase activiteit. Hoewel ook in *ITPA* genotypes die een SNP bevatten minder metabole bijwerkingen lijken voor te komen, is deze associatie niet

langer significant na correctie voor leeftijd, body mass index (BMI), cumulatief gebruik van cART en het gebruik van een PI of NNRTI. Het eindpunt hart- en vaatziekten (cardiovasculaire ziekten) is in dit onderzoek niet geassocieerd met ITPase activiteit of *ITPA* genotype, waarschijnlijk door het lage aantal gevallen dat voorkwam in de onderzochte populatie.

MECHANISME

De ITPase activiteit is geassocieerd met bijwerkingen ten tijde van therapie met tenofovir (algemene bijwerkingen en nefrotoxiciteit) en abacavir (metabole bijwerkingen) voor HIV en zou daarom mogelijk in de toekomst in kunnen worden gezet als biomarker voor het voorspellen van bijwerkingen. De ITPase activiteit lijkt in de studies beschreven in dit proefschrift een betere biomarker te zijn dan het *ITPA* genotype. Een voor de hand liggende verklaring voor de gevonden associatie zou kunnen zijn dat de actieve metabolieten van tenofovir en abacavir een substraat zijn voor het ITPase enzym en dat zo de activiteit van ITPase de vorming van toxische metabolieten beïnvloedt. Dit is echter getest en beide blijken geen direct substraat te zijn, waardoor deze hypothese moet worden verworpen (**hoofdstuk 4**). In de discussie (**hoofdstuk 8**) van dit proefschrift worden enkele hypothesen besproken over de mogelijke mechanistische verklaring achter de gevonden associaties. Mogelijk spelen verschuivingen in intracellulaire nucleotide voorraden of het ontstaan van zuurstofradicalen een rol, maar ook een veranderde cellulaire signaal transductie waarin mogelijk ITP een substraat is voor cyclisch guanosine-3',5'-monofosfaat (cGMP) behoort theoretisch tot de mogelijkheden. Duidelijk is dat er nog veel aanvullend onderzoek nodig is om het mechanisme achter de gevonden associaties in zijn geheel te verklaren.

VERANDERINGEN VEROORZAAKT DOOR VIRUS OF MEDICATIE?

Een normale ITPase activiteit tijdens het gebruik van abacavir voor HIV-infectie zou dus ongunstig kunnen zijn voor onder andere het ontwikkelen van risicofactoren voor cardiovasculaire ziekten. Voor HIV-patiënten is gebleken dat het risico op cardiovasculaire ziekten verhoogd is, maar onbekend is in hoeverre dit risico wordt veroorzaakt door de infectie zelf of door de cART. Om meer inzicht te krijgen in de metabole veranderingen tijdens een actieve, onbehandelde HIV-infectie, worden in **hoofdstuk 7** metabolieten in het plasma van 18 HIV-patiënten vergeleken met dat van 23 niet-HIV geïnfecteerde personen. In de onbehandelde HIV-patiënten worden meerdere verschillen gezien ten opzichte van de controle groep in de biogene amines, waarvan alle amines die verschilden, verlaagd zijn bij HIV-patiënten. Ook het lipidenprofiel verschilt tussen beide groepen met een toename van meervoudig onverzadigde triglyceride soorten in HIV, maar een afname van fosfolipiden.

Binnen de groep signaallipiden, met name van belang voor het doorgeven van signalen tussen immuuncellen, is een groot deel van de lipiden verhoogd, waaronder de lipiden afkomstig van de vorming van oxidatieve zuurstofradicalen. Concluderend bestaan er grote verschillen tussen HIV-patiënten en niet-HIV geïnfecteerde personen in zowel biogene amines als lipiden en signaallipiden. De resultaten van dit onderzoek kunnen bijdragen aan toekomstig onderzoek dat noodzakelijk is voor het beantwoorden van meerdere vragen, zoals waarom HIV-patiënten een verhoogd cardiovasculair risico hebben, of waarom er meer maligniteiten voorkomen bij HIV-patiënten. De meest opvallende bevinding van het onderzoek dat wordt beschreven in **hoofdstuk 7** is dat 12 maanden behandeling met abacavir bevattende cART in HIV-geïnfecteerde patiënten met succesvolle onderdrukking van de virale replicatie toch niet leidt tot herstel van de gevonden verschillen tussen onbehandelde HIV-patiënten en de controle populatie. Slechts enkele verlaagde amines nemen significant toe na 12 maanden cART en alle signaallipiden blijven verlaagd, ondanks de therapie. De overige lipiden laten wel veranderingen zien en blijken over het algemeen toe te nemen tijdens therapie. Samenvattend betekent dit dat de metabole veranderingen die ontstaan tijdens actieve HIV-infectie, niet compleet ongedaan worden gemaakt met een jaar lang succesvolle abacavir bevattende therapie tegen HIV.

CONCLUSIES

In **hoofdstuk 8** worden alle resultaten samengevat en wordt de balans opgemaakt tussen ITPase activiteit en *ITPA* genotype als biomarker voor bijwerkingen tijdens de behandeling met de purine analogen ribavirine voor hepatitis C en abacavir en tenofovir voor HIV. Ook de mogelijkheden voor toekomstig onderzoek worden hier besproken. De belangrijkste conclusies van dit proefschrift zijn:

- 1) In de leukocyten van HIV-patiënten is het enzym ITPase minder vaak aanwezig en is de expressie minder sterk dan in de leukocyten van niet-HIV geïnfecteerde mensen.
- 2) Het voorkomen van de SNP c.124+21A>C is minder sterk geassocieerd met een verminderde ITPase activiteit dan voorheen werd aangenomen.
- 3) ITPase activiteit is een betere biomarker dan *ITPA* genotype voor het voorspellen van:
 - a) anemie en hemoglobine-daling ten tijde van behandeling met ribavirine voor hepatitis C,
 - b) bijwerkingen in het algemeen en nefrotoxiciteit in het bijzonder ten tijde van behandeling met tenofovir voor HIV,
 - c) metabole bijwerkingen ten tijde van behandeling met abacavir voor HIV.
- 4) Bij alle bovengenoemde associaties is een verlaagde ITPase activiteit (<4 mmol IMP/mmol Hb/uur) gunstiger dan een normale ITPase activiteit.
- 5) Een verlaagde ITPase activiteit is echter mogelijk geassocieerd met

- a) een slechter herstel van nefrotoxiciteit na het staken van tenofovir voor HIV,
 - b) het vaker voorkomen van algemene bijwerkingen tijdens gebruik van abacavir voor HIV.
- 6) De verandering in metaboliëten bij patiënten met onbehandelde HIV-infectie, wordt niet volledig hersteld door een jaar succesvolle onderdrukking van de virale replicatie van HIV door gebruik van abacavir bevattende cART.

Toekomstig onderzoek zal uit moeten wijzen of ITPase ook bij andere indicaties voor tenofovir geassocieerd is met bijwerkingen en of het ook met andere bijwerkingen dan anemie, nefrotoxiciteit en metabole effecten geassocieerd is tijdens therapie met purine analogen. Verder zal onderzocht moeten worden in welke populaties de biomarker het best inzetbaar zal zijn. Ook algemeen onderzoek naar ITPase en de non-canonische nucleotiden is nodig om zowel hun gunstige als schadelijke effecten beter in kaart te brengen. Hopelijk zal dit leiden tot 'therapie op maat' voor elke patiënt.