

Discussion

Analysis of placental RNA in maternal plasma for prenatal diagnosis of pre-eclampsia and other disorders permits the following:

Allelic expression ratios can be analyzed using single nucleotide polymorphisms (SNPs). For this purpose, a powerful modification permitting robust, direct assessment of fetal chromosome dosage in maternal plasma was introduced recently: the RNA-SNP allelic ratio strategy (5). By quantitative comparison of the allelic expression ratios of a placentally-expressed, chromosome 21-encoded gene, *PLAC4*, the expression differences between two (normal) or three chromosome 21 copies (Down syndrome) become clearly detectable in maternal plasma (5). This approach can theoretically be applied to any gene with placental expression with placental RNA present in the plasma of pregnant females and absent in non-pregnant females.

High-throughput automated assays, such as using DNA chip technology, permitting quantitative and qualitative analysis of most, if not all, placental

(allelic) transcripts expressed and present in maternal plasma should be developed for this purpose.

References

1. Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* 2005, 12: 642-9.
2. Go ATJJ, Visser A, Mulders MAM, Blankenstein MA, Vugt JMG van, Oudejans CBM. Detection of placental transcription factor mRNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2004, 50: 1413-4.
3. Chim SS, Tong YK, Chin RWK, Lau TK, Leung TN, Chan LYS, et al. Detection of placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102: 14753-8.
4. Dijk M van, Mulders J, Poutsma A, Konst AA, Lachmeijer AM, Dekker GA, Blankenstein GA, Oudejans CB. Maternal segregation of the Dutch preeclampsia locus at 10q22 with a new member of the winged helix gene family. *Nat Genet* 2005, 37: 514-9.
5. Lo YM, Tsui NB, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Henung MM, et al. Plasma placental RNA allelic ratio permits non-invasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med* 2007; 13: 218-23.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2007; 32: 196-198

Immuunsuppressiva en hun doeleiwit

J. van PELT, F. ROMIJN, H. DEKTER, H. van ROSSUM en N. SMIT

De introductie van immuunsuppressiva heeft een doorbraak gebracht in de behandeling van patiënten bij orgaantransplantaties. Met name de komst van ciclosporine heeft het succespercentage van niertransplantaties enorm vergroot. Tegenwoordig is de overleving van een transplantaat veelal enkele tientallen jaren en is het rejectiepercentage per jaar slechts enkele procenten. Helaas heeft de chronische behandeling met immuunsuppressiva ook veel bijwerkingen waaronder nefrotoxiciteit en een vergrote kans op maligniteiten, vooral van de huid. Teneinde een balans te vinden tussen de minimale kans op afstoting en de reductie van bijwerkingen zijn frequente bloedspiegelbepalingen noodzakelijk om de optimale medicijndosering vast te kunnen stellen ('therapeutic drug monitoring') temeer daar er grote individuele verschillen in farmacokinetiek bestaan. Voor de analyse in volbloed zijn door een aantal firma's immunoassays ontwikkeld en meer recent wordt LC-MS toegepast. Na ciclosporine zijn een aantal andere immuunsuppressiva geïntroduceerd zoals tacrolimus, pimecrolimus, everolimus en sirolimus (zie tabel 1).

Naast orgaantransplantaties worden genoemde middelen in toenemende mate toegepast bij verschillende auto-immuunaandoeningen zoals M. Crohn en zowel systemisch als topicaal bij ernstige huidziekten. Sirolimus en everolimus lijken daarnaast een serieuze toepassing in de oncologie te krijgen.

Zoals gezegd vergt de dosering van immuunsuppressiva veel aandacht. Bloedspiegelbepalingen worden gebruikt als input voor zogenaamde farmacokinetische modellen (PK) waarmee de juiste dosering bere-

Tabel 1. Immuunsuppressiva, het bindende eiwit en het doeleiwit

Medicament	Bindend eiwit	Doeleiwit
Cyclosporin (Neoral, Sandimmune)	Cyclophiline	Calcineurine
Tacrolimus (FK 506, Prograf, Protopic)	FK-BP12	Calcineurine
Pimecrolimus (Elidel)	FK-BP12	Calcineurine
Sirolimus (Rapamycine, Rapamune)	FK-BP12	mTOR
Everolimus (RAD-001)	FK-BP12	mTOR

Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium, LUMC, Leiden

kend kan worden. Veel centra gebruiken alleen dalspiegels (C0) of de waardes 2 uur na dosering (C2), maar het is aangetoond dat de berekening van de oppervlakte onder de curve (AUC) met meerdere meetpunten tot nauwkeuriger resultaten leidt en daarmee tot een betere behandeling van de patiënt.

Helaas geeft dit niet altijd voldoende informatie over het klinische resultaat of het effect van medicatie. Hiertoe zijn gegevens nodig over bijvoorbeeld de remming van het doelwitenzym of een andere 'aflees- of effectparameter'. Farmacodynamiek (PD) is een geschikte kandidaat voor het beschrijven van het effect veroorzaakt door het medicijn. Deze kennis draagt bij tot meer inzicht in de verschillen tussen patiënten. Daarnaast kan PD ook voorspellingen mogelijk maken t.a.v. de klinische uitkomst.

Calcineurine

Calcineurine (PP2B, PP3) is een calciumafhankelijk serine/threoninefosfatase met een sleutelrol in de calciumsignaalroute. Als de calciumconcentratie in de T-cel toeneemt na T-celreceptorstimulatie, leidt dit tot activering van calcineurine. Calcineurine verwijderd vervolgens de fosfaatgroepen van NFAT ('nuclear factor of activated T-lymphocytes') en gaat de celkern binnen, wat een toegenomen transcriptie van RNA, coderend voor IL2 en IFN- γ medieert. Deze cytokinen zijn verantwoordelijk voor de activatie en regulatie van de immuunrespons. Ciclosporine bindt in de cel aan cyclophiline en dit complex is in staat calcineurine te remmen (zie figuur 1).

Tacrolimus is eveneens een calcineurineremmer maar gebruikt een ander bindingseiwit, te weten FKBP12 (FK506-binding protein 12) voor de remming van calcineurine. Ondanks dat de reversibele binding en inhibitie van beide complexen aan calcineurine op elkaar lijken verschilt de werking bij klinische toepassingen en zijn ook de bijwerkingen niet volledig gelijk.

Een analoog van tacrolimus: pimecrolimus wordt uitsluitend topicaal toegepast bij hardnekkige huidziekten zoals psoriasis, vitiligo en constitutioneel eczeem.

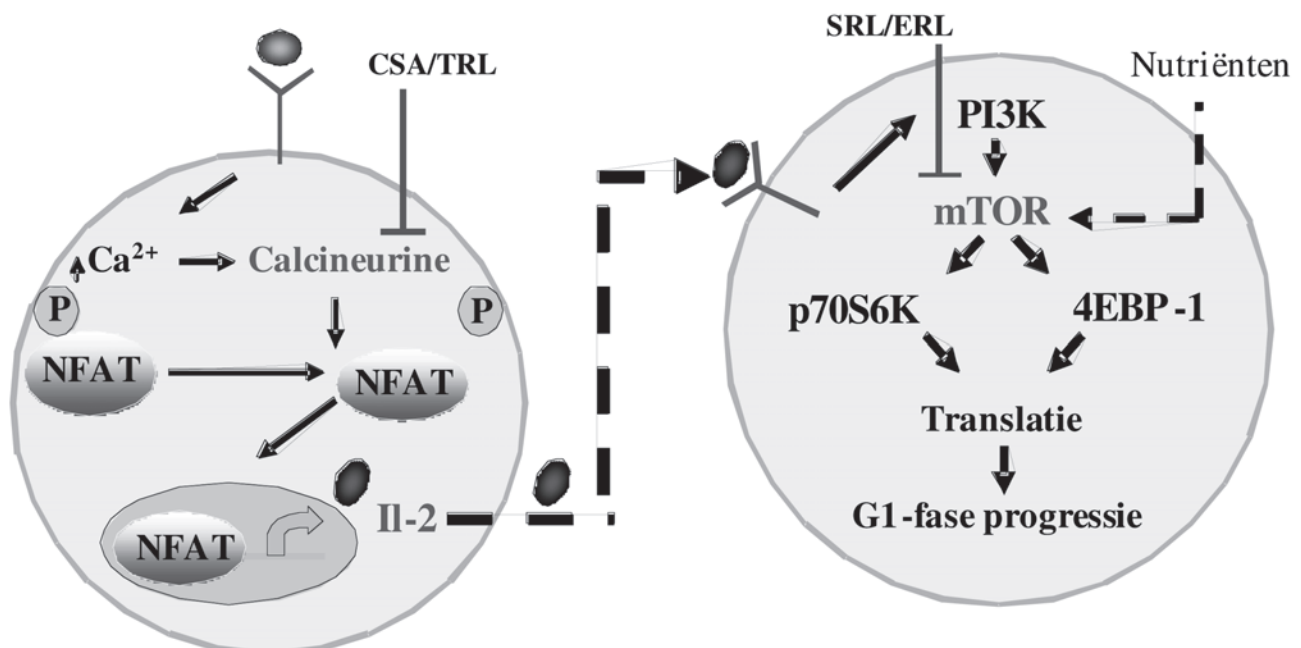
Proliferatiesignaalremmers

De immuunsuppressiva sirolimus en everolimus zijn beide rapamycines en binden eveneens aan FKBP12 maar geven opmerkelijk genoeg remming van mTOR ('mammalian target of rapamycine'). mTOR (ook wel met FRAP aangeduid) is een serine/threoninekinase met een belangrijke rol in de regulatie van celdelingen. In feite blokkeren sirolimus en everolimus door de remming van mTOR de normale proliferatieve respons van T-lymfocyten op een toegenomen IL-2-concentratie en worden daarom tegenwoordig ook wel proliferatiesignaalremmers (PSI) genoemd.

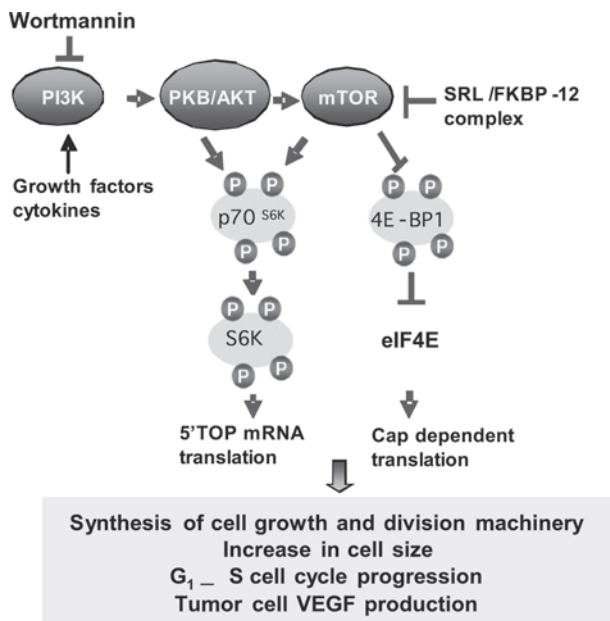
De werking van mTOR is tweeledig: enerzijds wordt door geactiveerd mTOR het p70S6-kinase gefosforyleerd, hetgeen na een paar tussenstappen tot initiatie en G1-faseprogressie leidt. Anderzijds wordt 4E-BP1 gefosforyleerd waardoor de binding met eIF-4E verloren gaat en dit eiwit vrijkomt en op alternatieve wijze de translatie van RNA in gang zet (zie figuur 2). Remming van beide routes leidt tot immuunsuppressie en is voor de oncologische wereld bijzonder interessant: de remming van celdeling. Daarnaast zijn beide middelen minder nefrotoxisch. Aan mTOR in de hypothalamus wordt tegenwoordig ook een cruciale rol toegekend in de signalering van de energiebehoefte en voedselinname.

Calcineurine-assay

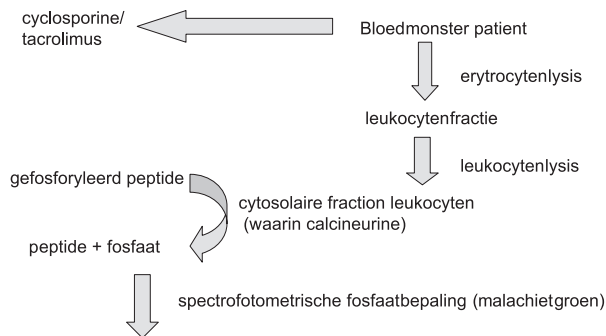
Calcineurine-activiteit bij patiënten wordt gemeten in de leukocytenfractie van het perifere bloed. Voor het isoleren van de leukocyten uit volbloed worden de erythrocyten d.m.v. NH₄Cl gelyseerd. De leukocyten fractie wordt na herhaald wassen gelyseerd in een speciale lysisbuffer voorzien van vitamine C ter voorkoming van deactivatie en opgeslagen bij -80°C.



Figuur 1. Immuunsuppressie in geactiveerde T-cellen

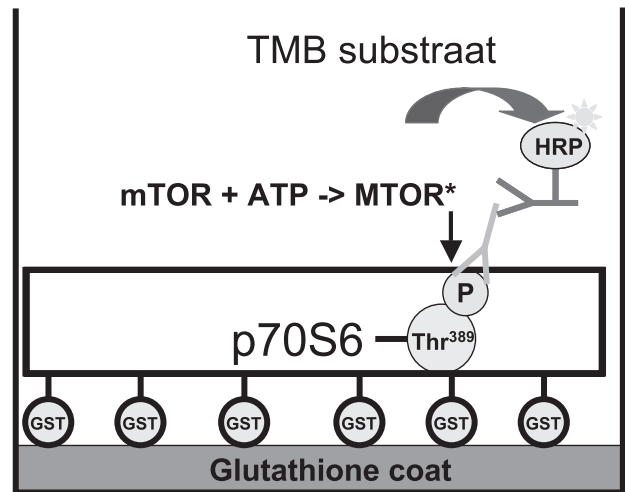


Figuur 2. mTOR pathway



Figuur 3. Calcineurine-assayprotocol

De calcineurine assay (1) is gebaseerd op de defosforylering van een fosfopeptidesubstraat (RII). Aangezien er ook andere fosfatase-enzymen aanwezig zijn die het substraat kunnen defosforyleren, wordt de calciumafhankelijke fosfataseactiviteit gemeten. Hiervoor wordt de fosfataseactiviteit in aanwezigheid van EGTA, een chelator van calcium, gemeten. De activiteit van de eveneens aanwezige fosfatasen PP1 en PP2A wordt geblokkeerd door een overmaat okadaïczuur. Het vrijgekomen fosfaat wordt vervolgens door malachietgroenreagens gebonden en de ontwikkelde kleur wordt spectrofotometrisch bij 610 nm gemeten (zie figuur 3). Eerdere beschreven methoden maakten gebruik van met P^{32} gelabeld RII-peptide waarna scheiding nodig is van vrij fosfaat en fosfopeptide of van een HPLC-scheiding van fosfopeptide en gedefosforyleerd peptide. Het voordeel van de spectrofotometrische methode is dus dat er geen radioactieve reagentia en HPLC-apparatuur noodzakelijk zijn en dat de calcineurine-activiteit na de enzymreactie direct uitgelezen kan worden.



Figuur 4. 'mTOR activity assay' gebaseerd op de K-LISA™

mTOR-assay

De door ons ontwikkelde mTOR-assay is gebaseerd op de K-LISA™ mTOR activity kit van CalBiochem. Deze assay maakt gebruik van een p70^{S6K}-GST-fusieproteïne dat gebonden wordt aan een microtiterplaat door middel van een glutathioncoating (zie figuur 4). Dit p70^{S6K}-eiwit wordt specifiek door mTOR gefosforyleerd op Thr-389. Na incubatie wordt een specifiek antilichaam gericht op het p70^{S6K}-Thr389-P toegevoegd en vervolgens een algemeen anti-IgG-gelabeld met horseradish-peroxidase. Na wassen geeft de omzetting van het toegevoegde TMB een kleurreactie die meetbaar is bij 450 nm. Deze assay is inmiddels met succes toegepast in velerlei cellen zoals PBMC's en diverse normale en tumorcellen. Toevoeging van sirolimus en everolimus aan PBMC's geeft een sigmoïdale remmingscurve, evenals de toevoeging van wortmannin, hetgeen een remming op het niveau van PI3-kinase geeft.

Besluit

De ontwikkeling van twee reproduceerbare assays voor respectievelijk calcineurine- en mTOR-activiteit opent de weg voor het farmacodynamisch monitoren van ciclosporine/tacrolimus- en sirolimus/everolimus-behandelde patienten. Kennis van deze karakteristieken zal meer inzicht kunnen geven in de relatie tussen farmacokinetiek / farmacodynamiek. Verder zijn de enzymactiviteiten interessante nieuwe biomarkers voor het monitoren van immuunsuppressietherapie.

Referentie

- Sellar KJ, van Rossum HH, Romijn FP, Smit NP, de Fijter JW, van Pelt J. Spectrophotometric assay for calcineurin activity in leukocytes isolated from human blood. *Anal Biochem* 2006; 358:104-110.