

Bestudering van (toegenomen) expressie van pyruvaatkinase antigeen and dyserythropoiese in patienten met pyruvaatkinasedeficientie

Gepubliceerd: 26-07-2010 Laatste bijgewerkt: 02-05-2024

Primaire doel: De hier beschreven studie heeft tot doel om de recentelijk verkregen resultaten omtrent verhoogde expressie van PK antigeen in PK-deficiënte patiënten te versterken. Dit kan behaald worden door het aantal patiënten en gezonde...

Ethische beoordeling	Goedgekeurd WMO
Status	Werving gestopt
Type aandoening	Bloed- en lymfestelselaandoeningen, congenitaal
Onderzoekstype	Observationeel onderzoek, met invasieve metingen

Samenvatting

ID

NL-OMON35096

Bron

ToetsingOnline

Verkorte titel

PKR-Ag expressie in PKD-patienten

Aandoening

- Bloed- en lymfestelselaandoeningen, congenitaal

Synoniemen aandoening

anemie, rode bloedbloedziekte

Betreft onderzoek met

Mensen

Ondersteuning

Primaire sponsor: Universitair Medisch Centrum Utrecht

Overige ondersteuning: Ministerie van OC&W

Onderzoeksproduct en/of interventie

Trefwoord: erythropoiese, hemolytische anemie, pyruvaatkinase, rode bloedcel

Uitkomstmaten

Primaire uitkomstmaten

De primaire studie-parameter: het meten van de hoeveelheid PK-antigeen bij patiënten met PK-deficiëntie. Hiertoe zal een rode-bloedcelconcentraat worden verkregen uit 6 ml perifere bloed (EDTA) van patiënten en gezonde proefpersonen. Hieruit zal de hoeveelheid PK-antigeen worden bepaald met behulp van een ELISA methode die recent in ons laboratorium is ontwikkeld (van Wijk et al, 2009). De gemeten hoeveelheden zullen worden vergeleken met die van gezonde proefpersonen en gecorreleerd met het fenotype en genotype van de patiënt.

Van Wijk, R., Huizinga, E.G., Van Wesel, A.C.W., Van Oirschot, B.A., Hadders, M.A. & van Solinge, W.W. (2009) Fifteen novel mutations in PKLR associated with pyruvate kinase (PK) deficiency: structural implications of amino acid substitutions in PK. Hum Mutat, 30, 446-453.

Secundaire uitkomstmaten

(1) het bepalen van de capaciteit van de PK-deficiënte hematopoëtische stamcel om te kunnen differentiëren naar erythroïde cellen, en bestudering van pro-apoptotische genexpressie in PK-deficiënte erythroïde cellen. Hiertoe zal de mononucleaire-celfractie met behulp van dichtheidsscheiding worden verkregen uit 20 ml perifere bloed (EDTA) van PK-deficiënte patiënten en gezonde proefpersonen. Deze cellen worden vervolgens 2 weken in-vitro gekweekt onder invloed groeifactoren (waaronder erythropoëetine). De gevormde erythroïde

kolonies zullen worden gekarakteriseerd (BFU-E en CFU-E) en geteld. Het aantal en de karakteristieken van de kolonies zullen worden vergeleken met die van gezonde proefpersonen. Hierna zullen de kolonies worden geoogst en totaal RNA worden geïsoleerd. Dit RNA wordt gebruikt om expressie van anti-apoptotische genen als BAD, BNIP3, en BNIP3I te meten met behulp van kwantitatieve RT-PCR technieken. Deze genexpressie-profielen zullen worden vergeleken met die van gezonde proefpersonen.

(2) karakteristieken van de PK-deficiënte rode bloedcel (het rode-bloedbeeld), status van de ijzerhuishouding, en de hoeveelheid erythropoëetine.

Voor een juiste interpretatie van de resultaten en om PK-deficiënte patiënten te classificeren naar hun fenotype dienen een aantal routinematige bepalingen gedaan te worden: het rode-bloedbeeld (e.g. hemoglobine, aantal reticulocyten), de ijzerhuishouding, en de hoeveelheid erythropoëetine. Daartoe wordt bij PK-deficiënte patiënten een 6 ml lithium-heparine bloedsample (t.b.v. het bepalen van de hoeveelheid erythropoëetine, en de ijzerstatus) en een 3 mL EDTA bloedsample (t.b.v. het rode-bloedbeeld) afgenomen. Genoemde bepalingen zullen worden verricht op het Centraal Diagnostisch Laboratorium van de afdeling Laboratorium Klinische Chemie en Haematologie van het UMC utrecht. De resultaten zullen worden vergeleken met de geldende referentiewaarden binnen het laboratorium.

Toelichting onderzoek

Achtergrond van het onderzoek

De volwassen rode bloedcel is voor zijn energievoorziening volledig afhankelijk van de glycolyse. Pyruvaatkinase (PK) is een belangrijk enzym in deze metabole route en een deficiëntie van dit eiwit is de meest voorkomende stoornis van de glycolyse. Het is daarmee een belangrijke oorzaak van hereditaire non-sferocyttaire hemolytische anemie (van Wijk en van Solinge 2005). Klinische symptomen ten gevolge van PK deficiëntie komen in het algemeen alleen voor bij patiënten die compound heterozygoot of homozygoot zijn voor een mutatie in het PKLR gen. Het klinisch beeld is erg variabel (Zanella et al, 2007); patiënten met identieke genotypen kunnen een heel verschillend klinisch beeld hebben (van Wijk en van Solinge, 2006). Er is tevens geen relatie tussen de rest enzymactiviteit en de ernst van de hemolyse. Met andere woorden: bij PK-deficiëntie bestaat er een slechte correlatie tussen genotype en fenotype. Metabool gezien leidt een deficiëntie van PK tot een verlaagde enzymactiviteit. Als gevolg daarvan ontstaat er een tekort aan adenosinetrifosfaat en een verhoging van de hoeveelheid 2,3-bisfosfoglyceraat. Uiteindelijk resulteert dit in een verkorte overlevingsduur van de rode bloedcel (Valentine en Paglia, 1980). De precieze mechanismen hierbij betrokken zijn echter niet bekend.

Bij PK-deficiënte patiënten is het aantal hematopoëtische voorlopercellen, waaronder CFU-GM, BFU-E, en CFU-GEMM, in de milt veel hoger dan in gezonde mensen (Aizawa et al, 2003). Dit duidt erop dat er bij PK-deficiënte patiënten verhoogde extramedullaire haematopoïese plaatsvindt. Daarnaast bevat de milt van PK-deficiënte patiënten veel apoptotische cellen terwijl dergelijke cellen niet teruggevonden worden in de milt van gezonde proefpersonen (Aizawa et al, 2003). Deze bevindingen suggereren dat PK-activiteit noodzakelijk is voor een goede uitrijping van erythroïde voorlopercellen, door het voorkomen van apoptose. Bij muizen is aangetoond dat PK-deficiëntie in rode bloedcellen geassocieerd is met ineffektieve erythropoëse (Aizawa et al, 2005). Daarnaast is in een PK deficiënte muizen cellijn aangetoond dat overexpressie van recombinant wild-type PK in staat is om de expressie van pro-apoptotische genen zoals Bad, Bnip3 en Bnip3l te verminderen (Aisaki et al, 2007).

Onze onderzoeksgroep heeft recent aangetoond dat verlies aan PK enzymactiviteit niet altijd gepaard gaat met een kwantitatieve reductie van de hoeveelheid PK antigeen. In ongeveer de helft van de patiënten is het juist geassocieerd met een (sterke) stijging van de hoeveelheid PK antigeen (van Wijk et al, 2009). Omdat bij vele patiënten de onderliggende mutatie juist instabiliteit van het eiwit voorspelt, is deze toename van de hoeveelheid eiwit een intrigerende observatie. De resultaten suggereren dat de metabole verstoring ten gevolge van PK-deficiëntie leidt tot een verhoogde expressie van het PKLR gen gedurende erythroïde differentiatie en uitrijping. Deze bevindingen hebben geleid tot de hypothese dat de verhoogde expressie van PK dient ter compensatie van het verlies aan enzymactiviteit. Het is daarnaast mogelijk dat deze overexpressie de PK-deficiënte erythroïde voorlopercel beschermt tegen apoptose door de expressie van pro-apoptotische genen te remmen. De hoeveelheid PK antigeen is daarom mogelijk een belangrijke determinant van het klinische fenotype en, daarmee samenhangend, belangrijk om tot een beter begrip van de complexe

fenotype-genotype correlatie van deze ziekte te komen.

Aisaki, K., Aizawa, S., Fujii, H., Kanno, J. & Kanno, H. (2007) Glycolytic inhibition by mutation of pyruvate kinase gene increases oxidative stress and causes apoptosis of a pyruvate kinase deficient cell line. *Exp Hematol*, 35, 1190-1200.

Aizawa, S., Harada, T., Kanbe, E., Tsuboi, I., Aisaki, K., Fujii, H. & Kanno, H. (2005) Ineffective erythropoiesis in mutant mice with deficient pyruvate kinase activity. *Exp Hematol*, 33, 1292-1298.

Aizawa, S., Kohdera, U., Hiramoto, M., Kawakami, Y., Aisaki, K.-I., Kobayashi, Y., Miwa, M., Fujii, H. & Kanno, H. (2003) Ineffective erythropoiesis in the spleen of a patient with pyruvate kinase deficiency. *Am J Hematol*, 74, 68-72.

Valentine, W.N. & Paglia, D.E. (1980) The primary cause of hemolysis in enzymopathies of anaerobic glycolysis: a viewpoint. *Blood Cells*, 6, 819-829.

Van Wijk, R., Huizinga, E.G., Van Wesel, A.C.W., Van Oirschot, B.A., Hadders, M.A. & van Solinge, W.W. (2009) Fifteen novel mutations in PKLR associated with pyruvate kinase (PK) deficiency: structural implications of amino acid substitutions in PK. *Hum Mutat*, 30, 446-453.

van Wijk, R. & van Solinge, W.W. (2005) The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis. *Blood*, 106, 4034-4042.

van Wijk, R. & van Solinge, W.W. (2006) Pyruvate kinase deficiency: genotype to phenotype. *Hematology (EHA Educ Program)*, 2, 55-62.

Zanella, A., Fermo, E., Bianchi, P., Chiarelli, L.R. & Valentini, G. (2007) Pyruvate kinase deficiency: the genotype-phenotype association. *Blood Rev*, 21, 217-231.

Doel van het onderzoek

Primaire doel: De hier beschreven studie heeft tot doel om de recentelijk verkregen resultaten omtrent verhoogde expressie van PK antigeen in PK-deficiënte patiënten te versterken. Dit kan behaald worden door het aantal patiënten en gezonde proefpersonen te vergroten. De hoeveelheid PK antigeen zal o.a. worden gecorreleerd met het klinische fenotype en het genotype.

Secundaire doel(en):

Deze studie heeft als secundair doel te onderzoeken of humane PK-deficiënte hematopoietische stamcellen kunnen differentiëren en uitrijpen naar erythroïde cellen. De pro-apoptotische gen-expressie in PK deficiënte erythroïde cellen zal daarbij nader worden onderzocht.

Onderzoeksopzet

Dit onderzoek wordt uitgevoerd als een observationele case-control studie.

Bloedmateriaal van 25 PK-deficiënte patiënten en 25 gezonde normale proefpersonen zal worden verzameld en gebruikt om het volgende te bepalen:

1. de hoeveelheid PK-antigeen in volwassen rode bloedcellen;

2. de in-vitro capaciteit van haematopoietische stamcellen om BFU-E*s en CFU-E*s te genereren.
3. de expressie van pro-apoptotische genen (e.g. BAD, BNIP3, BNIP3I) in erythroïde voorlopercellen.

Inschatting van belasting en risico

Bij patiënten en gezonde proefpersonen zal eenmalig 35 ml veneus bloed worden afgenomen met behulp van een venapunctie. Bij patiënten <12 jaar zal deze hoeveelheid 20 ml bedragen. Om het ongemak zoveel mogelijk te beperken zal de afname worden gecombineerd met reguliere controlebezoeken aan de behandelend arts.

Contactpersonen

Publiek

Universitair Medisch Centrum Utrecht

Postbus 85500
3508 GA, Utrecht
NL

Wetenschappelijk

Universitair Medisch Centrum Utrecht

Postbus 85500
3508 GA, Utrecht
NL

Locaties

Landen waar het onderzoek wordt uitgevoerd

Netherlands

Deelname eisen

Leeftijd

6 - Bestudering van (toegenomen) expressie van pyruvaatkinase antigeen and dyserythr ... 4-05-2025

Adolescenten (12-15 jaar)
Adolescenten (16-17 jaar)
Volwassenen (18-64 jaar)
Kinderen (2-11 jaar)
65 jaar en ouder

Belangrijkste voorwaarden om deel te mogen nemen (Inclusiecriteria)

Genetisch bevestigde diagnose pyruvaatkinase deficiëntie

Belangrijkste redenen om niet deel te kunnen nemen (Exclusiecriteria)

Patienten die binnen 3 maanden voorafgaand aan bloedafname een bloedtransfusie hebben ondergaan worden niet geïnccludeerd.

Onderzoeksopzet

Opzet

Type:	Observationeel onderzoek, met invasieve metingen
Onderzoeksmodel:	Anders
Toewijzing:	Niet-gerandomiseerd
Blinding:	Open / niet geblindeerd
Controle:	Geneesmiddel
Doel:	Anders

Deelname

Nederland	
Status:	Werving gestopt
(Verwachte) startdatum:	17-08-2010
Aantal proefpersonen:	50
Type:	Werkelijke startdatum

Ethische beoordeling

Goedgekeurd WMO

Datum: 26-07-2010

Soort: Eerste indiening

Toetsingscommissie: METC Universitair Medisch Centrum Utrecht (Utrecht)

Registraties

Opgevolgd door onderstaande (mogelijk meer actuele) registratie

Geen registraties gevonden.

Andere (mogelijk minder actuele) registraties in dit register

Geen registraties gevonden.

In overige registers

Register	ID
CCMO	NL31362.041.10