

Van gen naar ziekte; congenitale trombotische trombocytopenische purpura door mutaties in het ADAMTS13-gen

R.H.M.SCHIPHORST, N.C.A.J.VAN DE KAR EN L.P.W.J.VAN DEN HEUVEL

DE ZIEKTE

Trombotische trombocytopenische purpura (TTP) is een ziekte die gekenmerkt wordt door hemolytische anemie met vervormde erythrocyten en trombocytopenie. De ziekte kan gepaard gaan met nierfalen, neurologische afwijkingen en koorts. TTP wordt het meest gezien bij volwassenen, maar er is ook een congenitale vorm beschreven, waarbij de eerste episode vaak al in de neonatale periode optreedt. De incidentie van deze congenitale vorm is niet bekend, maar moet gezien de gepubliceerde casussen in de literatuur zeer laag zijn.¹⁻³

Bij patiënten met TTP worden in verschillende organen plaatjesrijke microtrombi gevonden. Deze microtrombi bevatten grote hoeveelheden Von Willebrandfactor (VWF) en nauwelijks fibrinogeen of fibrine, zoals gezien wordt bij diffuse intravasale stolling.² VWF wordt gevormd in endotheelcellen en megakaryocyten als multimeren met een hoogmoleculair gewicht ('unusually large'-VWF (ulVWF)-multimeren).

Deze ulVWF-multimeren worden opgeslagen in Weibel-Palade-lichaampjes in de endotheelcel en α -granulen in de plaatjes. De concentratie van VWF in plasma wordt grotendeels bepaald door VWF afkomstig uit endotheel. De VWF die wordt uitgestoten door endotheelcel en/of plaatje, wordt direct gesplitst door het in plasma aanwezige ADAMTS13 ('ADAMTS' is het acroniem van 'a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 repeats'). In situaties van zeer hoge bloeddoodstroming (hoge 'shear stress'), zoals in arteriolen en capillairen, ondergaan deze multimeren een vormverandering, waardoor het molecuul gevoeliger wordt voor het splitsen dan wel klieven van ulVWF door het specifiek metalloprotease ADAMTS13.³⁻⁵ Het is mogelijk dat ulVWF-multimeren ook reeds direct aan de oppervlakte van de endotheelcel worden gesplitst via het ADAMTS-13-eiwit, dat is gebonden aan trombospondinreceptoren.² Niet-gesplitste ulVWF-multimeren zijn zeer trombogene en kunnen in situaties van hoge shear stress spontaan leiden tot plaatjesaggregatie, zelfs zonder dat er endotheelbeschadiging is.

Een deficiëntie van ADAMTS-13-activiteit zorgt voor de biologisch zeer actieve, niet-gesplitste ulVWF-multimeren in plasma (figuur 1).

Bij patiënten met TTP zijn ulVWF-multimeren aantoonbaar in plasma.²⁻⁵ Bij veel patiënten met TTP wordt een activiteit van het ADAMTS13 $\leq 5\%$ ten opzichte van plasma van controlepersonen beschreven. Bij volwassenen wordt dit meestal veroorzaakt door de aanwezigheid van remmende antistoffen tegen ADAMTS13 in plasma. Zeldzamer is de eerdergenoemde congenitale of familiale vorm van TTP. Bij deze laatste vorm is er een constitutionele deficiëntie van ADAMTS13.⁶⁻⁷ Ongeveer de helft van de patiënten met deze congenitale vorm van TTP presenteert zich reeds vóór het 5e levensjaar en vaak al in de neonatale periode met recidiverende episoden van hemolytische anemie en trombocytopenie. Belangrijk is de tijdige herkenning van deze vorm van TTP, zodat adequate therapie kan worden gestart.¹

Niet alleen bij TTP-patiënten is een verminderde activiteit van ADAMTS13 aantoonbaar in plasma. Bij patiënten met idiopathische trombocytopenische purpura (ITP), levercirrose en chronische nierinsufficiëntie, maar ook bij gezonde neonaten en zwangere vrouwen wordt een verminderde activiteit van het ADAMTS13-eiwit gevonden, echter nooit $< 5\%$.⁸ Bij deze genoemde groep met verminderde ADAMTS13-activiteit wordt echter geen trombotische microangiopathie beschreven. Gezien deze bevinding, alsmede het gegeven dat bij de asymptomatische ouders van aangedane patiënten een ADAMTS13-activiteit van 6 tot 20% beschreven wordt, wordt aangenomen dat een ADAMTS13-activiteit in plasma van meer dan 5-10% voldoende is om microvasculaire plaatjesconsumptie te voorkomen.¹

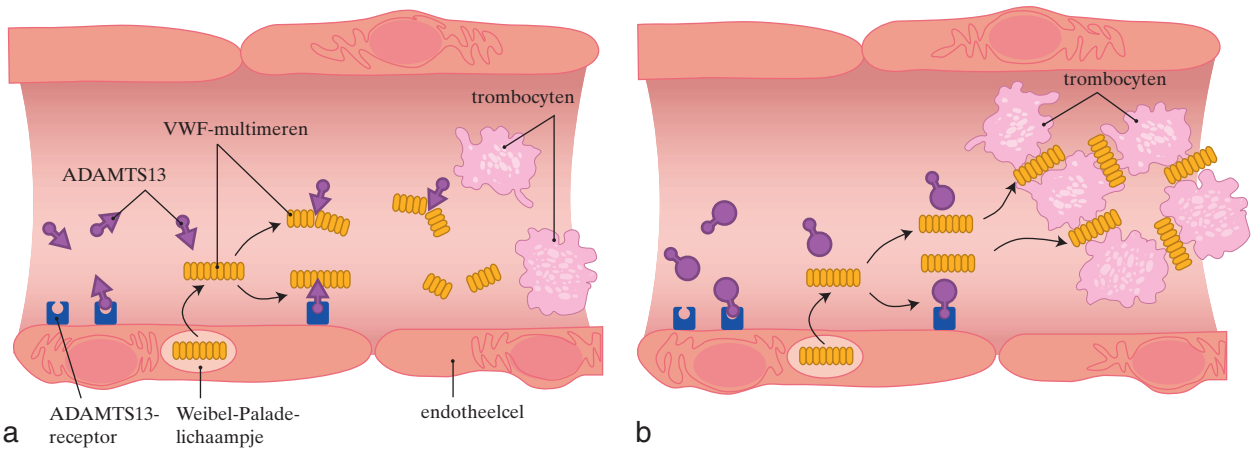
HET GEN

Koppelingsonderzoek uitgevoerd bij 7 TTP-patiënten uit 4 families met de congenitale vorm van TTP heeft geleid tot het vinden van het genetisch locus.⁹ Het ADAMTS13-gen is gelegen op chromosoom 9q34 en bestaat uit 29 exonen. Mutaties in dit ADAMTS13-gen zijn het onderliggende mechanisme dat verantwoordelijk is voor het ontstaan van congenitale TTP.⁹ Sinds 2001 zijn verschillende polymorfismen en meer dan 25 mutaties beschreven, waaronder 'missense'-mutaties (aminozuursubstituties), 'nonsense'-mutaties ('stops') en enkele deleties en inserties.⁹⁻¹² Deze mutaties zijn verspreid gelegen op het gen. Het betreft homozygote mutaties, alsmede samengestelde heterozygote mutaties. De functionele implicaties van een aantal mutaties in het ADAMTS13-gen zijn bevestigd met expressieanalyse in een in-vitrosysteem.¹¹ Tot op heden is er geen patiënt be-

Universitair Medisch Centrum St Radboud, afd. Kindernefrologie, Geert Groteplein Zuid 20, 6525 GA Nijmegen.

Mw.R.H.M.Schiphorst, arts-onderzoeker; mw.dr.N.C.A.J.van de Kar, kindernefroloog; dr.L.P.W.J.van den Heuvel, biochemicus.

Correspondentieadres: mw.dr.N.C.A.J.van de Kar (n.vandekar@cukz.umcn.nl).



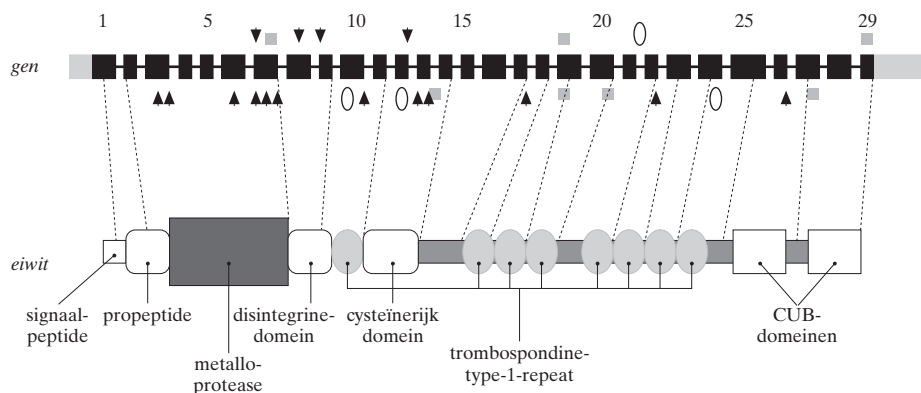
FIGUUR 1. Schematische weergave van de werking van ADAMTS₁₃-eiwit ('ADAMTS' is het acroniem van 'a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 repeats') in relatie tot hoogmoleculaire multimeren van Von Willebrand-factor (VWF) in de circulatie. (a) In geval van een normaal functionerend ADAMTS₁₃-eiwit bindt het ADAMTS₁₃, mogelijk via een receptor op endotheel of in de circulatie, aan de hoogmoleculaire multimeren van VWF ('unusually large' VWF (ulVWF)). Deze multimeren bevinden zich in de Weibel-Palade-lichaampjes in de endotheelcel en worden gesecreteerd bij endotheelactivatie. De hierdoor ontstane kleinere fragmenten van VWF kunnen geen adhesie en aggregatie van trombocyten induceren. ADAMTS₁₃ maakt mogelijk gebruik van zijn trombospondine-1-segmenten om te binden aan receptoren voor trombospondine aan het oppervlak van de endotheelcel.^{2,3} (b) Mutaties in het ADAMTS₁₃-gen leiden tot een niet tot nauwelijks functionerend ADAMTS₁₃-eiwit, waardoor ulVWF niet gesplitst wordt en dus persisteert in het plasma. Dit ulVWF is zeer trombogeen en kan reeds in situaties van hoge bloeddrooming ('shear stress'), zoals in arteriolen en capillairen, leiden tot spontane adhesie en aggregatie van trombocyten. De aanwezigheid van remmende antistoffen tegen ADAMTS₁₃ in plasma, leidend tot een deficiëntie van ADAMTS₁₃-activiteit, geeft hetzelfde resultaat.

schreven bij wie het totale ADAMTS₁₃-gen ontbreekt. Mogelijk is deficiëntie van het totale ADAMTS₁₃-gen letaal.¹ Figuur 2 geeft een schematisch overzicht van de mutaties die tot nu toe bekend zijn.

HET EIWIT

Het ADAMTS₁₃-gen codeert voor het ADAMTS₁₃-eiwit, bestaande uit 1427 aminozuren. Het eiwit maakt deel uit van de ADAMTS-familie van metalloproteasen

en heeft een molecuulgewicht van ongeveer 150 kD.⁵ Het ADAMTS₁₃-eiwit is opgebouwd uit verschillende domeinen, waarvan de verschillende functies nog niet zijn opgehelderd (zie figuur 2). De C-terminale kant van het propeptide eindigt met de sequentie RQRR (R = arginine; Q = glutamine), wat suggereert dat furine of een gerelateerd eiwit deze regio klieft tijdens de synthese, met als gevolg dat ADAMTS₁₃ wordt gesecreteerd in het plasma als een actief enzym.¹¹ In vitro reduceert



FIGUUR 2. Schematisch overzicht van het ADAMTS₁₃-gen, bestaande uit 29 exonen ('ADAMTS' is het acroniem van 'a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 repeats'). De tot nu toe beschreven mutaties in dit gen zijn hier weergegeven met symbolen:⁹⁻¹² (▲) 'missense'-mutaties, (■) deletie/insertie of 'splice'-mutaties, (○) 'nonsense'-mutaties. De mutaties zijn verspreid over het gen. Het ADAMTS₁₃-eiwit is opgebouwd uit verschillende domeinen. Met stippellijnen zijn grof aangegeven de exonen die corresponderen met de verschillende domeinen van het ADAMTS₁₃-eiwit. CUB staat voor 'complement components C1r/C1s, urinary epidermal growth factor bone morphogenetic protein-1'. Dit zijn eiwitten die nodig zijn in allerlei processen van ontwikkeling.

ADAMTS₁₃ de grootte van de uVWF-multimeren tot kleinere vormen, door de specifieke splitsing van de peptidebinding in het VWF-A2-domein tussen de aminozuren Y842 (tyrosine) en M843 (methionine), waarna 176-kDa- en 140-kDa-fragmenten ontstaan, die circuleren in de bloedbaan.^{13 14} De productie van ADAMTS₁₃ vindt plaats in de lever.¹⁵ De plasmaconcentratie ligt in de orde van grootte van 1 µg/ml. De halfwaardetijd in de circulatie bedraagt ongeveer 2 tot 3 dagen.^{16 17}

DIAGNOSTIEK EN THERAPIE

Het bepalen van de activiteit van ADAMTS₁₃ bij patiënten met TTP en zelfs bij aanwijzingen voor TTP is zeer belangrijk. Indien de activiteit < 5% bedraagt, dient onderzocht te worden of er remmende antistoffen tegen ADAMTS₁₃ zijn of dat er een congenitale deficiëntie bestaat. De huidige assays zijn complex, arbeidsintensief en tijdrovend en nog verre van optimaal, en verdergaande verbeteringen ten aanzien van deze bepaling zijn in ontwikkeling en zijn zeer belangrijk.¹⁸ Omdat de bepaling van ADAMTS₁₃-activiteit een complexe procedure en geen routinebepaling is, wordt deze bepaling vooralsnog in gespecialiseerde hematologische laboratoria verricht (onder andere Universitair Medisch Centrum Utrecht en Universitair Medisch Centrum St Radboud te Nijmegen). Mutatiedetectie kan worden gezien als een bevestiging van een vermoedelijke diagnose 'congenitale ADAMTS₁₃-deficiëntie'.

De behandeling van TTP bij patiënten met een verminderde activiteit van ADAMTS₁₃ op basis van de aanwezigheid van remmende antistoffen verschilt van de behandeling bij de congenitale vorm van TTP.¹⁻³ Vanwege de aanwezigheid van remmende antistoffen is meer plasma nodig en is plasmaferese effectiever dan plasma-infusie. Bij een aantal patiënten blijkt herhaaldelijke plasmaferese niet voldoende en in de literatuur wordt het gebruik van verschillende immunosuppressiva beschreven, met wisselende resultaten.^{2 3} Bij congenitale TTP kunnen symptomatische episoden worden voorkomen door periodieke plasma-infusies. Door de lange halfwaardetijd van ADAMTS₁₃ (2-3 dagen) kan volstaan worden met plasma-infusies elke 2 of 3 weken.^{16 17} Deze infusies zijn echter een risico voor het ontstaan van allergische reacties en het overdragen van (nog niet gedetecteerde) virussen. Het wachten is op een recombinant-ADAMTS₁₃-eiwit dat te gebruiken zal zijn bij de therapie van congenitale TTP.

Belangenconflict: geen gemeld. Financiële ondersteuning: geen gemeld.

ABSTRACT

From gene to disease; congenital thrombotic thrombocytopenic purpura due to mutations in the ADAMTS₁₃ gene. – Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) is characterised by haemolytic anaemia with fragmented erythrocytes and thrombocytopenia, accompanied by other symptoms such as renal dysfunction, neurological signs and fever. Proteolysis of the Von Willebrand blood-clotting factor (VWF) by a VWF cleaving protease or ADAMTS₁₃ is decreased in patients with

TTP, leading to ultra-large Von Willebrand multimers in the circulation. A lack of ADAMTS₁₃ activity can be caused by autoimmune inhibitors or may be due to a constitutional deficiency of this protein. Recently, the ADAMTS₁₃ gene that encodes for the ADAMTS₁₃ protein was found. It was mapped to chromosome 9q34 and consists of 29 exons. Several mutations have been identified in the ADAMTS₁₃ gene in patients with the congenital form of TTP. Symptomatic episodes in congenital TTP can be prevented by prophylactic plasma infusions every 2-3 weeks, hereby preventing further organ damage due to thrombotic microangiopathy.

LITERATUUR

- George JN, Sadler JE, Lämmle B. Platelets: thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2002;1:315-34.
- Moake JL. Thrombotic microangiopathies. *N Engl J Med* 2002;347:589-600.
- Tsai HM. Advances in the pathogenesis, diagnosis, and treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:1072-81.
- Furlan M, Robles R, Solenthaler M, et al. Deficient activity of von Willebrand factor-cleaving protease in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 1997;89:3097-103.
- Fujikawa K, Suzuki H, McMullen B, Chung D. Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family. *Blood* 2001;98:1662-6.
- Tsai HM, Lian EC. Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 1998;339:1585-94.
- Furlan M, Robles R, Galbusera M, et al. Von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* 1998;339:1578-84.
- Mannucci PM, Canciani MT, Forza I, Lussana F, Lattuada A, Rossi E. Changes in health and disease of the metalloprotease that cleaves von Willebrand factor. *Blood* 2001;98:2730-5.
- Levy GG, Nichols WC, Lian EC, Foroud T, McClintick JN, et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature* 2001;413:488-94.
- Schneppenheim R, Budde U, Oyen F, Angerhaus D, Aumann V, Drewke E, et al. Von Willebrand factor cleaving protease and ADAMTS₁₃ mutations in childhood TTP. *Blood* 2003;101:1845-50.
- Kokame K, Matsumoto M, Soejima K, Yagi H, Ishizashi H, Funato M, et al. Mutations and common polymorphisms in ADAMTS₁₃ gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:11902-7.
- Assink K, Schiphorst R, Allford S, Karpman D, Etzioni A, Brichard B, et al. Mutation analysis and clinical implications of von Willebrand factor-cleaving protease deficiency. *Kidney Int* 2003;63:1995-9.
- Dong JF, Moake JL, Nolasco L, Bernardo A, Arceneaux W, Shrimpton CN, et al. ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood* 2002;100:4033-9.
- Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem* 1998;67:395-424.
- Lee TP, Bouhassira EE, Lyubsky S, Tsai HM. ADAMTS₁₃, the von Willebrand factor cleaving metalloprotease, is expressed in the perisinusoidal cells of the liver. *Blood* 2002;100(Suppl 1):497a.
- Yagi H, Konno M, Kinoshita S, Matsumoto M, Ishizashi H, Matsui T, et al. Plasma of patients with Upshaw-Schulman syndrome, a congenital deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease activity, enhances the aggregation of normal platelets under high shear stress. *Br J Haematol* 2001;115:991-7.
- Furlan M, Robles R, Morselli B, Sandoz P, Lämmle B. Recovery and half-life of von Willebrand factor-cleaving protease after plasma therapy in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost* 1999;81:8-13.
- Pimanda JE, Chesterman CN, Hogg PJ. A perspective on the measurement of ADAMTS₁₃ in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol* 2003;70:257-62.

Aanvaard op 8 september 2003