

## Nederlandse samenvatting

De pentose fosfaat route (PPP) is een alternatieve route voor de oxidatie van glucose. In de meeste weefsels wordt 80 tot 90 procent van glucose geoxideerd door de glycolyse, de rest wordt geoxideerd door de PPP. In de laatste jaren zijn er 2 defecten in de PPP ontdekt [1-3]. Eerst werd in 1999 door onze groep een patiënt beschreven met een langzaam progressieve leukoencefalopathie (een aandoening van voornamelijk de witte stof van de hersenen) van onbekende oorzaak, en een sterke stapeling van de polyolen (suiker-alcoholen) ribitol en D-arabitol in de hersenen, liquor en in mindere mate plasma en urine. In 2004, werd aangetoond dat het enzym ribose-5-fosfaat isomerase (RPI) deficiënt is in gekweekte cellen van deze patiënt, en werden mutaties in het *RPIa* gen gevonden. Vervolgens werd in 2001 de eerste patiënt met een deficiëntie van het enzym transaldolase (TALDO) beschreven. Het defect werd gevonden in een tienermeisje dat zich in de neonatale periode presenteerde met een vernauwing van de aorta, vergrote clitoris, en milde bloedingsneigingen. Na enkele maanden ontwikkelde ze een hepatosplenomegalie (vergrote lever en milt). In urine werden verhoogde concentraties van de polyolen D-arabitol, ribitol en erythritol gevonden met slechts milde verhogingen in plasma en liquor. De diagnose werd bevestigd op de leeftijd van 10 jaar door de detectie van een homozygote deletie van 3-bp in exon 5 van het *TALDO* gen en een deficiënte TALDO activiteit in lymfoblasten. Op die leeftijd had ze levercirrhose (een chronische leverziekte) ontwikkeld en een persistente hepatomegalie. Een tweede patiënt met TALDO deficiëntie werd gedetecteerd in 2005 [4]. Dit meisje was een neonat met ernstig leverfalen en cardiomyopathie (vergroot hart), en zij overleed op de leeftijd van 18 dagen aan ademhalingsproblemen.

Het werk dat in dit proefschrift wordt gepresenteerd heeft zich voornamelijk geconcentreerd op het verbeteren van de diagnostiek voor patiënten met een defect in de PPP, het uitbreiden van de kennis over deze ziektebeelden en het bestuderen van de functie en het belang van de PPP.

Om de diagnostiek voor patiënten met een defect in de PPP te verbeteren en om de intracellulaire concentraties van suikerfosfaten in patiënten met een defect in de PPP te onderzoeken, werd een nieuwe methode ontwikkeld met behulp van vloeistofchromatografie-tandem massa spectrometrie (LC-MS/MS). Met deze methode, beschreven in **hoofdstuk 2**, werd de stapeling van sedoheptulose-7-fosfaat (sedoheptulose-7P) in bloedspots, fibroblasten en lymfoblasten afkomstig van een TALDO deficiënte patiënt aangetoond. In cellen van de RPI deficiënte patiënt werd geen stapeling van suiker-P gevonden; dit suggereert een efficiënte omzetting naar pentoses en pentitolen, die sterk verhoogd zijn in

lichaamsvloeistoffen van deze patiënt. Verder kan deze LC-MS/MS methode gebruikt worden voor het bepalen van de enzymactiviteit van bepaalde stappen van de PPP, door het meten van de betrokken suiker-P. Dit is gedaan voor TALDO en RPI deficiëntie.

Twee methodes zijn ontwikkeld voor het kwantitatief bepalen van polyolen in urine met behulp van LC-MS/MS (**hoofdstuk 3**). In de aanvankelijk eerstelijns screeningsmethode elueren de polyol-isomeren van dezelfde koolstoflengte als één piek, en worden dus niet van elkaar onderscheiden. Een tweede, zeer selectieve methode scheidt wel de verschillende polyol-isomeren waardoor de kwantitatieve detectie van erythritol, threitol, ribitol, arabitool, xylitol, sorbitol, mannitol, galactitol, sedoheptitol en perseitol mogelijk is. Polyol profielen passend bij eerder beschreven urine concentraties van polyolen bij TALDO en RPI deficiënties en galactosemie werden gevonden. We konden voor de eerste keer aantonen dat sedoheptitol en perseitol verhoogd zijn in patiënten met TALDO deficiëntie. Deze heptitolen lijken vanuit sedoheptulose-7P gevormd te worden via het tussenproduct heptulose. Deze methodes kunnen ook worden gebruikt voor het diagnosticeren van andere defecten die zich presenteren met verhoogde polyol excreties, en voor het monitoren van de galactitol excretie in patiënten met galactosemie na het starten van een galactose-beperkt dieet.

Een LC-MS/MS methode is opgezet voor de identificatie en kwantificering van de zeven-koolstofketen koolhydraten sedoheptulose en mannoheptulose in urine. Daarnaast werden andere zeven-koolstof keten koolhydraten zoals sedoheptitol, perseitol en sedoheptulose-7P gekarakteriseerd in urine van vier TALDO deficiënte patiënten (**hoofdstuk 4**). Deze patiënten hadden verhoogde urine concentraties van sedoheptulose en sedoheptulose-7P, samen met subtiele verhogingen van mannoheptulose, sedoheptitol en perseitol. Wij speculeerde dat gestapeld sedoheptulose-7P zeer waarschijnlijk verder gemetaboliseerd wordt naar sedoheptulose, mannoheptulose, sedoheptitol en perseitol, mogelijk als detoxificatie om de suiker-P concentraties te verlagen die mogelijk een cytotoxisch effect hebben zoals eerder gesuggereerd voor galactose-1P in galactosemie [5,6]. De nieuwe LC-MS/MS methode toont nieuwe urine biomarkers voor de identificatie van TALDO deficiëntie aan.

De diagnose van TALDO deficiëntie in 2006 in een Franse familie met vier aangedane kinderen, geboren bij dezelfde consanguine ouders, breidde het aantal TALDO deficiënte patiënten uit van twee naar zes [7]. Een van deze patiënten presenteerde zich in de antenatale periode met hydrops foetalis en oligohydramnion. De zwangerschap werd bij 28 weken medisch afgebroken en vruchtwater werd bewaard. De nieuw ontwikkelde methodes

werden gebruikt om retrospectief in het vruchtwater monster van deze foetus, polyolen, heptuloses en sedoheptulose-7P met LC-MS/MS te meten (**hoofdstuk 5**). Onze resultaten laten zien dat TALDO deficiëntie resulteert in verhoogde concentraties van sedoheptulose en ribitol in vruchtwater, terwijl de concentraties van erythritol, arabitol, mannoheptulose, sedoheptitol, perseitol en sedoheptulose-7P normaal zijn. Deze bevindingen tonen aan dat de PPP actief is tijdens de foetale ontwikkeling, en dat een defect van TALDO veranderingen in de vroege embryogenese kan veroorzaken. Naast moleculair onderzoek kan dit karakteristieke profiel in het vruchtwater bijdragen aan prenatale diagnostiek, in het bijzonder voor families met een index-casus, of voor zwangerschappen die gecompliceerd zijn met vroege hydrops geassocieerd met oligohydramnion.

Terwijl meer patiënten worden gediagnosticeerd, wordt het fenotype van TALDO deficiëntie meer gekarakteriseerd. In **hoofdstuk 6** wordt een nieuwe casus met TALDO deficiëntie beschreven samen met een overzicht van de klinische en biochemische bevindingen van alle bekende TALDO deficiënte patiënten. Alle patiënten werden geboren bij consanguine ouders en presenteerden zich in de neonatale of antenale periode met hepatosplenomegalie, lever dysfunctie, lever fibrose en anemie. De meeste patiënten toonde enkele dysmorphe kenmerken (b.v. anti-mongoloïde oogopslag, laag staande oren, cutis laxa), neonataal oedeem, aangeboren hart defecten of nierproblemen. De mentale en motorische ontwikkeling was meestal normaal. De meest recent gediagnosticeerde patiënt had klinische symptomen zoals eerder beschreven bij TALDO deficiëntie, maar is de eerste met rachitis en doofheid. Biochemische bevindingen waren vergelijkbaar met andere TALDO deficiënte patiënten. De verhoogde concentraties van erythritol, ribitol, arabitol, sedoheptitol, perseitol, sedoheptulose, mannoheptulose en sedoheptulose-7P in urine worden allemaal verklaard door het defect in de PPP. Er wordt gedacht dat sedoheptulose en sedoheptulose-7P stapeling in TALDO deficiëntie verantwoordelijk is voor de lever dysfunctie en de fibrose, en dat TALDO deficiëntie leidt tot verlaagde NADPH vorming door de PPP waardoor er lage NADPH/NADP en NADH/NAD ratio's zijn. De veranderde cytosolische redox status kan mogelijk een rol spelen bij de pathogenese in TALDO deficiëntie, bewijs hiervoor kan gevonden worden in de lage concentraties in patiënten van sommige metabolieten (b.v. cholesterol, estradiol, testosteron en 25-hydroxyvitamine D) die NADPH nodig hebben voor hun vorming.

Bij patiënten met cystinose als gevolg van de 57-kb deletie van o.a. het *CTNS* gen werd gevonden dat ze verhoogde concentraties van sedoheptulose in hun urine uitscheiden. Deze 57-kb deletie bevat ook een naastgelegen gen *CARKL*, coderend voor een eiwit dat voorspeld werd te

functioneren als een koolhydraat kinase. Wij hebben aangetoond dat het CARKL eiwit een sedoheptulokinase is dat de reactie: Sedoheptulose + ATP  $\rightarrow$  Sedoheptulose-7P + ADP katalyseert (**hoofdstuk 7**). Een enzym assay voor de fosforylering van sedoheptulose werd ontwikkeld en verlaagde sedoheptulokinase activiteit werd gevonden in fibroblasten van patiënten met de 57-kb deletie. Fibroblasten van patiënten met andere mutaties vertoonden normale enzymactiviteit. De mogelijke functie van sedoheptulokinase is om sedoheptulose-7P te vormen uit sedoheptulose, als glyceraldehyde-3P omgeleid wordt van de glycolyse naar de PPP. Cystinose patiënten met de veelvoorkomende 57-kb deletie hebben de ernstig infantiele nefropathische vorm, en tot nu toe is er geen verschil in klinisch fenotype gevonden tussen deze patiënten en patiënten met andere mutaties die de ernstige infantiele nefropathische vorm geven [8].

De belangrijkste functie van het oxidatieve gedeelte van de PPP is de productie van NADPH uit NADP<sup>+</sup> en daarmee de cytosolische NADPH concentratie te behouden. NADPH is belangrijk bij de verdediging tegen oxidatieve stress veroorzaakt door reactieve zuurstofradicalen. De PPP is sterk verbonden met de glycolyse door de intermediären glyceraldehyde-3P en fructose-6P. In eerdere studies is gerapporteerd dat onder oxidatieve stress verhoogde activiteit van de PPP in zoogdiercellen werd gezien. Het exacte mechanisme hiervan was onduidelijk. Onlangs is ontdekt dat gistcellen met gereduceerde activiteit van het sleutel glycolytische enzym triosefosfaat isomerase (TPI) een verhoogde resistentie vertonen voor het thiol-reducerende reagens diamide. We hebben aangetoond dat het onderliggende mechanisme gebaseerd is op een omleiding van de metabole flux van de glycolyse naar de PPP, de redox status van het cytosolisch NADP(H) wordt daarbij verhoogd (**hoofdstuk 8**). Van een ander sleutelenzym van de glycolyse, glyceraldehyde-3-fosfaat dehydrogenase (GAPDH), is bekend dat het wordt geïnactiveerd in reactie op verschillende oxiderende behandelingen (b.v. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), en onze resultaten toonde aan dat dit eenzelfde omleiding van de metabole flux veroorzaakte. PPP intermediären (suiker-P en NADPH/NADP<sup>+</sup> ratio) werden in verschillende type cellijnen gemeten en vergeleken met het wild type. Het resultaat liet duidelijk zien dat een verlaagde cellulaire TPI activiteit of geïnactiveerd GAPDH door H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in verhoogde waarden van bijna alle metabolieten van de PPP en de NADPH/NADP<sup>+</sup> ratio resulteerde. Dit effect is afwezig in gistcellen waarbij de eerste en snelheidsbepalende stap van de PPP geremd wordt. Om de metaboliet metingen te bevestigen werd een wiskundig model ontwikkeld gebaseerd op de bekende kinetische parameters (K<sub>m</sub>, V<sub>max</sub>) van de betrokken enzymen. Gebleken is dat 13 van de 14 kwalitatieve veranderingen in metaboliet concentraties correct voorspeld werden door het wiskundige model. Een verschil tussen de experimentele data en de voorspellingen werd alleen gevonden voor

sedoheptulose-7P. Rond de tijd van deze experimenten was het enzym sedoheptulokinase (zie hoofdstuk 7) nog onbekend en dus niet gebruikt in het wiskundige model, wat mogelijk een verklaring kan zijn voor dit verschil. Onze resultaten impliceren dat omleiding van de metabole flux een basismechanisme is in het tegengaan van oxidatieve stress, wat van nature optreedt bij GAPDH inactivatie. Patiënten met een defect in de PPP of glycolyse hebben mogelijk problemen om op geschikte wijze te reageren op oxidatieve stress. Gist knock-out modellen kunnen gebruikt worden om de biochemische reactie op oxidatieve stress te vergelijken met het wild type.

Als laatste vat **hoofdstuk 9** de huidige kennis samen van de metabole routes (PPP, glycolyse, glucuronaat route) betrokken bij suikers, polyolen en suiker-P metabolisme. Daarbij wordt ook de klinische beschrijving van patiënten met een defect in de PPP gegeven en de wijze waarop ze kunnen worden gediagnosticeerd met behulp van biochemische en moleculaire technieken.

Vergelijking van de klinische fenotypes van patiënten met een defect in het oxidatieve gedeelte van de PPP laat duidelijk zien dat RPI deficiëntie ernstige hersenafwijkingen veroorzaakt, terwijl bij TALDO deficiëntie de lever cirrose het meest aanwezig is. Interessant is dat het klinisch fenotype van patiënten met klassieke galactosemie, een defect in het galactose metabolisme, een combinatie is van hersen- en leverafwijkingen met cataract als een extra kenmerk. Klassieke galactosemie wordt biochemisch gekarakteriseerd door de stapeling van galactose en galactose-1P en het polyol galactitol. Er is bewijs dat de stapeling van galactitol gerelateerd is aan de hersen- en oogproblematiek, terwijl de lever dysfunctie toegeschreven wordt aan de toxiciteit van galactose-1P [5,6]. In diabetes mellitus is er bewijs voor neurotoxiciteit veroorzaakt door een ander polyol, namelijk sorbitol [9]. De hierboven genoemde voorbeelden wijzen erop dat supra-fysiologische waarden van polyolen in het centraal zenuwstelsel (RPI deficiëntie) hersenschade kunnen veroorzaken, terwijl intracellulaire verhoging van suiker-P (TALDO deficiëntie) interne orgaanschade veroorzaakt met als meest kwetsbare orgaan de lever. De functie van deze enzymen in de hersenen is niet uitgebreid onderzocht. De RPI deficiënte patiënt vertoont een hoog hersen: liquor: plasma gradient voor ribitol en D-arabitol. Deze bevinding suggereert dat RPI zeer belangrijk is in de hersenen, terwijl het afwezig zijn van neurologische problemen en normale polyol concentraties in de hersenen en liquor bij TALDO deficiëntie suggereert dat TALDO van minder belang is in de hersenen, of dat de hersenen een alternatieve route hebben om het metabole blok te omzeilen. In RPI en TALDO deficiëntie wordt verwacht dat een verlaagde NADPH productie door het oxidatieve gedeelte van de PPP betrokken is bij de

pathogenese van deze ziektebeelden. NADPH wordt gebruikt bij vele anabole routes, zoals vet synthese, cholesterol synthese en vetzuurketen verlenging. Vetten en cholesterol zijn beide componenten van myeline synthese die duidelijk abnormaal is bij RPI deficiëntie. Bij patiënten met TALDO deficiëntie lijkt er een verlaagde activiteit van sommige NADPH-afhankelijke reacties te zijn, waaronder hormoon-, cholesterol- en 25-hydroxyvitamine D synthese. Hemolytische anemie is in de meeste patiënten aanwezig (hoofdstuk 6), wat mogelijk door verlaagde NADPH productie in erythrocyten wordt veroorzaakt.

RPI en TALDO deficiëntie zijn waarschijnlijk beide onder-gediagnosticeerd, aangezien beide ziektes pas recent beschreven zijn en doordat specifieke analytische technieken die nodig zijn voor de metingen van de geschikte biomarkers slechts gelimiteerd beschikbaar zijn. Op basis van de bevindingen in dit proefschrift is het legitiem om voor te stellen om alle patiënten met onbegrepen hepatosplenomegalie, leverfunctie stoornissen, lever fibrose en hemolytische anemie presenterend in de neonatale of antenale periode te screenen voor TALDO deficiëntie, door het meten van polyolen en/of zeven-koolhydraat suikers in urine. Tevens, zouden alle patiënten met een slecht begrepen neurodegeneratief klinisch beloop gescreend moeten worden voor RPI deficiëntie door het meten van polyolen in urine.

*Referenties:*

1. van der Knaap MS, Wevers RA, Struys EA, Verhoeven NM, Pouwels PJ, Engelke UF, Feikema W, Valk J, Jakobs C. Leukoencephalopathy associated with a disturbance in the metabolism of polyols. *Ann Neurol* 1999;46:925-928.
2. Verhoeven NM, Huck JH, Roos B, Struys EA, Salomons GS, Douwes AC, van der Knaap MS, Jakobs C. Transaldolase deficiency: Liver cirrhosis associated with a new inborn error in the pentose phosphate pathway. *Am J Hum Genet* 2001;68:1086-1092.
3. Huck JHJ, Verhoeven NM, Struys EA, Salomons GS, Jakobs C, van der Knaap MS. Ribose-5-phosphate isomerase deficiency: New inborn error in the pentose phosphate pathway associated with a slowly progressive leukoencephalopathy. *Am J Hum Genet* 2004;74:745-751.
4. Verhoeven NM, Wallot M, Huck JHJ, Disch O, Ballauf A, Neudorf U, Salomons GS, van der Knaap MS, Voit T, Jakobs C. A newborn with severe liver failure, cardiomyopathy and transaldolase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 2005;28:169-179.
5. Holton JB, Walter JH, Tyfield LA. Galactosemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease. *New York: McGraw-Hill, 8<sup>th</sup> ed, vol I, 2001; 1553-1587.*
6. Berry GT. The role of polyols in the pathophysiology of hypergalactosemia. *Eur J Pediatr* 1995; 154: S53-S64.
7. Valayannopoulos V, Verhoeven NM, Mention K, Salomons GS, Sommelet D, Gonzales M, Touati G, de Lonlay P, Jakobs C, Saudubray JM. Transaldolase deficiency: a new cause of hydrops fetalis and neonatal multi-organ disease. *J Pediatr* 2006;149:713-717.
8. Heil SG, Levtchenko E, Monnens LA, Trijbels FJ, Van der Put NM, Blom HJ. The molecular basis of Dutch infantile nephropathic cystinosis. *Nephron* 2001;89:50-55.
9. Greene DA, Stevens MJ. The sorbitol-osmotic and sorbitol-redox hypotheses. In: LeRoith D, Taylor SI, Olefsky JM, eds. *Diabetes mellitus. Lippincott Raven, Philadelphia, 1996: 801-809.*