

## Defecten in de pentose fosfaat route

M.M.C. WAMELINK, E.A. STRUYS, G.S. SALOMONS en C. JAKOBS

De pentose fosfaat route (PPP) is een alternatieve route voor de oxidatie van glucose (figuur 1). 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). In 1999 werd door onze groep een patiënt beschreven met een langzaam progressieve leucoencefalopathie van onbekende oorzaak, en een sterke stapeling van de polyolen ribitol en D-arabitol in de hersenen, liquor en in mindere mate plasma en urine. In 2004 toonden wij aan dat zowel het enzym ribose-5-fosfaat isomerase (RPI) deficiënt is in gekweekte cellen van de patiënt als dat er oorzakelijke mutaties aanwezig waren in het *RPIa* gen. 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 bloedingneigingen. Na enkele maanden ontwikkelde ze een hepatosplenomegalie. In urine werden verhoogde concentraties van de polyolen D-arabitol, ribitol en erythritol aangetoond met slechts milde verhogingen van deze polyolen 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 door een deficiënte TALDO activiteit in lymfoblasten. Op die leeftijd werd lever cirrose geconstateerd en een persistente hepatomegalie.

### De focus in onze onderzoekslijn

*Het verbeteren van de diagnostiek voor patiënten met een defect in de PPP.*

Het is aannemelijk dat RPI en TALDO deficiëntie worden ondergediagnosticeerd. Dit deels doordat beide ziektes pas recent beschreven zijn, maar ook doordat er specifieke analytische technieken, die slechts gelimiteerd beschikbaar zijn, nodig zijn voor het meten van de specifieke biomarkers.

*Het uitbreiden van de kennis over deze ziektebeelden.*

Indien er meer patiënten worden gediagnosticeerd, kan het fenotype van de ziektes beter worden gekarakteriseerd. Ondertussen zijn er nu circa 20 patiënten met TALDO deficiëntie gediagnosticeerd en het kli-

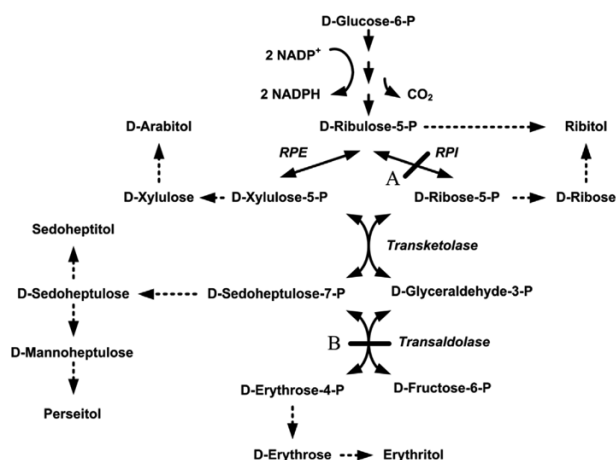
nisch en biochemisch beeld is nu al aardig in kaart gebracht. Er zijn geen nieuwe patiënten met RPI deficiëntie gevonden. Dit kan betekenen dat de ziekte heel erg zeldzaam is, of doorgaans lethaal is tijdens de zwangerschap of dat de diagnose wordt gemist. Vergelijking van de klinische fenotypes van patiënten met een defect in het oxidatieve gedeelte van de PPP laat duidelijk zien dat de patiënt met RPI deficiëntie ernstige hersenafwijkingen heeft, terwijl bij TALDO deficiëntie de lever cirrose het meest prominent aanwezig is. Door de functie en weefselverdeling van de twee verschillende enzymen te bestuderen en tevens de stapeling en/of tekorten van metabolieten op te sporen proberen we meer inzicht te verkrijgen in het ziekteproces.

*Het bestuderen van de functie en het belang van de PPP.*

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 bescherming tegen oxidatieve stress veroorzaakt door reactieve zuurstofradicalen. De PPP is sterk verbonden met de glycolyse door de intermediären glyceraldehyde-3P en fructose-6P.

### Diagnostiek

Om de diagnostiek naar patiënten met een defect in de PPP te verbeteren zijn er 4 nieuwe methodes opgezet. De eerste is een methode voor het meten van intracellulaire concentraties van suikerfosfaten in fibroblasten, lymfoblasten en bloedspots met behulp van



**Figuur 1.** De pentose fosfaat route: De omzettingen van de suikerfosfaten naar hun overeenkomstige suikers of polyolen (gestippelde pijlen) zijn niet bewezen in de mens. A, ribose-5-fosfaat isomerase; B, transaldolase.

Metabool Laboratorium, afdeling Klinische Chemie, VU Medisch Centrum, Amsterdam

E-mail: m.wamelink@vumc.nl

vloeistofchromatografie-tandem massa spectrometrie (LC-MS/MS) (4). Met deze methode, 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 de patiënt. Verder kan deze LC-MS/MS methode gebruikt worden voor het bepalen van de enzymactiviteit 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 (5). 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, arabitol, 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.

De vierde LC-MS/MS methode is opgezet voor de kwantificering en identificatie van de zeven-koolstof koolhydraten sedoheptulose en mannoheptulose in urine (6). Daarnaast werden andere zeven-koolstof keten koolhydraten zoals sedoheptitol, perseitol en sedoheptulose-7P gekarakteriseerd in urine van vier TALDO deficiënte patiënten. Deze patiënten hadden verhoogde urine concentraties van sedoheptulose en sedoheptulose-7P, samen met subtiele verhogingen van mannoheptulose, sedoheptitol en perseitol. De nieuwe LC-MS/MS methode geeft de mogelijkheid om nieuwe urine biomarkers voor de identificatie van TALDO deficiëntie aan te tonen.

De nieuw ontwikkelde methodes zijn gebruikt om retrospectief, in het vruchtwater monster van een bekende foetus aangedaan met TALDO deficiëntie, polyolen, heptuloses en sedoheptulose-7P met LC-MS/MS te meten (7). Deze foetus presenteerde zich in de antenatale periode met hydrops foetalis en oligohydramnion. Onze resultaten lieten zien dat TALDO deficiëntie resulteert in verhoogde concentraties van sedoheptulose en ribitol in vruchtwater, met normale concentraties van erythritol, arabitol, mannoheptulose, sedoheptitol, perseitol en sedoheptulose-7P. Onze 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.

### Kliniek TALDO deficiëntie

Wanneer meer patiënten worden gediagnosticeerd, wordt het fenotype van TALDO deficiëntie beter gekarakteriseerd. Van de ongeveer 20 patiënten (10 gepubliceerd) presenteerden alle patiënten zich in de neonatale of antenale periode met hepatosplenomegalie, lever disfunctie, lever fibrose en anemie (2, 4, 9-13). De meeste patiënten toonde dysmorphe kenmerken (b.v. anti-mongoloïde oogopslag, laag staande oren, cutis laxa), neonataal oedeem, aangeboren hartdefecten of nierproblemen. De mentale en motorische ontwikkeling was meestal normaal. Biochemische bevindingen toonde bij alle patiënten verhoogde concentraties van erythritol, ribitol, arabitol, sedoheptitol, perseitol, sedoheptulose, mannoheptulose en sedoheptulose-7P in urine en worden verklaard door het defect in de PPP. We denken dat sedoheptulose en sedoheptulose-7P stapeling in TALDO deficiëntie o.a. verantwoordelijk is voor de lever disfunctie 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. Er zijn ook aanwijzingen dat er sprake is van mitochondriële disfunctie bij TALDO deficiëntie (14).

### Zeldzame RPI deficiëntie

Er is slechts 1 patiënt met een deficiëntie van RPI. De patiënt is compound heterozygoot voor een frameshift en missense mutatie (p.Ala61Val) in het *RPI* gen. De expressie van de deficiëntie is celtypen afhankelijk. Het allel met de missense mutatie codeert voor een gedeeltelijk actief RPI enzym, terwijl het allel met de frameshift mutatie codeert voor een verkort eiwit, die niet tot expressie komt in de cellijnen van de patiënt (15). Deletie van *RKII* (coderend voor RPI) in gist is lethaal, samen met het feit dat er geen andere patiënten worden gevonden met een deficiëntie van RPI, leidt dit tot speculatie dat individuen die totaal geen RPI restactiviteit hebben door een homozygote ernstige mutatie niet levensvatbaar zijn.

### Spin off

Door onze zoektocht naar nieuwe patiënten in de PPP vonden wij dat patiënten met cystinose als gevolg van de 57-kb deletie in het *CTNS* gen verhoogde urinaire concentraties van sedoheptulose 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 → Sedoheptulose-7P + ADP katalyseert (16). 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 klinische fenotype gevonden tussen deze patiënten en patiënten met andere mutaties die de ernstige infantiele nefropathische vorm geven (17). Sedoheptulose is ook verhoogd in bloedspots, al tijdens de neonatale periode (18). Deze bevinding kan zorgen voor een snelle (pre)-symptomatische detectie van cystinose patiënten homozygoot voor de 57-kb deletie, waardoor een behandeling vroeg kan worden gestart.

### Functie PPP

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 intermediairen glyceraldehyde-3P en fructose-6P. Het is bekend dat de PPP activiteit omhoog gaat bij oxidatieve stress in zoogdiercellen. Het exacte mechanisme hiervan was onduidelijk. Onlangs is aangetoond in gistcellen met een verhoogde resistentie voor oxidatieve stress geproduceerd door het thiol-reducerende reagens diamide dat het onderliggende mechanisme gebaseerd is op een omleiding van de metabole flux van de glycolyse naar de PPP, waarbij de redox status van het cytosolisch NADP(H) wordt verhoogd (19). Verder is aangetoond dat de PPP een metabole redox sensor is en transcriptie reguleert tijdens de reactie op antioxidanten (20).

### Toekomstig onderzoek

Het toekomstige onderzoek zal gericht zijn op het verkrijgen van meer kennis over de pathofysiologie in de twee aangeboren defecten (TALDO en RPI deficiëntie), met hopelijk een werkzame behandeling als gevolg. Tevens willen we graag de nog niet volledig gekarakteriseerd enzymen die betrokken zijn bij de vorming van de polyolen verder beschrijven. Onze technieken voor het meten van suiker-P, polyolen en C7-suikers zullen verder gebruikt worden in de diagnostiek van bekende en misschien nieuwe defecten in de PPP en onderzoek naar de functie van de PPP o.a. tijdens oxidatieve stress.

### Referenties

1. van der Knaap MS, Wevers RA, Struys EA, Verhoeven NM, Pouwels PJ, Engelke UF, Feikema W, et al. 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, et al. 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. Wamelink MM, Struys EA, Huck JH, Roos B, van der Knaap MS, Jakobs C, Verhoeven NM. Quantification of sugar phosphate intermediates of the pentose phosphate pathway by LC-MS/MS: application to two new inherited defects of metabolism. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2005; 823: 18-25.

5. Wamelink MM, Smith DE, Jakobs C, Verhoeven NM. Analysis of polyols in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: a useful tool for recognition of inborn errors affecting polyol metabolism. *J Inher Metab Dis*. 2005; 28: 951-963.
6. Wamelink MM, Smith DE, Jansen EE, Verhoeven NM, Struys EA, Jakobs C. Detection of transaldolase deficiency by quantification of novel seven-carbon chain carbohydrate biomarkers in urine. *J Inher Metab Dis*. 2007; 30: 735-742.
7. Wamelink MM, Struys EA, Valayannopoulos V, Gonzales M, Saudubray JM, Jakobs C. Retrospective detection of transaldolase deficiency in amniotic fluid: implications for prenatal diagnosis. *Prenat Diagn*. 2008; 28: 460-462.
8. Verhoeven NM, Wallot M, Huck JHJ, Disch O, Ballauf A, Neudorf U, Salomons GS, et al. A newborn with severe liver failure, cardiomyopathy and transaldolase deficiency. *J Inher Metab Dis*. 2005; 28: 169-179.
9. Valayannopoulos V, Verhoeven NM, Mention K, Salomons GS, Sommelet D, Gonzales M, Touati et al. Transaldolase deficiency: a new cause of hydrops fetalis and neonatal multi-organ disease. *J Pediatr*. 2006; 149: 713-717.
10. Wamelink MM, Struys EA, Salomons GS, Fowler D, Jakobs C, Clayton PT. Transaldolase deficiency in a two-year-old boy with cirrhosis. *Mol Genet Metab*. 2008; 94: 255-258.
11. Tylki-Szymańska A, Stradowska TJ, Wamelink MM, Salomons GS, Taybert J, Pawłowska J, Jakobs C. Transaldolase deficiency in two new patients with a relative mild phenotype. *Mol Genet Metab*. 2009; 97: 15-17.
12. Balasubramaniam S, Wamelink MM, Ngu LH, Talib A, Salomons GS, Jakobs C, Keng WT. Novel heterozygous mutations in TALDO1 gene causing transaldolase deficiency and early infantile liver failure. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2011; 52: 113-116.
13. Holton JB, Walter JH, Tyfield LA. Galactosemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, 8<sup>th</sup> ed, vol I, 2001; 1553-1587.
14. Engelke UF, Zijlstra FS, Mochel F, Valayannopoulos V, Rabier D, Kluijtmans LA, Perl A, et al. Mitochondrial involvement and erythronic acid as a novel biomarker in transaldolase deficiency. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1802: 1028-1035.
15. Wamelink MM, Grüning NM, Jansen EE, Bluemlein K, Lehrach H, Jakobs C, Ralser M. The difference between rare and exceptionally rare: molecular characterization of ribose 5-phosphate isomerase deficiency. *J Mol Med (Berl)*. 2010; 88: 931-939.
16. Wamelink MM, Struys EA, Jansen EE, Levtchenko EN, Zijlstra FS, Engelke U, Blom HJ, et al. Sedoheptulokinase deficiency due to a 57-kb deletion in cystinosis patients causes urinary accumulation of sedoheptulose: elucidation of the CARKL gene. *Hum Mutat*. 2008; 29: 532-536.
17. 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.
18. Wamelink MM, Struys EA, Jansen EE, Blom HJ, Vilboux T, Gahl WA, Kömhoff M, et al. Elevated concentrations of sedoheptulose in bloodspots of patients with cystinosis caused by the 57-kb deletion: implications for diagnostics and neonatal screening. *Mol Genet Metab*. 2011; 102: 339-342.
19. Ralser M, Wamelink MM, Kowald A, Gerisch B, Heeren G, Struys EA, et al. Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. *J Biol*. 2007; 6: 10.
20. Krüger A, Grüning NM, Wamelink MM, Kerick M, Kirpy A, Parkhomchuk D, Bluemlein K, et al. The pentose phosphate pathway is a metabolic redox sensor and regulates transcription during the antioxidant response. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 15: 311-324.