

University of Groningen

Phenylketonuria: towards mechanism-based treatment

de Groot, Martijn Jonathan

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2015

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

de Groot, M. J. (2015). *Phenylketonuria: towards mechanism-based treatment*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Samenvatting in het Nederlands

Fenylketonurie, inleiding en achtergrond

In Nederland wordt bij pasgeborenen in de eerste levensweek bloed afgenomen met de hielprik. Dit bloed wordt gebruikt om een aantal aangeboren ziekten op te sporen. Eén van deze ziekten is fenylketonurie (PKU, een afkorting van de Engelse term *phenylketonuria*). PKU is een aangeboren ziekte van de stofwisseling van aminozuren. “Stofwisseling” staat voor de manieren waarop ons lichaam de bouwstoffen uit voedsel gebruikt voor allerlei processen. Hierbij gaat het vooral om koolhydraten, eiwitten en vetten. Deze bouwstoffen zijn opgebouwd uit kleinere eenheden. Zo bestaan eiwitten uit een aaneenschakeling van aminozuren. Voor de verwerking van de bouwstoffen uit voedsel zijn allerlei hulpstoffen (enzymen) nodig. PKU patiënten worden geboren met twee foutjes in het erfelijk materiaal, waardoor één van deze hulpstoffen niet goed werkt. Deze hulpstof, die het aminozuur fenylalanine omzet in het aminozuur tyrosine, doet dit bij PKU patiënten onvoldoende, waardoor de fenylalanineconcentratie in het bloed sterk stijgt. Onbehandeld leidt PKU tot een ernstige ontwikkelingsachterstand, met daarnaast soms epilepsie, gedragsproblemen en huidafwijkingen.

PKU werd voor het eerst beschreven in 1934, door de Noor Asbjørn Følling. De eerste effectieve behandeling van PKU werd beschreven in 1953, door de Duitser Horst Bickel en zijn collega's. Deze behandeling beperkte de inname van fenylalanine via de voeding, met als doel de fenylalanineconcentratie in het bloed te verlagen. Het verminderen van de inname van fenylalanine vormt nog steeds het belangrijkste onderdeel van de behandeling van PKU. Deze verminderde inname van fenylalanine wordt bereikt met een eiwitbeperkt dieet, dat wordt aangevuld met aminozuurmengsels zonder fenylalanine om tekorten van aminozuren te voorkomen. In 1963 ontwikkelden de Amerikaan Robert Guthrie en de Estse Ada Susi een test om een verhoogde fenylalanineconcentratie in het bloed aan te tonen, zodat het mogelijk werd om pasgeborenen te screenen op PKU. Door deze vroege diagnostiek kan de behandeling van PKU tijdig starten, waardoor de meeste ziekteverschijnselen worden voorkomen. Onlangs is er een nieuwe behandelvorm beschikbaar gekomen: de behandeling met tetrahydrobiopterine (BH4). BH4 zorgt er bij sommige patiënten voor dat de hulpstof die bij PKU aangedaan is, beter functioneert. Dit leidt tot een verlaging van de fenylalanineconcentratie in het bloed, waardoor het dieet minder strikt hoeft te zijn.

Hoewel er tegenwoordig veel bekend is over PKU, is een aantal zaken nog onvoldoende duidelijk. Dit geldt in het bijzonder voor de vraag, hoe de verhoogde fenylalanineconcentratie in het bloed de ontwikkeling verstoort. Daarnaast leidt de huidige behandeling van PKU niet tot een volledig normale ontwikkeling. Patiënten die volgens de huidige inzichten goed behandeld worden, hebben namelijk een licht

verlaagd intelligentiequotiënt (IQ), verstoringen in bepaalde hogere functies van de hersenen en mogelijk een verhoogd risico op psychiatrische aandoeningen. Dit roept de vraag op hoe de behandeling van PKU verder verbeterd kan worden.

Onderwerpen van dit proefschrift

In dit proefschrift zijn verschillende onderwerpen besproken die te maken hebben met de ziektemechanismen en behandel mogelijkheden van PKU. Hierbij is de verhoogde fenylalanineconcentratie in het bloed als uitgangspunt genomen. Gegevens uit verschillende eerdere onderzoeken hebben gesuggereerd dat de verhoogde fenylalanineconcentratie in het bloed een verstrend effect heeft op het transport van bepaalde aminozuren (de zogenaamde *large neutral amino acids* of LNAAs) over de bloed-hersenbarrière, de cellaag tussen het bloed en de hersenen. Door dit verstoorde transport stijgt de fenylalanineconcentratie in de hersenen, terwijl de concentraties van bepaalde andere aminozuren dalen. In de ontwikkeling van de hersenen spelen aminozuren een belangrijke rol. Zo zijn aminozuren de bouwstenen voor nieuwe eiwitten, die in de hersenen nodig zijn voor het vormen van nieuwe verbindingen tussen zenuwcellen en het verankeren van ervaringen en kennis. Een aantal aminozuren is daarnaast belangrijk voor de aanmaak van boodschapperstoffen (neurotransmitters), die een rol spelen bij de communicatie tussen zenuwcellen in de hersenen. Zowel de stijging van de fenylalanineconcentratie in de hersenen als de daling van concentraties van andere LNAAs in de hersenen zou deze processen kunnen verstoren. Gezien de mogelijke betrokkenheid van deze ziektemechanismen bij PKU, komen in dit proefschrift de volgende onderwerpen aan de orde: het transport van aminozuren vanuit het bloed naar de hersenen, de concentraties van aminozuren in de hersenen, de concentraties van boodschapperstoffen in de hersenen, de aanmaak van de eiwitten in de hersenen en de relatie van deze processen met de ontwikkeling van de hersenen. Vervolgens worden er twee nieuwe behandel mogelijkheden bij PKU beschreven, benaderd vanuit deze ziektemechanismen.

Bevindingen in dit proefschrift

In **hoofdstuk 1** worden verschillende theorieën over de ziektemechanismen van PKU gedetailleerd toegelicht, als introductie op de studies beschreven in dit proefschrift.

In **hoofdstuk 2** is onderzocht wat de relatie is tussen de fenylalanineconcentratie in het bloed, transport van aminozuren over de bloed-hersenbarrière en de eiwitaanmaak in de hersenen van PKU patiënten. Het transport van aminozuren en de eiwitaanmaak in de hersenen werden in kaart gebracht met behulp van een

zogeheten PET-scan, die kon volgen hoe radioactief gemerkt tyrosine naar de hersenen werd getransporteerd en daar werd ingebouwd. De statistische analyses lieten zien dat hogere fenylalanineconcentraties in het bloed een sterk verband hadden met minder transport van gemerkt tyrosine over de bloed-hersenbarrière. Deze verlagingen van het transport van gemerkt tyrosine hadden een sterk verband met minder inbouw van gemerkt tyrosine in de hersenen. De resultaten ondersteunen hiermee de theorie dat de verhoogde fenylalanineconcentratie in het bloed de eiwitaanmaak in de hersenen vermindert door een verstoring van het transport van aminozuren over de bloed-hersenbarrière.

In **hoofdstuk 3** is bij PKU patiënten gekeken naar de verbanden tussen de fenylalanineconcentratie in de hersenen en de processen die in **hoofdstuk 2** werden onderzocht. De fenylalanineconcentratie in de hersenen werd gemeten met een zogeheten MRS-scan. In twee van de drie meetgebieden toonden hogere fenylalanineconcentraties in de hersenen een sterk verband met lagere inbouw van tyrosine in de hersenen (in het derde gebied was dit verband niet statistisch significant). De fenylalanineconcentratie in het bloed en het transport van gemerkt tyrosine hadden hierbij geen aanvullende waarde voor het voorspellen van de inbouw van gemerkt tyrosine in de hersenen. Deze bevindingen suggereren dat de verhoogde fenylalanineconcentratie in de hersenen en/of hiermee gepaard gaande biochemische veranderingen de eiwitaanmaak in de hersenen bij PKU beïnvloeden.

Hoofdstuk 4 bestudeert een moleculaire route die dergelijke biochemische veranderingen zou kunnen koppelen aan de verminderde eiwitaanmaak in de hersenen bij PKU. Hiervoor is bij PKU muizen gekeken naar het stofje *cAMP responsive element binding protein* (CREB). Dit stofje speelt zowel een belangrijke rol bij het aansturen van eiwitaanmaak in de hersenen als bij leren en het vormen van geheugen. Bij de activering van CREB spelen meerdere omstandigheden een rol, waaronder de concentraties van aminozuren en neurotransmitters in de hersenen. CREB wordt geactiveerd door op een bepaalde plaats fosfaat toe te voegen, waardoor gefosforyleerd CREB (pCREB) ontstaat. De verhouding tussen pCREB en CREB, uitgedrukt als de pCREB/CREB ratio, is hiermee een maat voor CREB activiteit. We onderzochten de verbanden tussen aminozuren in het bloed, aminozuren in de hersenen, boodschapperstoffen in de hersenen, de pCREB/CREB ratio in verschillende hersengebieden en leren en het vormen van geheugen bij de zogeheten C57Bl/6 PKU muizen. Deze PKU muizen zijn afkomstig uit een muizenfamilie die veel gebruikt wordt bij hersenonderzoek, in tegenstelling tot muizen van de zogeheten BTBR familie, die het meest onderzocht is bij PKU. We verwachtten dat onze PKU muizen de typische biochemische kenmerken van PKU zouden hebben, met daarbij verlaagde pCREB/CREB ratio's en verstoringen van

leren en het vormen van geheugen. De C57Bl/6 PKU muizen konden echter net zo goed leren als de niet-PKU muizen, ondanks de aanwezigheid van de typische biochemische kenmerken van PKU. Het leervermogen van de C57Bl/6 PKU muizen verschilt hiermee van dat van de BTBR PKU muizen, die wel problemen hebben met leren en het vormen van geheugen. Hoewel de pCREB/CREB ratio's onder basale condities lager waren bij PKU muizen, zagen we deze verlagingen niet bij PKU muizen die gedragstesten voor leren en het vormen van geheugen hadden ondergaan. We concludeerden dat het pCREB/CREB systeem inderdaad een rol zou kunnen spelen bij PKU patiënten en dat de C57Bl/6 PKU muizen in staat zijn om de verlaagde pCREB/CREB ratio's te normaliseren tijdens gedragstesten. Verder onderzoek moet uitwijzen welke processen leiden tot de verlaagde pCREB/CREB ratio's bij de C57Bl/6 PKU muizen onder basale condities, hoe deze muizen de ratio's normaliseren tijdens gedragstesten en welke verschillen er zijn tussen C57Bl/6 PKU muizen en BTBR PKU muizen.

In **hoofdstuk 5** worden de resultaten van aanvullende gedragsexperimenten bij de C57Bl/6 PKU muizen beschreven. Deze experimenten richtten zich op stemming en motoriek, waarbij we verwachtten dat de PKU muizen gedragsafwijkingen lieten zien die passen bij een verstoorde stemming en motorische problemen. Dit gedrag werd gekoppeld aan de concentraties van boodschapperstoffen in de hersenen van de PKU muizen. In de meeste testen lieten de PKU muizen de gedragsafwijkingen zien die we verwachtten. Deze afwijkingen gingen gepaard met verlaagde concentraties van boodschapperstoffen in de hersenen die belangrijk zijn voor stemming en motoriek. De resultaten uit dit hoofdstuk vormen voor behandelexperimenten bij PKU muizen, met als uiteindelijke doel de behandeling van PKU patiënten te verbeteren.

Hoofdstuk 6 laat een voorbeeld zien van toepassing van kennis over ziektemechanismen voor een nieuwe behandelmethode bij PKU, namelijk behandeling met LNAAs (de groep aminozuren waarvan bij PKU het transport over de bloed-hersensbarrière verstoord lijkt te zijn). In dit hoofdstuk wordt de huidige kennis rond deze behandelvorm samengevat. Behandeling met LNAAs zou kunnen zorgen voor:

1. het verlagen van de fenylalanineconcentratie in het bloed en het verhogen van de concentraties van andere LNAAs in het bloed;
2. het verlagen van de fenylalanineconcentratie in de hersenen;
3. het verhogen van de concentraties van de LNAAs in de hersenen die belangrijk zijn bij de aanmaak van boodschapperstoffen;
4. het verhogen van de concentraties van alle niet-fenylalanine LNAAs in de hersenen, waardoor de eiwitaanmaak mogelijk toeneemt.

We concludeerden dat behandeling met LNAA's veelbelovend is, maar dat meer onderzoek nodig is voordat deze behandelvorm toegepast kan worden in de klinische praktijk.

Ook in **hoofdstuk 7** is gekeken naar een manier om de behandeling van PKU te verbeteren, door mogelijke nieuwe behandeldoelen van BH4 te onderzoeken. BH4 is niet alleen nodig voor een goede werking van de hulpstof die onvoldoende functioneert bij PKU, maar ook voor een goede werking van twee andere hulpstoffen, die betrokken zijn bij de aanmaak van boodschapperstoffen in de hersenen. In dit hoofdstuk onderzochten we of behandeling met BH4 bij (C57Bl/6) PKU muizen zorgt voor een hogere aanmaak van boodschapperstoffen en een verbetering van gedragsafwijkingen. Dit was niet het geval. Bij de BH4-behandelde muizen zonder PKU zagen we echter wel verhoogde concentraties van één van de boodschapperstoffen. Het zou kunnen dat BH4 bij PKU muizen ineffectief is, doordat de verschillende biochemische veranderingen in de hersenen het BH4-effect verhinderen.

Aanvullende onderzoeksgegevens

Naar aanleiding van bovenstaande bevindingen hebben we verdere experimenten gedaan, die zich richtten op het verder karakteriseren van de C57Bl/6 PKU muizen. Hierbij hebben we gekeken naar een mogelijke oorzaak van de verlaagde pCREB/CREB ratio's. Eén van de stofjes die CREB aansturen is *eukaryotic initiation factor 2 α* (eIF2 α). Bij een tekort aan aminozuren in lichaamscellen zet eIF2 α een aantal beschermingsmechanismen in werking, zoals het verminderen van eiwitaanmaak. Deze vermindering van eiwitaanmaak treedt onder meer op door het verminderen van CREB activiteit. Om te onderzoeken of eIF2 α betrokken is bij de verlaagde pCREB/CREB ratio's, hebben we eIF2 α en gefosforyleerd eIF2 α (peIF2 α) bestudeerd. Fosforylering van eIF2 α zorgt voor een hogere activiteit van dit stofje. De hoeveelheden peIF2 α en eIF2 α lieten geen consistente relatie zien met de verlaagde pCREB/CREB ratio's. We concludeerden daarom dat verhoogde eIF2 α activiteit waarschijnlijk niet de oorzaak is van de verlaagde pCREB/CREB ratio's bij onze PKU muizen. Verder onderzoek is nodig om de oorzaak van de verlaagde pCREB/CREB ratio's te achterhalen, waarbij vooral veranderingen die te maken hebben met boodschapperstoffen interessant lijken te zijn.

We waren ook benieuwd naar de gevolgen van de verlaagde pCREB/CREB ratio's. Om deze gevolgen in kaart te brengen, hebben we gekeken naar het stofje *polysialylated acid neural cell adhesion molecule* (PSA-NCAM). PSA-NCAM verstevigt de verbindingen tussen hersencellen, waardoor deze krachtiger met elkaar kunnen communiceren. We hebben de hoeveelheid PSA-NCAM van onze

PKU muizen vergeleken met die van niet-PKU muizen. Hierbij verwachtten we dat de PKU muizen minder PSA-NCAM zouden hebben dan niet-PKU muizen. Beide groepen muizen beschikten echter over vrijwel evenveel PSA-NCAM.

Tot slot hebben we gekeken naar gedrag zonder directe relatie met leren en het vormen van geheugen bij de PKU muizen. We verwachtten hierbij dat PKU muizen gedragsafwijkingen zouden laten zien ten opzichte van niet-PKU-muizen. Bij de meeste gedragstesten bleek dit inderdaad het geval te zijn. De resultaten suggereerden dat PKU muizen afwijkingen hebben van coördinatie en balans en daarnaast een nieuwe omgeving op een andere manier verkennen dan niet-PKU muizen. Beide bevindingen kunnen het gevolg zijn van de gevonden veranderingen in boodschapperstoffen in de hersenen.

Relevantie van dit proefschrift en richtingen voor vervolgonderzoek

Dit proefschrift geeft nieuw bewijs voor de betrokkenheid van diverse ziektemechanismen bij PKU. Onze experimenten onderstrepen de rol van het transport van aminozuren over de bloed-hersenbarrière en de gevolgen van verstoord transport voor de eiwitaanmaak in de hersenen bij PKU. Daarnaast hebben we aangetoond dat veranderingen van de fenylalanineconcentratie in de hersenen (en/of hiermee gepaard gaande biochemische veranderingen) waarschijnlijk van invloed zijn op de eiwitaanmaak in de hersenen van PKU patiënten. Door het CREB systeem bij PKU muizen te onderzoeken, hebben we een belangrijke brug kunnen slaan tussen de kennisgebieden van de neurobiologie en de aangeboren stofwisselingsziekten. De verlaagde pCREB/CREB ratio's bij PKU muizen onder basale condities suggereren dat het CREB systeem een rol kan spelen bij PKU patiënten. Bovenstaande resultaten bieden aanknopingspunten om de ziektemechanismen bij PKU nog gericht te onderzoeken. Dit geldt in het bijzonder voor de vraag welke biochemische veranderingen in de hersenen het meest bepalend zijn voor de ontwikkeling. Het antwoord op deze vraag kan gebruikt worden om nieuwe behandelvormen bij PKU toe te passen, zoals de behandeling met LNAs en nieuwe behelddoelen bij de behandeling met BH4.

De bevindingen van dit proefschrift zijn ook relevant voor de huidige klinische praktijk. Bij de behandeling van PKU is de fenylalanineconcentratie in het bloed op dit moment de meest gebruikte parameter om de effectiviteit van de behandeling te beoordelen. De onderzoeksgegevens van dit proefschrift wijzen erop dat het biochemische behelddoel niet zozeer het verlagen van de fenylalanineconcentratie in het bloed moet zijn, maar het normaliseren van het transport van aminozuren over de bloed-hersenbarrière. Dit principe onderstreept dat bij de behandeling van PKU een goede inname van de aminozuurmengsels van belang is, naast de beperking

van de inname van fenylalanine.

Om de vertaalslag te maken van fundamenteel onderzoek naar de klinische praktijk zijn nieuwe studies nodig. Deze studies zouden zich moeten richten op het verder karakteriseren van de gevolgen van PKU op biochemisch, moleculair en gedragsmatig niveau, zowel bij PKU muizen als bij PKU patiënten. Bevindingen uit dergelijke studies kunnen vervolgens gebruikt worden om de behandeling van PKU verder te ontwikkelen, met als uiteindelijke doel de behandeluitkomst en de kwaliteit van leven van PKU patiënten te verbeteren.