

SAMENVATTING

X-gebonden creatine transporter deficiëntie.

Creatine is een natuurlijke stof die vooral in de spieren zit. De stof heeft een belangrijke rol in de energiehuishouding van de cel. Creatine bindt namelijk fosfaat dat weer afgegeven wordt om ATP te vormen als de cel energie moet leveren (bijvoorbeeld om spierkracht te leveren). ATP is dé brandstof van de cellen. Creatine wordt omgezet naar creatinine dat uitgescheiden wordt in de urine. De creatine transporter is een eiwit dat in de celmembraan zit en creatine opneemt in de cel.

Creatine transporter deficiëntie (CRTR-D) is een erfelijke aandoening waarbij de creatine transporter niet werkt. De aandoening werd voor het eerst beschreven in 2001 en veroorzaakt een verstandelijke beperking. Kenmerkend zijn de sterk verlaagde creatine concentratie in de hersenen (dit wordt gemeten met een proton MR spectroscopie (¹H-MRS)) en een toegenomen verhouding van creatine ten opzichte van creatinine in de urine. Het falen van de creatine opname kan ook worden aangetoond in gekweekte huidfibroblasten van de patiënt.

CRTR-D wordt veroorzaakt door mutaties in het *SLC6A8* gen dat codeert voor de creatine transporter. Het *SLC6A8* gen is gelegen op het X-chromosoom en daarom erft de aandoening X-gebonden over. CRTR-D komt dus vooral bij jongens/mannen tot uiting.

In **hoofdstuk 2.1** beschrijven we een studie naar de verschijnselen van CRTR-D bij 101 jongens/mannen uit 85 families met een mutatie in het *SLC6A8* gen. De meeste patiënten bleken een matige tot ernstige verstandelijke beperking te hebben. Vooral de spraaktaalontwikkeling was beperkt. Veel voorkomende gedragsproblemen waren ADHD en autistische kenmerken. Ook epilepsie kwam veel voor maar meestal waren de aanvallen laag frequent en goed te behandelen. Motorische problemen waren meestal mild of matig. Extrapiramidale bewegingsstoornissen (zoals dystonie en athetose) zijn bekende verschijnselen van *GAMT*-deficiëntie (een creatine aanmaakstoornis) maar werden ook gezien bij CRTR-D. Verder bleken veel patiënten maag-darm problemen te hebben. Voedingsproblemen, overgeven en onvoldoende aankomen in gewicht waren vroege en soms zelfs de eerste verschijnselen. Ernstige obstipatie, soms zelfs ileus (darmobstructie), was een complicatie op latere leeftijd.

De creatine/creatinine ratio in urine was verhoogd bij alle patiënten en is dus een betrouwbare test om de aandoening, bij jongens/mannen, op te sporen. Er werden richtlijnen voor de diagnostiek van CRTR-D opgesteld.

Opvallend was dat patiënten met CRTR-D een normale of zelfs licht verhoogde creatine concentratie in het hersenvocht (liquor) hadden terwijl de aandoening gekenmerkt wordt door een sterk verlaagde creatine concentratie in de hersencellen. Bij de creatine aanmaakstoornissen (AGAT- en GAMT- deficiëntie) is het creatine wel sterk verlaagd in hersenvocht.

In de meeste families met CRTR-D werd een unieke mutatie in het *SLC6A8* gen aangetoond; slechts een enkele mutatie werd in meer dan één familie gevonden. In de meeste gevallen ging het om missense mutaties (mutaties die een verandering geven van één aminozuur) of één-aminozuur-deleties (wegvallen van één aminozuur). Sommige missense mutaties leiden tot een creatine transporter die toch nog een beetje creatine kan opnemen. De verschijnselen bij patiënten met deze mutaties waren meer wisselend en soms milder, maar de groep was te klein om te kunnen stellen dat de mutatie de ernst van de aandoening kan voorspellen.

Vaak (70%) bleek de moeder draagster van de mutatie maar bij een deel (30%) van de jongens/mannen met CRTR-D was de mutatie nieuw ontstaan.

In **hoofdstuk 2.2** beschrijven we negen patiënten met een deletie (ontbreken) van een groot deel van het *SLC6A8* gen en/of genen die naast het *SLC6A8* gen liggen. Direct naast het *SLC6A8* gen ligt het *BCAP31* gen en daarnaast ligt het *ABCD1* gen. Een defect van alleen het *ABCD1* gen veroorzaakt X-gebonden adrenoleukodystrofie, een progressieve neurologische aandoening die in de loop van het leven ontstaat. Recent werd bekend dat een geïsoleerd defect van *BCAP31* een ernstig ziektebeeld geeft met een zeer ernstige ontwikkelingsachterstand, dystonie, doofheid en overlijden op jonge leeftijd.

Patiënten met een deletie van *SLC6A8* en *BCAP31* hadden de zelfde verschijnselen als patiënten met een geïsoleerd defect van *BCAP31*. Deze verschijnselen zijn duidelijk ernstiger dan de verschijnselen van CRTR-D (geïsoleerd defect van *SLC6A8*) en worden zeer waarschijnlijk verklaard door het defect van het *BCAP31* gen. Echter, een patiënt met een deletie van alleen het *SLC6A8* gen en een stuk niet-coderend DNA tussen *SLC6A8* en *BCAP31* had ook ongewoon ernstige verschijnselen (vrijwel geen ontwikkeling, overlijden op 8 jaar, maar geen doofheid). Mogelijk kan dit ernstige beeld worden verklaard door de verstoring van een regulerend element in het niet-coderende DNA tussen *SLC6A8* en *BCAP31* in.

Patiënten met een deletie van zowel *BCAP31* als *ABCD1*, ontwikkelden cholestase (galstuwijng) van de lever en overleden in het eerste levensjaar. Dit wordt waarschijnlijk

veroorzaakt door een elkaar versterkend effect van het ontbreken van deze beide genen.

Hoofdstuk 2.3 gaat over de behandeling van CRTR-D. Patiënten met een creatine aanmaakstoornis (AGAT en GAMT deficiëntie) worden behandeld met creatine suppletie. Deze behandeling bleek niet effectief bij CRTR-D. Inmiddels is bekend dat hersencellen zelf ook creatine kunnen maken uit arginine en glycine. Suppletie van extra arginine en glycine leek daarom een logische behandeling bij CRTR-D. Negen jongens met CRTR-D, tussen 8 maanden en 10 jaar oud, werden behandeld gedurende 4-6 jaar met creatine, arginine en glycine in het Erasmus MC te Rotterdam. Zij werden gevolgd met herhaalde ¹H-MRS metingen en neuropsychologische onderzoeken. De behandeling leidde helaas niet tot een significante toename van creatine in de hersenen. Hoewel er aanvankelijk een verbetering werd gezien op de motorische en sociale subschalen van de ontwikkelingstest, was er ook geen blijvende verbetering van de ontwikkeling.

In **hoofdstuk 3** komen de vrouwen die draagster zijn van een mutatie in het *SLC6A8* gen aan bod. Omdat vrouwen twee X-chromosomen hebben, hebben draagsters naast een X-chromosoom met een defect *SLC6A8* gen nog een X-chromosoom met een normaal werkend *SLC6A8* gen en dit beschermt hen tegen verschijnselen van de aandoening. Echter, in alle cellen van een vrouw staat één van de twee X-chromosomen uit (X-inactivatie). Welke van de twee X-chromosomen wordt uitgezet is een toevalsproces. Dit uitzetten gebeurt al vroeg in de embryonale ontwikkeling en ligt vast voor de rest van het leven. Gemiddeld ligt de verhouding tussen cellen waarin het ene X-chromosoom actief is versus cellen waarin het andere X-chromosoom actief is rond de 50:50, maar extreme verhoudingen zijn mogelijk. Als het X-chromosoom met de mutatie toevallig in de meeste cellen het actieve X-chromosoom is, kan een vrouwelijke draagster van een X-gebonden aandoening toch verschijnselen hebben.

We onderzochten de verschijnselen en het X-inactivatie patroon in acht Nederlandse vrouwen die draagster waren van een mutatie in het *SLC6A8* gen (**hoofdstuk 3.1**). Symptomen van CRTR-D (leerproblemen, verstandelijke beperking en ernstige obstipatie) bleken voor te komen bij vrouwelijke draagsters. Het is echter moeilijk om de diagnose bij vrouwen vast te stellen. De creatine/creatinine ratio in urine was niet altijd verhoogd en de creatine concentratie in de hersenen (gemeten met ¹H-MRS) was niet altijd duidelijk verlaagd. Verder bleek in de gekweekte huidfibroblasten altijd één X-chromosoom te overheersen ("skewed X-inactivatie"), of wel het gemuteerde X-chromosoom of het

niet-gemuteerde chromosoom, waardoor de creatine opname-test zowel deficiënt als geheel normaal kon uitvallen. Deze testen zijn dus niet betrouwbaar voor opsporing van CRTR-D bij vrouwen. DNA diagnostiek van het *SLC6A8* gen is de meest betrouwbare test om de diagnose bij vrouwen vast te stellen.

In **hoofdstuk 3.2** beschrijven we twee broers met CRTR-D. Tegen de verwachting in werd met sequencing van DNA uit witte bloedcellen de *SLC6A8* mutatie niet terug gevonden bij de moeder. Echter, met een andere DNA techniek (denaturing high-performance liquid chromatography, DHPLC) kon de mutatie wel aangetoond worden in 6% van de witte bloedcellen van de moeder. Hiermee is voor het eerst aangetoond dat moeders van een zoon met CRTR-D ook “mozaïek” draagster kunnen zijn. Dit betekent dat de mutatie slechts aanwezig is in een deel van de cellen van moeder. Dit heeft belangrijke consequenties voor de voorlichting van ouders van een zoon met CRTR-D bij wie de mutatie nieuw ontstaan lijkt te zijn. Omdat een mozaïek bij de moeder niet uitgesloten kan worden met DNA sequencing in bloed, moet er altijd rekening gehouden worden met een herhalingskans in een volgende zwangerschap en moet prenatale diagnostiek worden aangeboden.

In **hoofdstuk 4** gaan we in op de vraag hoe CRTR-D tot symptomen leidt (pathogenese). Waarom leidt een defect in de creatine opname tot een creatine tekort in de hersencellen als de hersencellen zelf creatine kunnen maken?

Zoals eerder genoemd, vonden we normale tot licht verhoogde creatine concentraties in hersenvocht (liquor) van de patiënten met CRTR-D (**hoofdstuk 2.1**). Om dit te begrijpen, keken we naar de beschreven gevolgen van een defect van andere transporters, namelijk transporters voor neurotransmitters (signaalstoffen van zenuwen). Neurotransmitters worden uitgescheiden door neuronen (zenuwcellen) om een signaal door te geven aan andere neuronen. Daarna worden de neurotransmitters door de transporter weer terug opgenomen in de neuronen. Onderzoek in muizen toont dat een defect van deze transporters leidt tot een teveel aan de neurotransmitter in het hersenvocht en een sterk tekort aan deze neurotransmitter in de neuronen. Dit toont aan dat recycling essentieel is om de neurotransmittervoorraad op peil te houden.

Op grond hiervan beschrijven we in **hoofdstuk 4.1** een nieuwe hypothese over het ontstaan van het creatine tekort in de hersenen bij CRTR-D: creatine wordt gemaakt in de neuronen, die creatine vervolgens uitscheiden in het hersenvocht. In CRTR-D kunnen

Samenvatting

de neuronen het creatine niet meer heropnemen uit het hersenvocht en ontstaat dus een tekort aan creatine in de hersencellen door een recycling defect. Deze hypothese kan er op wijzen dat creatine ook een functie heeft als neurotransmitter of neuromodulator (stof die signaaloverdracht beïnvloedt).

Hoofdstuk 4.2 geeft een samenvatting van de nu bekende inzichten over de verschijnselen en pathogenese van CRTR-D, gebaseerd op de resultaten van dit proefschrift en een studie van de literatuur.