

Van gen naar ziekte; cystinose

E. Levtchenko¹, M. Wilmer^{1,2}, A.C. de Graaf-Hess², L. van den Heuvel^{1,2}, H. Blom², L. Monnens¹

Afdeling kindernefrologie¹, Laboratorium kindergeneeskunde en neurologie²

UMC St Radboud, Nijmegen

Correspondentieadres:

E.N. Levtchenko

Afdeling Kindernefrologie

UMC Nijmegen

P.O. 9101

6500 HB Nijmegen

Nederland

Tel. +31 24 3616872

FAX +31 24 3619348

e-mail e.levtchenko@cukz.umcn.nl

ABSTRACT

Cystinosis is an autosomal recessive disorder caused by an impaired transport of cystine out of lysosomes. The most severe infantile form of cystinosis starts with Fanconi syndrome at the age of 3-6 months. Untreated patients develop renal failure before the age of ten. Cystinosis gene (CTNS) maps to chromosome 17p13, spans 23kb and is composed of 12 exons. CTNS encodes a 367 amino acid protein, cystinosin, which is a H⁺ driven lysosomal cystine transporter. It is enigmatic how lysosomal cystine accumulation induces the clinical symptoms. ATP depletion was demonstrated in an experimental model consisting of loading lysosomes with cystinedimethylester.

The amino thiol cysteamine depletes lysosomal cystine content by a disulfide exchange reaction with cystine. The therapy with cysteamine should be administered as early as possible and continued after a renal transplantation as the extra renal damage still progresses.

Improved life expectancy of cystinotic patients requires the attention of specialists in internal medicine to this rare disorder.

DE ZIEKTE

Cystinose is een zeldzaam voorkomende ziekte, die wordt veroorzaakt door de stapeling van cystine in het lysosoom.

Het meest ernstige infantiele vorm van cystinose manifesteert rond 3-6 maanden met voedingsproblemen, afbuigende groeicurve, periodes van uitdroging en een enkele keer ook tekenen van rachitis. In dit stadium toont laboratoriumonderzoek een compleet Fanconi syndroom aan met verhoogde uitscheiding van aminozuren, kalium, calcium, bicarbonaat, fosfaat, glucose, uraat, carnitine, laag moleculaire eiwitten en albumine. Het optreden van braken met obstipatie in combinatie met hypokaliemie, hypofosfatemie en metabole acidose bij een zuigeling moeten aan dit ziektebeeld laten denken. Cystine kristallen in de cornea veroorzaken fotofobie en kunnen door de oogarts worden waargenomen vanaf de leeftijd van 1 jaar. Onbehandelde patiënten met infantiele vorm ontwikkelen een terminale nierinsufficiëntie rond de leeftijd van 10 jaar. Sinds cystinose patiënten dankzij niertransplantatie langer overleven, wordt duidelijk dat de stapeling van cystine in de organen buiten de nier tot verdergaande symptomen leidt met aantasting van ogen (retinopathie, leidend tot een afname van het gezichtsvermogen), endocriene organen (hypothyreoïdie, diabetes mellitus, hypogonadisme), spieren (progressieve spieratrofie) en het centrale zenuwstelsel¹. Multi-disciplinaire aanpak voor de follow-up van cystinose patiënten is noodzakelijk².

Bij de tweede vorm van cystinose, ook “late-onset” cystinose genoemd, verschijnen de symptomen meestal na het tiende levensjaar. De proximale tubulusstoornis is minder uitgesproken en de achteruitgang van de nierfunctie verloopt trager. Cystinekristallen kunnen in de cornea worden waargenomen.

De derde niet-nefropathische oculaire vorm van cystinose kenmerkt zich door de afwezigheid van nierlijden. De symptomen beperken zich tot fotofobie.

De behandeling van patiënten lijdend aan cystinose is tweevoudig. Op de eerste plaats is er een symptomatische behandeling van het Fanconi syndroom. Daarnaast is er een specifieke therapie met cysteamine ¹. Aminothiolen zoals cysteamine verlaagt het cystinegehalte in de lysosomen door disulfide uitwisseling met cystine waarbij vrije cysteïne en cysteamine-cysteïne disulfide worden gevormd en kunnen het lysosoom verlaten via cysteïne en lysine transporters zodat het verstoorde cystinetransport wordt omzeild (zie figuur 1).

Cysteamine therapie vertraagt de achteruitgang van de nierfunctie, verbetert de groei en vermindert de ernst en frequentie van de extrarenale orgaanaandoeningen. De behandeling met cysteamine moet zo vroeg mogelijk gestart en ook na niertransplantatie gecontinueerd worden vanwege de doorgaande stapeling in de andere organen. De cysteamine oogdruppels kunnen cystine kristalvorming in de cornea voorkomen en eventueel de kristallen zelfs doen oplossen ¹.

Nederlandse cystinose patiëntenvereniging biedt voorlichtingsmateriaal en ondersteunt cystinose patiënten en hun gezinnen (zie op <http://stofwisselingsziekten.nl/cystinose/>).

HET GEN

Cystinose is een autosomaal recessieve aandoening en wordt veroorzaakt door mutaties in het cystinose gen (CTNS). CTNS is gelegen op de korte arm van chromosoom 17 (17p13), omvat een gebied van 23 kb en bestaat uit 13 exonen. Mutaties in het CTNS gen zijn aangetoond bij alle 3 klinische vormen van cystinose. De meest frequent gevonden mutatie is een grote 57 kb deletie die de eerste 10 exonen en een zeer groot gedeelte upstream van CTNS overspant³.

Patiënten met de infantiele vorm van cystinose hebben meestal ernstige mutaties op beide allelen (vaak 57 kb deletie) die leiden tot een volledige truncatie van het eiwit, terwijl patiënten met de zogenaamde “late onset” vorm vaak mutaties hebben die minder belangrijke delen van het eiwit verstoren. Bij patiënten met de oculaire vorm van cystinose wordt meestal een compound heterozygote mutatie gevonden waarvan één ernstig⁴.

HET EIWIT

Het CTNS gen codeert voor het eiwit cystinosine bestaande uit 367 aminozuren. Cystinosine heeft 7 transmembraan domeinen en 2 zogenaamde targeting sequenties die de lokalisatie van het eiwit in het lysosomaal membraan bepalen (zie figuur 2). Cystinosine functioneert als een H⁺ symporter en verplaatst cystine en protonen uit het lysosoom. De daling van de pH in het lysosoom door H⁺ ATPase is noodzakelijk voor de normale functie van cystinosine (zie figuur 3)⁵.

DE CEL

In lichaamscellen zorgt cystinosine voor het transport van cystine uit het lysosoom. Het is nog onbekend op welke manier cystine stapeling in het lysosoom bij cystinose de cel kan beschadigen. Experimenteel onderzoek is uitgevoerd met proximale tubuluscellen, geladen met cystine dimethylester. In deze proximale tubuli kon een inhibitie van volume en glucose reabsorptie worden vastgesteld. Het voorgestelde mechanisme is een ATP depletie welke als consequentie heeft dat $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ wordt geïnhibeerd, wat leidt tot een verminderde functie van natriumgekoppelde transporters ⁶.

Ook apoptose zou een rol kunnen spelen. In gekweekte huidfibroblasten van cystinose patiënten en in de proximale tubuluscellen geladen met cystine dimetylester werd recent een verhoogde apoptose aangetoond ⁷.

DE POPULATIE

De jaarlijkse incidentie van cystinose is ongeveer 1 per 100.000-200.000 pasgeborenen, wat voor Nederland 1 à 2 nieuwe patiënten per jaar betekent ¹. Momenteel zijn er in Nederland in totaal 36 patiënten bekend. De oudste patiënt is momenteel 39 jaar. Obligate heterozygoten vertonen geen ziekteverschijnselen.

DIAGNOSTIEK

De diagnose van cystinose is gebaseerd op het vinden van een verhoogd cystine gehalte in de granulocyt. In het laboratorium kindergeneeskunde/neurologie van het UMCN is de HPLC methode voor de cystine bepaling ontwikkeld⁷. Cystine waarden bij gezonde controles zijn: 0.04 - 0.12 en bij obligate heterozygoten: 0.11- 0.6 nmol/mg eiwit . Onbehandelde patiënten met cystinose hebben cystine gehalte in de granulocyt ruim boven 1 nmol/mg eiwit.

Momenteel is de prenatale diagnostiek van cystinose mogelijk op basis van DNA analyse.

Mutatiedetectie in het cystinosine gen is mogelijk op de afdeling klinische genetica in het UMC St Radboud te Nijmegen.

Literatuurlijst

1. Gahl W, Thoene JG, Schneider J. Cystinosis: a disorder of lysosomal membrane transport. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed., New York: McGraww-Hill,2001: p.5085-6108.
- 2.
3. Gahl WA, Thoene JG, Schneider JA. Cystinosis. *N Engl J Med* 2002;347:111-121.
4. Abderhalden E. Familiäre Cystindiathese. *Z. Physiol Chem* 1903;38:557-561.
5. Fanconi G, Bickel H. Die chronische aminoacidurie (aminosäurediabetes oder nephrotisch-glukosurischer zwergwuchs) bei der glykogenose und der cystinkrankheit. *Helv Paediatr Acta* 194;94: 359..
6. Broyer M, Guillot M, Gubler MC, Habib R. Infantile cystinosis: a reappraisal of early and late symptoms. *Adv Nephrol Necker Hosp* 1981;10:137-166.
7. Niaudet P, Tête M-J, Broyer M. Renal disease in cystinosis. In: Broyer M, ed.: *Cystinosis*. Amsterdam Lausanne New York, Oxford, Paris, Shannon, Tokyo: Elsevier, 1999, p. 36-41.
8. Gretz N, Manz F, Augustin R Barrat TM, Bender-Gotze C, Brandis M, Bremer HJ, Brodehl J, Broyer M, Bulla M, Callis L, Chantler C, Diekmann L, Dillon MJ, Egli F, Ehrich JH, Endres W, Fanconi A, Feldhoff C, Geisert J, Gekle D, Gescholl-Bauer B, Grote K, Gruttner R, Hagge W, Haycock CB, Hennemann H, Klare B, Leupold D, Lohr H, Michalk D, Oliveira A, Ott F, Pistor K, Rau J, Scharer K, Schindera F, Schmidt H, Schulte-Wissermann H, Verrier-Jones K, Weber HP, Willenbockel U, Wolf H
Survival time in cystinosis: a collaborative study. *Proc Eur Dial Transplant Assoc* 1983;19:582-589.
9. Manz F, Gretz N. Progression of chronic renal failure in a historical group of patients with nephropathic cystinosis. *European Collaborative Study on Cystinosis. Pediatr Nephrol* 1994;8:466-471.
10. Gubler MC, Lacoste M, Sich M, Broyer M. The pathology of the kidney in cystinosis. In: Broyer M, ed.: *Cystinosis*. Amsterdam Lausanne New York, Oxford, Paris, Shannon, Tokyo: Elsevier, 1999, p.42-48.
11. Kaiser-Kupfer MI, Caruso RC, Minkler DS, Gahl WA. Long-term ocular manifestations in nephropathic cystinosis. *Arch Ophthalmol* 1986;104:706-711.
12. Tsilou ET, Rubin BI, Reed GF, Iwata F, Gahl W, Kaiser-Kupfer MI. Age-related prevalence of anterior segment complications in patients with infantile nephropathic cystinosis. *Cornea* 2002;21:173-176.
13. Chan AM, Lynch MJ, Bailey JD, Ezrin C, Fraser D. Hypothyroidism in cystinosis. A clinical, endocrinologic and histologic study involving sixteen patients with cystinosis. *Am J Med* 1970;48:678-692.

14. Fivush B, Green OC, Porter CC, Balfe JW, O'Regan S, Gahl WA. Pancreatic endocrine insufficiency in posttransplant cystinosis. *Am J Dis Child* 1987;141:1087-1089.
15. Winkler L, Offner G, Krull F, Brodehl J. Growth and pubertal development in nephropathic cystinosis. *Eur J Pediatr* 1993;152:244-249.
16. Reiss RE, Kuwabara T, Smith ML, Gahl WA. Successful pregnancy despite placental cystine crystals in a woman with nephropathic cystinosis. *N Engl J Med* 1988;31:223-226.
17. Gahl WA, Dalakas MC, Charnas L, Chen KT, Pezeshkpour GH, Kuwabara T, Davis SL, Chesney RW, Fink J, Hutchison HT. Myopathy and cystine storage in muscles in a patient with nephropathic cystinosis. *N Engl J Med* 1988;319:1461-1464.
18. Anikster Y, Lacbawan F, Brantly M, Gochuico BL, Avila NA, Travis W, Gahl WA. Pulmonary dysfunction in adults with nephropathic cystinosis. *Chest* 2001;119:394-401.
19. Broyer M, Tete MJ, Guest G, Bertheleme JP, Labrousse F, Poisson M. Clinical polymorphism of cystinosis encephalopathy. Results of treatment with cysteamine. *J Inherit Metab Dis* 1996;19:65-75.
20. Nichols SL, Press GA, Schneider JA, Trauner DA. Cortical atrophy and cognitive performance in infantile nephropathic cystinosis. *Pediatr Neurol* 1990;6:379-381.
21. Ballantyne AO, Trauner DA. Neurobehavioral consequences of a genetic metabolic disorder: visual processing deficits in infantile nephropathic cystinosis. *Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol* 2000;13:254-263.
22. Williams BL, Schneider JA, Trauner DA. Global intellectual deficits in cystinosis. *Am J Med Genet* 1994;49:83-87.
23. Broyer M, Tete MJ, Gubler MC. Late symptoms in infantile cystinosis. *Pediatr Nephrol* 1987;1:519-24.
24. Hauglustaine D, Corbeel L, van Damme B, Serrus M, Michielsen P. Glomerulonephritis in late-onset cystinosis. Report of two cases and review of the literature. *Clin Nephrol* 1976;6:529-536.
25. Langman CB, Moore ES, Thoene JG, Schneider JA. Renal failure in a sibship with late-onset cystinosis. *J Pediatr* 1985;107:755-756.
26. Anikster Y, Lucero C, Guo J, Huizing M, Shotelersuk V, Bernardini I, McDowell G, Iwata F, Kaiser-Kupfer MI, Jaffe R, Thoene J, Schneider JA, Gahl WA. Ocular nonnephropathic cystinosis: clinical, biochemical, and molecular correlations. *Pediatr Res* 2000;47:17-23.

27. Loirat C; Symptomatic therapy. In: Broyer M, ed.: Cystinosis. Amsterdam Lausanne New York, Oxford, Paris, Shannon, Tokyo: Elsevier, 1999, p 97-102.
28. Trauner DA, Fahmy RF, Mishler DA. Oral motor dysfunction and feeding difficulties in nephropathic cystinosis. *Pediatr Neurol* 2001;24:365-368.
29. Levtchenko E, Wilmer M, Blom H, van den Heuvel L, Monnens L. Enalapril diminishes albumin excretion in patients with cystinosis. *Clinical nephrology*: in press
30. Gahl WA, Tietze F, Butler JD, Schulman JD. Cysteamine depletes cystinotic leucocyte granular fractions of cystine by the mechanism of disulphide interchange. *Biochem J* 1985;228:545-550.
31. Kimonis VE, Troendle J, Rose SR, Yang ML, Markello TC, Gahl WA. Effects of early cysteamine therapy on thyroid function and growth in nephropathic cystinosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:3257-3261.
32. Shiratori K, Shimizu K, Ikeda M, Watanabe S, Hayashi N. Evidence for a significant role of gastrin in cysteamine-induced hypersecretion of gastric acid. *J Clin Gastroenterol* 1997;25:S84-88.
33. Gahl WA, Kuehl EM, Iwata F, Lindblad A, Kaiser-Kupfer MI. Corneal crystals in nephropathic cystinosis: natural history and treatment with cysteamine eye drops. *Mol Genet Metab* 2000;71:100-120.
34. Town M, Jean G, Cherqui S, Attard M, Forestier L, Whitmore SA, Callen DF, Gribouval O, Broyer M, Bates GP, van't Hoff W, Antignac C. A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nat Genet* 1998;18:319-324.
35. Attard M, Jean G, Forestier L, Cherqui S, van't Hoff W, Broyer M, Antignac C, Town M. Severity of phenotype in cystinosis varies with mutations in the CTNS gene: predicted effect on the model of cystinosis. *Hum Mol Genet* 1999;8:2507-2514.
36. Thoene J, Lemons R, Anikster Y, Mullet J, Paelicke K, Lucero C, Gahl W, Schneider J, Shu SG, Campbell HT. Mutations of CTNS causing intermediate cystinosis. *Mol Genet Metab* 1999;67:283-293.
37. Kalatzis V, Cohen-Solal L, Cordier B, Frishberg Y, Kemper M, Nuutinen EM, Legrand E, Cochat P, Antignac C. Identification of 14 novel CTNS mutations and characterization of seven splice site mutations associated with cystinosis. *Hum Mutat* 2002;20:439-446.
38. 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.
39. Phornphutkul C, Anikster Y, Huizing M, Braun P, Brodie C, Chou JY, Gahl WA. The promoter of a lysosomal membrane transporter gene, CTNS, binds Sp-1, shares sequences with the promoter of an

- adjacent gene, CARKL, and causes cystinosis if mutated in a critical region. *Am J Hum Genet* 2001;69:712-721.
40. Cherqui S, Sevin C, Hamard G, Kalatzis V, Sich M, Pequignot MO, Gogat K, Abitbol M, Broyer M, Gubler MC, Antignac C. Intralysosomal cystine accumulation in mice lacking cystinosin, the protein defective in cystinosis. *Mol Cell Biol* 2002;22:7622-7632.
 41. Chergui S, Kalatzis V, Trugnan G, Antignac C. The targeting of cystinosin to the lysosomal membrane requires a tyrosine-based signal and a novel sorting motif. *J Biol Chem* 2001;276:13314-13321.
 42. Kalatzis V, Cherqui S, Antignac C, Gasnier B. Cystinosin, the protein defective in cystinosis, is a H⁺-driven lysosomal cystine transporter. *EMBO J* 2001;20:5940-5949.
 43. Sakarcan A, Timmons C, Baum M. Intracellular distribution of cystine in cystine-loaded proximal tubules. *Pediatr Res* 1994;35:447-450.
 44. Foreman JW, Bowring MA, Lee J, States B, Segal S. Effect of cystine dimethylester on renal solute handling and isolated renal tubule transport in the rat: a new model of the Fanconi syndrome. *Metabolism* 1987;36:1185-1191.
 45. Ben-Nun A, Bashan N, Potashnik R, Cohen-Luria R, Moran A. Cystine loading induces Fanconi's syndrome in rats: in vivo and vesicle studies. *Am J Physiol* 1993;265:F839-44.
 46. Coor C, Salmon RF, Quigley R, Marver D, Baum M. Role of adenosine triphosphate (ATP) and NaK ATPase in the inhibition of proximal tubule transport with intracellular cystine loading. *J Clin Invest* 1991;87:955-961.
 47. Foreman JW, Benson LL, Wellons M, Avner ED, Sweeney W, Nissim I. Metabolic studies of rat renal tubule cells loaded with cystine: the cystine dimethylester model of cystinosis. *J Am Soc Nephrol* 1995;6:269-72.
 48. Racusen LC, Wilson PD, Hartz PA, Fivush BA, Burrow CR. Renal proximal tubular epithelium from patients with nephropathic cystinosis: immortalized cell lines as in vitro model systems. *Kidney Int* 1995;48:536-43.
 49. Laube GF, Stewart VC, Haq MR, Heales SJ, van't Hoff WG. Mitochondrial complex activity in human cystinotic and normal proximal tubular cells (PTC) (abstract). *Pediatr Nephrol* 2002;17:C50.
 50. Park M, Helip-Wooley A, Thoene J. Lysosomal cystine storage augments apoptosis in cultured human fibroblasts and renal tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:2878-2887.

51. Oshima RG, Willis RC, Furlong CE, Schneider JA. Binding assays for amino acids. The utilization of a cystine binding protein from *Escherichia coli* for the determination of acid-soluble cystine in small physiological samples. *J Biol Chem* 1974;249:6033-6039.
52. Kamoun P, C. Vianey-Saban, Aupetit J, Boyer S, Chadefaux-Vkemans B. Measurement of cystine in granulocytes and leukocytes: methodological aspects. In: Broyer M, ed.: *Cystinosis*. Amsterdam Lausanne New York, Oxford, Paris, Shannon, Tokyo: Elsevier, 1999, p 86-92.
53. De Graaf A, Trijbels F, Blom H. New method for determining cystine in leukocytes and fibroblasts. *Clin Chem* 1999;45:2224-2228.
54. Dumoulin R, Mandon G, Zobot MT, Vianey-Saban C, Divry P, Mathieu M. . In: Broyer M, ed.: *Cystinosis*. Amsterdam Lausanne New York, Oxford, Paris, Shannon, Tokyo: Elsevier, 1999, p. 93-96.

Tabel 1.

Intracellulaire cystine gehalte in de granulocyten gemeten met HPLC.

	Cystine gehalte (mediaan, range) nmol cystine/mg eiwit
Gezonde controles (n=8)	0,10 (0,04-0,12)
Obligate heterozygoten (n=15)	0,20 (0,11-0,63)
Onbehandelde patiënten met infantiele cystinose (n=3)	1,47 2,79 4,89

Legenda voor figuren:

Figuur 1.

Elektronmicroscopie van een glomerulus toont een grote multikernige podocyt en een cystine kristal.

Figuur 2.

Disulfide uitwisselingsreactie tussen cystine en cysteamine waarbij vrij cysteine en cysteamine-cysteine disulfide worden gevormd.

Figuur 3.

Cystinosine heeft 7 transmembraan domeinen en 2 zogenaamde lysosomale targeting sequenties. Cirkels geven potentiële glycosyleringsplaatsen aan en driehoeken – potentiële fosforyleringsplaatsen.

Figuur 4.

Cystinosine (1) functioneert als een H⁺ symporter en exporteert cystine en protonen uit het lysosoom. H⁺-ATPase (2) verplaatst protonen naar het lysosoom. Cysteïne wordt geïmporteerd en geëxporteerd door 2 verschillende transporters.