Laboratoriumdiagnostiek van galactosemie

Ben Masure

Supervisor: Prof. Dr. Pieter Vermeersch

Introductie

1. Galactose metabolisme
2. Types van galactosemie
3. Testen voor diagnose
4. Testen voor opvolging
5. Casuïstiek
6. New born screening (NBS)

Geschiedenis

- 1908: eerste gedocumenteerde case report
- 1950: Leloir pathway
- 1956: Eerste genetische mutatie
- 1963: New born screening

Leloir pathway

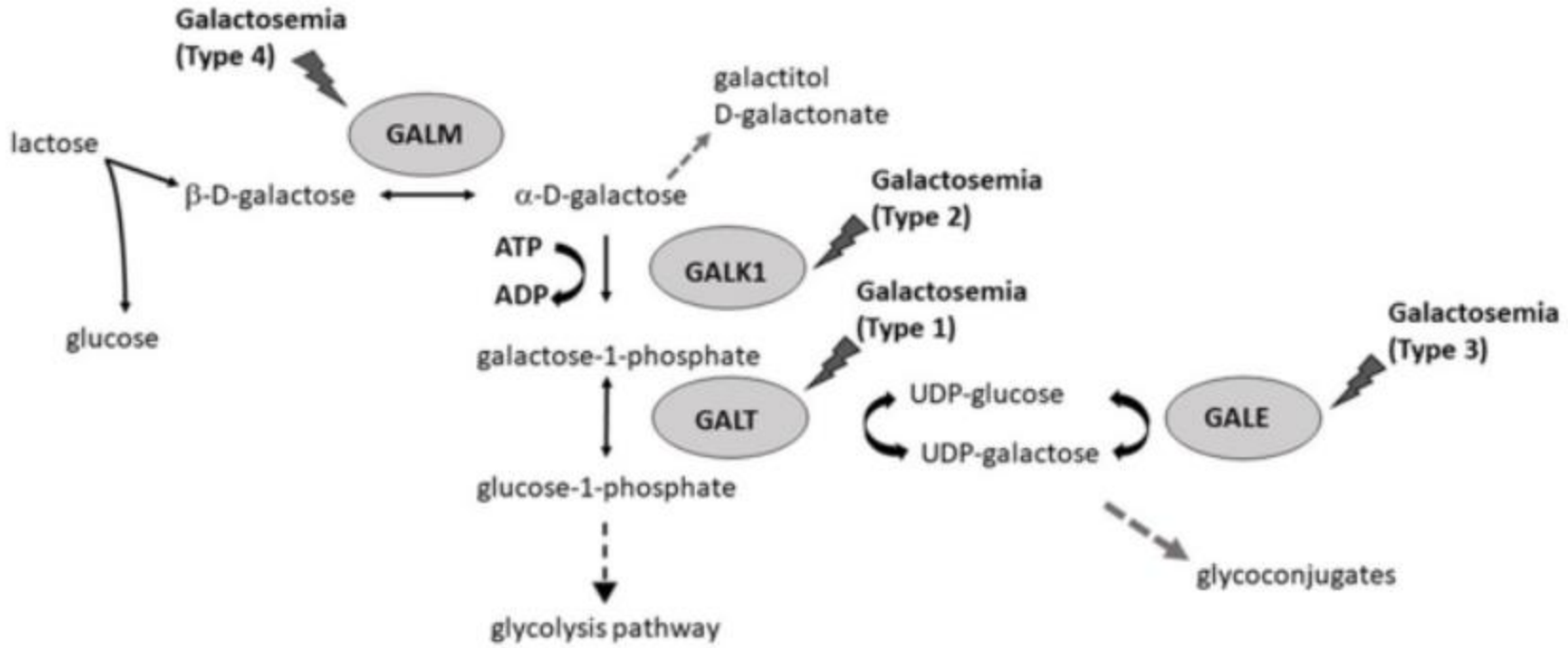


Figure 1. Schematic representation of the Leloir pathway and associated reactions. Several forms of galactosemia can be caused by deficiency of GALM, GALT, GALK1, or GALE.

Succoio et al. 2022

Galactose-1-fosfaat uridyl transferase (GALT) deficiëntie

Type I galactosemie

Klassieke galactosemie

Galactose-1-fosfaat (+UDP-glucose) <-> glucose-1-fosfaat (+ UDP-galactose)

Klinisch:

Acuut

- Icterus
- Braken
- FTT
- Hepatomegalie
- Sepsis

Lange termijn

- Neurologisch: cognitief, executief en taalvaardigheid
- Cataract
- POI

Pasquali et al. (2018)

Duarte variant galactosemie

Ook GALT-enzym deficiëntie

25% residuele activiteit

Klinisch: asymptomatisch

Fridovich-Keil et al. (2014)

Galactokinase (GALK) deficiëntie

Type II galactosemie

α-D-galactose -> galactose-1-fosfaat

Klinisch:

Cataract op jonge leeftijd

Uridine difosfaat galactose-4-epimerase (GALE) deficiency

Type III galactosemie

UDP-galactose -> UDP-glucose

3 varianten: perifere, intermediaire en gegeneraliseerde vorm

Klinisch:

Gegeneraliseerde vorm: gelijkend op klassieke galactosemie

Perifere en intermediaire vorm: asymptomatisch

Rubio-Gozalbo et al. (2021)

Galactomutarotase (GALM) deficiëntie

Type IV galactosemie

β-D-galactose -> α-D-galactose

Klinisch:

Cataract

Wada et al. (2019)

Klinisch scenario

Icterus, hepatomegalie, FTT, sepsis bij neonaat na introductie lactose

GALT en gegeneraliseerde GALE

Cataract

GALK en GALM

Diagnostisch scenario

Enzym assays

-GALT

Metaboliet assays

-reducerende suikers

-galactose-1-fosfaat

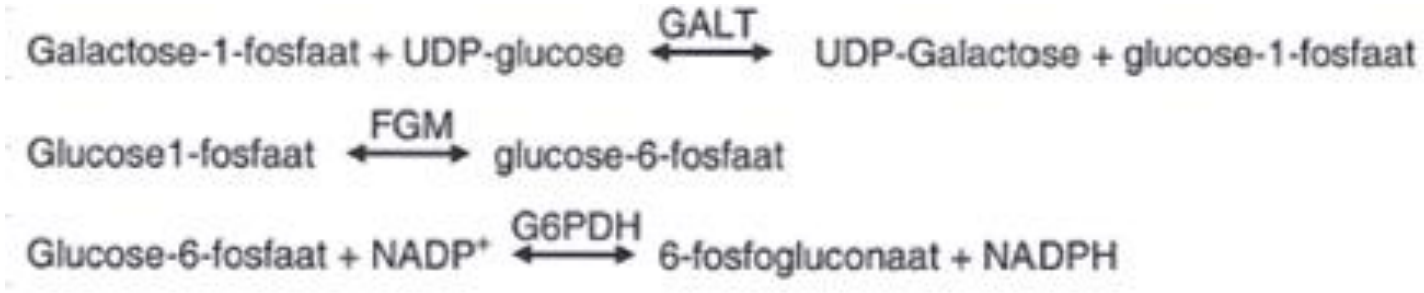
-galactitol

Genetica

Biochemische enzym assays: GALT

Specifiek voor GALT-deficiëntie

Testprincipe:



Metaboliet assays: Benedict’s test en DLC

Benedict’s reagens

- Reducerende suikers -> Cu2+ -> Cu+
- Visueel kleuromslag van blauw naar bruin-oranje

Dunnelaagchromatografie (DLC)

Metaboliet assays: galactose-1-fosfaat

Testprincipe:

1. Galactose-1-phosphate + H_2O $\xrightarrow{\textit{Alkaline phosphatase}}$ galactose + P_i

2. D-Galactose + NAD^+ $\xrightarrow{\textit{Galactose dehydrogenase}}$ D-galactone + NADH + H^+

Galactitol

- GC-MS
- Polyolen (urine)
- Diagnose
- Opvolging

Genetica

- Next generation sequencing (NGS)
- Sanger sequencing

Forms of Galactosemia	Gene	Location	Gene Size	Exons	Variants
Type 1 galactosemia (OMIM 230400)	*GALT*	9p13.3	4.3 kb	11	Ser135Leu Lys285Asn Gln188Arg Asn314Asp del 5.5 kb del 5 kb
Type 2 galactosemia (OMIM 230200)	*GALK1*	17q25.1	7.3 kb	8	Pro28Thr Ala198Val
Type 3 galactosemia (OMIM 230350)	*GALE*	1p36.11	5 kb	13	Val94Met Lys257Arg Gly319Glu
Type 4 galactosemia (OMIM 618881)	*GALM*	2p22.1	68 kb	7	Arg82* Ile99Leufs*46Trp311* Gly142Arg Arg267Gly

Succoio et al. 2022

Opvolging

- Galactose-1-fosfaat
  - GALT en GALE
- Galactitol
  - Vooral GALK (en GALM)

Yuzyuk et al. (2018)

Behandeling

- Dieet: minimaliseren galactose inname
  - Stop borstvoeding -> soja of elementaire kunstvoeding
  - Levenslang geen zuivelproducten
  - Fruit en groenten oké

Succoio et al. (2022)

Casus 1

Jongen 3 weken oud, aterme geboren

Ouders hebben familiale band

RvO: braken van melk, apnee en desaturatie

K: Icterisch

AST 3600 U/L, ALT 1750 U/L, bili 2mg/dL

Casus 1

08-09-2020 17:17 - bloed

Transferrine glycosylatie typering voor CDG (serum)

Besluit capillaire elektroforese	Gemengd patroon (type 1 en 2): Graag controlestaal aangezien leverdysfunctie een type I patroon kan verstoren.

Casus 1: GALE-deficiëntie

Resultaat:
Het DNA van de patiënt werd opgenomen in het CDG panel (zie achtergrond).
De patiënt is homozygoot voor de mutatie c.280G>A (p.Val94Met) in het *GALE* gen. De nomenclatuur van de mutatie is gebaseerd op het transcript NM_000403.3.
De mutatie werd bevestigd met Sanger sequencing.

Bespreking:
De patiënt is homozygoot voor een mutatie in het *GALE* gen (OMIM*606953). Dit gen is geassocieerd met 'Galactose epimerase deficiency' (autosomaal recessief).
Deze mutatie voorspelt een substitutie van een Valine naar een Methionine ter hoogte van codon 94. De mutatie is afwezig in homozygote status in de normale populatiedatabanken, komt wel voor in de mutatiedatabanken en werd eerder vermeld in de literatuur [Wohlers et al. (1999) Am J Hum Genet 64: 462]. Op basis van deze data wordt deze mutatie als pathogeen (klasse 5) geclassificeerd.

Conclusie:
Moleculair onderzoek toont aan dat de patiënt homozygoot is voor een mutatie in het *GALE* gen. De klinische diagnose kon dus moleculair verklaard worden. Om de recessieve aard van de aandoening te bevestigen is dragerschapsbepaling bij de ouders aangewezen. Hiervoor ontvangen wij graag bloed op EDTA.
De betekenis van dit resultaat kan besproken worden op een genetische raadpleging.

Casus 1

Transferrine glycosylatie typering voor CDG (serum)

Besluit capillaire elektroforese

Opvolging galactose epimerase dficiëntie.

5-sialo-Tf: 3.5%

4-sialo-Tf: 51.0%

3-sialo-Tf: 9.6%

2-sialo-Tf: 27.7%

1-sialo-Tf: 1.3%

asialo-Tf: 6.9%

Galactose-1-fosfaat (RBC)

1200,0 nmol/mL RBC (ref. waarden < 0.10 nmol/mL RBC)

Therapeutisch doel klassieke galactosemie: < 150 nmol/mL RBC

Uitgevoerd door UCL Saint-Luc

POLYOLEN

Dit is een semi-kwantitatieve bepaling:

Erythritol	39	mmol/mol creat.	89 - 158
Threitol	10	mmol/mol creat.	24 - 79
Ribitol	6	mmol/mol creat.	10 - 17
Arabitol	20	mmol/mol creat.	51 - 99
Xylitol	4	mmol/mol creat.	5 - 11
Galactitol	710	mmol/mol creat.	10 - 63
Mannitol	11	mmol/mol creat.	0 - 17
Sorbitol	50	mmol/mol creat.	2 - 13

Conclusie:

Opvolging.

Creatinine (urinestaal)	6.2	mg/dL

KU LEUVEN

Casus 1

POLYOLEN

Dit is een semi-kwantitatieve bepaling:

Erythritol	108	mmol/mol creat.	89 - 158
Threitol	15	mmol/mol creat.	24 - 79
Ribitol	20	mmol/mol creat.	10 - 17
Arabitol	51	mmol/mol creat.	51 - 99
Xylitol	1914	mmol/mol creat.	5 - 11
Galactitol	39	mmol/mol creat.	10 - 63
Mannitol	19	mmol/mol creat.	0 - 17
Sorbitol	135	mmol/mol creat.	2 - 13

Casus 1

Conclusie:

Opvolging.

Creatinine (urinestaal) 19.0 mg/dL

Transferrine glycosylatie typering voor CDG (serum)

Besluit capillaire elektroforese — Binnen normale grenzen. Dit sluit een aangeboren stoornis van de glycosylatie (CDG) niet uit.

Galactose-1-fosfaat (RBC)

15.0 nmol/mL RBC ref. waarden < 10.0 nmol/mL RBC

therapeutisch doel klassieke galactosemie: < 150 nmol/mL RBC

Casus 2

Jongen, 2 weken oud

PML 33 weken en 6 dagen

RvO: slechte circulatie, hypotonie en vaststellen corsouffle.

Bij opname vaststelling neonatale cholestase en leverfalen.

Galactose-1-P-Uridyl transferase (RBC)	C	1.7	µmol/h g Hb	15.4 - 32.2
Resultaat na verlengde incubatie.				
Correctie werd niet telefonisch doorgegeven:Correctie werd niet doorgebeld in opdracht van klinisch bioloog				
Galactose-1-P (RBC)		> 2000	µmol/L RBC	≤ 35

Casus 2: klassieke galactosemie

Opvolging 1 week

Galactose-1-P (RBC)	462	µmol/L RBC	≤ 35
Analyse uitgevoerd op EDTA ipv LiHep.			

Opvolging 3 maanden

Galactose-1-P (RBC)	283	µmol/L RBC	≤ 35
POLYOLEN			
Dit is een semi-kwantitatieve bepaling:			
Erythritol	109	mmol/mol creat.	89 - 158
Threitol	18	mmol/mol creat.	24 - 79
Ribitol	14	mmol/mol creat.	10 - 17
Arabitol	75	mmol/mol creat.	51 - 99
Xylitol	48	mmol/mol creat.	5 - 11
Galactitol	368	mmol/mol creat.	10 - 63
Mannitol	15	mmol/mol creat.	0 - 17
Sorbitol	159	mmol/mol creat.	2 - 13
Conclusie:			
Opvolging galactose-1-P uridyl transferrase (GALT) deficiëntie.			
Creatinine bij Polyolen (urinestaal)	9.0	mg/dL	

Casus 3

Meisje, 2 jaar oud

MVG: Normale zwangerschap en bevalling, goede gezondheid

RvC: Linker oog esotropie opgemerkt.

Cataract

Casus 3

POLYOLEN

Dit is een semi-kwantitatieve bepaling:

Erythritol		65	mmol/mol creat.	55 - 105
Threitol		37	mmol/mol creat.	12 - 71
Ribitol		11	mmol/mol creat.	8 - 11
Arabitol		41	mmol/mol creat.	32 - 78
Xylitol		10	mmol/mol creat.	5 - 49
Galactitol		731	mmol/mol creat.	3 - 17
Mannitol		19	mmol/mol creat.	7 - 48
Sorbitol		52	mmol/mol creat.	4 - 12

Conclusie:

Gestegen galactitol: beeld passend bij een galactosemie.

Creatinine bij Polyolen (urinestaal)		69.7	mg/dL	
Galactose-1-P-Uridyl transferase (RBC)		37.4	µmol/h g Hb	≥ 15.4
Galactose-1-P (RBC)	C	12	µmol/L RBC	≤ 35

Sterk gestegen galactose (718 µmol/L) met normaal galactose-1-P in rode bloedcellen, biochemisch passend bij galactokinase of galactose mutarotase deficiëntie.

New born screening

- Fluorometrische Beutler-gebaseerde methoden om GALT activiteit in DBS te meten
- Totaal galactose
- Betere outcome, maar nog steeds lange termijnscomplicaties

Yuzyuk et al. (2018)

Referenties

Succoio M, Sacchettini R, Rossi A, Parenti G, Ruoppolo M. Galactosemia: Biochemistry, Molecular Genetics, Newborn Screening, and Treatment. Biomolecules. 2022 Jul 11;12(7):968. doi: 10.3390/biom12070968. PMID: 35883524; PMCID: PMC9313126.

Pasquali M, Yu C, Coffee B. Laboratory diagnosis of galactosemia: a technical standard and guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). Genet Med. 2018 Jan;20(1):3-11. doi: 10.1038/gim.2017.172. Epub 2017 Oct 26. PMID: 29261178.

Fridovich-Keil JL, Gambello MJ, Singh RH, Sharer JD. Duarte Variant Galactosemia. 2014 Dec 4 [updated 2020 Jun 25]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Amemiya A, editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2025. PMID: 25473725.

Rubio-Gozalbo ME, Derks B, Das AM, Meyer U, Möslinger D, Couce ML, Empain A, Ficicioglu C, Juliá Palacios N, De Los Santos De Pelegrin MM, Rivera IA, Scholl-Bürgi S, Bosch AM, Cassiman D, Demirbas D, Gautschi M, Knerr I, Labrune P, Skouma A, Verloo P, Wortmann SB, Treacy EP, Timson DJ, Berry GT. Galactokinase deficiency: lessons from the GalNet registry. Genet Med. 2021 Jan;23(1):202-210. doi: 10.1038/s41436-020-00942-9. Epub 2020 Aug 18. PMID: 32807972; PMCID: PMC7790741.

Wada Y, Kikuchi A, Arai-Ichinoi N, Sakamoto O, Takezawa Y, Iwasawa S, Niihori T, Nyuzuki H, Nakajima Y, Ogawa E, Ishige M, Hirai H, Sasai H, Fujiki R, Shirota M, Funayama R, Yamamoto M, Ito T, Ohara O, Nakayama K, Aoki Y, Koshiba S, Fukao T, Kure S. Biallelic GALM pathogenic variants cause a novel type of galactosemia. Genet Med. 2019 Jun;21(6):1286-1294. doi: 10.1038/s41436-018-0340-x. Epub 2018 Oct 19. Erratum in: Genet Med. 2020 Jul;22(7):1281. doi: 10.1038/s41436-020-0836-z. PMID: 30451973.

Yuzyuk T, Viau K, Andrews A, Pasquali M, Longo N. Biochemical changes and clinical outcomes in 34 patients with classic galactosemia. J Inherit Metab Dis. 2018 Mar;41(2):197-208. doi: 10.1007/s10545-018-0136-9. Epub 2018 Jan 19. PMID: 29350350.

UZ LEUVEN