

Robert Phair, PhD | Metabolische valstrikken. Een nieuwe manier om over ME/CVS na te denken.

<https://youtu.be/uej1LXzRbnY>

Onze volgende spreker: Rob Phair, hier bij ons, komt van Integrative Bioinformatics nv, een lokaal bedrijf. Hij is bij ons aan het werk, uit een soort van interesse en goedheid van zijn hart, gedurende een paar jaar. Hij zal ons een theorie voor ME/CVS voorstellen, die velen onder jullie, gezien de vragen die kwamen zelfs vóór aanvang van het symposium, al kennen en we zien er naar uit het laatste nieuws daarover te horen. Rob kwam ongeveer drie jaar geleden naar ons en zei dat hij iets gelezen had in de Stanford Medical Magazine over CVS en dat hij ons wou proberen te helpen. Hij begon een bedrijfje, Integrative Bioinformatics, hier ter plaatse en hij zei dat hij iedere week een dag van zijn tijd wou schenken. Hij begon dus een dag per week te komen, hij raakte betrokken, leerde hoe sequentieanalyse te doen en dat soort dingen die hij nooit eerder had gedaan maar hij was heel erg bereid om dat allemaal te doen. Robert is ook een nerd, dat is geen belediging maar een compliment, van MIT, een ingenieur, en dan ging hij menselijke fysiologie leren en hij kent beide dus echt goed. Zijn bedoeling was om voorspellingen te kunnen doen en data te integreren op de wijze van een systeemingenieur. Dat was niet heel populair bij NIH en de reviewcomités. Hij zat aan John Hopkins en besloot er weg te gaan en zijn eigen bedrijf op te zetten en het als consultant te doen. Dat is heel goed gelukt en ik ben blij dat je dat gedaan hebt. Dit was hoe dan ook een perfect probleem voor hem en hij kwam zeggen dat hij wou helpen en ik zei: "Lieve hemel, een systeemingenieur die menselijke fysiologie kent, dat is echt wat ik wil, omdat volgens mij daar het antwoord ligt. Maar er zijn er haast geen want NIH wil ze niet financieren en dus was het fantastisch dat hij hier kwam en ik hield echt van het idee. Hij zal toegeven dat we niet weten of het correct is of niet, maar we zijn het aan het testen en hij zal je vertellen over de resultaten van die testen. Bedankt Ron. Goed. Ik zou willen vragen hoeveel van jullie het boek van David Bell gelezen hebben. Het heet: "Doktersgids voor CVS". Wel, dat is een goed aantal handen. Dit is het beste boek over het onderwerp, het is gepubliceerd in 1994. Ik zou willen dat er een bijlage bij dit boek was, om te behandelen wat sedertdien is gebeurd. Deze bijlage wordt geschreven door de wetenschappers op deze bijeenkomst. Ik heb veel van die mensen geleerd en ben blij hier te zijn. Het chronisch

vermoeidheidssyndroom is een complexe ziekte. Het menselijk lichaam is een non-lineair systeem. David Bell zegt in dit boek dat, als je CVS wil behandelen, je de symptomen moet kennen en je fysiologie en je farmacologie. Maar, als je CVS wil genezen, dan moet je de onderliggende mechanische basis kennen. Waarover ik vandaag wil vertellen, is een nieuwe manier van denken over CVS, die mij althans geholpen heeft vele stukjes samen te leggen om te zien hoe de verschillende symptomen en metingen een samenhangend verhaal vertellen. Om dat te doen, ga ik vertellen over deze drie thema's: genomica, biochemie en non-lineaire systeemtheorie. Misschien zeg je nu: wat hebben non-lineaire systemen te maken met biologie. Die vraag wordt me al gedurende heel mijn carrière gesteld, zoals Ron ook aangaf. Het is lastig om biologen te doen nadenken over wiskunde, het is eigenlijk ook lastig om wiskundigen te doen nadenken over biologie. Maar 45 jaar geleden nam ik een beslissing die mijn vader me nooit heeft vergeven. Die beslissing was dat ik mijn pas gedrukte MIT-diploma als electronica-ingenieur nam en vertrok om een doctoraat in de fysiologie te behalen. Hij vond dit een verschrikkelijk idee. Hij is ingenieur, mijn broer is ingenieur, zijn vader was ingenieur en ik ben ook verondersteld ingenieur te zijn. Dus wil ik je overtuigen dat non-lineaire systeemanalyse niet alleen thuis hoort bij de studie van biologische problemen maar dat het ook echt sommige zaken over CVS kan verklaren, die onverklaarbaar bleven. Laten we beginnen waar ik begon. Ik begon met het boek van David Bell en met Oslers Web, het boek van Hillary Johnson. Er stonden in die boeken veel verhalen over CVS epidemieën. Het bestaan van deze epidemieën is voor mij een belangrijk kenmerk van de ziekte. Dat je betrokkenheidspercentages hebt - d.w.z. het aantal mensen dat blootgesteld is aan wat het ook was - wel 10 of 25 %, zoals de slide aangeeft, vertelt me dat het mogelijk is dat een voorbeschikkende mutatie veel voorkomt. Toen ik terecht kwam in het Stanford Genome Technology Center en met Ron begon te praten, was het net rond de tijd dat de Big Data-studie, gefinancierd door het OMF en uitgevoerd aan Stanford, zijn vruchten begon af te werpen. En zo had ik plots toegang tot genoom-sequenties van 20 zwaar zieke CVS-patiënten. Dus begon ik te zoeken, niet naar zeldzame maar naar veelvoorkomende mutaties, vanwege dat kenmerk over de aanwezigheid van epidemieën, zoals die in Incline Village en die in Lyndonville, New York. Ik was vooral geïnteresseerd in gevallen van mutaties waar de mutatie iets kon te weeg brengen of onthullen dat bi-stabiliteit wordt genoemd. Ik ga het vandaag specifiek hebben over één dergelijke mutatie of set van mutaties maar eerst moet ik voor jullie definiëren of illustreren wat bi-stabiliteit is.

Hier is een schema. Dit schema komt uit een wiskundige studie in de Journal of Physical Chemistry en het beschrijft wat gekend is als een bi-stabiliteit in een non-lineair systeem. Het wil zeggen dat dit systeem - het kan het menselijk lichaam zijn, iedereen moet weten dat het menselijk lichaam een ongelooflijk non-lineair systeem is - een non-lineair systeem kan twee verschillende stabiele toestanden hebben. Een ervan, ik zal gewoon als voorbeeld gebruiken die bovenaan naast de letter A in het schema, is een volle lijn, die alle stabiele toestanden voorstelt die gezonde, stabiele toestanden zijn. De volle lijn onderaan, de gebogen lijn, stelt een geheel van ongezonde, stabiele toestanden voor. De punten, aangeduid met wiskundige striktheid, λ_1 en λ_2 , worden de limietpunten genoemd. De hypothese die ik wil testen hier, is dat CVS een botsing voorstelt met een van die limietpunten. Als je in de gezonde, stabiele toestand ben, links bovenaan dus, - ik denk dat ik een manier heb om dat aan te wijzen - , precies hier op dat punt, val je van de curve van de gezonde, stabiele toestanden en beland je beneden in die onderste, ongezonde, zieke, stabiele toestand. De assen van deze grafiek zijn niet heel duidelijk: horizontaal zijn systeemparameters, vertikaal zijn systeemvariabelen. Ze stellen kenmerken voor van het biologisch systeem dat we bestuderen. Die aanwezigheid van twee stabiele toestanden is waarnaar we zoeken in die genomesequenties, want we willen iets zien, een boodschap naar ons in het genoom dat ons vertelt dat bi-stabiliteit mogelijk is. Wat was de eerste, dergelijke genommutatie die we vonden? Dat is hier. In CVS, bij die twintig zwaar zieke patiënten, vonden we meerdere mutaties in een gen, IDO2 genoemd. Ik vertel je meteen wat IDO2 is, maar je kan hier zien dat er in de blauwe, horizontale balk, aminozuren (bouwstenen van eiwitten) staan, symbolen gevolgd door een nummer, gevolgd door nog een aminozuur-symbool. Dit zijn voorstellingen van mutaties. Bijvoorbeeld in de eerste kolom: een arginine (R), omgezet in tryptophan (W) in het 248-ste aminozuur van dit eiwit, en deze mutatie breekt het eiwit. Het eiwit werkt niet met deze mutatie, toch komt deze mutatie vaak voor. Als je kijkt op de rij met de SIPS CFS AF (allele frequentie), die zegt dat onze 20 patiënten die in 55% van de tijd hebben. En het 1000 Genomes Project, een van de standaard referentiegenomen, heeft het 42% van de tijd, dus is het een veel voorkomende mutatie. 42% van de mensen in de zaal, misschien zelfs meer, gezien we CVS bestuderen, hebben deze mutatie. Het is statistisch significant, op het niveau 0,03, niet op het niveau van 10 tot de 9-de macht dus ik kan niet zeggen dat het perfect is, en beweer ook niet dat het dat is. Wat verrassend is, is dat ook patiënten die niet die veel voorkomende mutatie hebben, een

andere, of 2 of 3 andere mutaties hebben voor dat zelfde eiwit IDO2. Hoewel ik niet weet of die allemaal biologisch gebroken zijn, weet ik wel dat alle voorspellingssoftwaretools - een ervan, SIFT, heb ik hier vermeld - die pogen te zeggen op basis van de sequentie of die al dan niet gebroken is, voorspellen dat ze allemaal gebroken zijn. Zelfs die in het midden hier, is een prematuur stopcodon, dat wordt een onzinmutatie genoemd, het maakt zelfs niet het volledige eiwit aan. Deze mutaties gaven dus een hint over wat er aan de hand was bij die zwaar zieke patiënten, die ik wil opvolgen. Ok, dus nu: wat is IDO2? IDO2 is het eerste enzyme in een reactie- pad, gekend als het kynureninereactiepad. Dit is de belangrijke afbraakroute voor een aminozuur genoemd tryptofaan. Dit is het minst frequente aminozuur in je eiwitten. Tryptofaan is een essentieel aminozuur, d.w.z. dat je het niet zelf kan aanmaken. Het is enkel beschikbaar in het dieet van organismen die het zelf kunnen maken. Tryptofaan heeft twee bestemmingen, waar we het over gaan hebben. Er zijn nog andere, kleinere bestemmingen, maar grote zijn het kynureninereactiepad, dat van oost naar west gaat in dit schema. Oost naar west (rechts naar links) en er zijn twee enzymes die de eerste reactie katalyseren: het IDO2-enzyme, waarover ik het net had met zijn mutaties, en IDO1, wat exact hetzelfde doet. Dus kan je zeggen: wat maakt het uit, dit zei ik tegen mezelf, wat maakt het uit dat IDO2 gebroken is, als IDO1 goed werkt en hetzelfde doet. Het kostte me weken, maanden misschien, om dit uit te vissen. Ik weet niet of ik het uitgevist heb, maar ik heb een manier waarop het kan werken. Om het systeem volledig te maken, er is een reactiepad dat van noord naar zuid gaat hier, wat ook belangrijk is voor de bestemming van tryptofaan en dat is de productie van serotonine, een molecule waar allen wellicht van gehoord hebben, ze is betrokken bij slaapregulering en veel andere zaken, zoals de controle van het immuunsysteem. Wat kan het dus zijn met het IDO-systeem dat belang heeft, aangezien IDO1 goed werkt en enkel IDO2 gebroken is. Het antwoord kwam van de enzymkinetiek. Dit is een van de meer ingewikkelde slides die ik heb, maar ik heb geleerd dat de CVS-patiënten- gemeenschap meer studies gelezen heeft over CVS dan ik, dus ben ik niet bang dat deze slides je petje te boven gaan. Ik ben bang dat je een vraag gaat stellen waarop ik niet kan antwoorden. Links is een grafiek van tryptofaan, de molecule die het substraat is voor dit enzym. De molecule die omgezet wordt in andere molecules. Op de verticale as is de flux door dit enzym, d.w.z. hoeveel molecules omgezet worden in een product per tijdseenheid, misschien 1000 molecules per seconde, zoiets. Op de horizontale as is de concentratie tryptofaan die in die reactie gaat, en je ziet voor IDO2, diegene die stuk is, IDO2

heeft de klassieke vorm. Dit is een Michaelis-Mentenvergelijking, genoemd naar de twee vrouwen die dit kenmerk van enzymen ontdekten in de jaren 1800, en het heeft de juiste vorm voor bijna alle enzymen. Maar IDO1 heeft niet dezelfde vorm, het verzadigt niet hierboven met een maximale reactiesnelheid, maar het gaat daarentegen over een top en komt daarna weer naar beneden. Dus bij heel hoge tryptofaanconcentraties is er veel minder flux dan ervoor, veel minder productie van kynurenine. In plaats dat de som van de totale flux iets als een Michaelis-Mentenvergelijking is, als je geen IDO2 hebt, lijkt het op wat je rechts hebt. Rechts zegt dat IDO2 in feite een backupsysteem is. Het werkt bij heel hoge concentraties tryptofaan, om een flux te behouden, doorheen het kynureninereactiepad, in de aanwezigheid van een heel hoge tryptofaanconcentratie. Nu zie je dus wat er verkeerd kan gaan. IDO2 werkt niet, het is stuk. Er is nu een veel lagere flux en zodra je over deze top gaat, zodra je, op een of andere manier, ik denk dat dit gebeurt bij de initiële stressor, die je tegenkwam die je in de CVS-ziekte duwde, je werd over deze top geduwd. Eens over de top ben je in de problemen, want telkens je nu de concentratie tryptofaan verhoogt, gaat de flux door het enzym naar beneden. En telkens de flux door het enzym naar beneden gaat, gaat de tryptofaanconcentratie omhoog, en telkens de tryptofaanconcentratie omhoog gaat, gaat de flux door het enzym naar beneden, en zo verder. Je wordt helemaal beneden de curve geduwd. Je zit vast aan de andere kant van deze top en bijgevolg zit je vast in wat ik de IDO-metabolische valstrik noem. De belangrijkste punten tot zover. Zwaar zieke CVS-patiënten hebben gemiddeld 1,7 gebroken kopieën van IDO2. Er zijn maar twee mogelijkheden. 1,7 is een hoog aantal vergeleken met 2, en zonder IDO2 als backup, opent een blokkering van IDO1 door zijn eigen substraat, bij hoge tryptofaanconcentraties, de deur naar een pathologische stabiele toestand. Dit is een voorbeeld van een bi-stabiliteit en van non-lineaire systemen, waar ik het bij het begin over had. Het volgende wat we deden, was tonen dat dit niet een kunstgreep zonder bewijs was. Ik stond daar, ik had het over de top gaan in de IDO1-kromme. Dat klinkt heel fijn maar we bouwden een wiskundig model. Dit is namelijk het deel van het project dat ik doe voor de kost, dus ik ben er blij mee. Dat is een model van het systeem dat ik tekende, het reactiepad van tryptofaan door kynurenine, en het reactiepad van tryptofaan naar serotonine. Wat het model toont, is dat een heel grote aangroei van tryptofaanconcentratie, artificieel aangemaakt in het model voor enkel 10 dagen, een verandering veroorzaakt in tryptofaan, zoals je kan raden, binnenin de cel. Als je die hoge tryptofaan in de ruimte tussen de cellen wegneemt, dan wordt ze weer normaal,

maar het kost 30 weken, een half jaar. Als je dat langer doet, als je hoge tryptofaan hebt gedurende, ik denk dat deze 8 weken is, dus twee maand aan stressoren, dan keer je nooit meer terug, zelfs als je de stressor wegneemt. Ik kan die tryptofaan terug wegnemen waar het de controle had en alles in de cel blijft waar het was. Dit is een zeer hoog niveau van tryptofaan, een zeer laag niveau van kynurenine het product stroomafwaarts, en dit is de flux door dat reactiepad, het IDO1-reactiepad, heel afgezwakt. Het model is dus consistent met het idee, het is niet enkel een plezier om te zien, het over die top gaan gebeurt ook echt in theorie, dus nu kan dit model voorspellingen doen, die we kunnen testen. Ik, een theoreticus, zou die zaken niet zelf kunnen testen. Ik deed veel experimenten bij John Hopkins maar dat was lang geleden en bovendien zijn deze experimenten veel moeilijker dan diegene die ik gewoon was, dus betekende dit dat ik een team nodig had. Het was een geluk dat OMF, toen ze dit financierden, ook een beurs voor Rons team financierden. Dus maakten Julie Wilhelmy, Curt Fischer en Sundari Suresh het mogelijk de metingen te doen die ik jullie zal laten zien. Curt Fischer is een expert in massaspectrometrie en Julie Wilhelmy heeft de beste experiment- handen waar ik ooit het genoeg had mee samen te werken, zij is de beste die ik ooit in het lab heb gezien. Dit team wou dus deze voorspellingen uit-testen: in cellen die zijn aangetast zal tryptofaan verhoogd zijn. Dit is het niveau van tryptofaan binnen in de cellen, dus niet buiten, maar binnen de cellen. Cellulair kynurenine en de ratio kynurenine / tryptofaan zal verlaagd zijn, dat is een andere voorspelling, en tenslotte zal de flux, gekatalyseerd door IDO, verminderd zijn bij CVS. We zijn daarmee begonnen. We zijn hier nog maar acht maand mee bezig, dit is dus n=6 patiënten. Wat we op deze twee grafieken hebben, is de kynurenineconcentratie in mol/cel. De rode datapunten zijn gezonde controles, de blauwe vierkantjes zijn CVS-patiënten. Je kan zien dat kynurenine, zoals voorspeld, substantieel lager is dan in de gezonde controles. Tijd gelijk aan nul hier, is wanneer we een metabolische tracer toevoegden, dat had ik moeten vermelden bij het ontwerp. Tracers worden hier gebruikt om de flux te volgen, zo zal ik je in de volgende twee slides laten zien waar de tracer komt. Maar dat is wat eigenlijk op de horizontale as uitgezet is, de tijd na toevoeging van de tracer. Op de rechterkant kan je zien dat de tryptofaan in de cellen ook hoog is bij de CVS-patiënten, zoals voorspeld. Dat is niet statistisch significant, ik hoop van wel eens we komen tot een n (aantal stalen), veel groter dan 6. De laatste, de verhouding kynurenine over tryptofaan, die is verlaagd, zoals voorspeld. Dit is heel significant bij n=6 patiënten. Dit is dus allemaal consistent met de theorie. We maten ook de

flux, waar ik het over had, door gebruik te maken van de carbon-13 gemarkeerde tryptofaan. Je kan zien dat de blauwe curve hier voor CVS, opnieuw veel lager is, vergeleken bij de productie van kynurenine bij gezonde controles. Dan de belangrijke punten voor elk van de drie thema's die ik behandelde. Er zijn op zijn minst voorbeschikkende mutaties die veel voorkomen. We hebben gegevens van een bepaalde set van mutaties in IDO2 in de biochemie, de blauwe cirkel van mijn Venndiagram, er zijn de reactiepaden van tryptofaan naar kyneurine en naar serotonine. Ik liet ze je zien en dan toonde ik je de substraatremming, een bepaald kenmerk van IDO1, wat het relevant maakt voor onze bistabiliteit, dat karakteristiek zou kunnen zijn voor het chronischevermoeidheidssyndroom. Daarna deden we de simulatie om te tonen dat het in theorie werkt en dat enkele van de voorspellingen van het model door experiment zijn bevestigd. Dit is belangrijk voor CVS, want metabolische valstrikken verklaren ME/CVS als een sprong, van een fysiologisch stabiele toestand naar een pathologische. Deze sprong wordt mogelijk gemaakt door voorbeschikkende, alledaagse mutaties. Hij wordt in gang gezet door een relatief onwaarschijnlijke combinatie van triggers. Het zijn niet altijd dezelfde triggers, om het even welke trigger die je in de bi-stabiele toestand krijgt, de lage toestand van je bi-stabiliteit en die uiteindelijk onderhouden wordt, niet door iets dat acuut gebroken is, maar door een biologisch defect, dat de evolutie nog niet heeft opgelost. De idee van een metabosche valstrik is één voorbeeld van die bi-stabiliteit. Hij krijgt steun van genoom- en computersimulaties en maakt voorspellingen die experimenteel bevestigd zijn. Ik wil gewoon even stilstaan bij de vraag waarom dit voor jou belang kan hebben. Dit is een schema van de hersenen in dwarsdoorsnede en in het paars zie je zes kernen, de nuclei raphes genoemd. Dit zijn de neuronen van het serotonerge zenuwstelsel in de hersenen en die neuronen kunnen een uitgebreid aantal gebieden van het brein besturen die relevant zijn voor CVS. Ik word weggeleid van het podium, laat me nog zeggen dat cognitieve functie, beweging, reuk, dysautonomie en motorische neuronen, het dopaminesysteem, alle soorten hoofdpijn, happen naar lucht, POTS, parasymphatische problemen en pijn, dat alles komt voort uit dit serotonerge zenuwstelsel in de hersenen. Ik denk dat het relevant is voor de ziekte. Hoe gaat het nu verder? We gaan intensief de valstrik verder volgen. We gaan samenwerkingen opzetten, ik moet zeggen dat er deze week wellicht 4 nieuwe samenwerkingen rond de valstrik opgedoken zijn uit onze wetenschappelijke discussies. We gaan therapieën ontwerpen en testen gebaseerd op de valstrik en zien of we ze kunnen doen werken. Als,

een grote als, CVS veroorzaakt wordt door een metabolische valstrik, dan is het onze taak de patiënt uit de zieke stabiele toestand te krijgen, terug omhoog doorheen het limietpunt naar het domein van de gezonde, stabiele toestand. Dank u.