

43. Charlwood J, Clayton P, Keir G, Mian N, Young E, Winchester B. Prenatal diagnosis of the carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type Ia (CDGIA) by a combination of enzymology and genetic linkage analysis after amniocentesis or chorionic villus sampling. *Pren Diagn* 1998; 18: 693-699.

Summary

Congenital defects in glycosylation: the CDG syndrome. Wevers RA, Grünwald S, Huijben K, Smeitink JAM and De Rijk-van Andel JF. Ned Tijdschr Klin Chem 2000; 25: 4-13.

The CDG syndrome is a group of inherited diseases in N-glycosylation of proteins. To date seven CDG types have been described. From four of these the molecular defect is known. Patients generally have a multi-system disease with an onset in early childhood. Often the nervous system is affected. The

clinical signs among the various clinical types are rather variable. Therefore a broad biochemical screening for CDG among patients with multi-system disease and among neurological patients is advocated. Transferrin isoelectric focusing in plasma is the cornerstone of the biochemical screening. In several CDG types enzymatic assays and molecular genetic techniques are available to confirm the specific diagnosis. Techniques are described that can be used to confirm a generalized defect in protein N-glycosylation. Also the diagnostic pitfalls in these techniques are discussed. Especially in case of unexplained abnormal glycoproteins results (for example clotting factors and thyroid parameters) the clinical chemist should consider the diagnosis CDG syndrome.

Keywords: alcohol abuse; CDG syndrome; protein glycosylation; metabolic disease; multisystem disease; glycoprotein biosynthesis; screening; transferrin isoforms.

Ned Tijdschr Klin Chem 2000; 25: 13-27

Diagnostiek van lysosomale stapelingsziekten

J.G.N. de JONG, R.A WEVERS, C.J.M. van den BERG, M.L.F. LIEBRAND-van SAMBEEK, A.A.E.T. van RENS en H.G.M. ROELOFS

Aan de meeste lysosomale stapelingsziekten ligt een deficiëntie van één van de lysosomale enzymen betrokken bij de afbraak van macromoleculen tot de monomoleculaire componenten ten grondslag. De drie belangrijkste groepen, ingedeeld op basis van het belangrijkste stapelingsproduct, zijn de sfingolipidosen, oligosaccharidosen en mucopolysaccharidosen. Mucolipidose II en III worden veroorzaakt door een defect in de processing van een aantal lysosomale enzymen, waardoor meer enzymen tegelijkertijd deficiënt zijn. Ook defecten in het transport over de lysosomale membraan, zoals van neuraminezuur, worden tot de lysosomopathieën gerekend. Van enkele neuronale ceroid lipofuscinosen is nu aangetoond, dat het lysosomale stapelingsziekten zijn. De kliniek van de lysosomopathieën is heterogeen, met als belangrijkste kenmerken, knik in de psychische en/of motore ontwikkeling en hepato- en/of splenomegalie. Screening in urine is mogelijk voor een tiental oligosaccharidosen door analyse van oligosacchariden en voor de groep van de mucopolysaccharidosen door meting van het glycosaminoglycaangehalte in de urine. Een defect in het transport van neuraminezuur resulteert in een verhoogde uitscheiding van deze suiker in de urine. Bij een afwijkend patroon van oligosacchariden of een verhoogde uitscheiding van glycosamino-

glycanen worden de betreffende enzymen in leukocyten, geïsoleerd uit een bloedmonster, gemeten om het defect te bevestigen of uit te sluiten. Voor het grootste deel van de sfingolipidosen en voor de neuronale ceroid lipofuscinosen is geen voorscreening mogelijk. De sfingolipidosen en nu ook enkele neuronale ceroid lipofuscinosen kunnen worden bevestigd of uitgesloten door directe meting van de diverse enzymen in leukocyten en/of fibroblasten.

Trefwoorden: lysosomale ziekten; sfingolipidosen; oligosaccharidosen; mucopolysaccharidosen; neuronale ceroid lipofuscinosen; sfingolipiden; oligosacchariden; glycosaminoglycanen; screening; urine; lysosomale enzymen

Het lysosoom als celorganel is voor het eerst beschreven door de De Duve. Het is betrokken bij de afbraak van diverse cellulaire macromoleculen zoals lipiden, glycoproteïnen en glycosaminoglycanen tot de monomoleculaire componenten. De afbraak wordt verzorgd door katabole enzymen, zelf ook glycoproteïnen, met pH optima in het zure gebied. Is de afbraak gestoord door een deficiëntie van één van de lysosomale enzymen dan ontstaat door een blokkade in het afbraakproces een opeenhoping van cellulair materiaal. Dit materiaal hoopt zich op in de lysosomen die uitdijen tot vacuolen en vaak al microscopisch waarneembaar zijn. Klinisch brengt dit met zich mee dat orgaanvergrotingen als hepato- en splenomegalie gevonden kunnen worden. Het enzymdefect kan ook in het centrale zenuwstelsel tot uiting komen. Verre gaande cerebrale degeneratie is vaak het gevolg. Niet zelden gaat een dergelijk lysosomaal enzymdefect gepaard met een duidelijke knik in de geestelijke- en/of

Laboratorium Kindergeneeskunde en Neurologie, Academisch Ziekenhuis Nijmegen, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen

Correspondentie: Dr. J.G.N. de Jong, Academisch Ziekenhuis Nijmegen, 319 Laboratorium voor Kindergeneeskunde en Neurologie, Reinier Postlaan 4, 6525 GC Nijmegen.
E-mail: j.dejong@ckslkn.azn.nl

motorische ontwikkeling. Ook het fenotype van de patiënt kan aanleiding zijn om aan een lysosomale stapelingsziekte te denken. Het is onjuist aan te nemen dat het uitsluitend gaat om een groep van ziekten die zich slechts op jeugdige leeftijd kan manifesteren. Voor de meeste lysosomale afwijkingen is dit wel het geval, maar soms komen duidelijk adulte vormen voor. Bekende voorbeelden van lysosomale ziekten die in een infantiele maar ook in een adulte vorm kunnen voorkomen zijn de ziekte van Gaucher, de metachromatische leukodystrofie en de ziekte van Pompe. Het is niet mogelijk om hier in te gaan op de symptomatologie van de diverse lysosomale stape-

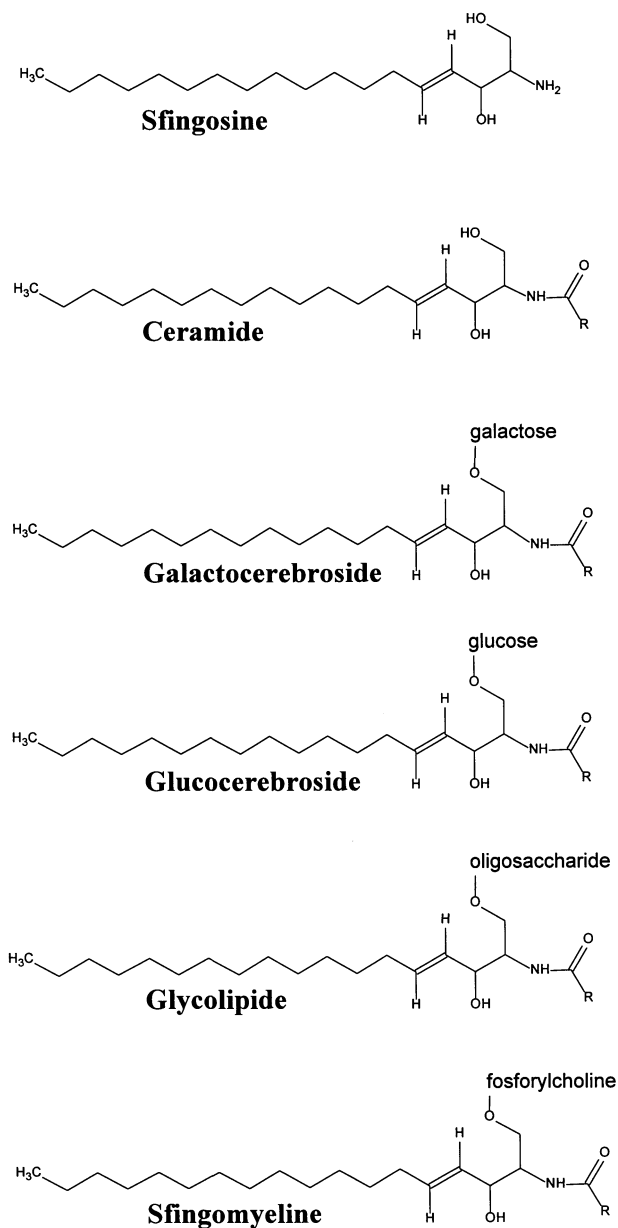
lingsziekten. Hiervoor kan worden verwezen naar onder andere Scriver et al (1), Fernandes et al (2) en Siegel et al (3). Tabel 1 geeft aan in welke gevallen gedacht moet worden aan een lysosomaal defect (4). In de loop der jaren is een groot aantal lysosomale enzymdeficiënties beschreven die ingedeeld kunnen worden in groepen op basis van het type van verbindingen waarvan de afbraak is verstoord: sfingolipidosen, mucopolysaccharidosen en oligosaccharidosen. Voor transport van de monomoleculaire componenten na afbraak door de katabole enzymen zijn transporteiwitten in de membraan verantwoordelijk. Ook hier zijn deficiënties bekend waardoor stapeling van neuraminezuur of cystine kan optreden. Bovengenoemde defecten worden veroorzaakt door mutaties in de katabole enzymssystemen of in de transporteiwitten zelf. Het defect kan ook op een hoger niveau liggen waarbij door een enzymdeficiëntie in het Golgi systeem de routing van een hele groep van lysosomale enzymen verstoord is en er een deficiëntie van een groep van lysosomale enzymen ontstaat. Dit is het geval bij de mucolipidosen II en III. Op basis van de kliniek en het waargenomen stapelingsmateriaal in weefsels en lichaamsvloeistoffen is de indeling van verschillende groepen ontstaan: sfingolipidosen, oligosaccharidosen en mucopolysaccharidosen. Men moet zich echter realiseren dat vaak de specificiteit van een enzym zich beperkt tot de af te splitsen groep, wat betekent dat één enzym betrokken kan zijn bij de afbraak van verschillende groepen van verbindingen. Zo bevatten zowel glycoproteïnen als een deel van de sfingolipiden oligosaccharide ketens waarvan de afbraak voor een deel door dezelfde enzymen wordt gekatalyseerd. In deze gevallen ontstaat stapeling niet alleen van sfingolipiden maar ook van oligosacchariden afkomstig van glycoproteïnen, waarbij de klinische consequenties van de sfingolipide stapeling op de voorgrond staan en de meeste van deze defecten daarom tot de sfingolipidosen worden gerekend.

Tabel 1. Indicaties voor lysosomale ziekten

<i>Systeemdegeneratie</i>	<i>Vorm-anomalieën</i>
- cherry red spot	- gargoyle uiterlijk
- macula afwijkingen	- angiokeratoom
- comea troebeling	- macrocephalie
- opticus atrofie	- groeistoornissen
- epilepsie	
- pyramidaal syndroom	<i>Interne symptomatologie</i>
- cerebellair syndroom	- hepato/splenomegalie
- knik in ontwikkeling	- botafwijkingen
- polyneuropathie	
- myopathie	
- sensibiliteitsstoornissen	
<i>Onderzoek</i>	
- CT-scan:	leukodystrofie
- Röntgenfoto:	skeletafwijkingen
- EMG:	vertraagde perifere zenuwgeleiding
- Laboratorium:	vacuolen in leukocyten
	Alderse granulatie in leukocyten
	stapelingsproduct in beenmerg
	sea blue histiocytes
	mucopolysacchariden in urine verhoogd of
	afwijkend elektroforese patroon
	oligosacchariden in urine verhoogd of
	afwijkend chromatogram
	onbegrepen hoge zure fosfatase activiteit
	in bloed
	onbegrepen hoog liquor eiwit bij kinderen

Tabel 2. Sfingolipidosen

Ziekte	Lipiden en oligosacchariden	Enzymdefect
Farber (Lipogranulomatosis)	Ceramide	Ceramidase
Niemann-Pick A en B	Sfingomyeline	Sfingomyelinase
Krabbe (Globoid Cell leukodystrofie)	Galactosylceramide	Galactosylceramidase
Metachromatische leukodystrofie	Sulfatide	Arylsulfatase A
Gaucher	Glucosylceramide	Glucosylceramidase
Fabry	Trihexosylceramide (gal-gal-glc-cer) Digalactosylceramide	α -Galactosidase A
G _{M1} -gangliosidosis	G _{M1} -ganglioside Oligosacchariden met eindstandig galactose	β -Galactosidase
Galactosialidosis	Gangliosiden en sialyloligosacchariden	“Protective protein” met secundaire deficiëntie van β -Galactosidase en sialidase
Tay-Sachs	G _{M2} -ganglioside	β -Hexosaminidase A
Sandhoff	G _{M2} -ganglioside, G _{A2} (asialo-G _{M2} -ganglioside), globoside, oligosacchariden met eindstandig N-acetylglucosamine	β -Hexosaminidase A en B

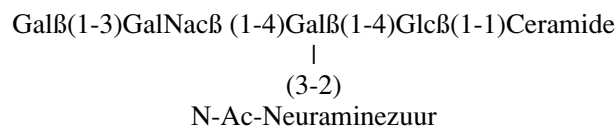


Figuur 1. Structuren van enkele sfingolipiden en hun bouwstenen.

Sfingolipidosen

De sfingolipidosen (tabel 2) vormen een groep van lysosomale stapelingsziekten waarbij sprake is van een genetisch defect in één van de enzymen betrokken bij de afbraak van de sfingolipiden. Terwijl bij de fosfolipiden en triglyceriden het glycerolskelet de basisstructuur van het molecuul vormt, is dit bij de sfingolipiden het sfingosine molecuul, structureel vergelijkbaar met een monoglyceride. De aminogroep van het sfingosine is geacyleerd met een vetzuur. Ceramide is qua structuur vergelijkbaar met een diglyceride (fig. 1). Aan de hydroxylgroep van het ceramide op de 1- plaats kunnen diverse groepen gekoppeld zijn. Als de hydroxylgroep veresterd is met fosforylcholine ontstaat het fosfolipide sfingomyeline. Bij de glycolipiden is de hydroxylgroep geglycosyleerd met een suiker (cerebroside) of een oligo-

saccharide. Glycolipiden vormen vooral in de hersenen een belangrijke groep van verbindingen. De voornaamste samenstellende lipiden in de hersenen zijn galactocerebroside en sulfatide (op de 3'-plaats gesulfateerd galactocerebroside). Deze cerebroside vormen samen met cholesterol de hoofdcomponenten van de witte stof met name van het myeline. Hersenweefsel bevat daarnaast een groot aantal glycolipiden met meer dan één suikerresidu. Ze zijn afgeleid van glucocerebroside. De samenstellende suikers zijn galactose (Gal), glucose (Glc), N-acetylglucosamine (GlcNac), N-acetylgalactosamine (GalNac), fucose (Fuc) en N-acetyl-neuraminezuur (NANA) (5). Een belangrijke groep van deze glycolipiden met complexe suikerstructuur vormen de gangliosiden gekenmerkt door de aanwezigheid van één of meer neuraminezuur suikers in de suikerketen. Door de aanwezigheid van een carboxylgroep in het neuraminezuur gedragen de gangliosiden zich als zure moleculen. Een veel gebruikte nomenclatuur voor de gangliosiden is die van Svennerholm. Zijn classificatie is gebaseerd op het aantal neuraminezuur groepen aanwezig in het molecuul en de loopsnelheid op TLC (5). G_{M1}- en G_{M2}-gangliosiden zijn monosialyl (M) verbindingen en bevatten één neuraminezuurgroep. G_{M1} is opgebouwd uit een suikerketen van 4 suikers waarbij neuraminezuur als vertakking aanwezig is:

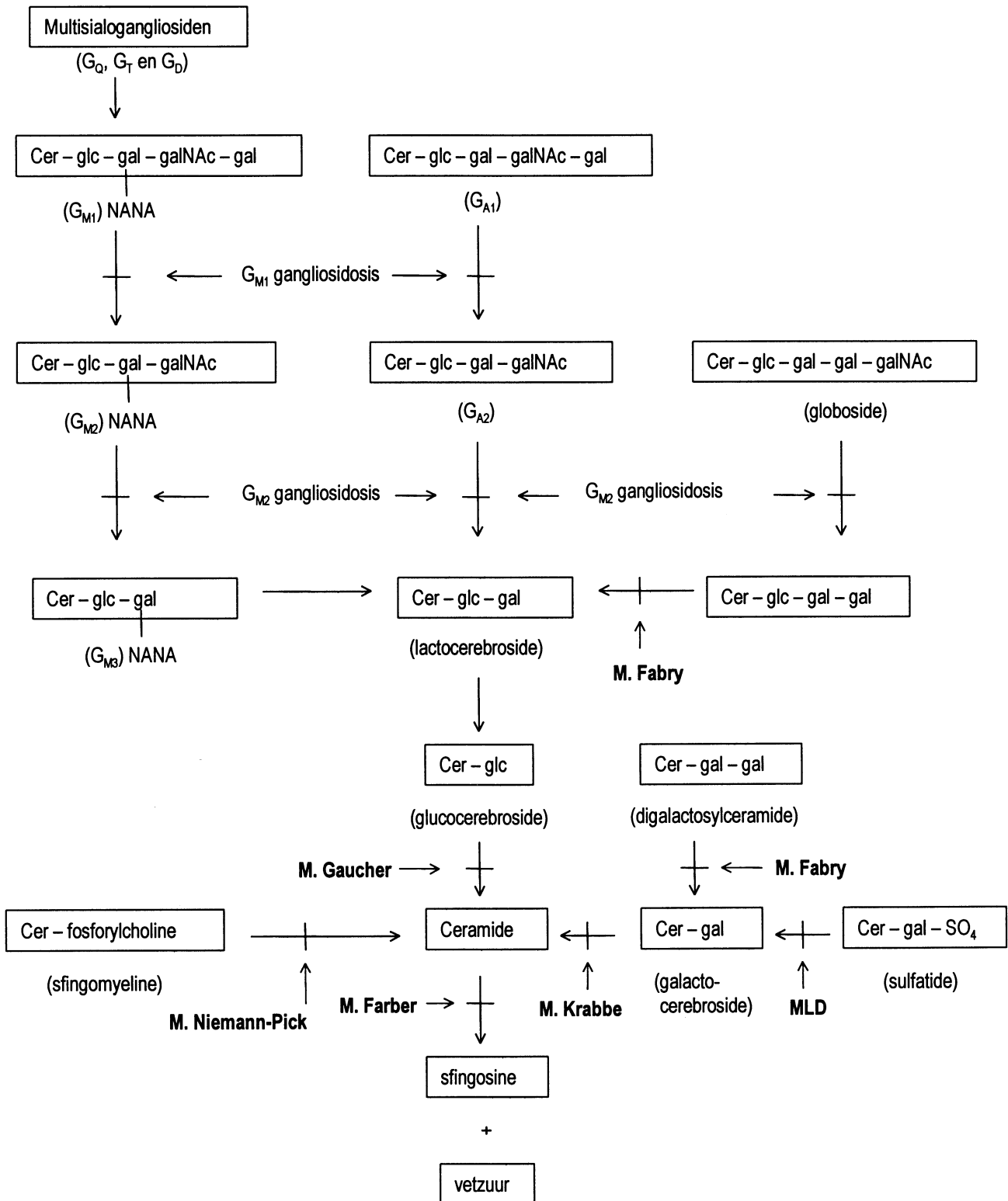


Bij GM2 is de eindstandige galactosegroep afgesplitst. Omdat sfingolipiden belangrijke bestanddelen vormen van het perifeer en centraal zenuwstelsel gaat een defect in de afbraak ervan bij vele van deze ziekten gepaard met neurologische aandoeningen. De sfingolipiden worden afgebroken door een achtereenvolgende afsplitsing van eindstandige moleculen van het hydrofiele of polaire deel van het molecuul. Dit kunnen suikermoleculen (glycolipiden), sulfaationen (sulfatiden) of fosforylcholine (sfingomyeline) zijn. Van het uiteindelijke resulterende ceramide skelet wordt het vetzuur, gebonden aan de aminogroep van het sfingosine afgesplitst door het ceramidase. Als op deze manier de glycosidische, de ester- en de N-acyl bindingen verbroken zijn, worden de gevormde monomoleculaire componenten over de lysosomale membraan getransporteerd en zijn voor verder metabolisme beschikbaar. Deficiënties zijn bekend voor vrijwel alle enzymen betrokken bij de afbraak van de sfingolipiden (fig. 2). Voor de afbraak van de hydrofobe sfingolipiden met korte hydrofiele groepen worden kleine nonenzymatische glycoproteïnen als activatoren gebruikt: sfingolipid activator proteïns (SAPS): GM2 activator proteïen en de groep van SAP A, B, C, en D proteïnen. Ook van deze eiwitten zijn deficiënties bekend, aanleiding gevend tot een klinisch beeld dat vergelijkbaar is met wat past bij een deficiëntie van het enzym, dat onder normale omstandigheden door de activator geactiveerd zou worden.

Lipidosen

De hydrolyse van de vetzuur ester binding in triglyceriden en cholesterolester in verband met de afbraak van triglyceriden en cholesterolesters wordt verzorgd door het enzym zure lipase. Een deficiëntie van dit enzym resulteert in accumulatie van cholesterolesters en triglyceriden in de weefsels. Afhankelijk van de leeftijd waarop de ziekte zich openbaart en de ernst van de kli-

nische symptomen worden hier twee fenotypen onderscheiden. De ziekte van Wolman is de ernstige, infantiele vorm. De cholesterol ester storage disease (CESD) is veel milder en wordt vaak pas op volwassen leeftijd gediagnostiseerd. Niemann-Pick C is een lipidose, die veroorzaakt wordt door een defect in het intracellulaire transport van exogeen cholesterol, resulterend in een accumulatie van cholesterol in het lysosoom.



Figuur 2. Afbraakroutes voor de belangrijkste sfingolipiden, met daarin aangegeven waar de diverse sfingolipidosen het afbraakproces blokkeren. Opgemaakt op basis van een voorbeeld uit ref. 3 en aangepast.

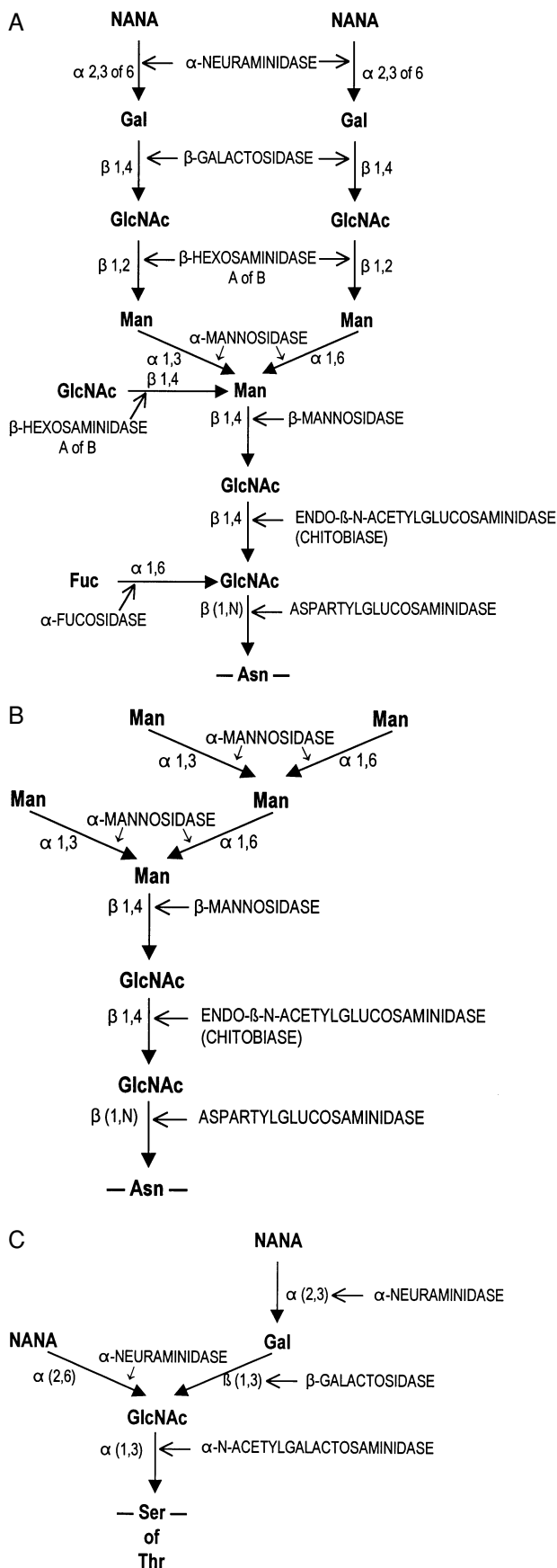
Tabel 3. Glycoproteïnos en mucolipidosen

Ziekte	Oligosacchariden en glycopeptiden	Enzymdefect
α -Fucosidosis	Fucosehoudende oligosacchariden en glycolipiden	α -Fucosidase
Aspartylglucosaminurie	GlcNac-Asn houdende glycopeptiden	N-aspartylglucosaminidase
α -Mannosidosis	Oligosacchariden met eindstandig α -mannose	α -Mannosidase
β -Mannosidosis	β -Mannosyl-GlcNac	β -Mannosidase
Sialidosis (mucopolipidosis I)	Sialyloligosacchariden	α -Neuraminidase (sialidase)
Galactosialidosis	Sialyloligosacchariden	“Protective protein” met secundaire deficiëntie van β -galactosidase en sialidase
α -N-acetyl-galactosaminidase deficiëntie	GalNac- α 1-Ser/Thr houdende glycopeptiden vaak met daaraan gekoppeld galactose en neuraminezuur	α -N-acetyl-galactosaminidase
GM1-gangliosidose	Oligosacchariden met eindstandig galactose	β -Galactosidase
M. Sandhoff	Oligosacchariden met eindstandig N-acetylglucosamine	β -Hexosaminidase A en B
Mucolipidoses II en III		Primair defect in UDP-glcNac: lysosomaal enzym glcNac fosfotransferase en secundaire deficiëntie van meerdere lysosomale enzymen

Oligosaccharidosen / Glycoproteïnos

Onder de groep van oligosaccharidosen wordt verstaan de lysosomale stapelingsziekten met oligosacchariden als belangrijkste stapelingsproduct. De oligosacchariden zijn afkomstig van glycoproteïnen. Een andere naam voor deze groep is die van de glycoproteïnos (tabel 3). Glycoproteïnen kunnen N-glycosidische, aan asparagine (Asn), of O-glycosidische, aan serine (Ser) of threonine (Thre) gekoppelde oligosacchariden bevatten. De N-glycosidische oligosacchariden zijn van het complexe, oligomannose, of hybride type en worden opgebouwd via een ingewikkelde synthese route die elders in deze editie van het tijdschrift wordt behandeld. De afbraak van glycoproteïnen in lysosomen wordt wat betreft het eiwitdeel verzorgd door proteasen. Het oligosaccharide wordt tot losse suikers afgebroken door de glycosidasen. N-aspartylglucosaminidase verbreekt bij de N-glycosidisch gebonden oligosacchariden de binding met het asparagine (fig. 3a en 3b). Een endoglycosidase splitst de binding tussen de twee N-acetylglucosamine moleculen. Het oligosaccharide wordt verder net als bij de glycolipiden door exoglycosidasen afgebroken. Figuur 3 illustreert welke enzymen betrokken zijn bij de afbraak van de verschillende typen oligosacchariden. Een deficiëntie van één van de enzymen heeft tot gevolg dat de rest van de oligosaccharideketen zich stapelt. De verschillende oligosaccharidosen geven elk een karakteristiek patroon van oligo-

sacchariden. De O-glycosidisch gebonden oligosacchariden (fig. 3c) zijn opgebouwd uit N-acetylglucosamine, galactose, N-acetylglucosamine, fucose en neuraminezuur. De synthese vindt plaats via directe overdracht van aan nucleotiden gekoppelde suikers aan de suikerketen. Hierbij is een grote diversiteit in structuren mogelijk. Over de afbraak van O-glycosidisch gekoppelde suikers is in vergelijking met de N-glycosidische minder bekend. De meeste oligosacchariden beschreven bij lysosomale stapelingsziekten zijn van het N-glycosidische type α -N-acetylglucosamine is een belangrijke bouwsteen van O-glycosidisch aan glycoproteïnen gebonden oligosacchariden. De basisstructuur bij de O-glycosidisch gebonden oligosacchariden kunnen in twee klassen worden ingedeeld: Gal β (1-3)GalNac- α -Ser (of Thr) en GlcNac- β (1-3)-GalNac- α -Ser (of Thr). Beide klassen bevatten dus α -GalNac-residuen gekoppeld via serine of threonine aan de eiwitketen (6). Enkele van de bovengenoemde enzymen zijn ook actief op glycolipiden en worden daarom ook vaak ingedeeld bij de sfgolipidose enzymen: β -N-Acetylhexosaminidase, β -galactosidase. Behalve oligosaccharide uitscheiding wordt bij deficiënties van deze enzymen ook stapeling van sfgolipiden waargenomen. Zij worden ingedeeld bij de sfgolipidosen omdat de sfgolipidestapeling op de voorgrond staat en ze zich ook klinisch van de echte glycoproteïnos onderscheiden.



Figuur 3. Afbraak door lysosomale enzymen van aan glycoproteïnen gekoppelde oligosacchariden. Afbraak van een N-glycosidisch gekoppeld oligosaccharide van het complexe type (A), van een N-glycosidisch gekoppeld oligosaccharide van het oligomannose type (B) en verondersteld afbraakmechanisme van een O-glycosidisch gekoppeld oligosaccharide (C). Opge maakt op basis van een voorbeeld uit ref. 19 en aangepast.

Glycogenosen

De glucose moleculen van glycogeen in het lysosoom worden afgesplitst door het α -glucosidase (zure maltase). Bij een deficiëntie van dit enzym (de ziekte van Pompe) accumuleert glycogeen in de weefsels. De ziekte van Pompe wordt ook tot de glycogenosen (type II) gerekend. Afbraakproducten van het accumulerende glycogeen worden bij M. Pompe uitgescheiden als een tetraglucoside-oligosaccharide samen met hogere polymeren van glucose (7). Ook bij enkele andere glycogenosen kunnen deze oligosacchariden in de urine worden aangetoond (type III, debrancher deficiency en type IX, fosforylase kinase deficiency) indien er sprake is van glycogeenstapeling (hepatomegalie) (8). Bij patiënten met late onset vormen van deze ziekte is het tetraglucoside vaak niet aantoonbaar in de urine zodat de diagnose met andere middelen, zoals enzymdiagnostiek, gesteld zal moeten worden.

Mucopolidose II en III / I-cell disease

Bij de mucopolidosen II en III (tabel 3) wordt door een post translatief defect in de biosynthese van de oligosaccharide keten van een aantal lysosomale enzymen de routing van de enzymen naar het lysosoom verstoord. De enzymen worden niet naar het lysosoom getransporteerd maar uitgescheiden door de cel. Dit leidt tot een deficiëntie van een aantal lysosomale enzymen in de cel en verhoogde activiteiten in plasma. De kliniek is ernstig. De diagnostiek berust op meting van de enzymactiviteiten in plasma.

Mucopolysaccharidosen

Bij patiënten met een mucopolysaccharidose (tabel 4) is één van de lysosomale enzymen betrokken bij de afbraak van glycosaminoglycanen GAG's, (synoniem voor mucopolysacchariden), deficiënt (9). Glycosaminoglycanen zijn lange negatief geladen suikerketens, opgebouwd uit repeterende disaccharide-eenheden. De disaccharide-eenheid bepaalt het type GAG: chondroïtine sulfaat (CS), dermataansulfaat (DS), keraatansulfaat (KS) of heparaansulfaat (HS). Bij alle GAG's, behalve bij KS, is één van de samenstellende suikers een uronzuur (glucuronzuur of iduronzuur). De suikerketens kunnen op diverse plaatsen gesulfateerd zijn. De hexosamine van CS en DS kan op de 4- of de 6-plaats, de hexose van KS op de 6-plaats en het uronzuur van CS, DS en HS op de 2-plaats verestert zijn met een sulfaatgroep. Bij HS kan naast de 6-OH-groep ook nog de stikstofgroep van de hexosamine gesulfateerd zijn. In de weefsels en cellen zijn GAG's gebonden aan een eiwitketen ("core-protein") en worden in die vorm proteoglycanen genoemd.

De binding aan de eiwitketen is veelal een binding aan een serinemolecuul via een xylose-galactose-galactose trisaccharide. Op die manier kunnen er één of meer GAG-moleculen van hetzelfde type of van verschillende typen aan het core proteïne gekoppeld zijn. GAG's en proteoglycanen zijn voor het merendeel gelokaliseerd buiten de cel. De afbraak van de GAG's tot monomoleculaire componenten door proteasen, sulfatasen en glycosidasen vindt intracellulair plaats in de lysosomen. Extracellulaire protease- en endogly-

Tabel 4. Mucopolysaccharidosen

	Naam	GAG in urine	Enzymdeficiënties
MPS 1H	Hurler	Dermataansulfaat Heparaansulfaat	α -L-iduronidase
MPS I S	Scheie	Dermataansulfaat Heparaansulfaat	α -L-iduronidase
MPS II	Hunter	Dermataansulfaat Heparaansulfaat	Iduronaat-2-sulfaat sulfatase
MPS III A	Sanfilippo A	Heparaansulfaat	Heparaan N-sulfatase (sulfamidase)
MPS III B	Sanfilippo B	Heparaansulfaat	N-acetyl-a-D-glucosaminidase
MPS III C	Sanfilippo C	Heparaansulfaat	Glucosamine acetyl-transferase
MPS III D	Sanfilippo D	Heparaansulfaat	N-acetyl- α -D-glucosamine-6-sulfatase
MPS IV A	Morquio A	Kerataansulfaat Chondroitine-6-sulfaat	Galactos(amin)e-6-sulfaat sulfatase
MPS IV B	Morquio B	Kerataansulfaat	β -galactosidase
MPS VI	Maroteaux-Lamy	Dermataansulfaat	N-acetyl-galactosamine-4-sulfatase (arylsulfatase B)
MPS VII	Sly	Dermataansulfaat Heparaansulfaat	β -glucuronidase

cosidase-activiteiten kunnen echter ook een rol spelen in het katabolisme van de proteoglycanen. Om volledig afgebroken te kunnen worden, moeten de proteoglycanen of GAG's door middel van endocytose over de celmembraan naar de lysosomen getransporteerd worden. Endoglycosidasen, zoals hyaluronidase, heparanoglucuronidase en endo- β -galactosidase, zijn in staat om ergens midden in de GAG-keten de glycosidische binding te splitsen. Op die manier worden meer eindstandige suikergroepen gecreëerd en de substraatconcentratie voor de exo-enzymen verhoogd. De splitsing van de GAG keten in monomoleculaire componenten (sulfaatien en suikermoleculen) wordt verzorgd door een team van exosulfatasen en exoglycosidasen. De volgorde van de afbraak ligt vast omdat de exo-enzymen alleen eindstandige sulfaatgroepen en suikers afsplitsen. Een deficiëntie van een exo-enzym heeft stapeling van de rest van de GAG-keten tot gevolg.

Neuronale Ceroid Lipofuscinoses (NCL)

De Neuronale Ceroid Lipofuscinoses (NCL's) vormen een groep van ernstige neurodegeneratieve aandoeningen gekenmerkt door een stapeling van autofluorescerend materiaal, voornamelijk in het centrale zenuwstelsel (10). Klinisch worden de NCL's gekenmerkt door onder andere progressief verlies van gezichtsvermogen, uiteindelijk leidend tot blindheid, vaak therapie resistente epileptische aanvallen, verlies van motore en intellectuele functies en vroegtijdig overlijden. Reeds lang bestond het vermoeden dat het hier om lysosomale stapelingsziekten ging, omdat met markers kon worden aangetoond, dat het stapelingsmateriaal gelocaliseerd was in lysosomale struc-

turen. De NCL's voldeden echter niet aan de klassieke definitie van lysosomale stapelingsziekten, omdat tot voor kort er geen lysosomaal (enzym)defect bekend was. Op basis van de resultaten van recent moleculair genetisch onderzoek zijn tenminste 8 verschillende NCL genen (*CNLI-8*) betrokken bij dit ziektebeeld. Dit heeft geleid tot een herclassificering van de NCL-ziekten. Deze is nu gebaseerd op het onderliggend gen defect. Voor een aantal is het gen product en de functie ervan bekend. Op basis hiervan kunnen enkele reeds met zekerheid tot de groep van lysosomale stapelingsziekten gerekend worden. Voor twee van de genen (*CLN1 en CLN2*) is aangetoond dat ze coderen voor lysosomale enzymen. Drie andere (*CLN3, 5 en 8*) coderen voor transmembraan eiwitten, waarvan de functies nog onbekend zijn. Voor *CLN3* is localisatie in de lysosomale membraan aangetoond. Het *CLN1* gen codeert voor palmitoyl-protein thioesterase (PPT) en defecten in dit enzym leiden tot de infantiele vorm van NCL (M. Santavuori-Haltia). PPT is een lysosomaal enzym dat palmitoyl thioesters, van met vetzuur geacyleerde cysteine residuen in eiwitten, deacyleert. Het gen product van het *CLN2* gen is tripeptidyl-peptidase I. Deficiënties van dit enzym zijn de oorzaak van de klassieke laat infantiele vorm van NCL (M. Jansky-Bielschowsky). Het *CLN3* gen, wat codeert voor een lysosomaal membraan eiwit, is betrokken bij het klassieke juveniele type (M. Batten). Omdat ook de variant laat infantiele NCL's, waaraan defecten in de *CLN5, 6 en 7* genen ten grondslag liggen, zowel qua kliniek als pathologie verwant zijn aan de rest, is het waarschijnlijk dat het ook bij deze types om defecten in lysosomale eiwitten gaat. Het gen voor de adulte vorm (Kufs dis-

ease) is nog niet bekend en mogelijk is bij dit ziektebeeld meer dan één gen betrokken.

De eiwitdiagnostiek voor *CLN1* en *CLN2* is nu op het zelfde niveau van de andere bekende lysosomale stapelingsziekten (11-13).

Transportdefecten

Na afbraak van verbindingen als triglyceriden, fosfolipiden, sfingolipiden, glycoproteïnen en glycosaminoglycanen resteren de moleculaire bouwstenen zoals vetzuren, glycerol, fosfaat, ceramide, sulfaat, monosacchariden en aminozuren. Het transport hiervan over de lysosomale membraan naar het cytoplasma vindt plaats veelal via specifieke transportmoleculen in de lysosomale membraan. Ook hier zijn defecten bekend, die aanleiding geven tot stapeling van deze monomoleculaire componenten. Het defect in transport van neuraminezuur is de meest bekende, aanleiding gevend tot (sterk) verhoogde uitscheiding van neuraminezuur.

Screening op stapelingsproducten in urine

Door het defect in de lysosomale afbraak zullen één of meer producten zich stapelen in het lysosoom. Secundair daaraan vindt vaak ook nog ophoping van andere niet direct aan het enzymdefect gerelateerde verbindingen plaats, waarschijnlijk doordat ook de andere niet deficiënte enzymen in hun functie belemmerd worden door het stapelingsfenomeen en de abnormale lysosomale inhoud en structuur (14). Door de stapeling groeien de lysosomen uit tot vacuoolachtige structuren, die microscopisch (licht en EM) herkenbaar zijn. Morfologisch onderzoek van weefsel, leukocyten en beenmerg kan vaak een belangrijke indicatie geven voor het aanwezig zijn van een lysosomaal stapelingsfenomeen. Door celdood kunnen de stapelingsproducten, afhankelijk van hun oplosbaarheid, in de circulatie komen en via de urine worden uitgescheiden (oligosacchariden, mucopolysacchariden en neuraminezuur). Door het aantonen van verhogingen in de concentratie van deze producten in urine kan worden voorgescreeend op een aantal lysosomale stapelingsziekten.

Oligosacchariden

Oligosaccharide uitscheiding in urine wordt gezien bij de glycoproteïnososen, een aantal sfingolipidosen en de ziekte van Pompe. In totaal kan door analyse van oligosacchariden in urine worden voorgescreeend op 10 verschillende lysosomale stapelingsziekten. De meest gebruikte techniek voor de analyse van oligosacchariden is één-dimensionale chromatografie op silicagel platen. Als loopmiddel wordt gebruikt een mengsel van butanol, azijnzuur en water in de verhouding 2:1:1. Het urinemonster (portie) wordt van tevoren ontzout, omdat zouten het loopgedrag van de oligosacchariden verstoren. Ontzouten kan geschieden met behulp van ionenwisselingschromatografie, maar eenvoudiger is een kleine hoeveelheid (100 mg) van een gemengde ionenwisselaar, voorbehandeld met azijnzuur, aan het urinemonster toe te voegen. Geladen oligosacchariden (glycopeptiden en neuraminezuurhoudende oligosacchariden) kunnen hierbij

echter verloren gaan. Daarom wordt altijd naast het ontzoute monster ook een niet ontzout monster gechromatografeerd. De hoeveelheid opgebrachte urine is leeftijdsafhankelijk en er wordt een correctie uitgevoerd voor het kreatinine gehalte van de urine (15,16). Suikerhoudende banden worden specifiek gekleurd door te sprayen met een orcinol oplossing in verdund zwavelzuur of door de plaat te dompelen in een orcinol zwavelzuur oplossing in aceton. De oligosacchariden worden zichtbaar na verhitting. Er bestaan, naast de voor suikers specifieke orcinolkleuring, specifieke kleuringen voor neuraminezuur en neuraminezuur houdende oligosacchariden (resorcinolkleuring) en glycopeptiden (ninhydrinekleuring). Om de positie van de oligosaccharide banden te kunnen bepalen worden standaarden zoals glucose, lactose, raffinose, tetraglucoside en sialyllactose in een mengsel meegenomen en een monster van gedeeltelijk gehydrolyseerd dextraan, dat glucose monomeer en de diverse α -(1-6) dimeren van glucose bevat (14). Urines van jonge kinderen bevatten altijd een aantal normale oligosacchariden, die onder andere afkomstig zijn van voeding. Borstvoeding maar ook andere voedingen geven een patroon van oligosaccharide banden, dat varieert met de voeding. De banden in het oligosaccharide patroon kunnen worden gekarakteriseerd door hun positie ten opzichte van die van de standaarden en ten opzichte van de polymeren van glucose uit een dextraanhydrolysaat (fig 4) te bepalen. Het vereist ervaring om de normale (voedings) patronen te leren kennen en te kunnen onderscheiden van de patronen, die passen bij een lysosomaal defect.

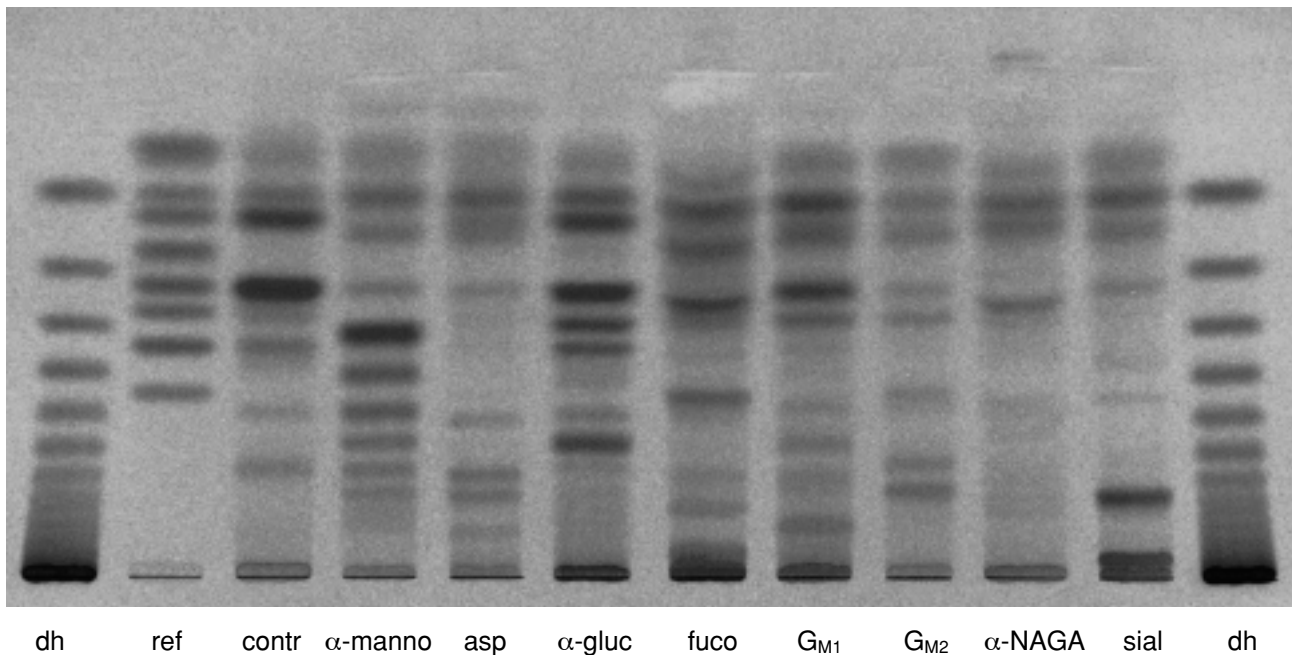
Glycoproteïnososen

α -Fucosidosis

De afsplitsing van fucose moleculen gekoppeld aan N-acetylglucosamine (GlcNac) residuen is een van de eerste stappen in de afbraak van oligosacchariden. Dit omdat het volgende enzym in de afbraakroute (N-aspartylglucosaminidase) alleen actief is als fucose, gekoppeld aan het aan asparagine gebonden GlcNac, is afgesplitst. Omdat het enzym aspartylglucosaminidase geremd wordt door de aanwezigheid van een fucoseresidu aan de N-acetylglucosaminegroep zullen bij een α -fucosidase deficiëntie behalve fucosehoudende oligosacchariden, zoals Fuc-GlcNac, ook fucoglycopeptiden, zoals Fuc-GlcNac-asp, worden uitgescheiden. Daarnaast worden ook grotere glycopeptiden en oligosacchariden met een fucoseresidu gekoppeld aan GlcNac verderop in de oligosacchariden keten als stapelingsproduct waargenomen (17-19). Laan 7 in fig. 4 geeft het TLC patroon na orcinol kleuring.

N-Aspartylglucosaminurie

Deficiëntie van het aspartylglucosaminidase verhindert de splitsing tussen de N-acetylglucosamine suiker en het asparagine van het glycopeptide, dat overblijft na de afbraak van de eiwitketen door diverse proteolytische enzymen. De oligosaccharideketen met twee N-acetylglucosamine residuen aan de reduce-



Figuur 4. Dunne laag chromatografie van oligosacchariden. Urines werden ontzout met een gemengde ionenwisselaar. dh: ref. monster van gedeeltelijk gehydrolyseerd dextraan, met daarin glucose monomeer, dimeer, trimeer, enz.; ref.: monster met referenten, van boven naar beneden: xylose, glucose, galactose, maltose, lactose, raffinose, tetraglucoside en sialyllactose; contr: normale controle kinderurine; α -manno: α -mannosidosis; asp: N-aspartylglucosaminurie; α -gluc: α -glucosidase deficiëntie (M. Pompe); fuco: fucosidosis; GM1: GM₁-gangliosidosis; GM₂: GM₂-gangliosidosis; α -NAGA: α -N-acetylgalactosaminidase deficiëntie; sial: sialidosis.

rende kant wordt kennelijk wel afgesplitst via een endo- β -N-acetylglucosaminidase (fig. 3a). Dit oligosaccharide wordt door exoglucosidasen tot monosacchariden afgebroken. Bij een deficiënte van het N-aspartylglucosaminidase resteert het N-aspartylglucosamine. Dit is het belangrijkste stapelingsproduct. Het kan met behulp van dunne laag chromatografie in urine niet met orcinol maar wel via de ninhydrinekleuring worden aangetoond. Daarnaast zijn ook andere glycopeptiden in de urine aanwezig, die wel via de normale screening op oligosacchariden met orcinol kleuring kunnen worden gezien, als gevolg van een gedeeltelijke afbraak van de oligosaccharide keten, maar ook oligosacchariden als gal- β -(1-4)GlcNac-Asn eventueel nog uitgebreid met een N-acetylneuraminy- of N-acetylglucosaminyl-groep. Deze volgorde van suikers komt normaal niet in N-glycosidisch gebonden suikerketens voor. Ze worden klaarblijkelijk gevormd door koppeling van suikers op basis van activiteiten van galactosyltransferasen bij een overmatig aanbod van substraat (17-19). In het TLC patroon zijn 3-4 extra banden te zien na orcinol kleuring (fig. 4 laan 5). De vrije $-\text{NH}_2$ groep van de glycopeptiden kleurt met ninhydrine zodat bij de analyse van aminozuren in urine 2 afwijkende pieken gezien worden in het profiel van de aminozuren afkomstig van N-aspartylglucosamine en gal- β -(1-4)GlcNac-Asn.

α -Mannosidosis

Patiënten met een deficiëntie van α -mannosidase scheiden $\text{Man}_n\text{GlcNac}$ ($n \geq 2$) oligosacchariden uit. Deze zijn afkomstig van de N-glycosidisch gebonden oligosacchariden van het oligomannose type gebonden aan de glycoproteïnen (fig. 3b). De urine bevat

een groot aantal van deze oligosacchariden waarvan $\text{Man}_2\text{GlcNac}$ in de hoogste concentratie aanwezig is (fig. 4 laan 4). De hoeveelheid en daarmee ook de intensiteit van de mannosyloligosacchariden neemt af met toenemend aantal mannose residuen (7,20,21).

β -Mannosidosis

Patiënten met een β -mannosidase activiteit scheiden het disaccharide $\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNac}$ uit (22,23). Dit disaccharide gedraagt zich op TLC wat betreft loopsnelheid vrijwel hetzelfde als lactose, een disaccharide dat veel in urine voorkomt. Om het β -mannosidase disaccharide te kunnen herkennen en scheiden van lactose is, is een speciaal loopmiddel nodig (22).

Sialidosis en galactosialidosis

Omdat neuraminezuur (sialic acid) bij de N-glycosidisch gebonden oligosacchariden een eindstandige suiker is, zijn de oligosacchariden uitgescheiden bij een neuraminidase deficiëntie hogere oligosacchariden bestaande uit 6 of meer samenstellende suikers. De belangrijkste oligosacchariden zijn volledig en gedeeltelijk gesialyleerde mono- en disialyl-oligosacchariden. Vrijwel dezelfde oligosacchariden worden gezien in een galactosialidosis urine. De relatieve hoeveelheden van de verschillende sialyloligosacchariden kunnen tot op zekere hoogte variëren (24). In het oligosaccharidepatroon zijn twee hoofdbanden duidelijk aanwezig (fig. 4 laan 11).

α -N-acetylgalactosaminidase deficiëntie

α -N-acetylgalactosamine is een belangrijke bouwsteen van O-glycosidisch aan glycoproteïnen gebonden oligosacchariden. Het komt ook in suikerketens van glycolipiden voor. Stapelingsproducten afkom-

stig van O-glycosidisch gebonden suikerketens worden gevonden in urine. Naar verwachting zullen zich ook lipidstructuren stapelen. De basisstructuur bij de O-glycosidisch gebonden oligosacchariden kunnen in twee klassen worden ingedeeld: Gal β (1-3)GalNac-Ser(of Thr) en GlcNac- β (1-3)-GalNac-Ser(of Thr). Beide klassen bevatten dus α -GalNac-residuen gekoppeld via serine of threonine aan de eiwitketen. De stapelingsproducten gevonden in urine zijn als gevolg hiervan glycopeptiden. De belangrijkste hiervan hebben echter niet een α -N-acetylgalactosamine maar een neuraminezuur als eindstandige suiker. De oorzaak hiervan is niet duidelijk. Het oligosaccharide patroon laat drie afwijkende banden zien na kleuring op neuraminezuur (resorcinol) waarvan één door de hogere intensiteit duidelijk zichtbaar is na orcinol kleuring de andere twee niet of kleuren erg zwak (fig. 4 laan 10). Kleuring op neuraminezuur met behulp van resorcinol maakt kennelijk door de hogere gevoeligheid alle drie de banden zichtbaar. Deze neuraminezuur houdende glycopeptiden kunnen na ontzoutingsprocedure met ionenwisselaars hieraan gebonden worden en daardoor verdwijnen. Na ontzouten kan bij deze deficiëntie zelfs een normaal patroon worden gevonden (16).

Sfingolipidosen

Belangrijkste componenten, waarvan het metabolisme verstoord is bij de sfingolipidosen en lipidosen zijn de glycolipiden, fosfolipiden, triglyceriden en cholesterolsters. Door hun slechte wateroplosbaarheid worden ze niet in de urine teruggevonden (bij een aantal sfingolipidosen, zoals bij de metachromatische leukodystrofie en de ziekte van Fabry, wordt lipidestapeling gezien in het urinesediment). Bij enkele sfingolipidosen echter is het enzym ook betrokken bij de afbraak van de oligosaccharideketen van de glycoproteïnen. Hier wordt naast lipidestapeling ook stapeling van oligosacchariden waargenomen. Ze kunnen daarom in principe ook tot de glycoproteïnosen gerekend worden. Deze oligosacchariden worden uitgescheiden in urine, waardoor screening mogelijk is.

G_{M1}-gangliosidosis

G_{M1}-gangliosidosis wordt veroorzaakt door een deficiëntie van het β -galactosidase. Omdat dit de eindstandige suiker is van het G_{M1}-ganglioside, een belangrijke component van neuronaal weefsel met name de grijze stof, is G_{M1}-ganglioside een belangrijk stapelingsproduct. β -Glycosidisch gebonden galactose is echter ook één van de samenstellende suikers in het complexe type oligosaccharide van de glycoproteïnen (fig. 3a). Bij G_{M1}-gangliosidosis wordt daarom ook een karakteristiek afwijkend oligosaccharide patroon in de urine waargenomen met 3-4 afwijkende oligosacchariden met β -glycosidisch aan de niet reducerende zijde gebonden galactose (fig. 4 laan 8) (7,25-27).

G_{M2}-gangliosidosis variant O (M. Sandhoff)

Bij deze variant van de G_{M2}-gangliosidosis zijn beide iso-enzymen A en B van het β -N-acetylhexosaminidase deficiënt (28). Het B-iso-enzym heeft een voor-

keur voor neutrale wateroplosbare oligosacchariden (29). Variant O (Morbus Sandhoff) wordt daarom gekenmerkt door stapeling en excretie van oligosacchariden. Bij variant B (Tay-Sachs disease) is alleen de hexosaminidase A activiteit deficiënt. Hierbij wordt geen verhoogde uitscheiding van oligosacchariden waargenomen. In het TLC patroon worden bij de ziekte van Sandhoff twee karakteristieke banden waargenomen. Strecker et al (30) en Warner et al (31) beschreven 10-12 N-acetylglucosamine bevattende oligosacchariden bij Sandhoff patiënten met twee hoofdcomponenten, waarschijnlijk corresponderend met de twee banden, die in het voor M. Sandhoff karakteristieke TLC patroon zichtbaar zijn (fig. 4 laan 9).

Mucopolysacchariden

Minimaal 10 verschillende enzymen (glycosidasen en sulfatasen) zijn nodig voor een volledige afbraak van de diverse GAG-ketens tot de monomoleculaire componenten. Omdat alleen eindstandige sulfaatgroepen of suikers afgesplitst kunnen worden zal een deficiëntie van elk van deze enzymen resulteren in een accumulatie van de rest van de GAG-keten in de cellen en in de weefsels. Op basis van deze enzymdeficiënties kunnen we 10 verschillende erfelijke ziektebeelden onderscheiden, ieder met een eigen stapelingsproduct of combinatie van stapelingsproducten. Tabel 4 geeft een overzicht van de verschillende mucopolysaccharidosen met de daarbij passende enzymdeficiënties en de stapelingsproducten (9). De verschillende mucopolysaccharidosen hebben gemeenschappelijke klinische kenmerken. De meest kenmerkende hiervan zijn: vergroting van de lever en/of milt ten gevolge van stapeling van de GAG's in deze weefsels, retardatie, grof gelaat, ("gargoyle uiterlijk"), corneatroebeling, stijfheid in de gewrichten en skeletafwijkingen. Voor een meer uitgebreide beschrijving van de kliniek van de verschillende typen mucopolysaccharidosen wordt verwezen naar Neufeld et al (32).

Screeningsprocedures

De GAG's, die zich stapelen in de weefsels, kunnen door celdood vrijkomen. Ze zijn goed wateroplosbaar en worden in de urine teruggevonden. Alle tot nu toe bekende mucopolysaccharidosen geven aanleiding tot verhoogde uitscheiding van GAG's in de urine (tabel 4). Meting van GAG's in urine is daarom algemeen gebruikt als screeningsprocedure voor mucopolysaccharidosen. Een goede screeningsprocedure dient zo weinig mogelijk vals negatieve uitslagen te geven (sensitiviteit) moet gemakkelijke en snel uitvoerbaar zijn en een minimum aan vals positieve uitslagen opleveren (specificiteit), omdat elke positieve uitslag een vervolgonderzoek oplevert. Screeningsprocedures voor mucopolysaccharidosen kunnen worden onderverdeeld in kwalitatieve en kwantitatieve bepalingmethoden. De kwalitatieve testen zoals de spot-test corrigeren over het algemeen niet voor de urineconcentratie en kunnen daardoor vals positieve en vals negatieve uitslagen geven. De kwantitatieve testen kunnen worden uitgevoerd op een 24-uurs urine, zodat de uitscheiding per 24-uur berekend kan wor-

den. Voor een screeningsprocedure heeft echter de bepaling in een portie, waarbij gecorrigeerd wordt voor de urineconcentratie door middel van het kreatinine gehalte de voorkeur. De bepalingsmethoden voor GAG in urine meten het totaal aan GAG's (CS, DS, HS en KS). De meeste testen maken gebruik van het feit dat GAG's langgerekte moleculen zijn met sterk negatief geladen sulfaatgroepen. Het reagens is meestal een positief geladen (basisch) molecuul. De resulterende complexen geven een troebeling (kationische detergentia), meetbaar als verhoogde absorptie of lichtverstrooiing, of een metachromatisch effect (basische kleurstoffen), meetbaar als een verhoging van de absorptie bij een bepaalde golflengte. Andere testen meten het uronzuurgehalte na precipitatie (carbazoltest). Van genoemde testen zijn de carbazoltest en de kwantitatieve metachromatische testen het meest betrouwbaar.

Uronzuur carbazoltest

Deze test meet het uronzuur (glucuronzuur en iduronzuur) gehalte in GAG, geprecipiteerd in een kationisch detergens (CPC, CETAB). De test is betrouwbaar maar bewerkelijk. Kerataansulfaat het uitscheidingsproduct bij de ziekte van Morquio bevat geen uronzuurresiduen en wordt daarom niet meegemeten. Patiënten met M. Morquio type A hebben echte naast een verhoging van het kerataansulfaat ook een verhoging van het chondroïtine-6-sulfaat gehalte in de urine, zodat met deze test toch een afwijkend verhoogde waarde in de urine zal worden gemeten.

Metachromatische testen

Metachromasie treedt op door de reactie van de basische kleurstoffen (toluidine blauw, Alcian Blue, Azure A, dimethylmethyleen blauw). De metachromasie treedt op door de regelmatige rangschikking van de kleurstofmoleculen langs de rechte polyanionische matrix (33). De spottesten zijn kwalitatieve metachromatische testen, die niet corrigeren voor de mate van geconcentreerdheid van de urine. Uit onderzoek is gebleken dat de spottesten niet betrouwbaar zijn. Zowel vals positieve uitslagen als vals negatieve uitslagen werden in deze studies gezien. De Ames spottest bijvoorbeeld, gebaseerd op de metachromatische kleurstof Azure A, gaf in een serie van 75 urines met 26 mucopolysaccharidosis urines, getest door twee verschillende laboratoria respectievelijk 19 en 35% vals negatieve en 22 en 12% vals positieve uitslagen. Met de kwantitatieve dimethylmethyleen blauw (DMB) methode (34) werden in deze serie geen vals negatieve en geen vals positieve uitslagen gevonden. De spottesten zijn dus onbetrouwbaar en gebruik ervan als screeningsprocedure voor mucopolysaccharidosen is niet meer verantwoord. Door ons is een screeningsprocedure ontwikkeld op basis van de dimethylmethyleen blauw (DMB), waarmee direct in urine dus zonder voorbereiding van het monster, gemeten kan worden (34). De methode gaf een goede correlatie met uronzuur-carbazoltest. De screening kan worden uitgevoerd in urineporties, waarbij gecorrigeerd wordt voor de geconcentreerdheid van de urine door de gemeten waarden uit te drukken per

mmol kreatinine. De referentiewaarden blijken sterk leeftijdsafhankelijk te zijn en vooral in het eerste levensjaar sterk af te nemen met de leeftijd. De voor de verschillende leeftijdscategorieën vastgestelde referentiewaarden bewegen zich binnen betrekkelijk nauwe grenzen. Omdat de oorspronkelijke DMB methode gestoord wordt door eiwit in de urine werd een gewijzigde DMB-bepaling ontwikkeld. Door toevoeging van Tris-base aan de bepaling kan ook in aanwezigheid van relatief hoge concentraties van eiwit (uitgetest tot een concentratie van 5 gram per liter) het GAG-gehalte betrouwbaar gemeten worden (35). Belangrijk bij het GAG assay is de keuze van het dimethylmethyleenblauw. De kwaliteit ervan kan worden afgelezen aan het spectrum. De absorptie bij de golflengte van het DMB-GAG complex moet in de DMB oplossing zonder GAG voldoende laag zijn om een toename van de absorptie goed te kunnen meten. Daarnaast moet het gehalte aan DMB in het preparaat en daarmee in de oplossing, die hiermee gemaakt wordt, voldoende hoog zijn, om al het GAG in het monster te kunnen binden. Een maat hiervoor is de absorptie van de DMB oplossing. De ijklijn van de bepaling heeft een beperkte lineariteit. Omdat GAG concentraties door variatie in kreatinine gehalte van de urines en variatie in leeftijd van de patiënten sterk kunnen uiteenlopen, moet altijd nagegaan worden of de gemeten waarde in het lineaire gebied van de ijklijn ligt en of het monster verdund moet worden ingezet. Zeker bij mucopolysaccharidose patiënten zal de waarde al gauw in het niet lineaire gebied liggen, waardoor een te lage waarde wordt gemeten en patiënten gemist kunnen worden. Indien tijdens de screening op mucopolysaccharidosen een verhoogde waarde voor het mucopolysaccharidegehalte wordt gevonden, volgt hierop een analyse van de samenstelling van de glycosaminoglycanen met behulp van 1-dimensionale elektroforese (36). Tevens worden in leukocyten, geïsoleerd uit heparinebloed de verschillende enzymen betrokken bij het metabolisme van GAG's gemeten. Normale urine bevat voornamelijk chondroïtinesulfaat. Bij een mucopolysaccharidose wordt na 1-dimensionale elektroforese een afwijkende samenstelling gevonden. Verhogingen van GAG zonder dat hieraan een erfelijke stofwisselingsziekte ten grondslag ligt worden onder andere gezien bij patiënten met reumatische ziekten, na myocard infarct en heparinetherapie. Ook zijn artificieel verhoogde uitslagen mogelijk door verontreiniging van de urine met lijmstoffen afkomstig van de rand van de urine opvangzakjes. Voor een uitgebreider overzicht zie Blau et al (37).

Neuraminezuur

Infantile sialic acid storage disease (ISSD) en Salla disease.

Defecten in transport van neuraminezuur kunnen worden opgespoord door neuraminezuur analyse in urine. Dit is in principe mogelijk door middel van resorcinol kleuring van de neuraminezuur band na dunne laag chromatografie. Omdat de verhogingen met name bij Salla disease gering kunnen zijn heeft een kwantitatieve meting van het neuraminezuur, ge-

corrigeerd wordt voor het kreatininegehalte van de urine, de voorkeur. Neuraminezuur kan kwantitatief gemeten worden met behulp van HPLC of enzymatisch, waarbij het na omzetting door N-acetyl-neuraminezuur aldolase als pyruvaat wordt gemeten.

Meting van glycosaminoglycaan gehalte in urine is een goede voorscreening voor de gehele groep van de mucopolysaccharidosen. Bij de mildere vormen van de mucopolysaccharidosen kunnen de verhogingen gering zijn en is een nauwkeurige meting vereist. Adulte patiënten met de ziekte van Morquio kunnen een normaal glycosaminoglycaangehalte in de urine hebben. Volwassen Morquio patiënten zijn echter op basis van het klinisch beeld goed te herkennen. Analyse van oligosacchariden is een goede voorscreening voor de groep van de oligosaccharidosen en een deel van de sfingolipidosen, hoewel in een enkel geval de patronen moeilijk zijn te interpreteren en soms, met name bij de milde vormen, de afwijkingen moeilijk zijn vast te stellen. Bij gevonden afwijkingen in het oligosaccharide-patroon, niet te verklaren op basis van voeding of medicatie en bij gevonden verhoging van de glycosaminoglycaan uitscheiding, wordt lysosomaal enzymonderzoek geadviseerd. Voor een aantal lysosomale stapelingsziekten met name uit de groep van de sfingolipidosen en mucolipidosen is geen voorscreening mogelijk. Dit betekent dat vaak rechtstreeks een beroep zal moeten worden gedaan op enzymbepalingen om een lysosomaal defect te bevestigen dan wel uit te sluiten.

Enzymdiagnostiek

Verreweg het grootste deel van de lysosomale enzymdefecten kan betrouwbaar in leukocyten worden vastgesteld. De leukocyt bevat een vrijwel compleet arsenaal aan lysosomale enzymen en is daarmee bij uitstek geschikt voor de diagnostiek van lysosomale enzymdefecten (4). Via dextraansedimentatie wordt uit een buis heparinebloed (10-15 ml, bij jonge kinderen minimaal 5-6 ml) een hoeveelheid leukocyten geïsoleerd, voldoende om een tiental lysosomale enzymen kwantitatief te meten. Ook na verzending per post expresse zodat het materiaal de volgende morgen arriveert kunnen nog betrouwbare enzymspiegels in het bloedmonster worden gemeten (4). Voor een goede en zo volledig mogelijke lysosomale diagnostiek is naast het bloedmonster echter ook een urinemonster nodig, omdat hierin al reeds een aantal lysosomale ziekten kunnen worden uitgesloten, waardoor het bloedmonster zo economisch mogelijk kan worden gebruikt voor het uitsluiten van de resterende lysosomale stapelingsziekten.

Oligosaccharidosen en mucopolysaccharidosen

Indien na voorscreening in urine afwijkingen zijn gezien in het oligosaccharide patroon of in het mucopolysaccharide gehalte en/of de samenstelling wordt het enzymdefect enzymatisch bevestigd of uitgesloten door meting van de enzymen in een bloedmonster. Bij de voorscreening op oligosaccharidosen en mucopolysaccharidosen moet men zich realiseren, dat in een aantal gevallen, met name bij de milde vormen, de

afwijkingen in het patroon respectievelijk de concentratie gering kunnen zijn en moeilijk vast te stellen.

Sfingolipidosen en lipidosen

Het merendeel van de defecten in de groep van de sfingolipidosen en de groep van de lipidosen resulteert in stapeling van alleen lipiden zonder oligosacchariden (tabel 2). Hierdoor is een voorscreening in urine op deze defecten door middel van oligosaccharide analyse niet mogelijk. Dit betekent dat hier rechtstreeks een beroep zal moeten worden gedaan op enzymbepalingen om een lysosomaal defect te bevestigen dan wel uit te sluiten.

Neuronale Ceroid Lipofuscinosen

Ook voor de groep van de Neuronale Ceroid Lipofuscinosen (NCL's) is geen voorscreening in urine bekend. Voor de infantiele (M. Santavuori-Haltia) en de klassieke laat infantiele vorm (M. Jansky-Bielschowsky) van de NCL's, veroorzaakt door defecten in respectievelijk het *CNL-1* en het *CNL-2* gen is de eiwitdiagnostiek nu op hetzelfde niveau van de andere bekende lysosomale stapelingsziekten. Voor de infantiele vorm is sinds kort een fluorometrisch substraat beschikbaar voor meting van de activiteit van het palmitoyl-protein thioesterase wat geschikt is voor pre- en postnatale enzymdiagnostiek (11). Voor de laat infantiele vorm (*CLN2*) is eveneens een fluorimetrisch substraat beschikbaar voor de bepaling tripeptidyl-peptidase I (12 en 13). Voor de andere NCL types is geen eiwit diagnostiek beschikbaar.

Overige

Enkele lysosomopathieën kunnen alleen in plasma worden aangetoond (mucolipidose II en III). In de zeldzame gevallen waar het enzymdefect moeilijk of niet in leukocyten kan worden aangetoond, kan het vrijwel altijd in gekweekte huidcellen, fibroblasten, worden gemeten. De ziekte van Niemann-Pick C, een defect in de verwerking van cholesterol in de cel, aanleiding gevend tot stapeling van cholesterol in lysosomen, kan alleen in een fibroblasten-kweek worden aangetoond door middel van een fillipinekleuring op het gestapelde cholesterol in de lysosomen van de fibroblasten.

Voor de diverse analyses zijn in de meeste gevallen op commerciële basis de noodzakelijke substraten verkrijgbaar. Meestal gaat het om fluorescentie metingen. Een representatief deel van het natuurlijk substraat van het enzym is gekoppeld aan het 4-methylumbelliferon (4-MU). In deze gekoppelde toestand fluoresceert het methylumbelliferon niet. Na incubatie van het leukocyten materiaal, bij het voor de lysosomale enzymen zure pH optimum, wordt door het te meten enzym het deel van het substraat, dat zijn specificiteit bepaalt afgekoppeld van het 4-MU. Het 4-MU fluoresceert als vrij molecuul na verhoging van de pH. Dit betekent dat na de enzymreactie het reactiemengsel basisch moet worden gemaakt. Voor een aantal van de lysosomale enzymen kan het substraat niet op deze manier, dat wil zeggen met een artificieel substraat, worden nagebootst, omdat het substraat op die manier niet specifiek genoeg is en ook

andere dan het te meten enzym met het substraat kunnen reageren of omdat behalve de af te splitsen groep ook de rest van het molecuul van belang is voor de activiteit van het enzym. In die gevallen wordt een substraat gebruikt, dat qua structuur het natuurlijk substraat zo veel mogelijk benadert. Vaak is dit ook een fluorescerend of een radioactief gelabeld substraat. Voorbeelden van enzymen, waarvoor meer specifieke substraten gebruikt worden zijn galactocerebrosidase en sfinngomyelinase.

De meeste lysosomopathieën erven autosomaal recessief over. De ziekte van Fabry en de ziekte van Hunter zijn voorbeelden van via het X-chromosoom overervende lysosomale ziekten. De enzymatische activiteit bij homozygoten of hemizygoten voor het gendefect is erg laag en varieert van 0 tot circa 10% van de gemiddelde referentiewaarde. Bij heterozygoten van de autosomaal recessief overervende lysosomopathieën wordt een restactiviteit van ongeveer 50% gevonden en worden geen klinische symptomen waargenomen. Voor de X-gebonden lysosomopathieën kunnen bij draagsters door non-random inactivatie van het X-chromosoom wel klinische verschijnselen optreden.

Pseudodeficiënties

Pseudodeficiënties worden gekenmerkt door een lage vaak haast deficiënte activiteit van het gemeten lysosomale enzym, zonder dat dit aantoonbare klinische consequenties heeft. Een bekend voorbeeld is de pseudodeficiëntie bij de metachromatische leukodystrofie. Twee mutaties, verantwoordelijk voor het merendeel van de pseudodeficiëntie allelen, zijn in het arylsulfatase gen aangetoond. Bij homozygoten voor deze mutaties wordt een activiteit gemeten, die 5-15% is van de normale activiteit en in de range ligt van activiteiten die bij echte patiënten wordt gemeten. De frequentie voor de pseudodeficiëntie mutaties, die meestal samen op hetzelfde chromosoom voorkomen is 15-20%. Dit betekent dat zij in homozygote vorm bij 2-4% van de populatie voorkomen (38). De mutaties zijn met behulp van mutatie analyse makkelijk aan te tonen. In een aantal gevallen, homozygotie voor het pseudodeficiëntie allel bijvoorbeeld, kan echter na meting van de enzymactiviteit en pseudodeficiëntie mutatie analyse niet vastgesteld worden of er sprake is van homozygotie voor het MLD allel. In dat geval wordt bij de verdenking op een metachromatische leukodystrofie een lipide analyse op het urinesediment uitgevoerd en het gehalte aan sulfatiden, het stapelingsmateriaal bij de MLD, gemeten. Bij MLD patiënten is dit duidelijk verhoogd, bij pseudodeficiënten is het sulfatide gehalte in het urinesediment niet hoger dan bij personen met een normale activiteit. De lipide analyse geeft in deze gevallen de doorslag voor de diagnostiek.

Chitotriosidase

Chitotriosidase is een plasma enzym afkomstig van geactiveerde macrofagen. Het is een endo- β -glucosaminidase. Chitotriosidase is sterk verhoogd bij patiënten met de ziekte van Gaucher, maar ook verhoogd in mindere mate bij 10 andere lysosomale stapelingsziekten. Een verhoogde waarde wordt ge-

meten bij de meerderheid van de patiënten met de ziekte van Gaucher, Krabbe, GM1-gangliosidose, Niemann-Pick A en B en Niemann-Pick C. De verhoging is secundair aan het primaire defect bij deze deficiënties en is opvallend hoog bij patiënten met de ziekte van Gaucher. De verhoging van het chitotriosidase lijkt karakteristiek voor lysosomale stapelingsziekten, omdat de verhoging niet wordt gezien bij 20 niet-lysosomale enzymdefecten of in plasma van patiënten met hepatomegalie geassocieerd met infecties. Meting van chitotriosidase in plasma kan een waardevolle aanvulling zijn op de diagnostiek van lysosomale stapelingsziekten, omdat een verhoging gemeen bij patiënten zonder diagnose indicatief is voor een defect in het lysosomale proces (39).

Vervolgonderzoek

Wordt een verlaagde enzym activiteit in leukocyten vastgesteld dan wordt in verband met de ernst van de diagnose het onderzoek in leukocyten herhaald en fibroblasten in kweek genomen om het defect in een tweede celtipe te kunnen bevestigen. Gekweekte huidcellen worden bewaard voor eventueel DNA onderzoek en genetisch advies binnen de familie.

Met dank aan:

Dr. O.P. van Diggelen voor zijn commentaar en aanvullingen met betrekking tot de Neuronale Ceroid Lipofuscinosen, waardoor de recente ontwikkelingen voor deze nieuwe groep van lysosomale ziekten verwerkt konden worden.

Literatuur

1. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York: McGraw-Hill, 1995: 2427-2879 en 3763-3797.
2. In: Fernandes J, Saudubray J-M, Van den Berghe G, eds. Inborn metabolic diseases: diagnosis and treatment. Springer Verlag, 1996: 375-395.
3. Suzuki K. Genetic disorders of lipid, glycoprotein, and mucopolysaccharide metabolism. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff PB, eds. Basic neurochemistry. New York: Raven Press, 1993: 793-813.
4. Wevers RA, Lamers KJB, Gabreels FJM. De diagnostiek van lysosomale stapelingsziekten. Tijdschrift NVKC 1987; 12: 40-45.
5. Agranoff BW, Hajra AK. Lipids. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff PB, eds. Basic neurochemistry. New York: Raven Press, 1993: 97-117.
6. Hirabayashi Y, Matsumoto Y, Matsumoto M. et al. Isolation and characterization of major urinary amino acid O-glycosides and a dipeptide O-glycoside from a new lysosomal storage disorder (Kanzaki disease). J Biol Chem 1990; 265: 1693-1701.
7. Peelen GOH, de Jong JGN, Wevers RA. HPLC analysis of oligosaccharides in urine from oligosaccharidosis patients. Clin Chem 1994; 40: 914-921.
8. Kumlien J, Chester MA, Lindberg BS, Pizzo P, Zopf D, Lundblad A. Urinary excretion of a glucose-containing tetrasaccharide. A parameter for increased degradation of glycogen. Clin Chim Acta 1988; 176: 39-48.
9. De Jong JGN, Wevers RA. Glycosaminoglycanen en mucopolysaccharidosen. Tijdschr NVKC 1992; 17: 2-8.
10. Bennett MJ and Hofmann SL. J Inher Metab Dis 1999; 22: 535-544.
11. Diggelen OP van, Keulemans JL, Winchester B, Hofman IL, Vanhanen SL, Santavuori P, Voznyi YV. Rapid fluorogenic palmitoyl-protein thioesterase assay: pre- and postnatal diagnosis of INCL. Mol Genet Metab 1999; 66: 240-4.

12. Vines DJ, Warburton MJ. Classical late infantile ceroid lipofuscinosis fibroblasts are deficient in lysosomal tripeptidyl-peptidase I. *FEBS Letters* 1999; 443: 131-135.
13. Rawlings ND, Barrett AJ. Tripeptidyl-peptidase I is apparently the CLN2 protein absent in classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1429: 496-500
14. De Jong JGN, Aerts JM, van Weely S, Hollak CE, van Pelt J, van Woerkom LM, Liebrand-van Sambeek ML, Wevers RA. Oligosaccharide excretion in adult Gaucher disease. *J Inher Metab Dis* 1998; 21: 49-59.
15. Blom W, Luteyn JC, Kelholt-Dijkman HH, Huijms JGM, Looenen MCB. Thin-layer chromatography of oligosaccharides in urines as a rapid indication for the diagnosis of lysosomal acid maltase deficiency (Pompe's disease). *Clin Chim Acta* 1983; 134: 221-227.
16. De Jong J, van den Berg C, Wijburg H, Willemsen R, van Diggelen O, Schindler D, Hoevenaars F, Wevers R. Alpha-N-acetylgalactosaminidase deficiency with mild clinical manifestations and difficult biochemical diagnosis. *J Pediatr* 1994; 125: 385-391.
17. Warner TG, O'Brien JS. Genetic defects in glycoprotein metabolism. *Ann Rev Genet* 1983; 17: 395-441.
18. Van Pelt J. Isolation and structural analysis of sialyloligosaccharides from sialidosis and galactosialidosis fibroblasts, placenta and urine. 1988. Thesis.
19. Thomas GH, Beaudet AL. Disorders of glycoprotein degradation and structure: α -mannosidosis, β -mannosidosis, fucosidosis, sialidosis, aspartylglucosaminuria, and carbohydrate deficient glycoprotein syndrome. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, 1995: 2529-2561.
20. Warner ThG, Mock AK, Nyhan WL, O'Brien JS. α -Mannosidosis: analysis of urinary oligosaccharides with high performance liquid chromatography and diagnosis of a case with unusually mild presentation. *Clin Gen* 1984; 25: 248-255.
21. Lott IT, Daniel PP. Serum and urinary trisaccharides in mannosidosis. *Neurology* 1981; 31:1159-1162.
22. Dorland L, Duran M, Hoefnagels FET, Breg JN, Fabry de Jonge H, Cransberg K et al. β -Mannosidosis in two brother with hearing loss. *J Inher Metab Dis* 1988; 11: 255-258.
23. Wenger DA, Sujansky E, Fennessey PV, Thompson JN. Human β -mannosidase deficiency. *N Engl J Med* 1986; 315: 1201-1205.
24. Van Pelt J, Kamerling JP, Bakker HD, Vliegenthart JF. A comparative study of sialyloligosaccharides isolated from sialidosis and galactosialidosis urine. *J Inher Metab Dis* 1991; 14: 730-740.
25. Suzuki Y, Sakuraba H, Oshima A. β -Galactosidase deficiency (β -galactosidosis): G_{M1} gangliosidosis and Morquio B disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, 1995: 2785-2823.
26. Okhura T, Yamashita K, Kobata A. Urinary oligosaccharides of G_{M1} -gangliosidosis. *J Biol Chem* 1981; 256: 8485-8490.
27. Warner ThG, Robertson AD, O'Brien JS. Diagnosis of G_{M1} -gangliosidosis based on detection of urinary oligosaccharides with high performance liquid chromatography. *Clin Chem Acta* 1983; 127: 313-326.
28. Sandhoff K, Andrae U, Jatzkewitz H. Deficient hexosaminidase activity in an exceptional case of Tay-Sachs disease with additional storage of kidney globoside in visceral organs. *Life Sci* 1968; 7: 283-288.
29. Gravel RA, Clarke JTR, Kaback MM, Mahuran D, Sandhoff K, Suzuki K. The G_{M2} gangliosidosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, 1995: 2839-2881.
30. Strecker G, Herlant-Peers MC, Fournet B, Montreuil J, Dorland L, Haverkamp J, et al. Structure of seven oligosaccharides excreted in the urine of a patient with Sandhoff's disease (G_{M2} -gangliosidosis-variant O). *Eur J Biochem* 1977; 81: 165-171.
31. Warner ThG, de Kremer RD, Applegarth D, Mock AK. Diagnosis and characterization of G_{M2} gangliosidosis type II (Sandhoff disease) by analysis of accumulating N-acetyl-glucosaminyl oligosaccharides with high performance liquid chromatography. *Clin Chim Acta* 1986; 154: 151-164.
32. Neufeld EF, Muenzer J. The mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, 1995: 2465-2493.
33. Lorincz AE, Hurst RE, Kolodny EH. The early laboratory diagnosis of mucopolysaccharidoses. *Ann Clin Lab Sci* 1982; 12: 258-266.
34. De Jong JGN, Wevers RA, Laarakkers C, Poorthuis BJHM. Dimethylmethylene blue based spectrophotometry of glycosaminoglycans in untreated urine: a rapid screening procedure for mucopolysaccharidosis. *Clin Chem* 1989; 35: 1472-1477.
35. De Jong JG, Wevers RA, Liebrand-van Sambeek R. Measuring urinary glycosaminoglycans in the presence of protein: an improved screening procedure for mucopolysaccharidoses based on dimethylmethylene blue. *Clin Chem* 1992; 38: 803-807.
36. Hopwood JJ, Harrison JR. High-resolution electrophoresis of urinary glycosaminoglycans: an improved screening test for the mucopolysaccharidoses. *Anal Biochem* 1982; 110: 120-127.
37. Ullrich K, Kresse H. Mucopolysaccharidoses. In: Blau N, Duran M, Blaskovics M, eds. *Physician's guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases*. London: Chapman & Hall, 1996: 303-319.
38. Barth ML, Ward C, Harris A, Saad A, Fensom A. Frequency of arylsulphatase A pseudodeficiency associated mutations in a healthy population. *J Med Genet* 1994; 31: 667-671.
39. Guo Y, He W, Boer AM, Wevers RA, de Bruijn AM, Groener JE, Hollak CE, Aerts JM, Galjaard H, van Diggelen OP. Elevated plasma chitotriosidase activity in various lysosomal storage disorders. *J Inher Metab Dis* 1995; 18: 717-722.

Summary

Diagnosis of lysosomal storage diseases. Jong JGN de, Wevers RA, Berg CJM van den, Liebrand-van Sambeek MLF, Rens AAET van and Roelofs HGM. Ned Tijdschr Klin Chem 2000; 25: 13-27.

Most of the lysosomal storage diseases underlies a deficiency of one of the lysosomal enzymes involved in the degradation of macromolecules to their monomolecular building blocks. On basis of clinical symptoms and storage products three main groups can be recognized, the sphingolipidoses, oligosaccharidoses and mucopolysaccharidoses. Mucopolysaccharidoses II and III are caused by a defect in the processing of the lysosomal enzymes, leading to a deficiency of several enzymes together. Lysosomal storage can also be due to a defect in the transport, for example for neuraminic acid, over the lysosomal membrane. For some of the neuronal ceroid lipofuscinoses it has been shown now that they belong to the group of lysosomal storage diseases. Clinical symptoms for the group of lysosomal storage diseases are heterogeneous. The most characteristic are decrease in mental and/or motoric development and hepato- and/or splenomegaly. Screening in urine is possible for 10 oligosaccharidoses by analysis of oligosaccharides and for the mucopolysaccharidoses by measurement of glycosaminoglycan content in urine. A defect in the transport of neuraminic acid can be detected by measurement of this compound in the

urine. When an abnormal oligosaccharide pattern is found or the glycosaminoglycan excretion is increased the concerning lysosomal enzymes are measured in leukocytes, isolated from a blood sample to confirm or exclude the defect. Screening in urine is not possible for most of the sphingolipidoses and for the neuronal ceroid lipofuscinoses. For the sphingolipidoses and some of the neuronal ceroid lipofuscinoses diagnosis can

be made by direct measurement of the various enzymes in leukocytes and/or fibroblasts.

Keywords: lysosomal disease; sphingolipidosis; oligosaccharidosis; mucopolysaccharidosis; neuronal ceroid lipofuscinosis; sphingolipid; oligosaccharide; glycosaminoglycan; screening; urine; lysosomal enzymes

Ned Tijdschr Klin Chem 2000; 25: 27-30

De klinisch-chemische diagnostiek van mitochondriële encephalomyopathieën

L.P. van den HEUVEL, J.M.F. TRIJBELS, A.J.M. JANSSEN en J.A.M. SMEITINK

Mitochondriële encephalomyopathieën zijn ziekten veroorzaakt door structurele en/of functionele afwijkingen van de mitochondriën. Classificatie vindt onder andere plaats op basis van het biochemisch defect. Er bestaat een grote variabiliteit in klinische expressie en structurele en functionele mitochondriële afwijkingen. Een nauwkeurige diagnose is noodzakelijk voor het verstrekken van behandelings- en erfelijkheidsadviezen. De waarde van de bepaling van lactaat en van andere metaboliëten voor de diagnostiek van mitochondriële encephalomyopathieën wordt besproken.

Trefwoorden: mitochondriocytopathie; lactaat; bloed; urine; liquor

Mitochondriën spelen als productie-eenheden van energie een zeer belangrijke rol bij het functioneren van cellen. De energie is nodig voor een uitgebreid scala van processen, zoals warmteproductie, synthese- en transportprocessen. In de spiercellen vereist de contractie veel energie. Deze energie wordt in de vorm van ATP via twee routes in de spiercel aangebracht: via de glycolyse in het cytoplasma van de cel en via de oxydatieve fosforylering in de mitochondriën. Gedurende de laatste decennia zijn veel patiënten beschreven met een stoornis in de mitochondriële energievoorziening van de cel (1,2). Deze defecten werden met name aangetoond bij patiënten lijdend aan een zogenaamde mitochondriële myopathie, een ziekte welke gedefinieerd wordt als spierziekte, gekarakteriseerd door structureel afwijkende mitochondriën en/of abnormaal functionerende mitochondriën. Daar mitochondriën in alle lichaamscellen behalve erythrocyten voorkomen kan in principe ieder orgaan

of weefsel zijn aangedaan. Frequent voorkomende klinische symptomen zijn: spierzwakte, inspanningsintolerantie, hypotonie, cardiomyopathie en aandoeningen van het centrale zenuwstelsel. Uit deze opsomming kan worden afgeleid dat de spierziekte geïsoleerd maar ook als deel van een "multisystem disorder" kan voorkomen. Biochemisch worden mitochondriële myopathieën gekarakteriseerd door stoornissen in de mitochondriële energievoorziening. Deze stoornissen kunnen worden onderverdeeld in:

- Defecten in het transport over het mitochondriële membraan. Als voorbeeld zij genoemd deficiëntie van het carnitine transportsysteem, waardoor langketen vetzuren intramitochondriëel niet geoxideerd kunnen worden, alsmede deficiënties van de adenine nucleotide translocator (ANT) en "voltage dependent anion channel" (VDAC) (3).
- Defecten in de mitochondriële substraatoxidatie. Als voorbeeld kan genoemd worden deficiëntie van één van de enzymen van het pyruvaat-dehydrogenase-complex, waardoor de oxidatie van pyruvaat gestoord is.
- Defecten in één of meer complexen van de mitochondriële ademhalingsketen. Inmiddels zijn defecten in alle complexen beschreven.
- Defecten gepaard gaande met een stoornis in de energieconservering. Het meest bekende voorbeeld in deze categorie is de "Luft disease", waarbij sprake is van losse koppeling van oxidatie en fosforylering (4).

De oxidatieve fosforylering

Mitochondriën zijn subcellulaire organellen die voorkomen in alle kernhoudende cellen. Ze bestaan uit een glad buitenmembraan, een intermembraan ruimte, een geplooid binnenmembraan en een matrix. Het buitenmembraan heeft poriën waardoor kleine moleculen vrij kunnen diffunderen. Het binnenmembraan is ondoorlaatbaar voor de meeste moleculen. Het bevat translocatoren voor transport van onder andere ionen en eiwitten. Een belangrijke functie van mitochondriën is de oxidatieve fosforylering (OXFOS). Hieronder wordt verstaan de oxidatie van brandstoffen en de productie van energie in de vorm van ade-

Laboratorium voor Kindergeneeskunde & Neurologie, Centrum voor Mitochondriële Ziekten, Academisch Ziekenhuis Nijmegen

Correspondentie: Dr. L.P. van den Heuvel, Laboratorium Kindergeneeskunde & Neurologie (424), Academisch Ziekenhuis Nijmegen, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen.
E-mail: B.vandeheuvel@ckslkn.azn.nl