

- through separate endosomes. *J Cell Biol* 1991; 114: 1149-1158.
10. Knisely AS, Magid MS, Dische MR, Crutz E. Neonatale Hemochromatosis. *Birth Defects* 1987; 23: 75-102.
  11. Petry CD, Wobken JD, McKay H, Eaton MA, Seybold VS, Johnson DE, Georgieff MK. Placental transferrin receptor in diabetic pregnancies with increased fetal iron demand. *Am J of Physiol* (in-press).
  12. Barker DJP, Bull AR, Osmond C, Simmonds SJ. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *Br Med J* 1990; 301: 259-262.
  13. Godfrey KM, Redman CWG, Barker DJP, Osmond C. The effect of maternal anaemia and iron deficiency on the ratio of fetal to placental weight. *Br J Obst Gyn* 1991; 98: 886-891.

### Summary

*Developments in the study of iron metabolism. Dijk P van en Eijk HG van. Ned Tijdschr Klin Chem* 1995; 20: 9-13.  
The fetal demand for iron increases during pregnancy. Mater-

nal serum-ferrotransferrin is internalized by the microvillous membrane by receptor-mediated endocytosis. How subsequently iron released from the endosome is transferred across the basolateral membrane is unknown. Puzzling is also the role of the basolateral transferrin receptors and the impact of the shift in complexity of the transferrin glycan chains (iso-transferrin) that occurs during pregnancy on iron transfer. By means of cultured cytotrophoblasts it will be studied whether the different iso-transferrins are processed in the same way at the brushborder and at the basolateral membrane. Iron transfer from mother to fetus is a one-way process. If iron is taken up from the brushborder and from the basolateral side a mechanism has to be postulated that preferentially transfers iron released from endosomes across the basolateral membrane towards the fetal circulation. By means of isolated microvillous plasma membranes and basolateral plasma membranes we will try to identify and eventually characterize the hypothesized mechanism for vectorial iron transport.

*Key-words: placenta; cytotrophoblast cells; iron transfer; transferrin; glycan-chain complexity; basolateral membranes; microvillous plasma membranes.*

*Ned Tijdschr Klin Chem* 1995; 20: 13-20

## Peroxisomale ziekten

R. B. H. SCHUTGENS en R. J. A. WANDERS

**Peroxisomen katalyseren essentiële metabole functies in zoogdiercellen. Bij de mens resulteert een dysfunctie van één of meer peroxisomale enzymen meestal in een ernstige ziekte. Momenteel is reeds bij 16 genetische ziekten herkend dat de biochemische stoornis op het nivo van de peroxisomen ligt. Een opmerkelijke genetische en fenotypische variabiliteit werd bij de meeste peroxisomale ziekten waargenomen. Betrouwbare biochemische methoden zijn beschikbaar voor de postnatale en de prenatale diagnostiek van de peroxisomale ziekten. Recent onderzoek concentreert zich op de opheldering van processen die een rol spelen bij de biogenese van peroxisomen, op de identificatie van de verschillende genetische mutaties alsook op de evaluatie van specifieke therapieën. Bij het biogenese onderzoek blijken gistmutanten waardevolle modelsystemen te zijn.**

Gedurende de laatste 10 jaren is duidelijk geworden dat peroxisomen in zoogdiercellen betrokken zijn bij essentiële metabole functies en dat - bij de mens - een deficiëntie van één of meer peroxisomale enzymen vrijwel altijd leidt tot een ernstige ziekte. Recent is tevens gebleken dat een ontregeling van het cellulaire

metabolisme en tumorvorming als gevolg van toxische agentia kan leiden tot een sterke proliferatie van peroxisomen, hetgeen suggereert dat ook bij deze processen peroxisomen een rol spelen (1).

Zelf zijn wij bij het peroxisomaal onderzoek betrokken geraakt in 1981 toen in het voormalige Binnengasthuis te Amsterdam kort na elkaar twee kinderen werden opgenomen met het cerebro-hepato-renaal (Zellweger) syndroom. Dit is een ernstige, onbehandelbare ziekte die reeds voor de geboorte tot expressie komt en waaraan vrijwel alle patiënten in het eerste levensjaar overlijden. De klinische karakteristieken waren toen reeds goed beschreven, maar er was weinig bekend over de biochemische achtergrond van het syndroom. De ouders van onze patiënten drongen aan op nader onderzoek en de ontwikkeling van een methode voor prenatale diagnostiek.

Op een door de kinderartsen W. H. H. Tegelaers en H. S. A. Heymans in 1982 belegde bijeenkomst werd door P. Borst (hoogleraar klinische biochemie, UvA) de hypothese geformuleerd dat het Zellweger syndroom veroorzaakt wordt door een peroxisomale dysfunctie. Onderzoek in de literatuur lag ten grondslag aan deze veronderstelling. Veel biochemisch onderzoek werd op dat moment verricht aan mitochondriale en aan lysosomale processen, maar het peroxisoom was een veronachtzaamd celorganel.

Aan de (klinisch) chemici van de Vakgroep Kinderneeskunde in het voormalige Binnengasthuis, Amsterdam werd de toetsing van bovenstaande hypothe-

*Klinisch Chemisch Laboratorium, Academisch Ziekenhuis, AMC, Amsterdam*

Correspondentie: Dr. R. B. H. Schutgens, Academisch Medisch Centrum, Meibergdreef 9, 1105 AZ Amsterdam.

**Tabel 1.** Functies van peroxisomen in humane cellen

*Anabole functies*

- Plasmalageen biosynthese\*
- Biosynthese van primaire galzuren\*
- Cholesterol biosynthese
- Glyoxylaat transaminering\*
- Dolichol biosynthese

*Katabole functies*

- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-genererende cellulaire ademhaling
- Bèta-oxidatie van:
  - Vetzuren (langketen/zeer langketen/vertakte keten)
  - Langketen dicarbonzuren
  - Prostaglandines
  - Xenobiotica
- L-pipecolinezuur oxidatie
- Ethanol oxidatie
- Purine afbraak
- Polyamine afbraak

\*: metabole route partieel peroxisomaal

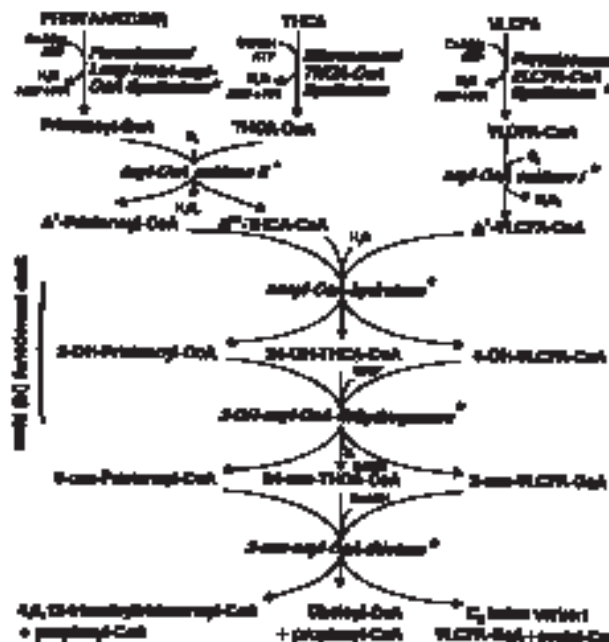
se toevertrouwd. In nauwe samenwerking met biochemici van de Vakgroepen Biochemie der RUU (H. van den Bosch en G. Schrakamp) en UvA (J. M. Tager, A. Schram en recent H. F. Tabak) en met de collega's van de Kindergeneeskunde in Nijmegen KUN (J. M. F. Trijbels en J. Bakkeren) en diverse klinici van de afdelingen Kindergeneeskunde UvA en KUN (L. Monnens) werd binnengedrongen in de wereld van de peroxisomen.

Het klinisch en biochemisch onderzoek op dit gebied heeft sindsdien veel informatie opgeleverd over de functies van peroxisomen in de humane cel. Bij een zestiental genetische ziekten is duidelijk geworden dat de oorzaak van de ziekten ligt op het nivo van een peroxisomale dysfunctie. Mede door een intensieve internationale coöperatie konden in relatief korte tijd aanzienlijke vorderingen gemaakt worden (2-5). Een tiental dissertaties (UvA, KUN, RUU) en meer dan 200 artikelen in internationale vaktijdschriften kwamen tot stand.

Hiermee wordt wellicht ten overvloede aangetoond dat klinisch-chemische laboratoria naast een taak bij de diagnostiek ook een belangrijke rol kunnen spelen bij grensverleggend wetenschappelijk onderzoek.

**Peroxisomen**

Peroxisomen (microbodies) werden pas in de vijftiger jaren ontdekt in zoogdiercellen door electronenmicroscopische studies en vervolgens biochemisch gekarakteriseerd in de zestiger jaren door de Duve en medewerkers (6). Laatstgenoemden definieerden het peroxisoom als een celorganel dat ten minste één H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producerend flavine-oxidase bevat en catalase. In zoogdiercellen komen peroxisomen in alle celtypen voor met uitzondering van de rijpe erythrocyt. De grootte en de enzyminhoud en daarmee de functie van het celorganel kan variëren per organisme en celtype. In lever- en niercellen worden grotere peroxisomen gevonden dan in andere celtypen. Peroxisomen



**Figuur 1.** Het peroxisomale  $\beta$ -oxidatie systeem van pristaanzuur, zeer lang keten vetzuren (VLCFA's), en trihydroxycholestaanzuur in de humane lever. De peroxisomale enzymen zijn met een \* aangegeven.

zijn specifiek zichtbaar te maken met een cytochemische kleuringsprocedure met alkalisch 3,3'-diaminobenzidine (DAB) waarbij gebruik gemaakt wordt van de catalase activiteit in het celorganel (7), met immunocytochemische procedures of met immunofluorescentie microscopie waarbij antisera gebruikt worden die opgewekt zijn tegen peroxisomale matrix- of membraaneiwwitten (8, 9).

Peroxisomen zijn talrijk in cellen die gespecialiseerd zijn in het vetmetabolisme en ook in zenuwweefsel. Ook in oligodendrocyten, die myeline produceren in het centrale zenuwstelsel, zijn veel peroxisomen aanwezig.

Anabole en katabole processen waarbij peroxisomen in humane cellen betrokken zijn staan vermeld in tabel 1.

Dit betreft de peroxisomale ademhaling waarbij met name in de lever een aantal oxidasen reacties katalyseren waarbij H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gegenereerd wordt met substraten als L- $\alpha$ -hydroxyzuren, D- en L-aminozuren, vetzuur-CoA-esters, polyamines, oxalaat, L-pipecolinezuur en glutaryl-CoA. Vervolgens wordt dit toxische H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o.i.v. catalase afgebroken, waarbij substraten als alcohol en nitriet betrokken kunnen zijn.

Een belangrijk metabool proces in de peroxisomen is de peroxisomale  $\beta$ -oxidatie waarbij verzadigde en (poly) onverzadigde langketen (C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub>), zeer langketen (>C<sub>22</sub>) en vertakte keten vetzuren (o.a. pristaanzuur) worden gemetaboliseerd, maar ook intermediairen in de biosynthese van primaire galzuren (di- en trihydroxycholestaanzuur, DHCA/THCA), dicarbonzuren, xenobiotica met een acyl zijketen en prostaglandines. De enzymen betrokken bij de peroxisomale  $\beta$ -oxidatie staan aangegeven in figuur 1. Het peroxisomale  $\beta$ -oxidatie systeem is geen duplicatie van

**Tabel 2.** Peroxisomale ziekten

*A. Geeneraliseerd verlies van peroxisomale functies*

- Zellweger (cerebro-hepato-renaal) syndroom (ZS)
- Neonatale adrenoleukodystrofie (NALD)
- Infantiele type van ziekte van Refsum

*B. Multipel verlies van peroxisomale functies*

- Chondrodysplasia punctata, rhizomele type (RCDP)
- "Zellweger-like syndrome".

*C. Enkelvoudig verlies van peroxisomale functies*

1. Stoornissen in peroxisomale beta-oxidatie

- X-gebonden Adrenoleucodystrofie
- AcylCoA oxidase deficiëntie (pseudo NALD)
- Multi (bi) functioneel eiwit deficiëntie
- Peroxisomaal thiolase deficiëntie (Pseudo ZS)

2. Overige stoornissen

- Klassieke vorm van ziekte van Refsum
- Mevalonaat kinase deficiëntie
- Hyperoxaalurie type I
- Acatlasemie
- AcylCoA: dihydroxyacetonfosfaat acyltransferase deficiëntie
- Alkyl-dihydroxyacetonfosfaat synthetase deficiëntie
- GlutarylCoA oxidase deficiëntie

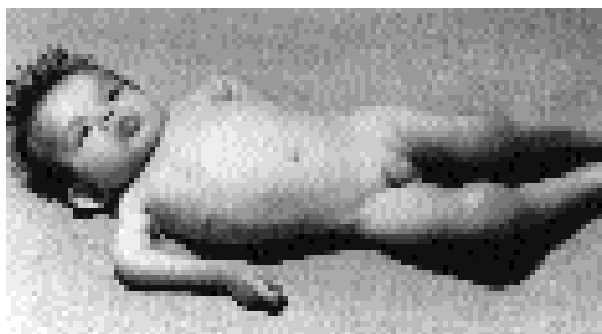
het vergelijkbare mitochondriale systeem, maar heeft een eigen substraatspecificiteit en een eigen set van enzymen.

Dysfunctie van het peroxisomale  $\beta$ -oxidatiesysteem door een deficiëntie van één of meerdere enzymen van het systeem leidt tot ernstige ziekte. Het is duidelijk geworden dat bepaalde functies van de peroxisomale  $\beta$ -oxidatie niet overgenomen kunnen worden door de mitochondriale  $\beta$ -oxidatie.

Peroxisomen spelen ook een essentiële rol in de biosynthese van etherfosfolipiden aangezien de twee enzymen die zorgdragen voor de introductie van de etherbinding, te weten acylCoA: dihydroxyacetonfosfaacyltransferase (DHAPAT) en alkyl-dihydroxyacetonfosfaatsynthetase (DHAP-S) exclusief in peroxisomen gelokaliseerd zijn (10). Etherfosfolipiden en met name de plasmalogenen (1-0-alk-1'-enyl-2-acyl-fosfoglyceriden) maken in hersenen meer dan 50% uit van de fosfolipiden in de celmembranen en zijn kennelijk essentieel voor de membraan functies. Defecten in de plasmalogenen-synthese lijden tot ernstige ziekten.

In de humane lever is het peroxisomale enzym alanine: glyoxylaaminotransferase (AGT) onontbeerlijk in het katabolisme van glyoxylaate. Een deficiëntie van dit enzym leidt tot hyperoxaalurie en ophopingen van glyoxylaate en oxalaate in weefsels en lichaamsvloeistoffen (11).

Recent is duidelijk geworden dat peroxisomen in staat zijn cholesterol te synthetiseren. Peroxisomen bevatten enzymen als acetoacetyl-CoA-thiolase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-reductase en mevalonaatkinase (12). Bovendien is sterol carrier protein-2



**Figuur 2.** Patiënt met het rhizomele type van chondrodysplasia punctata. De craniofaciale karakteristieken en de rhizomele verkorting van de bovenarmen is kenmerkend (foto beschikbaar gesteld door Dr. Faustina Lalatta, Milaan, Italië).

voornamelijk in de peroxisomen gelokaliseerd. Het is echter nog onduidelijk wat de fysiologische betekenis is van dit peroxisomale systeem voor cholesterolbiosynthese.

Peroxisomen zijn verder nog betrokken bij het metabolisme van o.a. pipercolinezuur (13), fytaanzuur (14), mevalonzuur (15), dolicholen en andere metabolieten (zie overzichten door Van den Bosch et al (16) en Lazarow en Moser (17)).

Veel kennis over functies van peroxisomen is in de afgelopen 10 jaren vergaard door onderzoek van lichaamsvloeistoffen, weefsels, gekweekte huidfibroblasten en spiercellen van Zellweger patiënten. Reeds in 1973 hadden Goldfischer en medewerkers gemeld dat bij elektronenmicroscopisch onderzoek van lever en niercellen van Zellweger patiënten geen peroxisomale structuren aantoonbaar zijn (18). Bij deze patiënten bleken in de tachtiger jaren ook de meeste peroxisomale functies in de cellen deficiënt waardoor vrijwel alle metabole processen waarbij peroxisomen betrokken zijn verstoord zijn, hetgeen tot een groot aantal metabole afwijkingen leidt. Het beschikbaar zijn van dit unieke 'modelsysteem' heeft de voortgang van het biochemisch onderzoek van peroxisomen zeer bevorderd. Goldfischer en medewerkers beschreven in deze publikatie tevens mitochondriale afwijkingen in weefsels van Zellweger patiënten. Momenteel worden deze mitochondriale abnormaliteiten als secundaire fenomenen gezien.

Net als mitochondrieën en chloroplasten vermenigvuldigen peroxisomen zich door deling. Peroxisomen bevatten geen DNA, hetgeen impliceert dat alle peroxisomale eiwitten gecodeerd worden door nucleaire genen. Alle peroxisomale eiwitten (matrixeiwitten en integrale membraaneiwitten) worden op vrije polyribosomen in het cytoplasma gesynthetiseerd en posttranslationeel opgenomen in het peroxisoom met halfwaardetijden in het cytosol van 1-15 minuten. Vrijwel alle peroxisomale eiwitten worden op hun finale grootte gesynthetiseerd d.w.z. dat zij bij opname in het peroxisoom niet in lengte verkort worden. Een uitzondering is het peroxisomale 3-oxoacyl-CoA-thiolase eiwit dat in humane cellen als een 44-kDa-precursor gesynthetiseerd wordt en vervolgens uitrijpt tot een 41 kDa-eiwit in de peroxisomale matrix.

Veel experimenteel werk richt zich op de ontrafeling van de verschillende facetten van het importproces van peroxisomale eiwitten. Subramani et al toonden aan dat veel peroxisomale eiwitten herkend worden door receptoren op de peroxisomale membraan doordat zij het N-terminale tripeptide-Ser-Lys-Leu (SKL) als peroxisomale postcode ("targetting sequence") bezitten (19). Sommige peroxisomale eiwitten hebben echter C-terminaal of intern in de eiwitketen andere peroxisomale postcodes (20). Er bestaan dus kennelijk verschillende mechanismen voor import van peroxisomale eiwitten.

In samenwerking met de groep van Tabak en medewerkers (Biochemie, UvA) worden twee modelsystemen gebruikt om de biogenese van peroxisomen nader te bestuderen en wel *Saccharomyces Cerevisiae* en Chinese hamster ovariumcellen (CHO cellen). Gistmutanten werden gegenereerd met defecten op het nivo van de biogenese van peroxisomen, zoals de pas-7-mutant met een deficiënte import van peroxisomaal thiolase en de pas-10-mutant met een defecte import van SKL-eiwitten. (21). Dit onderzoek is van groot belang voor de opheldering van processen, die een rol spelen bij de import van nieuw gesynthetiseerde peroxisomale eiwitten in peroxisomen in eukaryote cellen en in het verlengde daarvan, voor de opheldering van de primaire defecten die bij de mens leiden tot genetische ziekten t.g.v. stoornissen op het nivo van de biogenese van peroxisomen (22). Bij onderzoek aan andere gistmutanten met deficiënties van enzymen als malaatdehydrogenase, citraatsynthase of carnitine-acyltransferase werden aanwijzingen gevonden dat de peroxisomale membraan impermeabel is voor bepaalde metabolieten en dat voor substraatimport in peroxisomen specifieke importsystemen vereist zijn.

### **Peroxisomale ziekten**

Momenteel zijn er tenminste 16 genetische ziekten bekend die veroorzaakt worden door een peroxisomale dysfunctie (tabel 2). Aangezien van de meeste van deze ziekten het exacte genetische defect nog niet bekend is, wordt meestal een indeling gemaakt in drie subgroepen.

Bij de ziekten in subgroep A ontbreken functionele peroxisomen geheel of vrijwel geheel in alle celtypen door één of meer defecten in de biogenese van het celorganel. Zellweger syndroom behoort tot deze subgroep. Het is een lethale ziekte met een autosomaal recessieve overerving die gekenmerkt wordt door dysmorphogenese, ernstige neurologische dysfuncties, neurosensore defecten, psychomotore retardatie, ernstige spierhypotonie, oogafwijkingen, convulsies en renale (micro)cysten. Neuropathologisch onderzoek van de hersenen laat afwijkingen zien als neuronale migratiedefecten, dysplasie, vetstapeling in astrocyten en macrofagen en een myelinetekort. Neonatale adrenoleukodystrofie (NALD) en vooral het infantiele type van de ziekte van Refsum (IRD) zijn klinisch mildere ziekten uit deze subgroep (23).

Complementatie proeven met fibroblasten van patiënten uit deze subgroep lieten een opmerkelijke genetische variabiliteit zien met tenminste 9 verschillende

complementatiegroepen (24).

Er werd geen duidelijke relatie tussen genotype en fenotype gevonden. Slechts bij een tweetal Zellweger patiënten (een Japanse en een Kaap Verdische patiënt) is het primaire biochemische defect nu bekend (24). Dit defect bleek een puntmutatie te zijn in het gen van een peroxisomaal 35 kDa membraaneiwit (PAF-1 = peroxisome assembly factor-1). De mutatie leidt tot een premature terminatie bij de translatie van het eiwit en daarmee tot een peroxisomaal biogenese defect. Kennelijk is dit 35kDa membraan eiwit essentieel voor een stabiele peroxisomale structuur.

Een effectieve behandelingsmethode van deze ziekten is ondanks de toename van kennis over de biochemische achtergronden van de ziekten nog niet beschikbaar. Preventie d.m.v. prenatale diagnostiek is dan ook essentieel (zie onderstaand).

Tot de subgroep B behoort het rhizomele type van chondrodysplasia punctata (RCDP). Deze autosomaal recessieve ziekte wordt gekarakteriseerd door een dysproportie van met name de proximale delen van de extremiteiten, dwerggroei, craniofaciale afwijkingen, cataract, ernstige psychomotore retardatie en calcificaties van de epifysair schijven (figuur 2). In gekweekte fibroblasten zijn de peroxisomale structuren normaal aanwezig; of dat ook in de lever het geval is, is nog niet geheel duidelijk. Biochemisch onderzoek wees uit dat er bij RCDP-patiënten defecten zijn in de plasmalageenbiosynthese t.g.v. een deficiëntie van DHAPAT, maar vooral van DHAP-S naast een defect in de metabolisering van fytaanzuur en een defecte maturatie van het peroxisomale thiolase eiwit. Het merendeel van de patiënten overleeft het eerste levensjaar; overleving is zelfs mogelijk tot in de derde decade. Een effectieve behandelingsmethode is niet beschikbaar. Ook voor deze ziekte is preventie belangrijk.

Een groot aantal peroxisomale ziekten behoort tot de subgroep C. Peroxisomen zijn bij deze ziekten normaal in grootte en aantal in alle cellen. Er is een deficiëntie van één enkel peroxisomaal enzym. Diverse ziekten met een defect op het niveau van één van de peroxisomale beta-oxidatie-enzymen zijn bekend.

Talrijk zijn de patiënten die lijden aan X-gebonden adrenoleukodystrofie (X-ALD). De klinische presentatie van deze ziekte varieert enorm (25). De ernstigste variant is de juveniele vorm ("childhood type") die zich bij jongens op de leeftijd van zes tot acht jaar manifesteert met klachten van het centrale zenuwstelsel. Dit juveniele type is sterk progressief en leidt binnen enige jaren tot de dood. Adrenomyeloneuropathie (AMN) is een andere, veel voorkomende variant die zich in het 3e en 4e decade manifesteert door myelopathie met polyneuropathie en stoornissen van de bijnier ("Addison disease"). Het is opmerkelijk dat deze en andere fenotypen van de ziekten binnen één en dezelfde familie kunnen voorkomen. Vrouwen die heterozygoot zijn voor X-ALD kunnen na hun 50e levensjaar AMN-achtige verschijnselen vertonen.

De biochemische abnormaliteit bij X-ALD, de stape-

**Tabel 3.** Biochemische methoden voor prenatale diagnostiek van peroxisomale ziekten

	ZS/NALD/IRD	RCDP	X-ALD
<i>Vruchtwatercellen</i>			
<i>chorionfibroblasten</i>			
<i>(AFC/CVF)</i>			
VLCFA's	+	-	+
de novo plasmalageen biosynthese(36)	+	+	-
DHAP-AT activiteit(37)	+	+	-
<i>Chorion cellen (CVB)</i>			
VLCFA's	-	-	-
DHAP-AT activiteit	+	+	-
Plasmalageen gehalte	+	+	-
Immunoblot(thiolase)(31)	+	+	-
Fytaanzuur oxidase activiteit	+	+	-

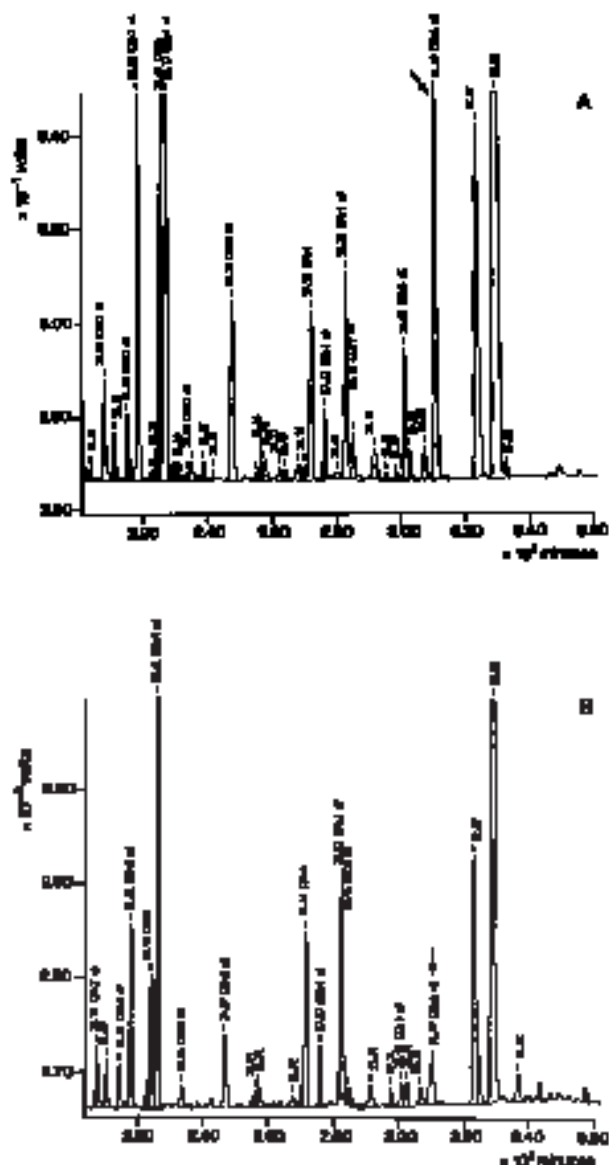
ZS: Zellweger syndroom; NALD: neonatale adrenoleukodystrofie; IRD: infantiele type van ziekte van Refsum; RCDP: rhizomele chondrodysplasia punctata; VLCFA's: zeer langketen (>C22) verzadigde vetzuren; DHAP-AT: acylCoA, dihydroxyacetonfosfaat acyltransferase; +: in de praktijk toegepaste, relevante methode voor diagnostiek; -: methode geeft geen relevante uitkomsten voor diagnostiek.

ling van zeer langketen (> C22) vetzuren (VLCFA's) in weefsels, bloed en gekweekte cellen, wordt veroorzaakt door een gestoorde peroxisomale activering van VLCFA's tot hun CoA-esters door een deficiëntie van VLCFA-CoA-synthetase (figuur 1) (26). Men veronderstelt dat de accumulatie van VLCFA's in gangliosiden in de hersenen leidt tot instabiliteit en afbraak van myeline in de neuronen. Ontstekingsprocessen en cytokines spelen hierbij een rol (27).

In 1993 hebben de groepen van Jean Louis Mandel en Patrick Aubourg uit Straatsburg resp. Parijs het ALD-gen gelokaliseerd in het Xq28 gebied en vervolgens gekarakteriseerd (28). Verrassend is dat het ALD-gen codeert voor een peroxisomaal transporteiwit. Het ALD-eiwit bleek bij vrijwel alle X-ALD-patiënten afwezig (29). Men neemt aan dat het ALD-eiwit betrokken is bij het transport en/of de activering van VLCFA-CoA-synthetase. Een groot aantal verschillende mutaties in het ALD-gen is inmiddels bij patiënten gevonden (30). Er kon tot nu toe geen relatie tussen het genotype en fenotype worden vastgesteld.

Beenmergtransplantatie met een HLA-identieke, MLC-negatieve donor is vooralsnog de enige effectieve behandelingsmethode gebleken voor een beperkt aantal patiënten met het juveniele type die nog in de beginfase van de ziekte zijn. In 1994 is de eerste transplantatie bij een Nederlandse patiënt met dit type X-gebonden ALD uitgevoerd in Leiden. In de Verenigde Staten van Amerika en in Frankrijk zijn tot nu toe een dertig patiënten met X-ALD op deze wijze behandeld.

Dieettherapie d.m.v. vetbeperking en suppletie met oliezuur (C18:1 $\omega$ 9) en erucaanzuur (C22:1 $\omega$ 9) is bij honderden X-ALD/AMN-patiënten die aan mildere



**Figuur 3.** Gaschromatografische fraktionering van methylesters van vetzuren in plasma van een controle (A) en een Zellweger patiënt (B). Fraktionering werd uitgevoerd met een Hewlett Packard 5890 gaschromatograaf met een capillaire kolom (SP-2330; Supelco) met "splitless" injectiesysteem, een temperatuurgradiënt van 50-250 °C en een FID-detektor. Docosahexeenzuur (C22:6 $\omega$ 3) is met een pijl aangegeven.

varianten lijden uitgetest. De klinische effecten zijn teleurstellend ondanks het feit dat de behandeling resulteert in een normalisatie van VLCFA's in het bloed (31).

Binnenkort zal een internationale studie gestart worden waarbij het effect van beta-interferon bij de patiënten, waarvoor geen geschikte donor gevonden kan worden, in beeld gebracht zal worden. Een vergelijkbare studie lijkt bij patiënten met multiple sclerose een gunstig effect te hebben. Ondanks de grote fenotypische variabiliteit van X-ALD is er toch behoefte aan prenatale diagnostiek. Hiervoor zijn biochemische en moleculair biologische technieken ontwikkeld, die alleen ingezet worden nadat is vastgesteld dat het geslacht van de foetus mannelijk is (tabel 3).

In de afgelopen jaren werden door ons m.b.v. biochemisch onderzoek ook tientallen patiënten gediagnostiseerd met een ziekte t.g.v. een stoornis van de peroxisomale beta-oxidatie op het niveau van ofwel acylCoA-oxidase, ofwel multi(bi) functioneel eiwit ofwel peroxisomaal thiolase (zie figuur 1). Alle overige peroxisomale functies zijn bij deze patiënten normaal. Andere peroxisomale ziekten uit subgroep C zijn een gevolg van stoornissen in de biosynthese van plasmalogenen (DHAP-AT- of DHAP-S-deficiëntie), ofwel in de metabolisering van glyoxylaet of van phytaanzuur (zie tabel 2).

### Diagnostiek

De postnatale biochemische diagnostiek van de verschillende peroxisomale ziekten richt zich op de vaststelling van specifieke metabole afwijkingen bij deze ziekten (5,17,32).

Een belangrijke parameter bij de diagnostiek van de ziekten uit subgroep A en de ziekten met een gestoorde peroxisomale beta-oxidatie uit subgroep C is de vaststelling van een accumulatie van VLCFA's en meestal van galzuurintermediären (THCA/DHCA) en pristaanzuur in plasma. Ook in fibroblasten van patiënten is het VLCFA gehalte sterk verhoogd. Tevens is het plasmaprofiel van de poly-onverzadigde vetzuren afwijkend bij Zellweger patiënten omdat met name de concentratie van docosahexeenzuur (C22:6 $\omega$ 3) bij Zellweger patiënten sterk verlaagd is (figuur 3). De plasma C22:6 $\omega$ 3 concentratie is 2-33  $\mu$ mol/l (n=9) bij patiënten; controles 75-180  $\mu$ mol/l (n=29). Bij gezonde personen wordt veel docosahexeenzuur gevonden in membraanfosfolipiden in het centrale zenuwstelsel en in fotoreceptorcellen. Bij Zellweger patiënten wordt ook in deze celtypen een deficiëntie van dit poly-onverzadigde vetzuur gevonden. Behandeling met dieet van een tweetal IRD-patiënten gedurende een periode van een jaar met C22:6 $\omega$ 3 leidde tot enige verbetering van de visus (Barth et al, ongepubliceerde waarnemingen).

Bij de ziekten uit subgroep A en B, bij DHAPAT-deficiëntie en DHAP-S-deficiëntie is de plasmalogeensynthese gestoord hetgeen met name in fibroblasten goed vast te stellen is. Fytaan-zuur accumuleert in plasma bij patiënten met een ziekte uit subgroep A en B en bij de adulte vorm van de ziekte van Refsum. De geïnteresseerde lezer verwijzen wij voor alle diagnostische details naar diverse recente overzichtsartikelen (4,16,17,32).

Prenatale diagnostiek is bij de meeste peroxisomale ziekten geïndiceerd. Betrouwbare biochemische methodieken werden ontwikkeld (tabel 3) (33,34).

Aanvankelijk werd in zwangerschappen met een herhalingsrisico voor één der peroxisomale ziekten biochemisch onderzoek gedaan met gekweekte vruchtwatercellen. De diagnose komt dan pas in de 18<sup>e</sup> of 19<sup>e</sup> zwangerschapsweek beschikbaar. Vervolgens werden door ons methodieken uitgewerkt met gekweekte chorionfibroblasten waardoor de uitslag reeds in de 12<sup>e</sup> of 13<sup>e</sup> week bekend is. Momenteel diagnostiseren wij ziekten uit de subgroepen A en B meestal direkt in chorioncellen (CVB), waardoor de

diagnose reeds in de 9e of 10e zwangerschapsweek aan de ouders kan worden meegedeeld.

Tot nu toe werden door ons in CVB 54 zwangerschappen met een risico voor ZS of NALD onderzocht, waarbij 14 (25,9%) aangedane foeten werden gediagnostiseerd. In 14 zwangerschappen met een RCDP-risico identificeerden wij 4 (28,5%) aangedane foeten. Er werden tot nu toe voor deze ziekten geen vals positieve of vals negatieve diagnoses gesteld.

Prenataal onderzoek voor X-ALD richt zich op bepaling van VLCFA niveau's in gekweekte chorionfibroblasten (CVF) en/of vruchtwatercellen. Bij het werken met CVF bestaat een risico voor maternale overgroei in de celkweek. Door ons werden in 22 zwangerschappen met een herhalingsrisico voor X-ALD, waarbij de foetus mannelijk was, 9 aangedane foeten gediagnostiseerd. Ook bij andere ziekten uit subgroep C met een gestoorde peroxisomale beta-oxidatie werden prenatale diagnoses gesteld (33).

De volgende uitdaging is pré-implantatie-diagnostiek m.b.v. enzymatische of moleculair diagnostische methoden. Hierbij worden eicellen in vitro bevrucht met spermacellen, waarna de embryo's uitgroeien tot een vier- of achtcellen stadium. Vervolgens wordt één enkele cel van de embryo gesepareerd voor genetische analyses. Slechts embryo's waarvan is vastgesteld, dat zij het specifieke genetische defect niet bezitten worden vervolgens in de baarmoeder geplaatst in de hoop dat er een zwangerschap ontstaat (34).

### Toekomstig onderzoek

Momenteel wordt veel onderzoek gedaan naar diverse aspecten van de biogenese van peroxisomen. Bovenstaand is aangegeven dat het recent beschikbaar komen van gistmutanten daarbij uitermate nuttig gebleken is en het onderzoek verder zal stimuleren. De verwachting is dat onderzoek op korte termijn duidelijk zal maken welke primaire defecten ten grondslag liggen aan de peroxisomale ziekten uit de subgroepen A en B en welke nucleaire genen hierbij een rol spelen. Aansluitend zal mutatie-analyse mogelijk worden en zullen wellicht mogelijkheden voor effectieve therapie gecreëerd worden.

Bij X-ALD zal onderzoek duidelijk moeten maken wat de functie is van het ALD-eiwit en wat de relatie is tussen een defect op het niveau van het ALD-eiwit en de waargenomen VLCFA-synthetase-deficiëntie. Tevens zal duidelijk worden of  $\beta$ -interferon en/of andere medicamenten een nuttig effect sorteren voor patiënten.

Complementatie-proeven zullen nodig zijn om een groot aantal patiënten, die lijden aan een ziekte t.g.v. een defect in de peroxisomale beta-oxidatie uit subgroep C te classificeren.

Tenslotte zal er naar wij hopen door onderzoek meer duidelijk worden omtrent de relatie tussen biochemisch defect en klinische expressie.

Waarschijnlijk zullen er in de komende jaren meer genetische ziekten herkend worden met een peroxisomale dysfunctie.

## Literatuur

1. Mauad TH, Nieuwkerk CMJ van, Dingemans KP, Smit JJM, Schinkel AF, Notenboom RGE, Bergh Weerman MA van den, Verkruijsen RP, Groen AK, Oude Elferink RPJ, Valk MA van der, Borst P, Offerhaus GJA. Mice with homozygous disruption of the *mdr2* P-glycoprotein gene: a novel animal model for studies of nonsuppurative inflammatory cholangitis and hepatocarcinogenesis. *Am J Pathol* 1994; in press.
2. Schutgens RBH, Heymans HSA, Wanders RJA, Bosch H van de, Borst P. Peroxisomale disorders: A newly recognized group of genetic diseases. *Eur J Pediatr* 1986; 144: 430-440.
3. Wanders RJA, Heymans HSA, Schutgens RBH, Barth PG, Bosch H van de, Tager JM. Peroxisomal disorders in neurology. *J Neurol Sci* 1988; 88: 1-39.
4. Schutgens RBH, Bouman IW, Nijenhuis AA, Wanders RJA, Frumau MEJ. Profiles of very long chain fatty acid in plasma, fibroblasts and bloodcells in Zellweger syndrome, X-linked adrenoleukodystrofie and rhizomelic chondrodysplasia punctata. *Clin Chem* 1993; 39: 1632-1637.
5. Wanders RJA, Schutgens RBH, Barth PG, Tager JM, Bosch H van de. Postnatal diagnosis of peroxisomal disorders: A biochemical approach. *Biochimie* 1993; 75: 265-279.
6. Duve C de, Baudhuin P. Peroxisomes (microbodies and related particles). *Phys Rev* 1966; 46: 323-357.
7. Fahimi HD. Cytochemical localisation of peroxidase activity in rat hepatic microbodies (peroxisomes). *J Histochem Cytochem* 1968; 16: 547-550.
8. Yokota S, Völkl P, Hashimoto T, Fahimi HD. Immunoelectron microscopy of peroxisomal enzymes: their substructural association and compartmentalization in rat kidney peroxisomes. In: Fahimi HD, Sies H. (eds). *Peroxisomes in biology and medicine* 1987; Springer, Berlin p. 115-127.
9. Brul S, Wiemer EAC, Oosthuizen M et al. Genetic heterogeneity in inherited disorders with a generalized impairment of peroxisomal functions: Visualisation by immunofluorescence microscopy of peroxisome assembly after somatic cell fusion of complementary cell lines. In: Azzi A, Dranota Z, Pappa S (eds). *Molecular basis of membrane associated diseases* 1988; Springer, Berlin p. 420-428.
10. Hajra AK, Bishop JE. Glycerolipid biosynthesis in peroxisomes via the acyl dihydroxyacetone phosphate pathway. *Ann N Y Acad Sci* 1982; 386: 170-182.
11. Danpure C. Recent advances in the understanding, diagnosis and treatment of primary hyperoxaluria type I. *J Inher Met Dis* 1989; 13: 363-366.
12. Krisans SK. The role of peroxisomes in cholesterol metabolism. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 7: 358-364.
13. Wanders RJA, Romeyn GJ, Schutgens RBH, Tager JM. Pipecolate oxidase: a distinct peroxisomal enzyme in man. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 104: 550-555.
14. Singh I, Pahan K, Singh AK, Barbosa E. Refsum disease: a defect in the  $\alpha$ -oxidation of phytanic acid in peroxisomes. *J Lipid Res* 1993; 34: 1755-1764.
15. Wanders RJA, Romeijn GJ. Mevalonate kinase, a peroxisomal enzyme and its deficient activity in liver but not fibroblasts from Zellweger patients. Abstract 32th SSIEM Annual Meeting, Edingburgh, UK. 1994; p. 171.
16. Bosch H van den, Schutgens RBH, Wanders RJA, Tager JM. Biochemistry of peroxisomes. *Ann Rev Biochem* 1992; 61: 157-197.
17. Lazarow P, Moser HW. Disorders of peroxisome biogenesis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). *The metabolic basis of inherited disease* 1989; 6th edition. Mc Graw-Hill, New York p. 1479-1509.
18. Goldfischer S, Moore CL, Johnson AB et al. Peroxisomal and mitochondrial defects in the cerebro-hepato-renal syndrome. *Science* 1973; 183: 62-64.
19. Subramani S. Targetting of proteins into the peroxisomal matrix. *J Membrane Biol* 1992; 125: 99-106.
20. Swinkels BW, Gould SJ, Bodnar AG, Rachubinski RA, Subramani S. A novel cleavable peroxisomal targeting signal at the amino terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. *EMBO J* 1991; 10: 3255-3262.
21. Leij I van der, Franse MM, Elgersma Y, Distel B, Tabak HF. Pas10p is a tetratricopeptide repeat protein, which is essential for the import of most matrix proteins into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 11782-11786.
22. Motley A, Hettema E, Distel B, Tabak HF. Differential import deficiencies in human peroxisome assembly disorders. *J Cell Biol* 1994; 125: 755-767.
23. Poll-Thé BT, Saudubray JM, Ogier HAM et al. Infantile Refsum disease: An inherited peroxisomal disorder; comparison with Zellweger syndrome and neonatal adrenoleucodystrophy. *Eur J Pediatr* 1987; 146: 477-483.
24. Shimozawa N, Suzuki Y, Orii T, Moser AB, Moser HW, Wanders RJA. Standardization of complementation grouping of peroxisome deficient disorders and the second Zellweger patient with peroxisomal assembly factor-I (PAF-I) defect. *Am J Human Genetic* 1993; 52: 843-848.
25. Moser HW, Moser AB, Smith KD et al. Adrenoleucodystrophy: Phenotypic variability and implications for therapy. *J Inher Met Dis* 1992; 15: 645-664.
26. Wanders RJA, Roermund CWT van, Wijland MJA van, Schutgens RBH, Bosch H van de, Schram AW, Tager JM. Direct demonstration that the deficient oxidation of very long chain fatty acids in X-linked Adrenoleucodystrophy is due to an impaired ability of peroxisomes to activate very long chain fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 153: 618-624.
27. Powers JM, Liu Y, Moser AB, Moser HW. The inflammatory myelinopathy of adrenoleucodystrophy: cells, effector molecules and pathogenetic implications. *J Neuro-path Exp Neurol* 1992; 51: 630-643.
28. Mosser J, Douar AM, Sarde CO, Feil R, Moser H, Poustka AM, Mandel JL, Aubourg P. Putative X-linked adrenoleucodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* 1993; 361: 726-730.
29. Mosser J, Lutz Y, Stoekel ME et al. The gene responsible for adrenoleucodystrophy encodes a peroxisomal membrane protein. *Hum Mol Genet* 1994; 2: 265-271.
30. Kemp S, Ligtenberg MJL, Geel BM van et al. Identification of a two base pair deletion in five unrelated families with adrenoleucodystrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 202: 647-653.
31. Aubourg P, Adamsbaum C, Lavallard-Rousseau MC et al. A two year trial of oleic and erucic acids ("Lorenzo's oil") as treatment for adrenomyeloneuropathy. *N Engl J Med* 1993; 329: 745-752.
32. Schutgens RBH, Wanders RJA. Peroxisomal disorders. In: Holton JB (ed.). *The Inherited Metabolic Diseases*, 2nd ed. 1994; Churchill Livingstone, Edinburgh p. 243-263.
33. Wanders RJA, Schutgens RBH, Bosch H van den, Tager JM, Kleijer WJ. Prenatal diagnosis of inborn errors in peroxisomal  $\beta$ -oxidation. *Prenatal Diagnosis* 1991; 11: 253-261.
34. Schutgens RBH, Wanders RJA, Nijenhuis AA, Purvis R, Dekker C. Rhizomelic Chondrodysplasia punctata: Prenatal diagnosis by biochemical analyses. *Intern Pediatr* 1993; 8: 45-52.
35. Editorial, PEPing up pre-implantation testing. *Nature Genetics*. 1994; 6: 1-2.
36. Schrakamp G, Schalkwijk CG, Schutgens RBH, Wanders RJA, Tager JM, Bosch H van den. Plasmalogen biosynthesis in peroxisomal disorders. *J Lipid Res* 1988; 29: 325-334.
37. Schutgens RBH, Romeijn GJ, Ofman R, Bosch H van den, Tager JM, Wanders RJA. AcylCoA: dihydroxyaceto-

ne phosphate acyltransferase in human skin fibroblasts: studies of the properties using a new assay method. *Biochim Biophys Acta* 1986; 879: 286-291.

## Summary

*Peroxisomal disorders. Schutgens RBH, Wanders RJA. Ned Tijdschr Klin Chem* 1995; 20: 13-20.

Peroxisomes catalyze essential metabolic functions in mammalian cells. In humans, peroxisomal dysfunction usually results in severe disease. At present, in at least 16 human disorders a dysfunction of one or multiple peroxisomal enzymes

has been established. A remarkable genetic and phenotypic variability is observed in many of the peroxisomal disorders. Precise diagnosis can be achieved by biochemical assays and all peroxisomal disorders in which this is relevant can be diagnosed prenatally, thus providing the option of genetic counselling.

Recent studies focus on the unravelling of details of the biogenesis of peroxisomes, identification of mutations and on the evaluation of specific therapies. Yeast mutants proved to be valuable model systems.

*Key-words: peroxisomes; peroxisomal disorders; Zellweger syndrome; X-linked adrenoleucodystrophy.*

*Ned Tijdschr Klin Chem* 1995; 20: 20-26

## Hyperhomocysteinemie

H.J. BLOM<sup>1</sup>, G.H.J. BOERS<sup>2</sup>, T.K.A.B. ESKESES<sup>3</sup> en J.M.F. TRIJBELS<sup>1</sup>

De eventuele relatie van cystathionine  $\beta$ -synthase (CS) deficiëntie en thermolabiliteit van 5,10-methyleen-tetrahydrofolaatreductase (MTHFR) met milde hyperhomocysteinemie (MHH) is bestudeerd bij patiënten met vroegtijdige arteriosclerose. Slechts één van de 20 bestudeerde patiënten met MHH vertoonde een CS-activiteit in de range van obligaate heterozygoten voor CS-deficiëntie, terwijl vijf van de 21 patiënten met MHH de zogenaamde thermolabele vorm van MTHFR hadden.

Geconcludeerd mag worden dat heterozygotie voor CS-deficiëntie waarschijnlijk niet een belangrijke oorzaak is voor milde hyperhomocysteinemie. Bij ongeveer 25% van de patiënten met milde hyperhomocysteinemie wordt het metabolisme van homocysteïne waarschijnlijk verstoord door de thermolabele vorm van MTHFR.

*Trefwoorden: homocysteïne; methionine; cystathionine  $\beta$ -synthase; methyleentetrahydrofolaat reductase*

In 1962 rapporteerden zowel Carson en Neill (1) als Gerritsen et al (2), onafhankelijk van elkaar, de aanwezigheid van hoge concentraties van homocystine in de urine van enkele mentaal geretardeerde kinderen. In de daarop volgende jaren werden behalve

mentale retardatie ook andere klinische kenmerken geassocieerd met homocystinurie bekend, zoals vroegtijdige arteriosclerose en trombose, ectopia lentis en skeletafwijkingen. In 1964 toonden Mudd et al (3) aan dat homocystinurie veroorzaakt wordt door een deficiëntie van cystathionine  $\beta$ -synthase (CS). Naast de verhoogde homocystinespiegels in urine en plasma vertonen patiënten met homocystinurie hypermethioninemie en hypocysteinemie. Homocystinurie kan ook veroorzaakt worden door methyleentetrahydrofolaat reductase (MTHFR) deficiëntie. Deze patiënten worden gekenmerkt door mentale retardatie, vroegtijdige arteriosclerose en trombose, maar vertonen geen ooglenstosering of skeletafwijkingen. In plasma van deze patiënten is methionine verlaagd en cystathionine vaak verhoogd.

Daarnaast kan homocystinurie ook veroorzaakt worden door defecten in het vitamine B12 metabolisme (Cbl C, D, E of F) en ernstige deficiënties van vitamine B12 of foliumzuur (tabel 1).

### Milde hyperhomocysteinemie

#### *Hart- en vaatziekten*

De hoge incidentie van arteriosclerose en trombose op zeer jonge leeftijd bij patiënten met homocystinurie (ernstige hyperhomocysteinemie) is zeer opvallend. In het Academisch Ziekenhuis Nijmegen is ook de relatie tussen milde hyperhomocysteinemie (MHH) en vroegtijdige arteriosclerose en trombose uitvoerig bestudeerd. In 1985 toonden Boers et al (4) aan dat MHH met een hoge prevalentie van 28% voorkomt bij patiënten met cerebrale of perifere arteriosclerose. Deze bevinding is vervolgens door een tiental verschillende onderzoeksgroepen bevestigd (zie overzichten 5-8). Verder is gebleken dat MHH een risicofactor is voor coronaire insufficiëntie en trombose (5-10).

*Laboratorium Kindergeneeskunde en Neurologie<sup>1</sup>, Endocrinologie, Interne Geneeskunde<sup>2</sup>, Gynaecologie/Obstetrie<sup>3</sup>, Academisch Ziekenhuis Nijmegen*

Gebruikte afkortingen: MHH: milde hyperhomocysteinemie; CS: cystathionine  $\beta$ -synthase; MTHFR: methyleentetrahydrofolaat reductase; MeTHF: 5-methyltetrahydrofolaat

Correspondentie: Dr. H.J. Blom, Laboratorium Kindergeneeskunde en Neurologie, Academisch Ziekenhuis Nijmegen, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen.