

17. Bosker HA, Laarse A van der, Cats VM, Brusckie AVG. Are enzymatic tests good indicators of coronary reperfusion? *Br Heart J* 1992; 67: 150-154.
18. Katus HA, Rempis A, Scheffold T, Diederich KW, Kuebler W. Intracellular compartmentation of cardiac troponin T and its release kinetics in patients with reperfused and nonreperfused myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1991; 67: 1360-1367.
19. Zwaan Ch de, Willems GM, Vermeer F, Res J, Verheugt FWA, Laarse A van der, Simoons ML et al. Enzyme tests in the evaluation of thrombolysis in acute myocardial infarction. *Br Heart J* 1988; 59: 175-183.
20. Katus HA, Rempis A, Looser S, Hallermeier K, Scheffold T, Kübler W. Enzyme linked immuno assay of cardiac Troponin T for the detection of acute myocardial infarction in patients. *J Mol Cell Cardiol* 1989; 21: 1349-1353.
21. Visser MP, Krill MTA, Muijtens AMMI, Willems GM, Hermens WTh. Distribution of enzymes in dog heart and liver. Significance for assessment of tissue damage from data on plasma enzyme activities. *Clin Chem* 1982; 27: 1845-1850.
22. Kreef BK van, Veen FH van der, Willems GM, Hermens WTh. Circulatory models in assessment of cardiac enzyme release in dogs. *Am J Physiol* 1993; 264 (Heart Circ Physiol 33): H747-H754.
23. Laarse A van der, Dijkshoorn NJ, Hollaar L en Caspers T. The (iso)-enzyme activities of lactate dehydrogenase, alpha-hydroxybutyrate dehydrogenase, creatine kinase and aspartate aminotransferase in human myocardial biopsies and autopsies. *Clin Chim Acta* 1980; 104: 381-391.
24. Clark GL, Robison AK, Gnepp DR, Roberts R, Sobel BE. Effects of lymphatic transport of enzyme on plasma creatine kinase time-activity curves after myocardial infarction in dogs. *Circ Res* 1978; 43: 162-169.
25. Bleifeld W, Mathey D, Hanrath P, Buss H, Effert S. Infarct size estimated from serial creatine phosphokinase in relation to left ventricular dynamics. *Circulation* 1977; 55: 303-311.
26. Grande P, Hansen BF, Christiansen C, Naestoft J. Estimation of acute myocardial infarct size in men by serum CK-MB measurements. *Circulation* 1982; 65: 756-764.
27. Hackel DB, Reimer KA, Ideker RE, Mikat EM, Hartwell TD, Parker CB, Braunwald EB, Buja M, Gold HK et al. Comparison of enzymatic and anatomic estimates of myocardial infarct size in man. *Circulation* 1984; 70: 824-835.

Summary

Troponin T release into plasma after acute myocardial infarction. Dieijen-Visser MP van, Wodzig KWH, Kragten JA and Hermens WTh. Ned Tijdschr Klin Chem 1996; 21: 22-28.

After acute myocardial infarction (AMI) cardiac enzymes and proteins are released into plasma and are used as biochemical markers of cardiac muscle injury. We studied the completeness of the release of troponin T, a cardiac protein that is largely bound to myofibrillar structures and compared it with the release of cytoplasmic cardiac enzymes creatine kinase (CK) and α -hydroxy butyrate dehydrogenase (HBD) in patients with AMI, treated with thrombolytic therapy. A two-compartment model was used to calculate the cumulative plasma release of the different cardiac markers. The calculated cumulative plasma release was expressed in gram equivalents (g-eq) healthy myocardium per liter plasma (infarct size). For the cardiac enzymes CK and HBD the mean total release over 72 hours, was respectively 5.9 (range 0.5-29, median 3.5, n=22) and 5.9 (range 0.31-36, median 3.3, n=22) g-eq/l, it did not further increase after 72 hours and the differences between enzymes were not significant. The cumulative troponin T release, expressed in gram equivalents of myocardium per liter of plasma was only 0.30 (range 0.0-2.0, median 0.16, n=22) g-eq/l after 72 hours and 0.51 (range 0.0-3.6, median 0.3, n=22) g-eq/l after 168 hours. After 72 hours total recovery of troponin T in g-eq/l is only 5% and after 168 hours only 8.5% of the total recovery of cytoplasmic cardiac enzymes after 72 hours.

Although cumulative troponin T release correlates well with infarct size estimated from cumulative plasma enzyme release, estimation of infarct size should preferably be performed from the plasma release curve of a slowly cleared cytoplasmic enzyme or protein.

Key-words: compartmental model; cardiac markers; quantification of tissue damage; infarct size; reperfusion; thrombolytic therapy.

Ned Tijdschr Klin Chem 1996; 21: 28-33

Toepassing van moleculair biologische methoden in het vaststellen van genetische afwijkingen bij hyperlipoproteïnemieën

P.N.M. DEMACKER, S.J.H. BREDIE en A.F.H. STALENHOF

In elk biomedisch onderzoek is er een wisselwerking tussen de diagnostische mogelijkheden en de toename van het theoretische inzicht. Dit kan goed wor-

Afdeling Algemeen Interne Geneeskunde, Academisch Ziekenhuis Nijmegen

Naar een voordracht voor de Werkgemeenschap Klinische Chemie i.o., juni 1995

Correspondentie: Dr. P. N. M. Demacker, Afdeling Algemeen Interne Geneeskunde, Academisch Ziekenhuis, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen.

den toegelicht op basis van de progressie van kennis op het gebied van het lipoproteïnenmetabolisme en de daarmee verband houdende verbeterde diagnostiek.

De weg die de afgelopen 20 jaar is afgelegd was lang maar uiterst vruchtbaar. Zeer veel afwijkingen in het lipoproteïnenmetabolisme, die voorheen nauwelijks te onderscheiden waren van andere afwijkingen, kunnen nu worden gediagnostiseerd op moleculair niveau. Voor een klinische-chemisch georiënteerd onderzoeker op het gebied van lipoproteïnenafwijkingen was en is dit een vruchtbare tijd. In het navolgende zal worden uitgelegd hoe men op basis van

degelijke klinisch-chemische diagnostiek, dankzij een netwerk van samenwerkende klinici en laboratoria, vruchtbaar fundamenteel onderzoek kan doen om zodoende kennis te vergaren omtrent de potentie van nieuwe diagnostische mogelijkheden in de klinische chemie.

Op basis van de verworven kennis kan gesteld worden, dat bij ernstige hyperlipoproteïnemieën familie-screening dringend is aan te bevelen. Dit kan het beste geschieden door het opsporen van fenotypische expressie; uitvoerige DNA-analyse is voornamelijk van fundamenteel belang.

Trefwoorden: lipoproteïnen, apoproteïnen, genetische analyse

Onderzoek naar hyperlipoproteïnemieën is lange tijd beperkt gebleven tot onderzoek naar hyperlipidemie of hypercholesterolemie. Dit hing duidelijk samen met de diagnostische mogelijkheden om lipoproteïnenfracties accuraat en precies te bepalen. De introductie van de Fredrickson-typing van veel voorkomende lipoproteïnenafwijkingen was gebaseerd op de mogelijkheid, naast cholesterol en triglyceriden, nu ook een kwalitatieve lipoproteïnenbepaling uit te voeren middels een lipidogram. Dit betrof echter een indeling van het plasma en niet van de patiënt. Ten gevolge van variabele, exogene dan wel endogene factoren, kon een patiënt in de loop van de tijd een ander fenotype te zien geven. De research is er daarna op gericht geweest deze variabele factoren, met name de endogene, op te helderen om aldus de oorzaak van de afwijking beter te begrijpen. Door ethische beperkingen is een groot deel van de noodzakelijke kennis verkregen door middel van proefdieronderzoek en geëxtrapoleerd naar de humane situatie. Ter verifiëring van de ontwikkelde hypothesen omtrent de pathogenese zijn er vervolgens een aantal nieuwe diagnostische testen ontwikkeld die bijna allemaal mogelijk zijn door onderzoek van een eenvoudig bloedmonster uit een armvene. Dit mag verwondering wekken omdat lipoproteïnenafwijkingen vaak hun origine in de lever hebben. Bedoelde methoden maken ook nu nog in wisselende mate deel uit van een arsenaal van bepalingen die sequentiëel worden toegepast ter opheldering van een defect in het lipoproteïnenpatroon. De beschikbaarheid van deze methodes leidde ertoe dat ons laboratorium geleidelijk aan een belangrijke rol kon spelen bij de diagnostiek van hyperlipoproteïnemieën; niet alleen in ons academisch ziekenhuis maar ook in de regio. Uiteindelijk leverde dit een groep van patiënten op (propositi) met een afwijking die oblikaat erfelijk moest zijn bepaald.

De moleculair biologische diagnostiek stond toen nog in de kinderschoenen; het vereiste in ieder geval een zodanige expertise dat slechts weinig laboratoria ons patiëntenmateriaal konden bestuderen. In de tachtiger jaren waren deze laboratoria vooral in het buitenland te vinden. Het ophelderen van het moleculair biologische defect kostte toen vaak jaren. Dit pionierswerk maakte duidelijk dat de diagnostiek er met de moleculair biologie een geheel nieuwe dimensie bij zou kunnen krijgen. Geleidelijk aan gingen daarom ook

enkele Nederlandse laboratoria zich op dit gebied specialiseren, daartoe in staat gesteld door subsidies o.a. van NWO en de Nederlandse Hartstichting. Er ontstonden aldus settings met ervaring in deze of gene afwijking, omdat men vroeger t.b.v. het primaire onderzoek "probes" had ontwikkeld. Deze specialisatie is nu nog steeds waarneembaar, al is het door de introductie van de PCR methodiek nu veel beter mogelijk met enige ervaring op dit gebied een nieuwe lipoproteïne-afwijking "erbij te nemen".

Onderzoek naar moleculair biologische afwijkingen bij patiënten met hyperlipoproteïnemie

Naarmate moleculair biologische methodes betrouwbaarder werden is veel potentieel aangewend voor het ophelderen van moleculair biologische defecten bij patiënten met hyperlipoproteïnemie. Dit geschiedde op basis van zuiver wetenschappelijk onderzoek o.a. om inzicht te krijgen in de functie van een functioneel enzym of apoproteïne. Tevens leverde dit inzicht op omtrent de potentie van deze moleculair biologische methodes voor het opsporen van patiënten met een hoog risico voor atherosclerose t.g.v. een primair erfelijke afwijking in het lipoproteïnenmetabolisme. In de afgelopen 10 jaar heeft ons laboratorium in samenwerking met andere laboratoria gewerkt aan de opheldering van het genetisch defect van de volgende hyperlipidemieën:

- Familiaire Hypertriglyceridemie t.g.v. apoproteïne (apo) C-II-deficiëntie of lipoproteïne lipase (LPL)-deficiëntie
- Familiaire Hypercholesterolemie (FH) t.g.v. LDL-receptordeficiëntie of t. g. v. een apoB-100 mutatie
- Familiaire Dysbetaloproteïnemie (FD) t.g.v. een mutatie in het apoE-gen
- Familiair Gecombineerde Hyperlipoproteïnemie (FCH); het genetische defect is hierbij nog niet opgehelderd.

Het genetische defect van patiënten met familiale hypertriglyceridemie

Apo C-II deficiëntie

In 1981 beschreven wij een familie waarvan 4 propositi een nuchtere triglyceridenconcentratie in plasma hadden van 3 tot 12 mmol/l (1). Het plasma cholesterol was laag normaal en na overnacht staan van het plasma bij 4 °C was er bij alle 4 de patiënten een duidelijke roomlaag op de meniscus zichtbaar, daaronder was het plasma helder. Isoelektrische focussing van de VLDL apoproteïnen liet zien dat de patiënten in het geheel geen apoC-II hadden. Dit is een bekende activator voor het enzym lipoproteïne lipase (LPL). Daarnaast hadden de patiënten het apo E2/2 genotype. Ook bleek de postheparine LPL-activiteit erg laag, zelfs na toevoegen van exogeen apoC-II. Infusie van normaal plasma gaf bij een van de patiënten een tijdelijke daling van de triglyceridenconcentratie in plasma te zien, aangevend dat hierdoor het defect in de lipolyse tijdelijk werd opgeheven door toediening van exogeen apoC-II.

Het ophelderen van het onderliggende moleculair biologische defect bleek zeer moeilijk omdat deze

technieken nog in opkomst waren. Uiteindelijk lukte het om in Londen en in Bethesda onderzoeksgroepen voor deze vraagstelling te interesseren (2-5). Gevonden werd dat in het apoC-II gen een guanosine base op de plaats 2943 was weggefallen. Het gevolg hiervan was dat de genetische code vanaf die plaats geheel verkeerd werd afgelezen. Dit resulteerde iets verderop in een vroegtijdig stopcodon. Het afgeschreven apoC-II eiwit was dus slechts een klein peptide dat 17 aminozuren bevatte met onvoldoende lipidenbindend vermogen. Hierdoor verdween het zeer snel uit het plasma met als uiteindelijk gevolg het optreden van apoC-II-deficiëntie en hypertriglyceridemie (5,6). Genetische deficiëntie van apoC-II is elders in de wereld nog in elf andere families vastgesteld. Het onderliggende moleculair biologische effect is bij alle families verschillend. De afwijkingen in de Nijmeegse familie zijn in zoverre uniek doordat er ook nog sprake is van een partiële LPL-deficiëntie en doordat het samengaat met het relatief zeldzaam voorkomend apo E2/2 genotype. In de literatuur is de gevonden afwijking apoC-II Nijmegen genoemd.

LPL-deficiëntie

In 1985 werd een patiënte naar onze lipidenpoli verwezen die in de leeftijd van 22 tot 25 jaar 8 keer een acute pancreatitis had doorgemaakt. Patiënte was bekend met hypertriglyceridemie vanaf jonge leeftijd. Analyse op het laboratorium leerde dat patiënte in nuchtere staat een plasma triglyceridenconcentratie had tot 30 mmol/l; na overnacht staan bij 4 °C was er een duidelijke roomlaag zichtbaar op het plasma, dat verder helder was. Bepaling van de post-heparine LPL-activiteit in plasma leerde dat patiënte LPL-deficiënt was.

Verdergaand onderzoek deed het sterke vermoeden rijzen dat de pancreatitisaanvallen optraden nadat de patiënte orale contraceptiva was gaan gebruiken. Na het advies over te gaan op een andere manier van anticonceptie verdwenen de pancreatitisaanvallen.

Moleculair biologisch onderzoek leerde dat er met de zg Southern blot-analyse geen grote veranderingen in het LPL-gen waarneembaar waren. Na sequencing van een stuk DNA dat met behulp van de polymerase chain reactie was verkregen, bleek er een G→C-transitie te hebben plaats gevonden in nucleotide 725 dat resulteerde in een Pro→Arg-substitutie. Vanwege het zeer ernstige defect dat hieruit resulteerde kon men afleiden dat dit stuk van essentieel belang is voor de activiteit van het enzym (7).

Ten tijde van de publikatie van deze onderzoekgegevens was deze mutatie, genaamd LPL-Nijmegen, nog een van de zeldzame mutaties ooit gedetecteerd in het LPL-gen. Op dit moment zijn er echter al meer dan 55 mutaties in het LPL-gen beschreven met sterk verschillende consequenties voor de LPL-activiteit.

Moleculair biologisch onderzoekingen van familiale hypercholesterolemie

Mutaties in de LDL-receptor

Dankzij het werk van de Nobelprijswinnaars Goldstein en Brown is bekend dat de LDL-receptor een

cruciale rol speelt bij de cholesterolhomeostase en daardoor voor een groot deel verantwoordelijk is voor de hoogte van de plasma cholesterolconcentratie. De frequentie van de heterozygote vorm van FH is 1:500. Door een gedisciplineerde screening op onze lipidenpoli van families van patiënten met een plasma cholesterolconcentratie van meer dan 8 mmol/l, konden wij in de loop der jaren meer dan 100 FH-families identificeren. Tot nu toe is er bij meer dan de helft een inventariserende analyse van het LDL-gen gedaan. In geen enkele familie resulteerde dit in het opsporen van het genetische defect, dit in tegenstelling tot de frequente vaststelling van genetische varianten in andere instellingen. Dit zou te wijten kunnen zijn aan de ongevoeligheid van de toendertijd gebruikte diagnostische methodes, zoals Southern blotting. Het duidt er in ieder geval op, dat het DNA-materiaal van onze onderzochte FH-patiënten geen ernstige deleties, inserties etc. bevat, dit in tegenstelling tot een aantal mutaties die elders zijn gedetecteerd. Gezien de extra diagnostische "power" van moderne screeningsmethodes voor het opsporen van mutaties, zoals "single strand conformation polymorphism" en dichtheidsgradiënt gel-elektroforese is het waarschijnlijk dat toepassing van deze technieken nog kan leiden tot het opsporen van een groot aantal "single-base" mutaties. Op dit moment zijn er met toepassing van traditionele en moderne methodes al meer dan 140 verschillende mutaties in het LDL-receptorgen bekend. Een sluitend diagnostisch onderzoek is in de praktijk dus zeer arbeidsintensief, zelfs in een daartoe gespecialiseerd laboratorium. Gelukkig zijn de belangrijkste mutaties geografisch geconcentreerd. Zo bleek uit werk van Defesche et al (8) dat de mutatie in Zuid Afrika identiek is met een mutatie in de buurt van Amsterdam. Zeer waarschijnlijk was dus een van de Zuid Oost Indiëvaarders, die zich als kolonisten in de 17^e eeuw in Zuid Afrika vestigden, reeds drager van het gen. Door inteelt is de genafwijking daarna in dit land sterk verbreid. Voorafgaande genetische diagnostiek heeft voor individuele patiënten met een FH geen meerwaarde voor de behandeling. In dergelijke gevallen zullen zonder meer cholesterol synthese-inhibitoren kunnen worden voorgeschreven. De diagnose FH kan men in de meeste gevallen reeds stellen op klinische gronden. De diagnose is vrijwel zeker bij een patiënt met een plasma-cholesterolconcentratie >8 mmol/l en een normale plasma-triglyceridenconcentratie, in combinatie met een of meer familieleden met een verhoogd cholesterol hebben. Het vóórkomen van peesxanthomen is daarnaast een specifiek klinisch kenmerk.

Apo B-3500 mutatie

Dit betreft een mutatie in het apo B-100 eiwit, het belangrijkste eiwit van de "very-low" en "low-density" lipoproteïnen dat als ligand functioneert voor de LDL-receptor. De frequentie van deze mutatie is 1,5% van alle patiënten met heterozygote FH. Ook deze mutatie gaat gepaard met hypercholesterolemie omdat de mutatie in de "LDL receptor binding domein" van het apoB-100 ligt. Gezien de relatieve zeldzaamheid is het individuele screenen van families

met FH zeer bewerkelijk. Vandaar dat men DNA-materiaal poolt t. b. v. een specifieke PCR-reactie. Indien deze positief is, dan gaat men verder met onderzoek van de individuele monsters. In het DNA materiaal van onze FH-families bleek geen enkele apoB-3500-mutatie voor te komen. Uit verder onderzoek bleek dat de respons van deze patiënten op cholesterol-synthese-inhibitors niet te onderscheiden is van die van FH-heterozygoten (8). Hiermee vervalt de noodzaak om eerst omslachtige diagnostiek te verrichten alvorens de patiënt te kunnen behandelen.

Het genetisch defect van patiënten met familiale dysbetalipoproteïnemie (type III hyperlipoproteïnemie)

Mutaties in het apoE-gen

Zoals bekend zijn er verschillende natuurlijke mutaties in het apo E gen. De 3 verschillende apoE-isoproteïnen E2, E3 en E4 kunnen aanleiding geven tot 6 verschillende apoE-genotypen, te weten de apoE2/2, E3/3, E4/4 homozygoten en de apoE2/3, E3/4 en E2/4 heterozygoten. Daarnaast zijn er nog diverse apoE-varianten bekend waarbij er een mutatie is opgetreden in een andere deel van het apoE-gen. Dit is uiteraard pas na onderzoek van interessant patiëntenmateriaal gebleken. Ook onderzoek van Nijmeegse families heeft veel geleerd over een aantal apoE-genafwijkingen (9-16). Dit onderzoek is wat het moleculair biologische gedeelte betreft voornamelijk uitgevoerd te Leiden. Verderop zal hier nog even op worden teruggekomen.

ApoE-feno- of genotypering is relevant i.v.m. de diagnose familiale dysbetalipoproteïnemie en de diagnose Alzheimer. Men veronderstelt dat apoE-genotypering betrouwbaarder is dan (eendimensionele) fenotypering omdat, het isoelektrische focuseringspatroon beïnvloed wordt door posttranslationele modificaties zoals glycosylering en sialylering. Dit leidt tot subbandjes waardoor het patroon moeilijk te interpreteren is. In het kader van een groot opgezet familieonderzoek hebben wij de diagnostische kracht van onze apoE-fenotypering vergeleken met apoE-genotypering zoals uitgevoerd op het laboratorium van Dr LM Havekes in Leiden. De resultaten van dit onderzoek bij meer dan 550 monsters zullen nog worden gepubliceerd, maar ze bevestigen de grote betrouwbaarheid van onze apoE-fenotypering die gebruik maakt van eendimensionele disc gels. In combinatie met ultracentrifugatie en kwantitatieve bepaling van de remnantfractie in de vorm van de zg type III ratio (VLDL-chol/plasma TG) blijkt deze methode ook een goede screeningsmethode voor het detecteren van zg apoE-varianten. Bij apoE-varianten blijkt er vaak een discrepantie tussen de uitkomst van apoE-fenotypering en de type III ratio. Zo bleek bij twee patiënten uit schijnbaar verschillende families die uiteindelijk genetisch als apoE3-Leiden konden worden gekarakteriseerd, dat zij een dikke apoE3-band hadden met een sterk verhoogde type III ratio (16). Uit grootscheeps familieonderzoek op basis van 3 propositi uit Leiden en twee uit Nijmegen konden 37 nieuwe patiënten met deze afwijking worden gevonden. Door genealogisch

onderzoek van deze, schijnbaar niet verwante families, bleek er in de 17^e eeuw een gemeenschappelijke voorouder te bestaan die drager moet zijn geweest van deze mutatie.

In tegenstelling tot de variant apoE3-Leiden hebben andere FD-patiënten met een apoE-variant wel vaak het apoE2/2-fenotype, maar bij deze patiënten was de type III ratio slechts matig verhoogd. Verder is er een groep met het apoE2/3-fenotype dat eveneens een mutatie in het apoE-gen had tot uiting komend in een matig verhoogde type III ratio. Zonder DNA-analyse verkregen wij dus, op grond van de discrepantie tussen apoE-fenotypering en de type III ratio, sterke aanwijzingen dat er sprake moest zijn van een apoE-variant. Dit werd later bevestigd door apoE-genotypering. Deze diagnose stelde de medicus practicus in staat de patient een gerichte therapie te geven. Het zonder meer apoE-genotypering verrichten zonder inzicht te verkrijgen in de "remnant" concentratie (type III ratio) beschouwen wij onvolledige diagnostiek, omdat slechts maximaal 10% van de personen met het apoE2/2-genotype uiteindelijk FD ontwikkelt. Uit ons onderzoek blijkt dat een verhoogde remnantconcentratie een veel hogere diagnostische waarde voor het voorspellen van FD in een familie heeft dan het apoE2/2-genotype. Dit geldt ook voor de apoE-varianten.

Het genetische defect van patiënten met familiair gecombineerde hyperlipoproteïnemie

Familiair gecombineerde hyperlipidemie is het voorkomen van verhoogde cholesterol- en/of triglyceridenconcentraties bij twee of meer personen in de eerstegraads familieleden; FCH gaat gepaard met vroegtijdig hart- vaatlijden en dit kenmerk maakt deel uit van de diagnose. Het is de meest voorkomende erfelijke afwijking van het lipidenmetabolisme met een frequentie in de bevolking van 1 tot 2%. Gezien de frequentie en de ernst van de aandoening is het reeds lang een vrome wens van de clinicus practicus om over een betrouwbare diagnostische marker voor FCH te kunnen beschikken zonder uitvoerig familieonderzoek te moeten doen (17-19). Met financiële steun van de Nederlandse Hartstichting zijn wij reeds enkele jaren bezig om bij een groot aantal FCH families gemeenschappelijke biochemische en genetische kenmerken op te sporen. Duidelijk is geworden dat veel patiënten gekarakteriseerd zijn door een zg. zwaar LDL-subfractiepatroon. Verder onderzoek leerde dat bij het bepalen van het LDL-subfractiepatroon zowel omgevingsfactoren als genetische factoren een rol spelen. Verder werd aangetoond, in samenwerking met moleculair biologen elders, dat de expressie van FCH relatief frequent gepaard gaat met mutaties in het gen voor lipoproteïnelypase (20). Verder lijken ook nieuwe genetische markers die leiden tot hypertriglyceridemie en verlaagd HDL erfelijk geassocieerd te zijn met de aandoening. De resultaten van dit vruchtbare onderzoek worden momenteel bewerkt voor publikaties. Verder is het materiaal dat door middel van een grote familiescreening werd verkregen nog dagelijks uitgangspunt van nieuwe analyses en nieuwe hypothesen.

Epiloog

Dankzij een aantal gedreven en bekwame pioniers is het nu duidelijk dat bij veel hyperlipidemieën een afwijking aanwezig is in het DNA-materiaal. Waar dit momenteel nog niet is aangetoond is het waarschijnlijk dat dit met gevoeligere methodes binnenkort wel aangetoond kan worden. Met een genetische marker is het mogelijk predispositie aan te tonen bij familieleden van een propositus. Er zijn echter ethische en financiële bezwaren tegen grootschalig DNA-onderzoek. Algemeen overheerst de mening dat deze diagnostiek alleen relevant is als het bij de diagnostiek meerwaarde heeft ten opzichte van de conventionele diagnostiek en leidt tot preventieve maatregelen die de ontwikkeling van ziekte kunnen remmen of voorkomen. Gezien echter het groot aantal mutaties in de belangrijkste genen van het lipoproteïnenmetabolisme, zoals het LPL- en LDL-receptorgen, is genetisch onderzoek geen sinecure. Men moet immers over voldoende kennis beschikken van de moleculaire biologie en speciaal de toepassing hiervan t.b.v. genetisch onderzoek. Het onderzoek vraagt om speciale analyse-apparatuur met de bijbehorende kennis om deze apparatuur te bedienen. Ook is er een behoorlijke investering nodig in ruimte en chemicaliën; bijna elke mutatie vraagt immers om een specifiek primerpaar of om een specifieke benadering. Het zal duidelijk zijn dat dergelijke analyses op grote schaal voorbehouden zijn aan gespecialiseerde laboratoria, al is het mogelijk dat een geïsoleerde afwijking op een niet gespecialiseerd laboratorium goed gedijdt. Het noodzakelijke voorwerk is dan echter al elders gedaan.

Bij de genetische diagnostiek van hyperlipidemieën, zoals FD en FCH, moet worden bedacht dat andere factoren, die mogelijk ook voor een deel nog genetisch bepaald zijn, voor 50 tot meer dan 90% bij kunnen dragen aan de uiteindelijke expressie van de afwijking. Uitgebreid familieonderzoek met fenotypering blijft dus geboden. Met toepassing van de moderne klinisch-chemische analysers en met het gebruik van uniforme, scherpe, normaalwaarden is er in dit opzicht t. b. v. de preventie meer te bereiken dan uitgebreide genetische diagnostiek. Uiteindelijk zijn genetische afwijkingen die leiden tot hyperlipidemie in de bevolking zeldzaam. Echter, bij een ernstige aandoening met de mogelijkheid tot vroegtijdige preventie is genetisch onderzoek een belangrijk hulpmiddel voor het opsporen van personen met een hoog risico. Voor de toekomst zullen wij in Nijmegen naast het apoE-fenotype mogelijk ook enkele genotypen bepalen van de in Nederland meest voorkomende mutaties in het lipoproteïnenmetabolisme. Het doel van ons huidige onderzoek, bij onder andere FCH-families, is erop gericht deze veel voorkomende genafwijkingen te identificeren.

Literatuur

1. Stalenhoef AFH, Casparie AF, Demacker PNM, Stouten JTJ, Lutterman JA, van 't Laar A. Combined deficiency of apolipoprotein CII and lipoprotein lipase in familial hyperchylomicronemia. *Metabolism* 1981; 30: 919-926.
2. Humphries SE, Williams L, Myklebost O, Stalenhoef AFH, Demacker PNM, Baggio G, Crepaldi G, Galton DJ

- and Williamson R. CII deficiency: Familial preliminary analysis of the gene defect in two independent families. *Hum Genet* 1984; 67: 151-155.
3. Humphries SE, Berg K, Gill L, Cuning AM, Robertson FW, Stalenhoef AFH, Williamson R, Borresen AL. The gene for apolipoprotein C-II is closely linked to the gene for apolipoprotein E on chromosome 19. *Clin Genet* 1984; 26: 389-396
4. Davison PJ, Stalenhoef AFH, Humphries SE. Apolipoprotein CII (apo CII) gene expression defect in an individual with familial apo CII deficiency. *Biochem Biophys Res Comm* 1987; 148: 320-328.
5. Fojo SS, Stalenhoef AFH, Marr K, Gregg RE, Ross RS, Brewer HB. A deletion mutation in the apo C-II gene (apo-C-II Nijmegen) of a patient with a deficiency of apolipoprotein C-II. *J Biol Chem* 1988; 263: 17913-17916.
6. Fojo SS, Gennes JL de, Beisiegel U, Baggio G, Stalenhoef AF, Brunzell JD, Brewer HB Jr. Molecular genetics of apo C-II and lipoprotein lipase deficiency. *Adv Exp Med Biol* 1991; 285: 329-333.
7. Bruin T, Kastelein JJ, Van Diermen DE, Ma Y, Henderson HE, Stuyt PM, Stalenhoef AF, Sturk A, Brunzell JD, Hayden MR. A missense mutation Pro157 Arg in lipoprotein lipase (LPL-Nijmegen) resulting in loss of catalytic activity. *Eur J Biochem* 1992; 208: 267-272.
8. Defesche J. The molecular basis of familial hypercholesterolemia. *Academisch Proefschrift*, Amsterdam 1993.
9. Stuyt PMJ, Demacker PNM, 't Laar A van. Serum lipids, lipoproteins and apolipoprotein E phenotypes in relatives of patients with type III hyperlipoproteinaemia. *Eur J Clin Invest* 1984; 14: 219-226.
10. Smeets HJM, Poddighe J, Stuyt PMJ, Stalenhoef AFH, Ropers HH, Wieringa B. Identification of apolipoprotein E polymorphism by using synthetic oligonucleotides. *J Lipid Res* 1988; 29: 1231-1237.
11. Maagdenberg AMJM van den, Stalenhoef AFH, Gevers Leuven JA, Havekes LM, Frants RR. Apolipoprotein E*3-Leiden allele results from a partial gene duplication in exon 4. *Biochem Biophys Res Comm* 1989; 165: 851-857.
12. Smit M, Knijff P de, Kooy-Meys E van de, Maagdenberg AM van den, Gevers Leuven JA, Stalenhoef AFH, Stuyt PMJ, Frants RR, Havekes LM. Genetic heterogeneity in familial dysbetalipoproteinaemia. The E2 (Lys 146 → Gln) variant results in a dominant mode of inheritance. *J Lipid Res* 1990; 31: 45-53.
13. Knijff P de, Stalenhoef AFH, Mol MJTM, Gevers Leuven JA, Smit J, Erkelens DW, Schouten J, Frants RR, Havekes LM. Influence of apo E polymorphism on the response to simvastatin treatment in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1990; 83: 89-97.
14. Eyk R van, Chan L, Top B, Stalenhoef AFH, Havekes LM, Frants RR. An additional MspI RFLP at the human hepatic lipase (HL) gene locus. *Nucl Acids Res* 1990; 18: 3110.
15. Knijff P de, Maagdenberg AMJM van den, Stalenhoef AFH, Gevers Leuven JA, Demacker PNM, Kuyt LP, Frants RR, Havekes LM. Familial dysbetalipoproteinemia associated with apolipoprotein E3-Leiden in an extended multigeneration pedigree. *J Clin Invest* 1991; 88: 643-655.
16. Knijff P de, Maagdenberg AMJM van den, Boomsma DI, Stalenhoef AFH, Smelt AHM, Kastelein JJPK, Marais AD, Frants RR, Havekes LM. Variable expression of familial dysbetalipoproteinemia in apolipoprotein E*(Lys146→Gln)allele carriers. *J Clin Invest* 1994; 94: 1252-1262.
17. Stalenhoef AFH, Demacker PNM, Lutterman JA, 't Laar A van. Plasma lipoproteins, apolipoproteins and triglyceride metabolism in familial hypertiglyceridemia. *Arteriosclerosis* 1986; 6: 387-394.
18. Graaf J de, Swinkels DW, Haan AF de, Demacker PN, Stalenhoef AF. Both inherited susceptibility and environmental exposure determine the low-density lipoprotein subfraction pattern distribution in healthy Dutch families. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 1295-1310.

19. Bredie SJH, Kimeney LA, Haan AFJ de, Demacker PNM, Stalenhoef AFH. Inherited susceptibility determines the distribution of dense low density lipoprotein subfraction profiles in familial combined hyperlipidemia. Submitted for publication
20. Hoffer MJV, Bredie SJH et al. The lipoprotein (Asn291→Ser) mutation is associated with elevated lipid levels in families with familial combined hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis* 1995, in press.

Summary

Application of molecular biological methods to determine genetic traits in hyperlipoproteinemias. Demacker PNM, Bredie SJH and Stalenhoef AFH. Ned Tijdschr Klin Chem 1996; 21: 28-33.

Ned Tijdschr Klin Chem 1996; 21: 33-36

De bepaling van niet eiwit-gebonden 1,25-dihydroxyvitamine D in plasma met behulp van symmetrische dialyse

L.M.J.W. SWINKELS¹, H.J.C. van HOOFF¹, H.A. ROSS² en T.J. BENRAAD¹

Slechts een klein deel van de totale concentratie 1,25 dihydroxy-vitamine D3 [1,25(OH)₂D₃] in plasma circuleert in vrije vorm. Het grootste deel is gebonden aan plasma-eiwitten, met name aan vitamine-D bindend eiwit (DBP) en albumine.

Algemeen wordt aangenomen dat de fractie niet aan eiwit gebonden, ofwel 'vrij' hormoon de biologische activiteit bepaalt. Wij beschrijven een eenvoudig uitvoerbare dialyse-methode voor de bepaling van vrij 1,25(OH)₂D₃ in plasma. In deze "symmetrische" dialyse is de snelheid waarmee getritieerd 1,25(OH)₂D₃ door een dialysemembraan migreert een functie van de grootte van de vrije fractie van het 1,25(OH)₂D₃ in plasma. Voor deze meting is slechts weinig tracer nodig. In tegenstelling tot evenwichts-dialyse en ultrafiltratie-technieken is het voor symmetrische dialyse niet noodzakelijk de tracer uitgebreid te zuiveren. De intra-assay variatie-coëfficiënt bedraagt 4,4 %; de interassay variatie-coëfficiënt 12,9%.

Trefwoorden: vitamine D, cholecalciferol, vrij hormoon, biologische beschikbaarheid

Actief 1,25(OH)₂D₃ wordt gevormd door hydroxylering van vitamine D₃. Vitamine D₃ ontstaat onder in-

Laboratorium voor Endocrinologie en Voortplanting¹ en Afdeling Inwendige Geneeskunde, Endocriene Ziekten², Academisch Ziekenhuis Nijmegen, St. Radboud.

Naar een voordracht voor de Werkgemeenschap Klinische Chemie i.o., juni 1995

Correspondentie: Dr. L.M.J.W. Swinkels, Laboratorium voor Endocrinologie en Voortplanting, Academisch Ziekenhuis St. Radboud, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen.
Ingekomen: 16.10.95

In biomedical research there is a fruitful cooperation between the diagnostic possibilities and the increase in theoretical knowledge. This is very clear from the research on hyperlipoproteinemias. Due to motivated pioneers, it is now possible to detect various defects in the various genes involved in lipoprotein metabolism. It was a pleasure to follow this way of increasing diagnostic power, which was stimulated by the close cooperation of clinicians, clinical chemists and molecular biologists. After at least 20 years of hard working the possibilities and the horizons of these analyses emerge. To outline the possibilities of genetic analysis in the treatment of patients and in long term intervention programmes we have summarised our research results obtained in the preceding years.

Key-words: lipoproteins, apoproteins, genetic analysis

vloed van licht in de huid uit 7-dehydrocholesterol. De eerste stap in de activatie van het vitamine D₃, de 25-hydroxylering, geschiedt in de lever. In de nier vindt vervolgens 1-hydroxylering tot 1,25(OH)₂D₃ plaats. Het 25-hydroxy-vitamine D₃ en 1,25(OH)₂D₃ kunnen gedeactiveerd worden door 24-hydroxylering. Dit gebeurt eveneens in de nier (1).

1,25(OH)₂D₃ speelt een belangrijke rol in de calcium-homeostase en botstofwisseling. Het stimuleert de calcium-opname door de darm en remt de 1-hydroxylering van 25-hydroxy-vitamine D₃ in de nier. Evenals steroid- en schildklierhormonen circuleert 1,25(OH)₂D₃ in plasma gebonden aan een specifiek transport eiwit, het DBP, en aan albumine. 1,25(OH)₂D₃ heeft een lagere affiniteit voor DBP dan 25-hydroxy-vitamine D₃ (2). Vieth (3) berekende dat slechts 0,1% van het totale 1,25(OH)₂D₃ in plasma in vrije vorm circuleert.

Algemeen wordt aangenomen dat juist de concentratie van het niet-aan-eiwit-gebonden, "vrij" hormoon bepalend is voor de biologische activiteit (4). De radioreceptorassay voor de bepaling van 1,25(OH)₂D₃ is onvoldoende gevoelig om de concentratie vrij 1,25(OH)₂D₃ direct te meten. Men is aangewezen op de indirecte benadering, d.w.z. het meten van de vrije fractie (de verhouding vrij/totaal) 1,25(OH)₂D₃ na toevoeging van een kleine hoeveelheid getritieerd 1,25(OH)₂D₃. Door vermenigvuldiging van de vrije fractie met de totale concentratie kan de vrije concentratie berekend worden.

Voor zover ons bekend bestaat er slechts één publikatie waarin een methode voor de bepaling van vrij 1,25(OH)₂D₃ wordt beschreven (5). Deze bepaling in onverdund plasma is afgeleid van de centrifugale ultrafiltratie methode van Hammond et al (6). Koenig et al (7) stelde met deze methode vast, dat de vrije