

## Overzichten

# Congenitale defecten in de glycosylering: het CDG-syndroom

R.A. WEVERS<sup>1</sup>, S. GRÜNEWALD<sup>2</sup>, K. HUIJBEN<sup>1</sup>, J.A.M. SMEITINK<sup>3</sup>, J.F. de RIJK-van ANDEL<sup>4</sup>

Het CDG-syndroom is een groep erfelijke ziekten in de N-glycosylering van eiwitten. Er zijn zeven CDG typen beschreven en van vier ervan is het moleculaire defect bekend. Patiënten hebben veelal een multisysteemziekte met neurologische symptomatologie. Enkele symptomen zijn reeds vanaf de geboorte aanwezig. De klinisch symptomatologie van de verschillende CDG-typen verschilt nogal. Daarom wordt een brede screening op CDG aangeraden onder patiënten met multisysteem ziekten en onder neurologische patiënten. Transferrine iso-elektrische focusering in plasma is de hoeksteen van de diagnostiek van het CDG-syndroom. Bij verschillende CDG-typen is enzymdiagnostiek in leukocyten of fibroblasten mogelijk en zijn ook moleculair genetische technieken beschikbaar om de diagnose te bevestigen en meer specifiek te maken. De technieken die nodig zijn om een defect in de eiwit N-glycosylering te diagnosticeren en de valkuilen die daarbij om de hoek komen kijken, worden beschreven. De klinisch chemicus dient vooral bij onbegrepen afwijkende uitslagen van glycoproteïnen (o.a. stollingsfactoren en schildklierparameters) aan de diagnose CDG te denken.

*Trefwoorden: alcohol abuses; CDG-syndroom; glycosylering van eiwit; metabole ziekte; multisysteemziekte; glycoproteïnebiosynthese; screening; transferrine-isovormen*

De nomenclatuur rond het "Carbohydrate Deficient Glycoprotein (CDG)" syndroom werd in november 1999 gewijzigd. Besloten werd de betekenis van de letters CDG te wijzigen in "Congenital Disorders of Glycosylation" of in het Nederlands "Congenitale Defecten in de Glycosylering". Het CDG-syndroom is een pas recent ontdekte groep erfelijke stofwisselingsziekten. Jaeken beschreef in de tachtiger jaren

*Laboratorium Kindergeneeskunde en Neurologie, Instituut Neurologie<sup>1</sup>, Academisch ziekenhuis Nijmegen; Afdeling Kindergeneeskunde<sup>2</sup>, Heinrich-Heine Universiteitsziekenhuis Düsseldorf, Duitsland; Afdeling Kindergeneeskunde<sup>3</sup>, Academisch ziekenhuis Nijmegen; Afdeling Neurologie<sup>4</sup>, Ignatius ziekenhuis Breda*

Correspondentie: Dr. R.A. Wevers, Instituut Neurologie, Academisch ziekenhuis Nijmegen, Reinier Postlaan 4, 6500 HB Nijmegen.  
E-mail: r.wevers@ckslkn.azn.nl

een geretardeerde tweeling met endocriene en ook biochemische afwijkingen (1,2). De rode draad bleek dat de afwijkingen gevonden werden in een aantal plasma glycoproteïnen. In samenwerking met de Rotterdamse groep van Van Eijk kon worden gedemonstreerd dat het plasma transferrine bij iso-elektrische focusering een afwijkend patroon had (3). Deze bevindingen vormden de basis voor verder onderzoek waarbij tenslotte het primaire defect van de erfelijke ziekte van de tweeling kon worden opgehelderd. Omdat het defect gelegen was in de biosynthese van het oligosaccharidedeel van N-geglycosyleerde eiwitten kreeg het syndroom de naam CDG-syndroom. Met de iso-elektrische focusering van plasma transferrine was een eenvoudig te meten biochemische marker van de ziekte gevonden. Het aantal patiënten waarbij een glycosyleringsdefect kon worden vastgesteld groeide daardoor snel. Zowel klinisch alsook biochemisch bleek het echter om een heterogene groep te gaan. Inmiddels zijn een zevental verschillende subgroepen beschreven en kon van vier subgroepen het primaire defect worden opgehelderd. In dit artikel zal het proces van N-glycosylering van eiwitten worden beschreven. De verschillende typen van het CDG-syndroom zullen worden belicht en speciale aandacht zal worden besteed aan de Nederlandse bijdragen aan het onderzoek aan deze nieuwe ziekten. De Rotterdamse groep van Van Eijk stond aan de wieg van de opheldering van het biochemische defect van het allereerste CDG-subtype (Ia). Utrechtse en Rotterdamse collegae ontdekten simultaan met een Duits onderzoeksteam het CDG Ib subtype (4,5). De Nijmeegse groep vond voor het eerst patiënten met het CDG Ic subtype en ontrafelde met hulp van een groep uit Zürich het metabole defect dat eraan ten grondslag ligt (6,7).

### De functie van eiwitglycosylering

De meeste eiwitten in plasma en in de extracellulaire matrix zijn geglycosyleerd evenals de meerderheid van de eiwitten in het plasmamembraan van de cel. Ook diverse intracellulaire eiwitten zijn geglycosyleerd zoals bij voorbeeld alle lysosomale enzymen. In dit artikel zal uitsluitend de N-glycosylering worden besproken. De oligosaccharide-structuren op deze eiwitten, ook wel glycanen genoemd, hebben vele verschillende functies (8). Zij spelen onder meer een rol in:

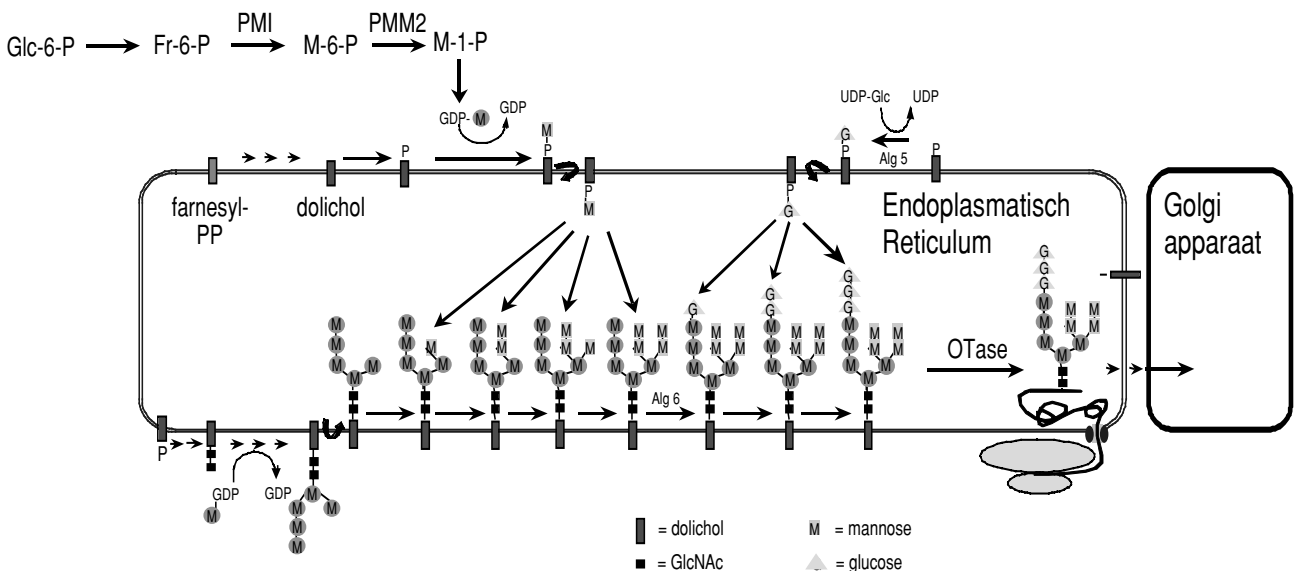
1. de vouwing van eiwitten tijdens hun verblijf in het endoplasmatisch reticulum
2. de bescherming van het eiwit tegen proteases
3. het moduleren van de biologische activiteit van het eiwit
4. het bereiken van de subcellulaire of extracellulaire bestemming van het eiwit
5. de klaring van eiwitten uit het plasma
6. cel-cel interacties en
7. eiwit-eiwit interacties.

Gezien de veelheid van processen waarin de glycosylering een rol speelt is het voorspelbaar dat bij defecten in het glycosyleringsproces belangrijke problemen voor het cellulaire functioneren zullen kunnen ontstaan. Dat dit ook werkelijk klinisch aanleiding kan zijn voor het ontstaan van ernstige ziektebeelden is reeds lang bekend. De erfelijke ziekte I-cell disease of mucopolisaccharidose bewees dit. Bij deze ziekte kan door een enzymdefect in het Golgi apparaat, geen mannose-6-fosfaatgroep worden gezet op het oligosaccharidedeel van eiwitten die een lysosomale bestemming hebben. De mannose-6-fosfaatgroep dient als herkennings signaal voor de import van deze eiwitten in het lysosoom. Bij patiënten met I-cell disease kan de receptor de lysosomale eiwitten niet herkennen, waardoor een importprobleem voor het lysosoom ontstaat. De eiwitten verdwalen als het ware, worden uit de cel geëxporteerd en komen in de bloedbaan terecht. Het werk dat deze lysosomale enzymen in het lysosoom zouden moeten doen wordt niet uitgevoerd en het lysosoom blijft zitten met een groot scala van stapelingsproducten, allemaal substraten van lysosomale enzymen.

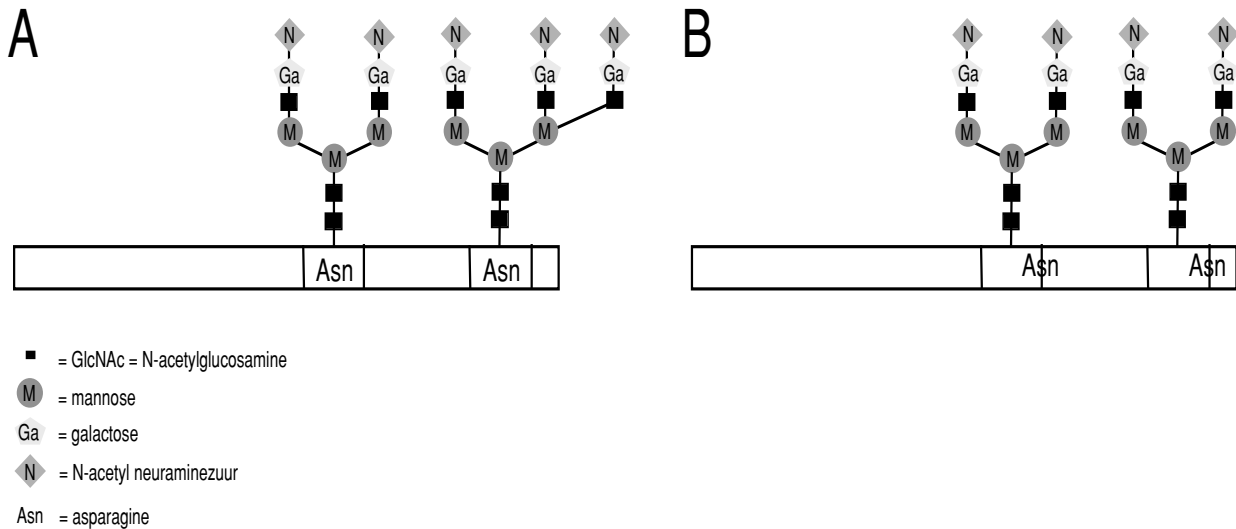
### Het proces van eiwit N-glycosylering

Het proces van N-glycosylering van eiwitten vindt deels in het cytoplasma, deels in het ruwe endoplasmatisch reticulum (RER) en deels in de verschillende

onderdelen van het Golgi apparaat plaats (9). De verschillende suikers worden in het cytoplasma voor inbouw in een oligosaccharide geschikt gemaakt. In figuur 1 wordt dit geïllustreerd voor mannose. De opbouw van het oligosaccharide vindt plaats op een dolichol carrier in het RER. Het dolichol-oligosaccharide-complex wordt wel een "lipid-linked oligosaccharide" (LLO) genoemd. Nadat het dolichol zelf eerst in het membraan van het RER is gefosforyleerd worden er aan de cytoplasmatische kant van het membraan enzymatisch twee N-acetylglucosamine eenheden (GlcNAc) aangebouwd. Daarna volgt de opbouw met mannoses eveneens aan de cytoplasmatische kant van het membraan. Nadat vijf mannoses zijn toegevoegd komt de oligosaccharidestructuur aan de kant van het lumen van het RER te zitten. Daar gaat de opbouw met mannoses verder. Deze worden in een dolichol-gebonden vorm aangeleverd in het RER (figuur 1). Uiteindelijk ontstaat een LLO met een  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  structuur. Dit kant en klare oligosaccharide is nu geschikt om van zijn dolichol carrier overgezet te worden op een eiwitketen. Ook dit proces verloopt enzymatisch met behulp van een oligosaccharyltransferase. Het enzym plaatst het oligosaccharide op een asparagine die onderdeel uitmaakt van een glycosyleringsplaats. Deze plaats wordt door het enzym herkend doordat er een herkenningssequentie in voorkomt van Asn-X-(Ser/Cys/Thr) waarbij de X ieder aminozuur behalve proline of asparaginezuur kan zijn. De oligosaccharide keten is met het eiwit verbonden via een glycosidische band. Het zojuist gevormde glycoproteïne komt nu in een fase van vouwing en van eventuele assemblage met andere subunits. Tevens zal de laatste hand worden gelegd aan de oligosaccharideketen. De eiwitten worden hierbij begeleid door een speciale groep van chaperonne-eiwitten en vouwingsenzymen. Voorbeelden van vouwingsenzymen zijn Erp72 en glucose regula-



**Figuur 1.** De biosynthese van het oligosaccharide deel van N-geglycosyleerde eiwitten. OTase: oligosaccharyltransferase; PMM2: fosfomannomutase (defect bij CDG IA); PMI: fosfomannose isomerase (defect bij CDG Ib); Alg6: glucosyltransferase (defect bij CDG Ic).



**Figuur 2.** N-glycosylering van transferrine. A: pentasialotransferrine; B: tetrasialotransferrine.

ted protein 58 of grp58. Chaperonne-eiwitten komen in hoge concentratie in het ER voor. Zij immobiliseren het jonge glycoproteïne als het ware zodat er voldoende tijd is om de vouwing en assemblage kwalitatief goed te laten verlopen. Een belangrijke vertegenwoordiger van deze groep is het 78 kD glucose-regulated protein of grp78 (ook wel immunoglobulin binding protein of BiP genoemd). Andere chaperonnes in het ER behoren veelal ook tot de familie van glucose-regulated (stress) proteins (bv grp94, grp170, calreticuline en calnexine). De chaperonnes hebben tevens een kwaliteitsbewakingfunctie. Als een eiwit niet goed gevouwen of geassembleerd is ontstaat een stabiele aggregatie met bij voorbeeld het BiP-eiwit waarna afbraak volgt. Vouwing van eiwitten verloopt foutief bij biochemische stress zoals bij tekorten van ATP, glucose, zuurstof of calcium. Onder dergelijke condities wordt de vorming van chaperonne eiwitten opgevoerd teneinde de kwaliteit van het proces in het ER te kunnen garanderen. Tijdens de vouwing en assemblage wordt de oligosaccharide-keten door nog drie enzymen bewerkt, waarbij de glucoses weer worden verwijderd en het oligosaccharide de vorm  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  aanneemt (figuur 1). Nadat de meeste eiwitten zo vrijwel volledig zijn gevouwen en de meeste eiwitcomplexen volledig zijn geassembleerd is het glycoproteïne klaar om het ER te verlaten en naar het cis-Golgi te gaan waar het zal worden klaargemaakt om zijn finale bestemming te bereiken.

In het Golgi apparaat aangekomen ondergaat het glycoproteïne nog zes enzymatische stappen, verdeeld over de verschillende onderdelen van het Golgi. In geval van transferrine ontstaat uiteindelijk een biantennair of een triantennair oligosaccharide, waarbij N-acetylneuraminezuurgroepen eindstandig op de entennes zitten (figuur 2). Naast dit oligosaccharide bestaan nog enkele andere typen die voor N-glycosylering van eiwitten worden gebruikt. Alle typen hebben een basisstructuur met twee GlcNAc-eenheden en drie mannoses. Zo kunnen er naast het hierboven be-

schreven bi- of triantennaire “complexe type” andere glycosyleringstypen ontstaan (1. “high mannose” 2. hybride 3. poly-N-acetylglucosamine) die hier verder niet besproken worden. Het type oligosaccharide dat op een bepaalde positie wordt gezet vertoont microheterogeniteit en is afhankelijk van de species, het celtype, het ontwikkelingsstadium en de conformatie van het eiwit zelf. Ook kan de glycosylering worden beïnvloed door pathologische processen en door bepaalde medicijnen.

### De diagnostiek van N-glycosyleringsdefecten in het laboratorium

Het vinden van afwijkingen in de glycosylering van transferrine vormt van oudsher de hoeksteen van de diagnostiek van het CDG-syndroom. Transferrine iso-elektrische focusering heeft zich inmiddels in Nederland in de praktijk van vele klinisch genetische centra een plaats verworven. Transferrine is een voorbeeld van een N-geglycosyleerd plasma eiwit (10). Het bezit twee potentiële glycosyleringsplaatsen (Asn 413 en 611) waarop een glycaanstructuur van het zogenaamde “complexe type” met twee of drie entennes geplaatst is (figuur 2). Steeds zit het negatief geladen N-acetylneuraminezuur eindstandig op de entennes. Deze lading is medebepalend voor het iso-elektrische punt van het eiwit. In normaal humaan plasma komt de tetrasialo-variant, waarin de beide glycosyleringsplaatsen door bi-antennaire glycaanstructuren bezet zijn, als kwantitatief meest belangrijke vorm voor. Ook trisialo-, pentasialo- en hexasialotransferrine zijn bestanddelen van normaal humaan plasma (11). Tabel 1 laat de onderlinge verhoudingen van de verschillende vormen in normaal plasma zien die in ons laboratorium als referentiewaarden worden aangehouden. De eerste maand na de geboorte moet overigens met iets andere referentiewaarden rekening worden gehouden (12).

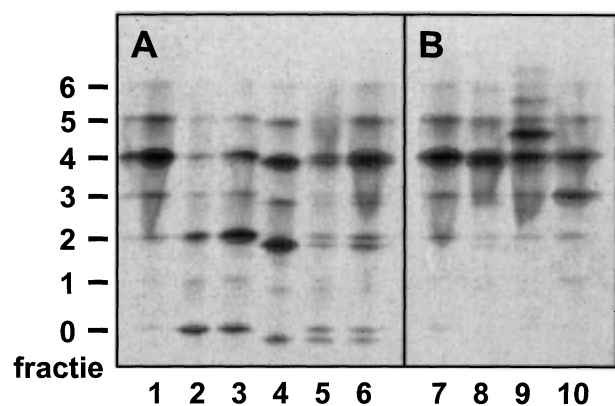
Wanneer nu asialo-, monosialo-, disialo- of trisialotransferrine in verhoogde mate in plasma worden gevonden is er een hypoglycosylering van transferrine.

**Tabel 1.** Referentiewaarden voor de verschillende transferrine vormen in plasma

Transferrine fractie	Referentie range (%) controles (n=30)	Range (%) CDG Ia (n=12)
0	0.0 - 2.6	5.4 - 29.5
1	0.0 - 2.6	0.1 - 7.1
2	1.6 - 6.1	17.0 - 37.7
3	2.5 - 15.6	5.0 - 12.5
4	51.2 - 72.2	20.6 - 49.5
5	12.1 - 30.8	3.9 - 19.3
6	0.0 - 9.0	0.0 - 5.9

Dit vormt een aanwijzing voor een N-glycosyleringsdefect. Bij de verschillende vormen van het CDG-syndroom gaat het om primaire defecten in de N-glycosylering. Er zijn echter ook enkele beelden die secundair een dergelijke hypoglycosylering van transferrine veroorzaken. Dit komt ondermeer voor bij galactosaemie (13), hereditaire fructose intolerantie (14), ernstige leverpathologie (15) en bij het hemolytisch uremisch syndroom. De in de klinische chemie meest bekende oorzaak van transferrine hypoglycosylering is echter de chronische alcohol abuses (15-17). Het spreekt voor zich dat de diagnose CDG-syndroom pas kan worden gesteld als secundaire oorzaken van transferrine hypoglycosylering zijn uitgesloten. Andersom mag op basis van een transferrine profiel pas van een vermoeden van alcohol abuses worden gesproken als alle andere primaire en secundaire oorzaken van transferrine hypoglycosylering zijn uitgesloten.

Afwijkende glycosylering van transferrine kan met verschillende technieken worden gedemonstreerd (11, 16, 18-21). Zo wordt voor de diagnostiek van alcohol abuses vaak de CDtect methode gebruikt die op ionenwisseling gebaseerd is (16). Voor de diagnostiek van het CDG-syndroom heeft het de voorkeur een techniek te hanteren waarmee alle transferrinevormen van elkaar kunnen worden onderscheiden (22). Het



**Figuur 3.** Iso-elektrische focusering van transferrine in serum of plasma. Tussen haakjes onder b. in deze legende de nomenclatuur volgens Weidinger et al (23).

Voorbeelden van de diverse patiënten categorieën 1: Normale patroon; 2: CDG Ia; 3: CDG Ic; 4: CDG IX; 5: Galactosemie; 6: Alcohol abuses. Polymorfismen in het transferrine eiwitdeel: 7: Normale patroon (TfC1); 8: Frequent voorkomende variant (TfC1C2); 9: Zeldzame variant (TfC1B2). Zeldzame variant (geen naam bekend).

meest in gebruik is de iso-elektrische focusering met immunodetectie. Figuur 3a laat in laan 1 het patroon zien van een normaal plasma waarin de tetrasialo-band als meest belangrijke component aanwezig is. Daarnaast is een drietal patiënten met verschillende typen van het CDG-syndroom weergegeven waarin de verhoging van de asialo en de disialofractie opvalt. Laan 5 en 6 laten het patroon zien van respectievelijk een patiënt met een onbehandelde galactosemie en een patiënt met alcohol abuses. Een complicatie bij de interpretatie van de iso-elektrische focuseringspatronen is het voorkomen van polymorfismen in het eiwitdeel van het transferrine (23). Dergelijke polymorfismen kunnen het iso-elektrisch punt van het eiwit en daarmee het transferrine iso-elektrische focuseringsprofiel beïnvloeden. Dit aspect vormt overigens eveneens een complicatie bij alle andere technieken waarbij transferrine-iso-vormen van elkaar worden gescheiden en dus ook bij de CDtect methode. Polymorfismen in het eiwitdeel van transferrine hebben klinisch voor zover bekend geen enkele betekenis. Er bestaan vele verschillende polymorfismen die in wisselende mate van invloed kunnen zijn op het iso-elektrisch punt van de transferrinevormen (23). Door het optreden van dergelijke polymorfismen laat het iso-elektrische focuseringspatroon vaak dubbele banden zien. Dit illustreert dat de betreffende patiënt twee verschillende transferrine-allelen heeft (hetero-allelisch). Figuur 3b laat enkele van deze polymorfismen zien en toont hoezeer de interpretatie bemoeilijkt kan worden. Laan 8 heeft dubbele banden voor de disialo- en de trisialofractie. Dit betreft een zeer frequent voorkomend polymorfisme dat ook in figuur 3a laan 5 en 6 wordt gezien. In de lanen 9 en 10 gaat het om zeer zeldzame polymorfismen. Ze zijn in deze figuur opgenomen om te illustreren dat de interpretatie lastig kan worden. De patiënt in laan 10 heeft het normale allel en een allel met een polymorfisme. Van dit laatste allel komt een eiwitproduct met een duidelijk ander iso-elektrisch punt. De verandering van de lading van het eiwitdeel is van dien aard dat het iso-elektrisch punt van de tetrasialovorm precies op de plaats van de trisialovorm terecht komt. De trisialofractie is op zijn beurt verschoven naar de positie van de disialofractie. Het gehele patroon zou gemakkelijk foutief als hypoglycosylering geïnterpreteerd kunnen worden. Een hulpmiddel dat in dit soort moeilijke gevallen kan worden gebruikt om na te gaan of een eiwitpolymorfisme in het spel is, is een incubatie van het monster met neuraminidase. Dit enzym zal alle transferrinevormen ontdoen van hun eindstandige neuraminezuur en daardoor alle ladingsvariatie veroorzaakt door het oligosaccharidedeel van het transferrine wegnemen. Normaal zal nu bij iso-elektrische focusering nog slechts één transferrineband te zien zijn. Indien de patiënt hetero-allelisch is voor een bepaald polymorfisme in het eiwitdeel van transferrine zullen na de incubatie met neuraminidase nog twee banden aanwezig zijn.

Om nu met nog grotere zekerheid van een glycosyleringsdefect te kunnen spreken is het van belang te kunnen aantonen dat ook andere plasmaglycoproteïnen afwijkend geglycosyleerd zijn. In Nijmegen

wordt hiervoor de elektroforese van thyroxinebindend globuline (TBG) gebruikt. Wanneer nu een glycosyleringsprobleem vaststaat is het onderscheid tussen primaire en secundaire vormen aan de orde. Als door exclusie van secundaire oorzaken is vastgesteld dat het naar alle waarschijnlijkheid om een primair glycosyleringsdefect gaat is het van belang om vast te stellen of er een type I patroon met verhoogd asialo- en disialotransferrine aanwezig is. In dat geval is de bepaling van de enzymen fosfomannomutase (PMM) en fosfomannose-isomerase (PMI), die betrokken zijn bij respectievelijk het CDG Ia en Ib subtype (figuur 1), in leukocyten of fibroblasten een logische volgende stap naar de diagnose, daarna gevolgd door moleculair genetische analyse. Wanneer deze enzymbepalingen niet tot de diagnose leiden kan het nog om het CDG Ic type gaan en is LLO-analyse in fibroblasten een volgende diagnostische stap. Het CDG-type I (CDG Ia, Ib, Ic en Ix tezamen) komt vele malen frequenter voor dan alle andere typen. In het zeldzame geval dat toch een ander patroon op de transferrine iso-elektrische focusering wordt gezien kan het om de CDG-typen II, III of IV gaan en hangen de volgende diagnostische stappen af van het gevonden transferrineprofiel.

#### **Welke andere eiwitten zijn afwijkend bij CDG?**

Afwijkingen zijn bij het CDG-syndroom gevonden in vele N-geglycosyleerde eiwitten. Sommige plasma-eiwitten zijn in concentratie verhoogd zoals de lysosomale enzymen. Wanneer de concentratie van een plasma-eiwit normaal is garandeert dit niet dat het normaal geglycosyleerd is. Naast transferrine vallen ook andere plasmaglycoproteïnen als alfa-1-antitrypsine, TBG, haptoglobine, antitrombine III en orosomucoïd als afwijkend op wanneer elektroforetische technieken worden toegepast. Soms wordt bij het CDG-syndroom ook proteïnurie en hypoalbuminemie gevonden. In de stolling worden eveneens eiwitafwijkingen gevonden zoals een verlaagde concentratie van de stollingsfactoren VIII, IX en XI, van antitrombine III, proteïne C, proteïne S en van de heparine cofactor II. Het fibrinogeen D-dimeer is vaak juist in concentratie verhoogd. Schildklierparameters kunnen bij CDG afwijkend zijn. TBG kan in concentratie verlaagd zijn net als het totaal plasma T3 en T4, terwijl TSH in serum vaak verhoogd is. Een onverklaarde neonatale hypothyreoïdie of een biochemisch euthyreoïde status met laag TBG moeten altijd aanleiding zijn om de mogelijkheid van een CDG-syndroom nader te onderzoeken. Andere endocriene afwijkingen zijn gevonden in prolactine, FSH en GH (24).

Bestudering van glycosylering van eiwitten in het centrale zenuwstelsel (CZS) is van speciaal belang gezien de duidelijke neurologische symptomatologie bij de meeste CDG-typen. Gebleken is dat het humane CZS een specifieke "brain-type" glycosylering kent (25). De oligosacchariden op de N-geglycosyleerde glycoproteïnen wijken af van de oligosacchariden op perifeer geglycosyleerde eiwitten. Om deze redenen is gezocht naar een glycoproteïne in de liquor dat lokaal in het CZS wordt gemaakt en niet door transu-

datie in de liquor kan zijn gekomen. Het beta-trace-eiwit is hiervoor gebruikt. Pohl et al en Grünewald et al vonden een evidente hypoglycosylering van dit eiwit in liquor van CDG Ia, Ic en II patiënten (26,27). Andere CDG-typen zijn op dit aspect nog niet nagekeken. De beta-trace eiwitelektroforesetechniek biedt ook de mogelijkheid om glycosyleringsdefecten op te kunnen sporen die uitsluitend de "brain-type" glycosylering treffen. Grünewald et al vonden bij een Nederlandse patiënt een eerste aanwijzing voor het bestaan van een dergelijk tot het CZS beperkt defect (27).

#### **De verschillende typen van het CDG-syndroom**

Langzaam is duidelijk geworden dat aan het CDG-syndroom verschillende primaire defecten ten grondslag kunnen liggen. De variatie in de klinische beelden van de verschillende typen is groot. Het gaat om multisysteem ziekten (28), wat eenvoudig te begrijpen is door de veelheid van eiwitten in ons lichaam die N-geglycosyleerd zijn. De meeste CDG-typen hebben een neurologische component maar zoals hieronder beschreven zijn er ook subtypen, zoals het CDG Ib subtype, waarbij het centrale zenuwstelsel niet aangedaan lijkt te zijn. Daar het proces van eiwit N-glycosylering een zeer complexe biosynthese van de oligosaccharide keten vereist, waarbij tientallen enzymen een rol spelen, kan worden voorzien dat de CDG-typen waarvan nu het enzymdefect is opgehelderd nog maar het begin vormen van een veel grotere groep defecten. Er is in dit relatief onontgonnen gebied van de stofwisseling nog veel te ontdekken. Het laat zich voorspellen dat ook de O-glycosylering van eiwitten, die in dit artikel verder niet wordt besproken, oorzaken van nog onbekende stofwisselingsziekten in zich kan dragen. Hieronder worden de klinische, moleculair genetische en biochemische aspecten van de CDG-typen beschreven. De naamgeving van de verschillende CDG-typen is van oudsher bepaald door de bij transferrine iso-elektrische focusering gevonden patronen. Hierdoor hebben alle CDG-I-subtypen eenzelfde transferrineprofiel met verhoogd asialo- en disialotransferrine. Door de in november 1999 te Leuven gemaakte afspraken over nomenclatuur rond het CDG-syndroom wordt de koppeling tussen de nomenclatuur en het transferrineprofiel verlaten. De tot op heden bekende typen van het CDG-syndroom zullen worden hernoemd. Het CDG-I-type zal alle defecten betreffen die hun oorzaak hebben in de assemblage van het dolichol-oligosaccharidecomplex. Grofweg komt het erop neer dat vrijwel alle defecten in de biosynthese van dit complex in het cytoplasma en het ER onder het CDG-I-type zullen vallen. Defecten in de verdere "processing" van het complex in het Golgi apparaat zullen onder het CDG-II-type vallen. CDG-varianten waarvan het moleculaire defect nog niet gevonden is zullen pas na het vinden van het primaire defect in deze nomenclatuur kunnen worden ingepast. Door deze zeer recente afspraken verandert er betrekkelijk weinig aan de naamgeving van de tot op heden gepubliceerde subtypes van het syndroom. Waar dit wel het geval is wordt dat hieronder aangegeven.

### **CDG-Ia (fosfomannomutase-deficiëntie)**

Het CDG Ia subtype is het eerst ontdekte en het meest frequent voorkomende CDG-subtype. Reeds bij de geboorte hebben patiënten met CDG Ia klinische verschijnselen van de ziekte. Meest karakteristiek zijn de abnormale vetverdeling met lipodystrofie, abnormale vetverdeling ("fat pads") aan de rugzijde en ingetrokken tepels ("inverted nipples"). Neonatale hypertrofe obstructieve cardiomyopathie is beschreven (29) evenals congenitaal nefrotisch syndroom (30). Vaak is er een "failure to thrive". Niet zelden overlijden patiënten reeds op vroege kinderleeftijd. Het cerebellum is veelal atroof. Andere patiënten raken ernstig geretardeerd en kunnen door de axiale hypotonie, de perifere neuropathie en de ataxie niet of niet goed lopen. Bij de meeste patiënten ontstaat een ernstige spraakachterstand. De groei is vertraagd en langzaam ontwikkelen de patiënten een kyphoscoliose. Oogheelkundig is bij CDG Ia patiënten retinitis pigmentosa beschreven. Volwassen patiënten met CDG Ia zijn beschreven (31). Hoewel pogingen zijn gedaan om patiënten met mannose te behandelen bleek dit niet effectief (32). Er is geen therapie voor de ziekte beschikbaar. CDG Ia erft autosomaal recessief over. Er ligt een defect in het cytoplasmatische enzym fosfomannomutase aan ten grondslag (33). Op enzymniveau kan dit zowel in leukocyten als in fibroblasten worden aangetoond. In het betreffende PMM2-gen op chromosoom 16p13 zijn verschillende mutaties gevonden (34,35). Klinisch chemisch worden naast de afwijkende plasmatransferrine-isovorm verdeling (met verhoogd asialo- en disialotransferrine) vele andere afwijkingen gevonden. Zoals hierboven beschreven worden afwijkende concentraties gezien van enkele stollingsfactoren en hun inhibitoren, van TBG, T3 en T4 en van de enzymactiviteit van enkele lysosomale enzymen in plasma. Proteïnurie komt veel voor evenals hypoalbuminemie.

### **CDG-Ib (fosfomannose-isomerase deficiëntie)**

Het CDG Ib subtype is een autosomaal recessief overervende ziekte. Klinisch wijkt het beeld zeer af van de Ia- en Ic-subtypen. De patiënten hebben namelijk geen mentale- of motore retardatie. Zij hebben een gastrointestinale aandoening gekarakteriseerd door een "protein-losing" enteropathie (4,5). Ook wordt leverpathologie gezien. Trombose en levensbedreigende bloedingen kunnen bij het beeld voorkomen. De eerste symptomen kunnen al in het eerste levensjaar optreden (diarree en/of braken). Klinisch-chemisch kan naast het afwijkende transferrine isoelektrische focuseringspatroon (een type-I-patroon met verhoogd asialo- en disialotransferrine) een ernstige hypoproteïnemie en een verlaagd antitrombine III worden waargenomen. De ziekte blijkt te berusten op een deficiëntie van het enzym fosfomannose-isomerase in het cytoplasma. Hierdoor kunnen de patiënten geen mannose-6-fosfaat uit fructose-6-fosfaat vormen. Het lipid-linked oligosaccharide dat nodig is voor eiwitglycosylering bestaat voor 9/14 deel uit mannose. Om een volledig afgebouwd LLO te krijgen dat voor eiwitglycosylering geschikt is zal dus

veel mannose nodig zijn. Door het tekort aan mannose-6-fosfaat dat door het PMI-enzymdefect zal ontstaan kan onvoldoende GDP-mannose worden gemaakt, waardoor onvoldoende volledig afgebouwd LLO kan worden gemaakt. De eiwitglycosylering zal stagneren. In tegenstelling tot het CDG Ia subtype is er voor CDG Ib patiënten een effectieve therapie die zowel de glycosylering van eiwitten alsook de klinische symptomen normaliseert. De therapie bestaat uit levenslange orale toediening van mannose. Zoals figuur 1 demonstreert kan dit mannose worden omgezet in mannose-6-fosfaat dat vervolgens door het fosfomannomutase weer kan worden omgezet in mannose-1-fosfaat waarna de eiwitglycosylering verder weer normaal kan verlopen. Mannose wordt ook via de voeding verkregen en vanuit het lysosoom is er een voortdurend aanbod van mannose door afbraak van glycoproteïnen. Blijkbaar is de hoeveelheid op deze wijze verkregen mannose onvoldoende voor een adequate glycosylering en kunnen de symptomen van patiënten met PMI-deficiëntie niet worden voorkomen. Het defect kan op enzymniveau worden aangetoond in leukocyten en in gekweekte huidcellen. Ook op DNA-niveau zijn mutaties in het PMI-gen gevonden.

### **CDG-Ic (dolichol pyrofosfaat Man<sub>6</sub>GlcNac<sub>2</sub> alfa-1,3-glycosyltransferasedeficiëntie)**

Door in het laboratorium kindergeneeskunde en neurologie van het AZN systematisch plasmamonsters van alle patiënten die worden aangeboden voor lysosomale enzymdiagnostiek na te kijken op transferrine-isovormen werden een zevental patiënten uit vier families gevonden die duidelijk afwijkende patronen hadden maar enzymatisch normaal bleken wat betreft PMM- en PMI-activiteit. Het transferrineprofiel was een type-I-profiel met verhoogd asialo- en disialotransferrine. Toen bleek dat ook andere glycoproteïnen als het TBG een abnormaal elektroforetisch gedrag vertoonden was duidelijk dat deze patiënten aan een nog onbekende vorm van het CDG-syndroom leden. Ook het klinisch beeld was duidelijk anders dan bij de bekende CDG-typen. Er is geen abnormale vetverdeling en geen afwijkend cerebellum bij MRI. De patiënten hebben een neurologisch bepaald ziektebeeld met psychomote retardatie, epilepsie en axiale hypotonie. Oogheelkundig werden naast het strabisme geen afwijkingen gezien. De patiënten zijn klinisch minder aangedaan dan patiënten met het CDG Ia subtype. Aan de andere kant waren de afwijkingen in de stolling juist ernstiger dan bij CDG Ia patiënten. CDG Ic erft autosomaal recessief over. Uiteindelijk werd het moleculaire defect van deze patiënten op een bijzondere wijze opgehelderd. In gekweekte huidcellen van deze patiënten werd een duidelijk afwijkend profiel gevonden van LLO's (6). Dit wijst op een defect van de opbouw van het oligosaccharide in het endoplasmatisch reticulum. De groep van Berger, Aebi en Hennet uit Zürich had reeds lange tijd ervaring met afwijkende LLO profielen in mutante giststammen. Door nu het LLO profiel van de patiënten te vergelijken met de LLO profielen van vele door hen gekarakteriseerde gistmutanten

werd een gelijkenis gezien met Alg5 en Alg6 gistmutanten. In de cellijnen van de patiënten bleek zich een LLO te stapelen met een  $\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$  structuur (figuur 1). Door nu gebruik te maken van de analogie van het humane - en het gistgenoom konden de humane Alg5- en 6-genen snel worden gevonden. Door beide genen op mutaties na te kijken kon worden uitgesloten dat het Alg5-gen de ziekte van de patiënten veroorzaakte. In het Alg6-gen werd wel een mutatie gevonden (7). Bij alle patiënten betrof dit een puntmutatie (998C→T). Op aminozuurniveau veroorzaakt deze mutatie de inbouw van een valine in plaats van een alanine (A333V) in het glucosyltransferase dat door dit gen wordt gecodeerd. De volledige naam van het enzym is dolichol pyrofosfaat  $\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$  alfa-1,3-glucosyltransferase. Het enzym is verantwoordelijk voor de opbouw van een eerste glucosemolecuul aan de oligosaccharideketen. De glucoses in de oligosaccharideketen zijn van belang voor de enzymactiviteit van het oligosaccharidetransferase dat het oligosaccharide overzet van de dolichol-carrier op het eiwit. De glucosyltransferasereactie vindt vlak voor deze overdracht plaats (figuur 1). Met hulp van het gistmodel kon ook worden aangetoond dat deze mutatie werkelijk de oorzaak is van de afwijkende glycosylering. Expressie van het niet gemuteerde humane glucosyltransferase cDNA in de Alg6-gistmutant bleek de afwijkende glycosylering in deze mutant partiëel te kunnen corrigeren. Wanneer echter het humane glucosyltransferase met de 998C→T mutatie in de gist tot expressie werd gebracht werd de afwijkende glycosylering van deze gistsoort niet gecompenseerd. Ongeveer tegelijk met het hier beschreven onderzoek vond onafhankelijk ook de groep van von Figura in Göttingen ditzelfde defect (36). In hun publicatie noemde deze groep dit defect het CDG type V. Door de recente afspraken over nomenclatuur rond het CDG-syndroom staat nu vast dat dit subtype in de toekomst CDG type Ic genoemd zal worden.

### CDG-Ix

Er zijn patiënten beschreven die bij transferrine iso-elektrische focusering een type-I-patroon (asialo- en disialotransferrine verhoogd) bleken te hebben maar klinisch en biochemisch niet als CDG Ia, Ib of Ic geclassificeerd konden worden (37). Omdat het moleculaire defect in deze patiënten vooralsnog onopgelost is worden zij voorlopig als CDG type Ix benoemd. Vanwege het feit dat het transferrineprofiel uitwijst dat de oligosaccharideketen onvolledig is afgebouwd ofwel in onvoldoende mate op de eiwitketen wordt overgezet is de verwachting dat het defect bij deze patiënten in het cytoplasma of in het endoplasmatisch reticulum ligt. Speciale aandacht als kandidaat voor de plaats van een mogelijk defect gaat uit naar het oligosaccharidetransferase, een complex enzym met vele subunits dat de uiteindelijke overdracht van de oligosaccharideketen van zijn dolichol-carrier naar het eiwit moet verzorgen (figuur 1). Ook is het mogelijk dat in deze groep nog meerdere verschillende onderliggende defecten aantoonbaar zullen blijken.

### CDG-IIa (N-acetylglucosaminyltransferase II)

Van het CDG II type zijn nog slechts weinig patiënten bekend (38). Door de nieuwe afspraken rond de nomenclatuur zullen de tot op heden beschreven patiënten in het vervolg als CDG type IIa worden gerubriceerd. Patiënten met CDG IIa hadden al direct na de geboorte symptomen. De patiënten waren ernstig geretardeerd en hadden dysmorphe kenmerken aan de thorax, de oren en de extremiteiten. Beide patiënten hadden stereotype handwasbewegingen, een ventrikelseptumdefect, hypogonadisme en osteopenie. Het cerebellum was niet atroof. De ziekte erft autosomaal recessief over. Het plasma transferrine iso-elektrische focuseringspatroon was afwijkend met een sterk verhoogde disialo fractie en een vrijwel afwezige tetrasialo fractie. De stollingsfactoren IX, XI, XII en ook antitrombine III, proteïne S, proteïne C en de heparine cofactor II waren in concentratie verlaagd tot sterk verlaagd. Analyse van de oligosaccharide ketens in het transferrine van patiënten leverde uiteindelijk de sleutel voor het moleculaire defect op. De ketens bleken getrunceerd en waren monoentennair en monogesiayleerd. Dit wees op een defect in het N-acetylglucosaminyltransferase II (GlcNAcT-II) in het Golgi complex (39). In een normale cel bouwt het enzym GlcNAcTase-I een eerste N-acetylglucosamine aan de  $\text{Man}_3\text{GlcNac}_2$ -structuur die alle glycanen betrokken bij N-glycosylering gemeenschappelijk hebben. Pas daarna kan het GlcNAcT-II een N-acetylglucosamine voor de tweede entenne toevoegen. Omdat dit enzym deficiënt is bij het CDG IIa type zal de tweede entenne van de glycanen bij deze patiënten niet kunnen worden afgebouwd. Op enzymniveau kan het defect in gekweekte huidcellen van patiënten worden aangetoond. Mutaties in het betreffende gen zijn aangetoond.

### CDG-III

Van het CDG III type zijn slechts twee patiënten uit verschillende landen bekend (40). Het ziektebeeld van deze kinderen liet zijn eerste symptomen ("floppy infants") al direct na de geboorte zien. Zij waren sterk psychomotor geretardeerd, hadden een tetraparese met opticus atrofie, hepatomegalie en depigmentaties van de huid. De MRI toonde duidelijke afwijkingen onder meer met dysmyelinisatie. De iso-elektrische focusering van transferrine liet licht verhoogde a-, mono-, di- en trisialo fracties zien. Het moleculaire defect van dit CDG-type is vooralsnog onopgelost. Door de nieuwe nomenclatuur afspraken zal de naam CDG III komen te vervallen. Dit subtype zal een nieuwe naam krijgen zodra het primaire defect bekend is.

### CDG-IV

Ook van het CDG IV type zijn tot op heden slechts twee niet gerelateerde patiënten bekend (41). Beiden waren microcefaal, hadden dysmorphe kenmerken en hadden een neurologisch bepaald ziektebeeld met epilepsie. MRI liet afwijkingen zien van het cerebrum en het cerebellum. Transferrine iso-elektrische focusering liet een verhoogd disialotransferrine zien

bij een normale asialofractie. Het moleculaire defect van dit CDG type is nog onopgehelderd. Ook hier geldt dat de naam CDG IV zal komen te vervallen. Dit subtype zal een nieuwe naam krijgen zodra het primaire defect is opgehelderd.

### **Prenatale diagnostiek**

Zodra in een familie de diagnose CDG is gesteld kan in de meeste gevallen bij een volgende zwangerschap prenatale diagnostiek worden aangeboden (typen Ia, Ib, Ic, II). Alle tot op heden bekende CDG-varianten erven autosomaal recessief over. Het herhalingsrisico op een volgend aangedaan kind is voor dezelfde ouders dus 25%. Het is niet mogelijk gebleken de eiwitglycosylering zelf als betrouwbare marker van de ziekte bij prenatale diagnostiek te gebruiken (42). Het is dus voor de prenatale diagnostiek noodzakelijk dat het primaire defect in de betreffende familie op eiwitniveau of op DNA niveau bekend is. Als enigszins mogelijk zal in voorkomende gevallen de prenatale diagnostiek gebaseerd worden op zowel de meting van de enzymactiviteit als op moleculair genetische technieken (43). Wel moeten dan natuurlijk in een eerder stadium de voor deze familie specifieke mutatie of mutaties zijn vastgesteld. In sommige gevallen zal worden volstaan met of de enzymbepaling of de mutatieanalyse in het foetale materiaal.

### **Bij welke indicaties dient aan het CDG-syndroom gedacht te worden?**

Aanvankelijk heeft de toepassing van transferrine iso-elektrische focusering in het kader van de diagnostiek van het CDG-syndroom zich beperkt tot patiënten met de genoemde specifieke klinische kenmerken van het CDG Ia subtype (zoals abnormale vetverdeling, ingetrokken tepels en cerebellum atrofie) en patiënten met een onverklaarde neonatale hypothyreoïdie. Inmiddels is duidelijk dat niet alle CDG-patiënten deze typische klinische kenmerken hebben. Het CDG-syndroom blijkt een pluriforme verzameling klinische beelden te zijn. Voor veel van de CDG-typen geldt dat patiënten een multisysteem ziekte hebben vaak met neurologische betrokkenheid. Echter, na de ontdekking van het CDG Ib subtype kan niet meer worden gesteld dat alle CDG-patiënten neurologische symptomatologie hebben. De onbekendheid met het beeld maar ook het ontbreken van specifieke klinische kenmerken bemoeilijkt de klinische diagnose van het CDG-syndroom. Daarbij komt dat zeker nog niet alle CDG varianten gevonden zijn. Omdat er varianten van het CDG-syndroom bestaan die goed behandelbaar zijn en omdat prenatale diagnostiek in enkele van de CDG-typen mogelijk is, is het van belang om alle patiënten met CDG zo vroeg mogelijk te diagnosticeren. Om deze redenen heeft het CDEMZ-laboratorium (Chemische Diagnostiek Erfelijke Metabole Ziekten) een speciale verantwoordelijkheid. Er gaan stemmen op om transferrine iso-elektrische focusering breed in de diagnostiek van erfelijke ziekten in te zetten en tot een vast aspect te maken in de diagnostische benadering van iedere patiënt die wordt aangeboden voor metabool onderzoek.

In Nijmegen zal voorlopig worden doorgedaan met het screenen op klinische indicatie en met het nakijken van alle monsters die voor lysosomale diagnostiek worden aangeboden. Ons advies is om screening op CDG uit te voeren op een viertal groepen patiënten:

- patiënten met één van de specifieke kenmerken van CDG Ia (abnormale vetverdeling, ingetrokken tepels en cerebellum atrofie) of CDG Ib (protein losing enteropathy, recidiverend braken met pas-sagière leverziekte verschijnselen)
- patiënten met twee of meer van de overige kernsymptomen van tot op heden bekende CDG-typen (failure to thrive, achterstand in ontwikkeling, epilepsie, axiale hypotonie, strabisme)
- patiënten met onverklaarde afwijkende uitslagen van een glycoproteïne (o.a. stollingsfactoren, schildklierparameters)
- patiënten met een onverklaarde multisysteem ziekte.

Het op CDG nakijken van patiënten die voor metabole diagnostiek worden aangeboden aan een KGC heeft belangrijke consequenties. De metabole diagnostiek gebeurt nu veelal op urine, terwijl transferrine iso-elektrische focusering een plasma monster vereist. De patiënten zouden hiervoor dus extra geprikt moeten worden. De benadering in de verschillende Klinisch Genetische Centra in Nederland is vooralsnog verschillend. Het verdient dan ook aanbeveling de diagnostische aanpak van CDG met de kinderartsen in Uw ziekenhuis en met de klinisch chemici uit Uw KGC te bespreken.

### **Literatuur**

1. Jaeken J, VanderSchueren-Lodeweyckx M, Casaer P, Snoeck L, Corbeel L, Eggermont E et al. Familial psychomotor retardation with markedly fluctuating serum prolactin, FSH and GH levels, partial TBG deficiency, increased arylsulphatase A and increased CSF protein: a new syndrome? *Ped Res* 1980; 14: 179.
2. Jaeken J, Eggermont E, Stibler H. An apparently homozygous X-linked disorder with carbohydrate deficient glycoproteins. *Lancet* 1987; II: 1938.
3. Jaeken J, van Eijk HG, van der Heul C, Corbeel L, Eeckels R, Eggermont E. Sialic acid deficient serum and cerebrospinal fluid transferrin in a newly recognised genetic syndrome. *Clin Chim Acta* 1984; 144: 245-247.
4. Niehues R, Hasilik M, Alton G, Körner C, Schiebe-Sukumar M, Koch HG et al. Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome Type Ib. Phosphomannose isomerase deficiency and mannose therapy. *J Clin Invest* 1999; 101(7): 1414-1420.
5. De Koning TJ, Dorland L, van Diggelen OP, Boonman AMC, de Jong GJ, van Noort WL et al. A novel disorder of N-glycosylation due to phosphomannose isomerase deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 245: 38-42.
6. Burda P, Borsig L, de Rijk-van Andel J, Wevers R, Jaeken J, Carchon H, Berger EG, Aebi M. A novel carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome characterised by a deficiency in glucosylation of the dolichol-linked oligosaccharide. *J Clin Invest* 1998;102(4): 647- 652.
7. Imbach T, Burda P, Kuhnert P, Wevers RA, Aebi M, Berger EG, Hennet T. A mutation in the human ortholog of the *Saccharomyces cerevisiae* ALG6 gene causes carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type Ic. *PNAS* 1999; 92(12): 6982-6987.



8. Dwek RA. Glycobiology: towards understanding the function of sugars. *Biochem Soc Trans* 1995; 23: 1-24.
9. Epstein FH. Folding of secretory and membrane proteins. *New Eng J Med* 1998; 339(23): 1688-1695.
10. MacGillivray RTA, Mendez E, Shewale JG, Sinha SK, Lineback-Zins J, Brew K. The primary structure of transferrin. *J Biol Chem* 1983; 258: 3543-3553.
11. Van Noort WL, van Eijk HG. Microheterogeneity of human serum transferrin: a biological phenomenon studied by isoelectric focusing in immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 1988; 9: 589-598.
12. Van Pelt J, Bakker JA, Velmans MH, Spaapen LJM. Carbohydrate deficient transferrine values in neonatal and umbilical cord serum. *J Inher Metab Dis* 1996; 19: 253-256.
13. Charlwood J, Clayton P, Keir G, Mian N, Winchester B. Defective galactosylation of serum transferrin in galactosaemia. *Glycobiology* 1998; 8: 351-357.
14. Jaeken J, Pirard M, Adamowicz M, Pronicka E, van Schaftingen E. Inhibition of phosphomannose isomerase by fructose-1-phosphate: an explanation for defective N-glycosylation in hereditary fructose intolerance. *Ped Res* 1996; 40: 764-766.
15. Gravel P, Walzer C, Aubry C, Balant LP, Yersin B, Hochstrasser DF et al. New alterations of serum glycoproteins in alcoholic and cirrhotic patients revealed by high resolution two dimensional gel electrophoresis. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 220: 79-85.
16. Stibler H. CDT in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. *Clin Chem* 1991; 12: 2029-2037.
17. De Keijzer MH, Kant GD, van den Bergh FAJTM, Vermes I. Enige ervaringen met de bepaling van koolhydraat-deficient transferrine in serum. *Tijdschrift Ned Ver Klin Chem* 1995; 20: 207-208.
18. Van Eijk HG, Geelhoed-Mieras MM, Kroos MJ, van Noort WL. Vergelijking van de kwalitatieve bepaling van humane sialo-transferrinen met de IEF en HPLC. *Tijdschrift Ned Ver Klin Chem* 1999; 24: 181-184.
19. Harrison HH, Miller KL. Multiple serum protein abnormalities in carbohydrate deficient glycoprotein syndrome: pathognomonic finding of two-dimensional electrophoresis. *Clin Chem* 1992; 38: 1390-1393.
20. Löf K, Koivula T, Seppä K, Fukunaga T, Siilanaake P. Semi-automatic method for the determination of different isoforms of carbohydrate deficient transferrin. *Clin Chim Acta* 1993; 217: 175-186.
21. Iourin O, Mattu TS, Mian N, Keir G, Winchester B, Dwek RA et al. The identification of abnormal glycoforms of serum transferrin in carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type I by capillary zone electrophoresis. *Glycoconj J* 1996; 13: 1031-1042.
22. Vreken P, Rusch H, Huijben K, Wevers RA. Anion-exchange chromatography versus isoelectric focusing of transferrin in diagnosis of the carbohydrate deficient glycoprotein syndrome. *J Inher Metab Dis* 1998; 21: 447-448.
23. Weidinger S, Cleve H, Schwarzfischer F, Postel W, Weser J, Goerg A. Transferrin subtypes and variants in Germany: further evidence for a Tf null allele. *Hum Genet* 1984; 66: 356-360.
24. De Zegher F, Jaeken J. Endocrinology of the carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type I from birth through adolescence. *Ped Res* 1995; 37(4): 395-401.
25. Hoffmann A, Nimtz M, Wurster U, Schmidt HS. Carbohydrate structures of beta-trace protein from human cerebrospinal fluid: evidence for "brain type" N-glycosylation. *J Neurochem* 1994; 63: 2185-2196.
26. Pohl S, Hoffmann A, Rudiger M, Nimtz M, Jaeken J, Conradt HS. Hypoglycosylation of a brain glycoprotein (beta-trace protein) in CDG syndromes due to phosphomannomutase deficiency and N-acetylglucosaminyl-transferase II deficiency. *Glycobiology* 1997; 8: 1077-1084.
27. Grünwald S, Huijben K, de Jong JGN, Smeitink JAM, Rubio E, Boers GHJ et al. Beta-trace protein in human cerebrospinal fluid: a diagnostic marker for N-glycosylation defects in brain. *Biochim Biophys Acta* 1999; 61883: 1-7.
28. Jaeken J, Stibler H, Hagberg B. Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome. *Acta Paed Scand* 1991; S375: 1-71.
29. Clayton PT, Winchester BG, Keir G. Hypertrophic obstructive cardiomyopathy in a neonate with the carbohydrate deficient glycoprotein syndrome. *J Inher Metab Dis* 1992; 15: 857-861.
30. Van der Knaap MS, Wevers RA, Monnens L, Jacobs C, Jaeken J, van Wijck JAE. Congenital nephrotic syndrome: a novel phenotype of type I carbohydrate deficient glycoprotein syndrome. *J Inher Metab Dis* 1996; 19: 789-91.
31. Stibler H, Blennow G, Kristiansson B, Lindehammer H, Hagberg B. Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome: clinical expression in adults with a new metabolic disease. *J Neurol Neurosurg Psych* 1994; 57: 552-556.
32. Alton G, Kjaergaard S, Etchison JR, Skovby F, Freeze HH. Oral ingestion of mannose elevated blood mannose levels: a first step towards a potential therapy for carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type I. *Biochem Mol Med* 1997; 60: 127-133.
33. Van Schaftingen E, Jaeken J. Phosphomannomutase deficiency is a cause of carbohydrate deficient glycoprotein syndrome. *FEBS letters* 1995; 377: 318-320.
34. Matthijs G, Schollen E, Pardon E, Veiga-DaCunha M, Jaeken J, Cassiman JJ et al. Mutation in PMM2, a phosphomannomutase gene on chromosome 16p13, in carbohydrate deficient glycoprotein I syndrome (Jaeken syndrome). *Nature Genetics* 1997; 16: 88-92.
35. Matthijs G, Legius E, Schollen E, van der Berk P, Jaeken J, Barone R et al. Evidence for genetic heterogeneity in the carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type I (CDGI). *Genomics* 1996; 35: 597-599.
36. Körner C, Knauer R, Holzbach U, Hanefeld F, Lehle L, von Figura K. Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type V: deficiency of dolichol-P-Glc: Man<sub>9</sub>GlcNac<sub>2</sub>-PP-dolichyl glucosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 95: 13200-13205.
37. Huemer M, Huber W-D, Schima W, Holzbach U, Wevers RA, Stöckler-Ipsiroglu S. Budd Chiari syndrome associated with coagulation abnormalities in a child with carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type IX. *J Pediatrics* in press.
38. Jaeken J, De Cock P, Stibler H, van Geet C, Kint J, Ramaekers V et al. Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type II. *J Inher Metab Dis* 1993; 16: 1041.
39. Jaeken J, Schachter H, Carchon H, De Cock P, Coddeville B, Spik G. Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type II: a deficiency in Golgi-localised N-acetylglucosaminyltransferase II. *Arch Dis Childh* 1994; 71: 123-127.
40. Stibler H, Westerberg B, Hanefeld F, Hagberg B. Carbohydrate deficient glycoprotein (CDG) syndrome - a new variant, Type III. *Neuropaediatrics* 1993; 24: 51-52.
41. Stibler H, Stephani U, Kutsch U. Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome - a fourth subtype. *Neuropaediatrics* 1995; 26: 1-3.
42. Clayton P, Winchester B, Di Tomaso E, Young E, Keir G, Rodeck C. Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome: normal glycosylation in the fetus. *Lancet* 1993; 341: 956.

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. Mucopolysaccharidose 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