

Overzichten

Peroxisomale ziekten: metabole en moleculaire basis en laboratoriumdiagnostiek

R.J.A. WANDERS, M. DURAN, B.T. POLL-THE en H.R. WATERHAM

Peroxisomale ziekten zijn relatieve nieuwkomers in het gebied van de erfelijke metabole ziekten, waarover in de afgelopen jaren veel bekend is geworden. Dat heeft met name te maken met het feit dat er veel nieuwe informatie beschikbaar is gekomen omtrent zowel de functies alsook de biogenese van peroxisomen, waardoor de metabole en moleculaire basis van de meeste peroxisomale ziekten op dit moment opgelost is zoals in dit overzichtsverhaal beschreven wordt.

Trefwoorden: peroxisomen; genetische ziekten; fosfolipiden; vetzuren; Zellwegersyndroom

Een karakteristiek aspect van eukaryote cellen is de aanwezigheid van gespecialiseerde organellen die alle hun eigen rol spelen in de celfysiologie. Dat geldt bijvoorbeeld voor het mitochondrion waar de oxidatieve fosforylering plaatsvindt, maar ook voor het lysosoom waar de afbraak van allerlei macromoleculen plaatsvindt, en zo ook de celkern waar de genetische informatie besloten ligt. Na lang te zijn onderschat als een organel van betrekkelijk geringe fysiologische waarde, is de werkelijke betekenis van peroxisomen voor de humane fysiologie in de laatste decennia duidelijk geworden. De meeste van de functies van peroxisomen hebben te maken met het lipidenmetabolisme. Defecten in één of meerdere van de peroxisomale functies zijn veelal geassocieerd met ernstige klinische manifestaties. Het prototype van de groep van peroxisomale ziekten is het cerebro-hepato-renale syndroom van Zellweger, in het kort Zellweger-syndroom, zoals dat voor het eerst in 1964 beschreven is door Bowen, Lee, Zellweger en Lindenberg als "A Familial syndrome of Multiple Congenital Defects" in een viertal kinderen die zich presenteerden met een merkwaardige combinatie van klinische afwijkingen. In alle gevallen was er sprake

van extreme spierhypotonie bij de geboorte, alsmede een reeks van congenitale misvormingen, waaronder een hoog voorhoofd, wijde fontanellen en schedel-naden, vlakke orbitarand, epicanthus, brede lage neusrug, displastische oorschelpen, micrognathie, hoog palatum, glaucoom met corneatroebeling, camptodactylie, pes equinovarus, e.a. De groep van peroxisomale ziekten omvat nu zeventien verschillende ziektebeelden, weergegeven in tabel 1.

Hoewel verschillende classificaties door de jaren heen zijn voorgesteld, is er consensus om een classificatie te gebruiken waarin twee groepen onderscheiden worden, te weten: 1) peroxisoombiogenesedefecten (PBD's) en 2) enkelvoudige peroxisomale enzym-/eiwitdeficiënties.

Het is de bedoeling van dit overzicht om de lezer op de hoogte te brengen omtrent de klinische, metabole en moleculaire aspecten van de verschillende peroxisomale ziekten. Om enige noodzakelijke achtergrond te verschaffen zullen eerst enkele basisprincipes van de peroxisoombiogenese en de functies van peroxisomen besproken worden.

Peroxisoombiogenese

Hoewel nog niet volledig opgelost, zijn de basisprincipes van de peroxisoombiogenese in de laatste jaren wel opgehelderd. Identificatie van de genen en de eiwitten betrokken bij de peroxisoombiogenese is mogelijk geworden door het feit dat het mechanisme van peroxisoombiogenese gelijk is voor de verschillende eukaryote soorten, waaronder schimmels, planten en zoogdieren. Er zijn met name studies verricht aan bakkersgist (*Saccharomyces cerevisiae*), waardoor veel aspecten van de peroxisoombiogenese opgehelderd zijn. Deze kennis is succesvol geëxtrapoleerd naar de peroxisomale biogenese bij de mens en heeft geleid tot de identificatie van de humane genen en eiwitten betrokken bij de peroxisoombiogenese. Om verwarring te voorkomen is er een eenduidige nomenclatuur tot stand gekomen, waarbij de genen betrokken bij de peroxisoombiogenese 'PEX-genen' worden genoemd en de betrokken eiwitten 'peroxinen'.

Het eerste principe van de peroxisoom biogenese is dat peroxisomale eiwitten zoals ze gecodeerd worden door nucleaire genen (peroxisomen hebben geen eigen DNA) gesynthetiseerd worden op vrije cytosolische polyribosomen waarna de eiwitten posttranslationeel in het peroxisoom geïmporteerd worden. Dit geldt voor zowel de peroxisomale matrixeiwitten als

Academisch Medisch Centrum, Universiteit van Amsterdam, Laboratorium Genetische Metabole Ziekten, Afdeling Klinische Chemie, Neurologie en Kindergeneeskunde, Emma Kinderziekenhuis, F0-224, Meibergdreef 9, 1105 AZ Amsterdam, Nederland

Correspondentie: Prof.dr. R.J.A. Wanders, Academisch Medisch Centrum, Universiteit van Amsterdam, Laboratorium Genetische Metabole Ziekten, Postbus 22700, 1100 DE Amsterdam
E-mail: r.j.wanders@amc.uva.nl

de membraaneiwwitten. Dit gegeven impliceert dat nieuw gesynthetiseerde peroxisomale eiwwitten specifieke 'targeting'-signalen moeten hebben die de betreffende eiwwitten naar het peroxisoom dirigeren om ervoor te zorgen dat ze ook daadwerkelijk in het peroxisoom terechtkomen. Onderzoek heeft uitgewezen dat peroxisomale matrixeiwwitten in principe één van twee verschillende signalen bevatten genoemd PTS1 en PTS2. Het PTS1-signaal, waarbij PTS staat voor 'peroxisome targeting signal' is een C-terminaal tripeptide met de sequentie serine-lysine-leucine (SKL), of een variant op dit thema, zoals dat gebruikt wordt door de meeste (> 90%) van de humane peroxisomale eiwwitten (zie figuur 1). Enkele matrixeiwwitten worden

naar het peroxisoom gedirigeerd via een tweede signaal, genoemd PTS2, zoals dat gelokaliseerd is nabij de N-terminus, waarbij het gaat om een sequentie van 9 aminozuren met het volgende motief:

(1)arginine / lysine-(2)leucine / valine / isoleucine-(3-7)X5-(8)glutamine / histidine-(9)leucine, waarbij de X aangeeft dat op die positie ieder willekeurig aminozuur mag zitten.

Het *tweede* principe van peroxisoombiogenese is dat peroxisomale eiwwitten opgenomen worden in reeds aanwezige peroxisomen die op die manier weer groter worden totdat een kritische grootte wordt bereikt, waarna de peroxisomen zich delen in twee dochterperoxisomen. Conceptueel kan het ingewikkelde pro-

Tabel 1. De peroxisomale ziekten

<i>Peroxisoombiogenesedefecten</i>					
Nr. Peroxisomale ziekte	Afkorting	Eiwit	Gen	Chromosoom	MIM
1. Zellweger-syndroom	ZS	Peroxinen	<i>PEX</i> -genen	Multipelen loci	214100
2. Neonatale adrenoleukodystrofie	NALD	Peroxinen	<i>PEX</i> -genen	Multipelen loci	214110
3. Infantiele vorm van de ziekte van Refsum	IRD	Peroxinen	<i>PEX</i> -genen	Multipelen loci	202370
4. Hyperpipecolinezuur-acidemie	HPA	Peroxinen	<i>PEX</i> -genen	Multipelen loci	266510
5. Rhizomele chondrodysplasia punctata type 1	RCDP Type 1	Pex7p	<i>PEX7</i>	6q21-q22	215100
<i>Enkelvoudige peroxisomale enzym- / eiwitdeficiënties</i>					
Nr. Peroxisomale ziekten	Afkorting	Eiwit	Gen	Chromosoom	MIM
6. X-gebonden adrenoleukodystrofie	X-ALD	ALDP	<i>ABCD1</i>	Xq28	300100
7. Acyl-CoA-oxidasedeficiëntie (pseudo-neonatale ALD)	ACOX1-deficiëntie	Straight-chain acyl-CoA oxidase (SCOX/ACOX1)	<i>SCOX</i> / <i>ACOX1</i>	17q25	264470
8. D-bifunctional-proteïndeficiëntie	D-BP-deficiëntie	D-BP	<i>HSD17B</i>	5q2	261515
9. 2-Methylacyl-CoA-racemasedeficiëntie	Racemasedeficiëntie	AMACR	<i>AMACR</i>	5p13.3-p12	604489
10. Rhizomele chondrodysplasia punctata type 2 (DHAPAT-deficiëntie)	RCDP Type 2	DHAPAT	<i>GNPAT</i>	1q42.1-42.3	222765
11. Rhizomele chondrodysplasia punctata type 3 (alkylDHAP-synthasedeficiëntie)	RCDP Type 3	alkylDHAP-synthase	<i>ADHAPS</i>	2q33	600121
12. Refsum disease (fytanoyl-CoA-hydroxylasedeficiëntie)	ARD	Fytanoyl-CoA-hydroxylase (PhyH)	<i>PHYH</i> / <i>PAHX</i>	10p15-p14	266500
13. Hyperoxalurie type 1	PH1	Alanine:glyoxylaat-aminotransferase (AGT)	<i>AGXT</i>	2q37.3	259900
14. Glutaar-acidemie type 3	GA3	?	?	?	231690
15. Mevalonaatkinasedeficiëntie	MK-deficiëntie	Mevalonaatkinase	<i>MVK</i>	12q24.1	251170 260920
16. Akatalasemie	-	Catalase	<i>CAT</i>	11p13	115500
17. Mulibrey nanism	MUL	Trim37p	<i>TRIM</i>	17q22-23	253250

ces van de peroxisoombiogenese opgedeeld worden in verschillende stappen, te weten: 1) herkenning van de PTS1- en PTS2-signalen door oplosbare receptoren; 2) herkenning van de receptoren, met hun eiwitten daaraan gebonden, op het niveau van de peroxisomale membraan; 3) dissociatie van het receptor-eiwitcomplex gevolgd door transport van het PTS1- of het PTS2-eiwit over de peroxisomale membraan; 4) het recyclen van de receptoren zodat die opnieuw een ronde kunnen maken (zie figuur 1).

Twee verschillende strategieën zijn van grote betekenis geweest voor de identificatie van de humane genen betrokken bij de verschillende stappen van de peroxisoombiogenese. Bij de *eerste* strategie is met name gebruik gemaakt van de informatie zoals die uit genetische studies in verschillende gistsoorten is voortgekomen, waarbij de verschillende gist-‘peroxine’-sequenties gebruikt zijn om databestanden door te zoeken op jacht naar humane homologen (1). Bij de *tweede* strategie is gebruik gemaakt van peroxisoomdeficiënte chinese-hamsterovarium(CHO)-cellen en cDNA-expressiebanken om het defect in de verschillende mutanten te corrigeren. Deze twee strategieën tezamen hebben geleid tot de identificatie van alle humane PEX-genen zoals die gemuteerd zijn in elk van de complementatiegroepen zoals later wordt besproken.

Functies van peroxisomen

Peroxisomen spelen een onontbeerlijke rol in het humane metabolisme, zoals duidelijk moge zijn uit het feit dat de afwezigheid van peroxisomen in Zellwegerpatiënten geassocieerd is met ernstige klinische afwijkingen. In tabel 1 worden de verschillende functies van peroxisomen bij de mens weergegeven.

Vetzuur- β -oxidatie

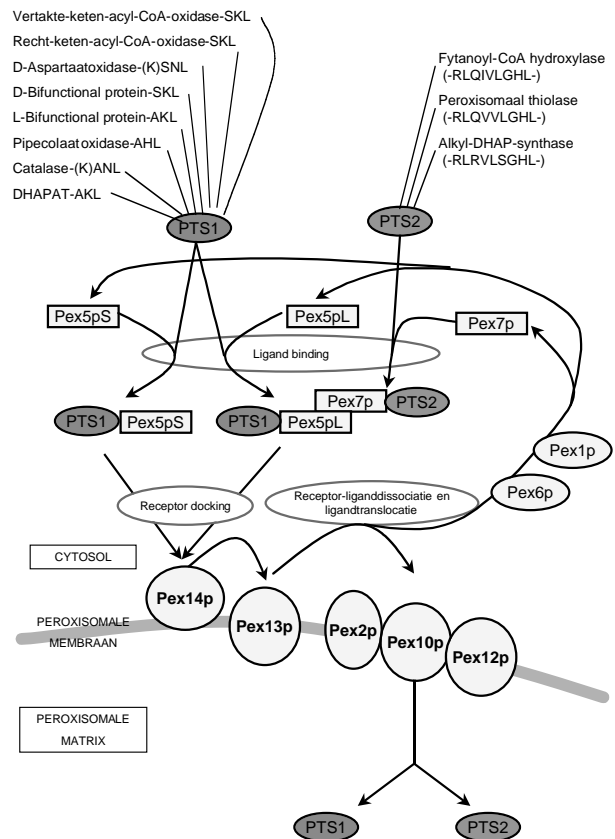
Peroxisomen bevatten een vetzuur- β -oxidatiesysteem net zoals mitochondriën. Het mechanisme waarlangs vetzuren geoxideerd worden in de twee organellen, is vergelijkbaar, waarbij het om vier opeenvolgende reacties gaat, te weten: een dehydrogenering, een hydratering, wederom een dehydrogenering en tenslotte een thiolytische splitsing. Het uiteindelijke resultaat is het afsplitsen van een twee-koolstof-eenheid van het vetzuur in de vorm van acetyl-CoA, dat op zijn beurt dan afgebroken kan worden in de citroenzuur(Krebs)-cyclus. Daarbij worden dan CO₂ en H₂O geproduceerd en ontstaat er energie in de vorm van ATP.

De peroxisomale en mitochondriale β -oxidatiesystemen hebben verschillende functies in de cel, waarbij mitochondriën met name verantwoordelijk zijn voor de β -oxidatie van het merendeel van de vetzuren die in het dieet voorkomen, waaronder palminezuur, oliezuur, linolzuur, etc.

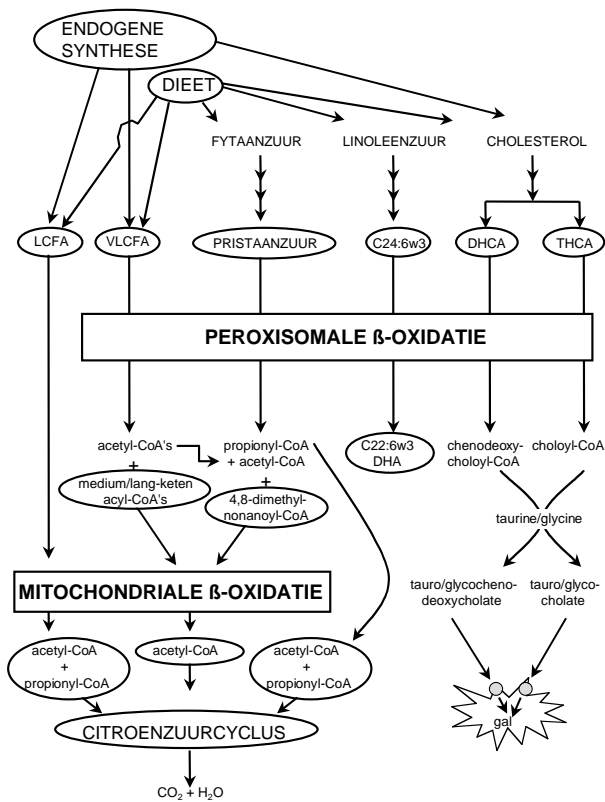
Peroxisomen zijn niet zozeer belangrijk voor de energievoorziening, maar spelen een belangrijke rol bij het oxideren van verschillende vetzuren die niet in de mitochondriën geoxideerd kunnen worden. De belangrijkste zijn: 1) zeer-langketen vetzuren (‘very

long-chain fatty acids’; VLCFA), met name hexacosaan- (C26:0); 2) pristaanzuur (2,6,10,14-tetramethylpentadecaanzuur), zowel direct afkomstig uit het dieet als indirect, via α -oxidatie van fytaan- (zie later); 3) di- en trihydroxycholestaanzuur (DHCA en THCA). De laatste twee verbindingen zijn intermediairen bij de vorming van de primaire galzuren cholzuur en chenodeoxycholzuur vanuit cholesterol in de lever (figuur 2).

Een andere belangrijke functie van het peroxisomale β -oxidatiesysteem betreft de synthese van polyonverzadigde vetzuren, zoals docosahexaeenzuur (C22:6 ω 3). Recente studies hebben laten zien dat de vorming van C22:6 ω 3 vanuit linoleenzuur (C18:3 ω 3)



Figuur 1. Huidig model van de peroxisoombiogenese. PTS1-eiwitten gesynthetiseerd op vrije polyribosomen worden herkend en gebonden door PTS1-receptoren waarvan er twee vormen zijn, te weten: een korte (S-) vorm Pex5pS en een lange (L-) vorm, Pex5pL. Pex5pS is in staat om PTS1-eiwitten naar de peroxisomale dockingmachinerie te leiden met Pex14p als eerste actieve component, terwijl Pex5pL nodig is voor de PTS2-impport met Pex7p als de PTS2-receptor. In afwezigheid van Pex5pL is het Pex7p / PTS2-eiwitcomplex niet in staat om op de peroxisomale membraan te landen. Na binding van het Pex5pS / PTS1-eiwit of Pex5pL / PTS1-eiwit / Pex7p / PTS2-eiwitcomplex aan Pex14p en vervolgens aan Pex13p, dissocieert het complex waarna de PTS1- en PTS2-eiwitten (liganden) over de peroxisomale membraan translokieren, een proces dat afhankelijk is van Pex2p, Pex10p en Pex12p. De receptoren Pex5pS, Pex5pL en Pex7p recyclen terug naar het cytosol. Pex1p en Pex6p worden geacht betrokken te zijn bij het recyclen van de receptoren. Niet getoond in de figuur zijn Pex3p, Pex16p en Pex19p die alle betrokken zijn bij het correcte dirigeren van peroxisomale membraaneiwitten (PMPs) naar de peroxisomale membraan.

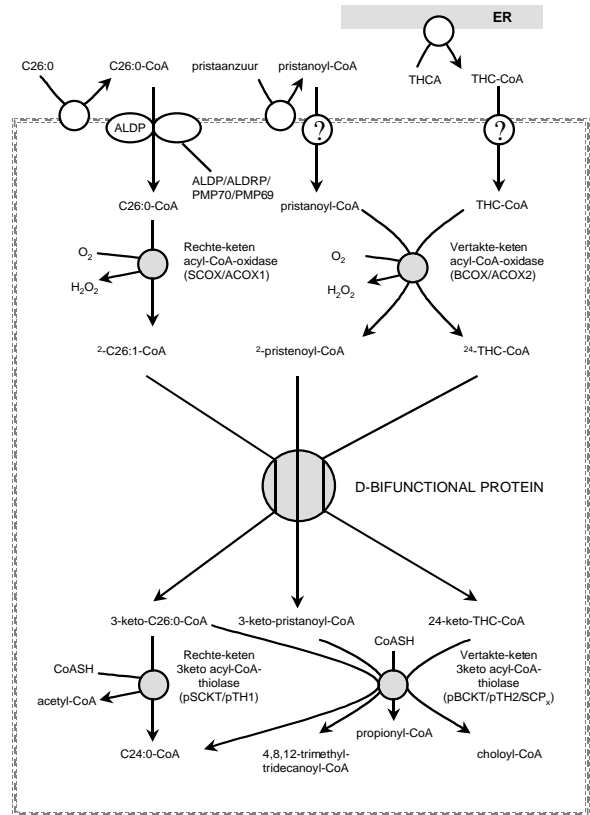


Figuur 2. Schematische voorstelling van de rol van het peroxisomale β -oxidatiesysteem in de oxidatie van zeer-langketen vetzuren, pristaanzuur, C24:6 ω 3, en di- en trihydroxycholestaanzuur (DHCA en THCA) en de interactie tussen peroxisomen en mitochondriën, de uiteindelijke plaats waar oxidatie tot CO₂ en H₂O plaats vindt.

de actieve betrokkenheid vereist van het peroxisomale vetzuuroxidatiesysteem op het niveau van de omzetting van C24:6 ω 3 naar C22:6 ω 3, zoals aangegeven in figuur 2.

Belangrijk is te vermelden dat het peroxisomale vetzuur- β -oxidatiesysteem uitsluitend in staat is om de ketenverkorting van vetzuren te bewerkstelligen, doch niet in staat is om vetzuren volledig te oxideren. Dit is het meest overtuigend aangetoond voor pristaanzuur dat slechts drie β -oxidatiecycli in peroxisomen ondergaat, waarbij uiteindelijk 4,8-dimethylnonanoyl-CoA wordt gevormd. Dit wordt dan naar de mitochondriën getransporteerd in de vorm van een carnitine-ester om daar tenslotte tot CO₂ en H₂O afgebroken te worden (figuur 2).

Ook de zeer-langketen vetzuren worden waarschijnlijk tot het niveau van een midketen-acyl-CoA-ester afgebroken in het peroxisoom, waarna ze naar de mitochondriën worden gedirigeerd in de vorm van een carnitine-ester om aldaar compleet geoxideerd te worden. Figuur 2 laat ook zien dat de CoA-esters van chenodeoxycholzuur en cholzuur geproduceerd worden door middel van β -oxidatie van de galzuurintermediaire dihydroxycholestanoyl-CoA en trihydroxycholestanoyl-CoA, waarna chenodeoxycholoyl-CoA en choloyl-CoA in het peroxisoom omgezet worden in taurine- of glycineconjugaten die het peroxisoom verlaten om uiteindelijk in de gal uitgescheiden te worden (figuur 2).



Figuur 3. Enzymologie van het peroxisomale vetzuur β -oxidatiesysteem: humane peroxisomen bevatten twee acyl-CoA-oxidasen, waarvan één specifiek is voor recht-keten-acyl-CoA-esters en de ander specifiek reactief is met 2-methyl-vertakte-keten-acyl-CoA-esters, zoals pristanoyl-CoA en di- en trihydroxycholestanoyl-CoA. De producten van de twee acyl-CoA-oxidasen, dat wil zeggen de acyl-CoA-esters van C26:0, pristaanzuur en di- en trihydroxycholestaanzuur, worden door een enkel enzym genaamd D-bifunctionaal proteïne met zowel hydratase als 3-hydroxy-acyl-CoA-dehydrogenase-activiteit omgezet in de corresponderende 3-keto-acyl-CoA-esters. Tenslotte zijn er twee verschillende thiolasen in het peroxisoom aanwezig voor de laatste β -oxidatiestap, waarbij pTH2 (= SCPx) in staat is om alle 3-keto-acyl-CoA-esters te accepteren, terwijl pTH1 alleen reageert met de 3-keto-acyl-CoA-esters van recht-keten vetzuren, zoals C26:0.

Figuur 3 laat de enzymologie van het peroxisomale vetzuuroxidatiesysteem zien. Humane peroxisomen bevatten twee acyl-CoA-oxidasen, één specifiek voor recht-keten vetzuren, zoals C26:0, genaamd "straight-chain" acyl-CoA-oxidase (SCOX/ACOX1) en een tweede oxidase dat de dehydrogenering van 2-methyl-vertakte ketenvetzuren, zoals pristanoyl-CoA en di- en trihydroxycholestanoyl-CoA katalyseert. Het tweede enzym wordt 'branched-chain' acyl-CoA-oxidase (BCOX/ACOX2) genoemd. De enoyl-CoA-esters van C26:0, pristaanzuur, DHCA en THCA worden vervolgens omgezet in hun 3-ketoacyl-CoA-esters door een bifunctioneel enzym met zowel enoyl-CoA-hydratase- als 3-hydroxyacyl-CoA-dehydrogenaseactiviteit (D-bifunctionaal proteïne). Humane peroxisomen bevatten ook twee peroxisomale thiolasen, genaamd pTH1 en pTH2. Zoals te zien is in figuur 3 speelt pTH2 een onontbeerlijke rol in de oxidatie van 2-methyl-vetzuren, terwijl zowel pTH1 als pTH2 3-ketoacyl-CoA-esters van recht-keten vetzuren accepteren.

Etherfosfolipidensynthese

Etherfosfolipiden zijn een speciale klasse van fosfolipiden die anders zijn dan de welbekende di-acylfosfolipiden in de zin dat zich op de 1-plaats van de glycerol-backbone een etherbinding bevindt in plaats van een esterbinding. In principe zijn er twee groepen etherfosfolipiden met ofwel een 1-O-alkyl- of een 1-O-alk-1-enylbinding. De laatstgenoemde fosfolipiden zijn met name bekend onder hun triviale naam plasmalogenen. Platelet-activating-factor (PAF: 1-O-alkyl-2-acetyl-glycerofosfocoline) is het meest bekende etherfosfolipide. Plasmalogenen komen meestal voor in hun ethanolamine- of cholinevorm.

Figuur 4 laat de enzymologie van de etherfosfolipiden-synthese zien met een deel van de enzymen in het peroxisoom en een ander deel in het endoplasmatisch reticulum. De synthese van etherfosfolipiden start in het peroxisoom met de productie van acyl-dihydroxyacetonfosfaat (acyl-DHAP) uit DHAP door het peroxisomale enzym dihydroxyacetonfosfaat-acyltransferase (DHAPAT), gevolgd door de introductie van de typische etherbinding door het enzym alkyl-DHAP-synthase. Deze twee enzymen zijn exclusief peroxisomaal. De derde stap wordt gekatalyseerd door het enzym alkyl/acyl-DHAP:NAD(P)H oxido-reductase, dat een bimodale verdeling heeft en gelokaliseerd is in zowel pe-

roxisomen als endoplasmatisch reticulum. Het product alkyl-glycerol-3-fosfaat (alkyl-G-3P) wordt dan vervolgens omgezet in plasmalogenen. Zowel DHAPAT als alkyl-DHAP-synthase zijn gezuiverd en hun coderende genen geïdentificeerd.

Vetzuur- α -oxidatie

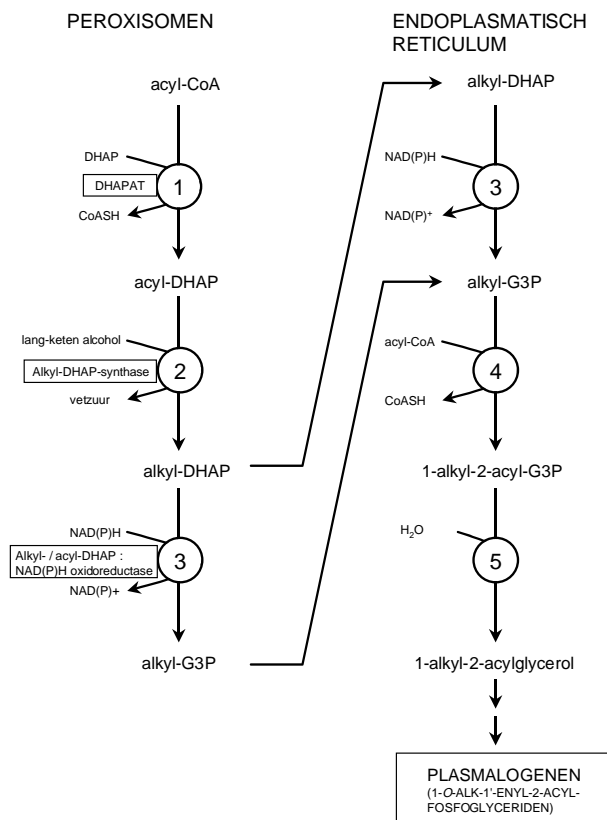
3-methyl-vertakte-keten-vetzuren kunnen niet door β -oxidatie afgebroken worden door de aanwezigheid van een methylgroep op de 3-plaats. In plaats daarvan ondergaan 3-methylvetzuren eerst een zogenaamde α -oxidatie, waarbij de terminale carboxylgroep geëlimineerd wordt. Eén van de belangrijkste fysiologische 3-methylvetzuren is fytaanzuur (3,7,11,15-tetramethylhexadecaanzuur), waarvan al lang geleden is vastgesteld dat het zich ophoopt in patiënten met de ziekte van Refsum. Daarnaast is fytaanzuur ook verhoogd bij andere peroxisomale ziekten (zie later).

Het mechanisme waarlangs 3-methylvetzuren worden afgebroken via α -oxidatie is recent opgelost. Figuur 5 laat de structuur en de enzymologie van het peroxisomale vetzuur- α -oxidatiesysteem zien. Fytaanzuur wordt eerst geactiveerd tot fytaanoyl-CoA, via het lang-keten-acyl-CoA-synthetase (LACS), zoals dat voorkomt aan de buitenkant van het peroxisomale membraan, waarna het de peroxisomale matrix ingaat waarschijnlijk via een carrier-eiwit. Eenmaal binnen in het peroxisoom ondergaat fytaanoyl-CoA hydroxylering door het enzym fytaanoyl-CoA-hydroxylase, gevolgd door splitsing van het 2-hydroxyfytaanoyl-CoA tot pristanal en formyl-CoA. Deze reactie wordt gekatalyseerd door het enzym 2-hydroxyfytaanoyl-CoA-lyase. Hierna wordt pristanal omgezet in pristaanzuur door een nog onbekend aldehydedehydrogenase, waarna het pristaanzuur geactiveerd wordt door pristanoyl-CoA-synthetase. Zoals hiervoor beschreven, ondergaat het pristanoyl-CoA dan drie β -oxidati cycli in het peroxisoom, waarbij uiteindelijk 4,8-dimethylnonanoyl-CoA ontstaat dat het peroxisoom verlaat als carnitine-ester, om in mitochondriën tot CO₂ en H₂O geoxideerd te worden.

Hoewel nog niet eenduidig vastgesteld, lijkt het er op dat het complete pad van fytaanoyl-CoA tot pristaanzuur, pristanoyl-CoA en dan door tot 4,8-dimethylnonanoyl-CoA in het peroxisoom gelokaliseerd is (figuur 5). De meeste enzymen betrokken bij de peroxisomale vetzuur- α -oxidatie zijn inmiddels bekend en hun genen geïdentificeerd, met uitzondering van het aldehydedehydrogenase (zie (2) voor een overzicht).

Synthese van cholesterol en andere isoprenoïden

De laatste jaren is steeds duidelijker geworden dat peroxisomen ook een rol spelen in de synthese van isoprenoïden. Dit wordt afgeleid uit het feit dat de enzymen mevalonaatkinase, fosfomevalonaat kinase en mevalonaat-pyrofosfaatdecarboxylase in peroxisomen gelokaliseerd zijn. Volgens Krisans (3) is het hele eerste deel van de *de novo*-isoprenoïdsynthese van acetyl-CoA tot farnesylpyrofosfaat gelokaliseerd in peroxisomen, hoewel dat geenszins onomstreden is. In die visie echter zou mevalonaatkinasedeficiëntie ook een peroxisomale ziekte zijn.



Figuur 4. Synthese van etherfosfolipiden. De synthese van etherfosfolipiden start in het peroxisoom met de vorming van acyl-dihydroxyacetonfosfaat, (acyl-DHAP) door het enzym dihydroxyacetonfosfaat-acyltransferase (DHAPAT), gevolgd door de introductie van de typische etherbinding door het enzym alkyl-DHAP-synthase, waarbij dan alkyl-DHAP gegenereerd wordt. Zowel DHAPAT als alkyl-DHAP-synthase zijn strikt peroxisomaal.

Omzetting van glyoxylaet

Glyoxylaet is een toxische metaboliet op basis van het feit dat het door het enzym lactaatdehydrogenase omgezet kan worden in oxalaet, dat als calciumoxalaet kan neerslaan en tot ernstige problemen in verschillende organen kan leiden. Onder normale condities wordt glyoxylaet omgezet in glycine, via het enzym alanine-glyoxylaet-aminotransferase (AGT), een peroxisomaal enzym bij de mens. Als dit enzym onwerkzaam is, zoals in hyperoxalurie-type-1-patiënten, dan hoopt glyoxylaet op en wordt het of geoxideerd tot oxalaet of gereduceerd tot glycolaet, wat verklaart waarom patiënten met hyperoxalurie type 1 zowel verhoogde hoeveelheden oxalaet als glycolzuur uitscheiden in de urine.

L-pipecolinezuurafbraak

L-lysine wordt normaliter afgebroken via de zogenaamde saccharopineroute, via de opeenvolgende werking van het enzymcomplex α -aminoadipinezuur-synthetase, bestaande uit L-lysine: 2-oxoglutarate-reductase en saccharopinedehydrogenase. Lysine kan echter ook afgebroken worden via pipecolinezuur via de pipecolinezuurafbraakroute, die met name van belang schijnt te zijn in de hersenen, aangezien daar de activiteit van de saccharopineafbraakroute laag is. In de pipecolinezuurafbraakroute wordt pipecolinezuur, zoals geproduceerd uit L-lysine, afgebroken via het enzym L-pipecolinezuuroxidase, dat bij de mens een peroxisomaal enzym is (4, 5).

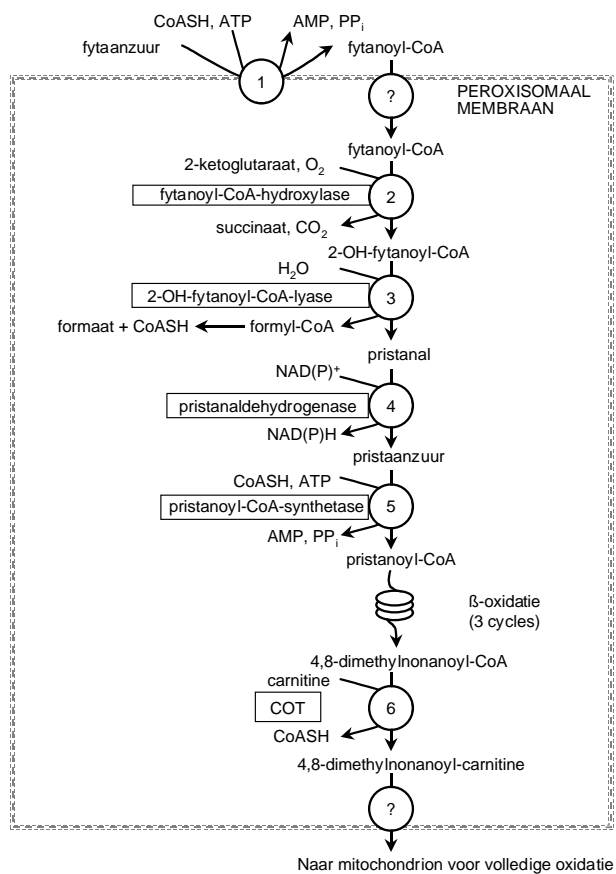
De peroxisomale ziekten

De meest gebruikte classificatie is gebaseerd op de verdeling van de peroxisomale ziekten in twee groepen, te weten: 1) de peroxisoombiogenesedefecten (PBD's) en 2) de enkelvoudige peroxisomale (enzym-) eiwitdeficiënties, die hieronder besproken worden.

De peroxisomale biogenesedefecten

1. Zellweger-syndroom (MIM-214100)

Sinds de eerste beschrijving in 1964 door Bowen e.a. (6) zijn er honderden patiënten beschreven in de literatuur (zie Heymans (7), Wanders e.a. (8) en Wilson e.a. (9) voor overzichten). Uit de beschrijvingen van honderdveertien Zellweger-patiënten concludeerde Heymans dat de klinische presentatie van het Zellweger syndroom gedomineerd wordt door enerzijds de cranio-faciale dysmorphie, bestaande uit een prominent voorhoofd (67%), plat achterhoofd (81%), verwijde fontanellen en schedelnaden (96%), vlakke orbitarand (100%), epicanthus (95%), een lage brede neusrug (100%), dysplastische oorschelpen (100%), micrognathie (100%) en een hoog palatum (95%), en anderzijds door een scala aan neurologische afwijkingen, waarbij de ernstige hypotonie (99%) op de voorgrond staat. Andere neurologische afwijkingen betreffen een abnormale Moro-reflex (100%), hypo-/areflexie (98%) en epileptische insulpen (92%). Daarnaast worden veelvuldig oogafwijkingen waargenomen, waaronder corneatroebeling, cataract, glaucoom



Figuur 5. Structuur en enzymologie van het peroxisomale fytanzaanzuur- α -oxidatiesysteem. Fytanzaanzuur ondergaat eerst activering tot fytanoyl-CoA, een reactie gekatalyseerd door het lang-keten acyl-CoA-synthetase (LACS), aanwezig op de buitenkant van het peroxisomale membraan. Fytanoyl-CoA gaat dan het peroxisoom in via een ontbekend mechanisme, waarna fytanoyl-CoA gehydroxyleerd wordt tot 2-hydroxyfytanoyl-CoA via het enzym fytanoyl-CoA-hydroxylase, dat deficiënt is in M. Refsum. Hierna wordt 2-hydroxyfytanoyl-CoA gesplitst door het enzym 2-hydroxyfytanoyl-CoA-lyase in formyl-CoA en pristanal, wat op zijn beurt dan geoxideerd wordt tot pristaanzuur. Het pristaanzuur dat aldus geproduceerd is, wordt omgezet in zijn CoA-ester, waarschijnlijk door het enzym very long-chain acyl-CoA synthetase (VLACS), gevolgd door β -oxidatie in het peroxisoom tot 4,8-dimethylnonanoyl-CoA, dat daarna voor volledige oxidatie naar het mitochondrion wordt geshutteld.

en nystagmus. Ook worden veelvuldig afwijkingen aan de handen en voeten waargenomen, zoals een apenplooi en pes equinovarus.

Bij pathologisch-anatomisch onderzoek worden afwijkingen aan verschillende orgaansystemen waargenomen, met name de hersenen. Het neuropathologisch onderzoek van de hersenen laat onder meer de volgende afwijkingen zien: polymicrogyrie, pachygyrie, tekort aan myeline, verwijde ventrikels, cerebrale en cerebellaire neuronale heterotopieën, afwijkende configuratie van de onderste olijkern en de nucleus dentatus, vetstapeling in de astroglia-cellen, specifieke degeneratie met of zonder tekenen van fagocytose alsmede andere afwijkingen. Daarnaast zijn er ook frequent leverafwijkingen. De leverafwijkingen kunnen variëren van een praktisch normaal histologisch beeld, tot een ernstige micronodulaire cirrose,

afhankelijk van de leeftijd van de patiënt. Opmerkelijk is dat er sprake is van een massale ijzerstapeling in de eerste levensmaanden, die na de 20^{ste} levensweek meestal niet meer manifest is. Terwijl de ijzerstapeling verdwijnt, blijft de leverfibrose progressief, hetgeen een causaal pathogenetisch verband tussen ijzerstapeling en leverfibrose onwaarschijnlijk maakt. Bij het merendeel van de Zellweger-patiënten ouder dan twintig weken ontstaat een ernstige verstoring van de normale leverarchitectuur, met verkavelende fibrose en micronodulaire cirrose. Röntgenonderzoek toont skeletafwijkingen in een deel van de patiënten aan, bestaande uit gestippelde calcificaties van o.a. de patella, het acetabulum, en de trochanter major van het femur. De nieren tonen in praktisch alle gevallen multipole, meestal subcorticaal gelegen cysten van glomerulaire of tubulaire oorsprong. Het merendeel (>90%) van de Zellweger-syndroom-patiënten overleeft het eerste levensjaar niet.

2. Neonatale adrenoleukodystrofie (MIM 202370)

Naast Zellweger-syndroom is de peroxisoombiogenese ook verstoord in andere fenotypen, te weten: neonatale adrenoleukodystrofie (NALD) en de infantiele vorm van de ziekte van Refsum (IRD). NALD is voor het eerst beschreven door Ulrich e.a. (10) als "Connatal ALD" in een jongen die zich bij de geboorte presenteerde als een hypotoon kind met convulsies, hypo-/areflexie, afwezige Moro-reflex en weinig spontane bewegingen. De patiënt vertoonde alle kenmerken van een adrenoleukodystrofie, zoals een karakteristieke demyelinisatie van de witte stof, bijnierschorsatrofie, opgezwollen adrenocorticale cellen met daarin de karakteristieke lamellae. Er werden echter ook een aantal opvallende afwijkingen in het centraal zenuwstelsel gevonden die niet pasten bij de X-gebonden vorm van ALD. Vandaar de naam NALD. Het is nu duidelijk dat het hier in werkelijkheid gaat om twee geheel verschillende ziektebeelden, waarbij NALD veel meer overeenkomsten vertoont met Zellweger-syndroom dan met X-gebonden ALD.

3. Infantiele vorm van de ziekte van Refsum (IRD)

IRD werd voor het eerst beschreven in 1982 door Scotto e.a. (11) in een drietal patiënten, onder wie een vijfjarige jongen met een vergrote lever en een aantal andere afwijkingen, waaronder mentale retardatie, sensore neurale doofheid, pigmentaire degeneratie van de retina, anosmie en dysmorphe kenmerken. Ultrastructurele analyse van de lever liet lamellaire structuren zien die ook in plantenchloroplasten worden gezien en waarvan bekend is dat ze gebonden fytol bezitten. Deze microscopische waarneming leidde ertoe dat de auteurs plasmafytaan zuur gemeten hebben, wat inderdaad sterk verhoogd bleek te zijn. Op basis hiervan werd de naam 'infantile phytanic acid storage disease' gesuggereerd met als synoniem 'infantile Refsum disease (IRD)'. Deze naam is net als NALD uiterst verwarrend vanwege zijn impliciete suggestie dat de klassieke vorm van Refsum en de infantiele vorm verwant zouden zijn, hetgeen geenszins het geval is.

De patiënten beschreven door Scotto e.a. (11) zijn la-

ter in veel meer detail beschreven door Poll-The e.a. (12) op de leeftijd van negen, tien en twaalf jaar. Latere studies hebben duidelijk gemaakt dat fytaan zuur niet de enige afwijking is bij IRD-patiënten, maar dat het hele scala aan afwijkingen zoals dat gevonden wordt bij Zellweger-patiënten ook bij IRD-patiënten aangetroffen wordt, met uitzondering van de deficiëntie van etherfosfolipiden.

Onderscheid tussen Zellweger-syndroom (ZS), NALD en infantiele M. Refsum

Vanwege de fenotypische overlap tussen ZS, NALD en IRD is het vaak moeilijk om patiënten te classificeren, met name omdat er fenotypische varianten beschreven zijn die niet voldoen aan de karakteristieken van één van de drie categorieën. Zellweger-syndroom, NALD en IRD hebben gemeenschappelijk het voorkomen van leverziekte, een variabele achterstand in ontwikkeling, retinopathie en doofheid die meestal al in de eerste maanden van het leven begint.

Daarnaast zijn ZS-patiënten ernstig hypotoon en zwak vanaf de geboorte en hebben uitgesproken cranio-faciale afwijkingen, peri-artculaire calcificaties, ernstige hersenmisvormingen geassocieerd met een neuronaal migratiedefect en een vroege dood in het eerste levensjaar.

Patiënten met NALD hebben hypotonie, convulsies, kunnen polymicrogyrie hebben, progressieve witte stofafwijkingen en overlijden meestal op de latere kinderleeftijd.

Patiënten met IRD zijn het minst ernstig aangedaan, hebben over het algemeen milde tot afwezige cranio-faciale afwijkingen, géén neuronaal migratiedefect en géén progressieve witte stofafwijkingen. De cognitieve en motorische ontwikkeling is variabel met een matige tot ernstige mentale retardatie, doofheid en visuele handicaps als het gevolg van de retinopathie. Het overleven van IRD-patiënten is variabel, waarbij sommige patiënten zelfs de volwassen leeftijd kunnen bereiken.

4. Hyperpipecolinezuuracidemie (MIM 239400)

In de literatuur zijn verschillende artikelen gepubliceerd waarin een geïsoleerde hyperpipecolinezuuracidemie (HPA) gerapporteerd is. Een eerste patiënt werd beschreven door Gatfield e.a. (13) in een jongen met hepatomegalie, retinopathie en progressieve neurologische uitval. Daarnaast zijn drie andere patiënten in de literatuur beschreven die alle ernstige klinische afwijkingen hadden, inclusief een hepatomegalie, retinopathie, ontwikkelingsachterstand en verschillende dysmorphe kenmerken zoals in twee patiënten beschreven door Burton e.a. (14). Na de ontdekking dat pipecolinezuur ook verhoogd was in patiënten met een peroxisoombiogenesedefect zoals Zellweger-syndroom, zijn deze patiënten gere-evalueerd en is vast komen te staan dat in alle vier de patiënten sprake was van een deficiëntie van peroxisomen, e.e.a. op basis van het feit dat naast pipecolinezuur ook andere peroxisomale metabolieten verhoogd waren en er in fibroblasten een gegeneraliseerd verlies van peroxisomale functies werd gevonden. In de patiënt zoals gerapporteerd door Thomas e.a. (15) hebben wij zelf

uitgebreid onderzoek gedaan inclusief complementatie-analyse, wat geleid heeft tot de identificatie van het defecte gen op het niveau van *PEXI* (zoals later besproken).

Gebaseerd op deze resultaten kunnen we concluderen dat de patiënten beschreven door Gatfield e.a. (13), Thomas e.a. (16) en Burton e.a. (14), allen aangedaan zijn door een peroxisoombiogenesedefect en dat HPA niet een apart fenotype is.

Aan de andere kant zijn er in de literatuur verschillende patiënten beschreven met wel degelijk geïsoleerde pipecolinezuuracidemie. In 1991 beschreven Roesel e.a. (17) bijvoorbeeld dat er verhoogde pipecolinezuurniveaus waren in plasma en urine van een patiënt met het Dyggve-Melchior-Clausen-syndroom. Wij hebben in de afgelopen periode tien patiënten met dit syndroom geanalyseerd en in één van deze patiënten hebben wij verhoogd pipecolinezuur gevonden, hetgeen er op wijst dat de bevinding van hyperpipecolinezuuracidemie in een enkelvoudige patiënt met dit syndroom een toevalligheid moet zijn geweest. In 1969 rapporteerde Vallat e.a. (18) de toevallige ontdekking van hyperpipecolinezuuracidemie in een vierenveertigjarige man, die een manager is van een kleine commerciële firma, waarbij zijn belangrijkste gezondheidsprobleem een terugkerende embolie is, waarschijnlijk op basis van een bescheiden hyperhomocysteinemie (20 $\mu\text{mol/l}$; normaal: <14). De plasmapipecolinezuurniveaus in deze patiënt waren maar liefst 250 en 220 $\mu\text{mol/l}$ (normaal: $<2,5$), bij twee gelegenheden.

Vervolgonderzoek heeft aangetoond dat het om L-pipecolinezuur gaat en niet om D-pipecolinezuur. De meest voor de hand liggende reden voor de stapeling van L-pipecolinezuur zou zijn een deficiëntie van het peroxisomale enzym L-pipecolinezuuroxidase, dat alleen in de lever tot expressie komt.

Enzymatisch onderzoek naar deze mogelijkheid was uitgesloten aangezien de patiënt geen toestemming tot een leverbiopsie gaf. Nadat we het cDNA en gen coderend voor L-pipecolinezuuroxidase geïdentificeerd hadden, zoals beschreven door IJlst e.a. (19), werd het mogelijk langs moleculaire weg na te gaan of er wellicht een deficiëntie van pipecolinezuuroxidase zou zijn op basis van een mutatie in het gen coderend voor dit enzym. Mutatieanalyse heeft echter bij de patiënt géén verandering laten zien. Tenslotte zijn in de recente literatuur door Poll-The e.a. (20) nog een drietal patiënten met diverse neurologische afwijkingen beschreven, waarbij ook sprake is van een geïsoleerde pipecolinezuuracidemie. In twee van de drie patiënten was er ook stapeling van pipecolinezuur in liquor. De analyse van peroxisomen in een leverbiopt liet geen afwijkingen zien. Op dit moment zijn wij druk doende om te achterhalen wat het onderliggende defect in deze patiënten is.

Biochemische en moleculaire basis van de peroxisoombiogenesedefecten (PBD's)

Zoals boven beschreven, zijn peroxisomen afwezig, of in ieder geval sterk gereduceerd in aantal en grootte, in PBD-patiënten als gevolg van een defect in de peroxisoombiogenese, zoals in meer detail later

wordt besproken. Als gevolg daarvan is er een geeneraliseerd verlies van peroxisomale functies in al deze PBD's, wat zich weerspiegelt in een serie van afwijkingen.

Het betreft:

Verhoogde plasma-zeer-langketenvetzuren: Zoals besproken, zijn peroxisomen de plaats waar oxidatie van zeer-langketenvetzuren, zoals C24:0 en C26:0, plaatsvindt. Oxidatie van deze vetzuren is deficiënt in PBD-patiënten. Gemiddeld genomen zijn de spiegels van zeer-langketenvetzuren het meest verhoogd in plasma van Zellweger-patiënten en minder verhoogd in mildere PBD-patiënten (21).

Verhoogde plasmadi- en -trihydroxycholestaanzuur: Zoals te zien is in figuur 2 en 3 ondergaan DHCA en THCA ketenverkorting in peroxisomen, waarbij chenoxycholezuur en cholzuur geproduceerd worden. Dit verklaart waarom DHCA en THCA verhoogd zijn in het plasma van Zellweger-, NALD- en IRD-patiënten.

Verhoogde plasmapristaanzuur en -fytaanzuurniveaus: Pristaanzuur- β -oxidatie vindt in peroxisomen plaats, hetgeen verklaart waarom pristaanzuur verhoogd is in PBD-patiënten. Belangrijk is te vermelden dat de niveaus sterk kunnen variëren en zelfs normaal kunnen zijn, hetgeen verklaard wordt uit het feit dat pristaanzuur alleen uit het dieet kan komen, ofwel direct ofwel indirect vanuit fytaanzuur dat α -oxidatie ondergaat in peroxisomen zoals hierboven beschreven.

Verhoogd pipecolinezuur: De deficiëntie van pipecolinezuuroxidase in PBD-patiënten leidt tot verhoogde plasmapipecolinezuurspiegels. Om onduidelijke redenen zijn de niveaus in plasma van PBD-patiënten sterk variabel.

Deficiënte DHA(C_{22:6}ω₃)-spiegels in plasma en erytrocyten: Zoals hierboven is beschreven, spelen peroxisomen een essentiële rol in de vorming van DHA. Dit verklaart de deficiëntie van DHA in Zellweger-patiënten, hoewel in milder aangedane patiënten de niveaus normaal kunnen zijn.

Deficiënte erythrocytoplasmalogeniveaus: Als gevolg van het feit dat de synthese van etherfosfolipiden afhankelijk is van peroxisomen is in principe de synthese van plasmalogenen deficiënt in alle PBD-patiënten. Desalniettemin zijn de plasmalogeneniveaus alleen deficiënt in patiënten met het ernstige-fenotype-Zellweger-syndroom. Ze kunnen partieel gereduceerd of zelfs normaal zijn in minder aangedane patiënten, zoals in IRD (22).

Metabole en moleculaire basis van de peroxisoombiogenesedefecten (PBD's)

In de afgelopen jaren is veel bekend geworden omtrent de genetica van de PBD's. Een belangrijke stap voorwaarts is de toepassing van complementatieanalyse geweest. Het principe van deze techniek is het fuseren van cellen van twee patiënten waarbij hybride cellen (heterokaryons) ontstaan. Deze heterokaryons die de genetische informatie van beide patiënten bevatten, worden vervolgens een aantal dagen in kweek genomen, waarna gekeken wordt of er herstel van peroxisoomvorming is. Indien het antwoord negatief is dan moet de conclusie zijn dat het bij deze twee pa-

tiënten om mutaties in *hetzelfde* gen gaat. Aan de andere kant, als peroxisomen wèl opnieuw gevormd zijn, dan moet dat betekenen dat het om verschillende genen moet gaan in de twee patiënten. Een eerste studie, verricht door Brul e.a. (23) in zeven patiënten, liet al zien dat er een opvallend grote genetische heterogeniteit moest zijn, omdat deze zeven patiënten tot maar liefst vijf verschillende complementatie groepen bleken te behoren. Een zelfde conclusie is later getrokken door Roscher e.a. (24) en Yajima e.a. (25). In het kader van een samenwerkingsverband is nadien vastgesteld dat de complementatie groepen zoals geïdentificeerd in Amsterdam, Baltimore en Gifu te rangschikken zijn in negen unieke complementatie groepen. In de jaren daarna zijn er nog een aantal andere complementatie groepen bijgekomen, zodat we op dit moment twaalf verschillende groepen kennen (tabel 2). In alle twaalf complementatie groepen is het betrokken gen inmiddels geïdentificeerd (1).

Tabel 2 geeft een overzicht van de twaalf verschillende complementatie groepen, met de bijbehorende genen en fenotypes. De resultaten geven duidelijk aan dat er één groep is, die anders is dan de elf andere groepen, zowel in termen van de bijbehorende celbiologie (alleen een defect in de importroute van de PTS2; zie later), alsook het fenotype, aangezien het de enige groep is waarin rhizomele chondrodysplasia punctata (RCDP) aangetroffen wordt. Tot op dit moment is er geen enkele PBD-patiënt gevonden die tot deze groep behoort.

In ons eigen centrum hebben we complementatiestudies gedaan in 301 PBD-patiënten, waaronder 80 RCDP-patiënten. De overige 224 patiënten met PBD-fenotypes zijn in de 11 overblijvende groepen geclassificeerd, waarbij verreweg de meeste patiënten (139 = 63%) in de PEX1-groep gevonden worden, gevolgd door 22 patiënten (=10%) in de PEX6-groep en 12 patiënten (=5,4%) in de PEX12-groep (Gootjes en

Wanders, niet gepubliceerd). De identificatie van de genen betrokken bij ieder van de complementatiegroepen, heeft mutatieanalyse mogelijk gemaakt en dit heeft geleid tot identificatie van vele mutaties die over het algemeen een privé-karakter hebben -dat wil zeggen dat ze per patiënt verschillend zijn. Daarnaast zijn er twee veel voorkomende mutaties gevonden in het PEX1-gen, te weten een missensemutatie (G843D) (26) die aanleiding geeft tot een partiële disfunctie van PEX1p, en een 1-bp-insertie (C.2097insT) (27) die een volledig verlies van functies van PEX1 geeft. Dit verklaart waarom patiënten homozygoot voor de G843D-mutatie altijd een mild fenotype laten zien, terwijl patiënten homozygoot voor de C.2097insT-mutatie het ernstige Zellweger-fenotype laten zien.

5. Rhizomele chondrodysplasia punctata (RCDP) (MIM 215100)

Onder chondrodysplasia punctata wordt een heterogene groep van botdysplasieën verstaan met als gemeenschappelijk kenmerk stippeling van de epifyse schijven. In de literatuur zijn verschillende genetische vormen van chondrodysplasia punctata beschreven. De twee belangrijkste vormen zijn de Conradi-Hunerman-vorm (MIM 118650), met een autosomaal dominante overerving, en de autosomaal-recessieve rhizomele vorm, waarin peroxisomale afwijkingen gevonden zijn. De rhizomele vorm wordt gekarakteriseerd door een disproportionaliteit van met name de proximale delen van de extremiteiten, dwerggroei, cranio-faciale afwijkingen, cataract en mentale retardatie. De cranio-faciale afwijkingen bestaan uit een brede, lage neusrug, epicanthus, hoog gewelfd voorhoofd, displastische oorschelpen en micrognathie. Röntgenologische studies laten over het algemeen een serie van afwijkingen zien, waaronder een symmetrische verkorting van het dijbeen en het opperarmbeen met onregelmatige en brede metafy-

Tabel 2. Complementatie groepen in de peroxisoombiogenesedefecten (PBD)

Nr.	Complementatiegroep			PTS-import		Peroxisomale membraan-structuren	Betrokken gen	Fenotypen
	Gifu	KKI	Adam	PTS1	PTS2			
1.	A	8	VI	-	-	+	<i>PEX26</i>	ZS/NALD/IRD
2.	B	7 (=5)	VII	-	-	+	<i>PEX10</i>	ZS/NALD/IRD
3.	C	4 (=6)	III	-	-	+	<i>PEX6</i>	ZS/NALD/IRD
4.	D	9	VIII	-	-	-	<i>PEX16</i>	ZS
5.	E	1	II	-	-	+	<i>PEX1</i>	ZS/NALD/IRD
6.	F	10	V	-	-	+	<i>PEX2</i>	ZS
7.	G	12	IX	-	-	-	<i>PEX3</i>	NALD
8.	H	13	X	-	-	+	<i>PEX13</i>	ZS/NALD
9.	J	14	XI	-	-	-	<i>PEX19</i>	ZS
10.		2	IV	-	+/-	+	<i>PEX5</i>	ZS/NALD/IRD
11.		3	XII	-	-	+	<i>PEX12</i>	ZS/NALD/IRD
12.	R	11	I	+	-	+	<i>PEX7</i>	RCDP

sairschijven en stippeling van de epifysairschijven. De kalkstippeling van de epifysairschijven is in alle patiënten onder de leeftijd van achttien maanden aanwezig, maar verdwijnt in oudere patiënten. Aan de andere kant blijven de dijbeenkoppen ernstig gedeformeerd en laten alle patiënten een gebrek zien van een duidelijke nucleus van de dijbeenkop.

Biochemische en moleculaire basis van rhizomele chondrodysplasia punctata (RCDP) Type 1

De identificatie van RCDP als een peroxisomale ziekte, dateert uit 1985 toen Heymans e.a. (28) rapporteerden dat de plasmalogeenniveaus in erythrocyten van RCDP-patiënten sterk verlaagd waren. In dezelfde studie werd gerapporteerd dat fytaanzuur sterk verhoogd was, wat op dat moment reeds de betrokkenheid van twee (waarschijnlijk) peroxisomale functies impliceerde. Meer gedetailleerde studies zijn in de daaropvolgende jaren gedaan, hetgeen geleid heeft tot de ontdekking van een serie van verschillende peroxisomale afwijkingen, te weten: (1) alkylDHAPsynthasedeficiëntie; (2) fytanoyl-CoA-hydroxylasedeficiëntie; (3) (partiële) DHAPAT-deficiëntie en (4) deficiëntie van de 41-kDa-rijpe-vorm van het peroxisomale thiolase (alleen de precursor-44-kDa-vorm is aanwezig).

De onderliggende basis voor deze wonderlijke combinatie van vier verschillende deficiënties werd in 1997 opgehelderd, toen drie groepen onafhankelijk van elkaar ontdekten dat het defecte gen het *PEX7*-gen is, dat codeert voor de zogenaamde PTS2-receptor (*PEX7p*), die de import van PTS2-eiwitten in het peroxisoom katalyseert (figuur 1). Inderdaad blijken zowel alkylDHAPsynthase als fytanoyl-CoA-hydroxylase en peroxisomaal thiolase alle echte PTS2-signalen te bevatten (figuur 1).

Zoals later in dit artikel wordt besproken, blijkt RCDP genetisch heterogeen te zijn met twee andere vormen die veroorzaakt worden door mutaties in de genen coderend voor respectievelijk DHAPAT en alkylDHAPsynthase. Belangrijk is te vermelden dat in alle RCDP-patiënten, zoals wij die in de afgelopen jaren hebben geïdentificeerd, de erythrocytoplasmalogeenniveaus altijd sterk verlaagd zijn. Dat maakt plasmalogeenanalyse een zeer betrouwbare start van de diagnostiek van RCDP.

Recente studies hebben geleid tot de opheldering van de moleculaire basis van RCDP type 1 en een grote variëteit aan mutaties is beschreven in het *PEX7*-gen (29, 30). Er is sprake van één veelvoorkomende mutatie, de zogenaamde L229ter-mutatie, die voor de helft van de mutante *PEX7*-allelen zorg draagt.

Enkelvoudige peroxisomale (enzym)eiwitdeficienties

Peroxisomale β -oxidatiedefecten

6. X-gebonden adrenoleukodystrofie (X-ALD) (MIM 300100)

X-gebonden adrenoleukodystrofie (X-ALD) is de meest voorkomende enkelvoudige peroxisomale ziekte, met een minimale incidentie van 1:21.000 mannen (31) in Amerika tot 1:15.000 in Frankrijk (Aubourg, persoonlijke mededeling, geciteerd in Kemp e.a.

(32)). De fenotypische expressie van X-ALD is zeer divers. Op dit moment worden er zes fenotypische varianten van X-ALD onderscheiden (33). Deze classificatie is enigszins arbitrair en gebaseerd op de leeftijd waarop het ziekteproces begint en de organen die primair aangedaan zijn. De twee meest voorkomende fenotypes die tezamen voor > 80% van alle gevallen zorg dragen, zijn 'childhood cerebral ALD' (CCALD) en 'adrenomyeloneuropathie' (AMN). CCALD begint tussen het derde en tiende levensjaar en wordt gekarakteriseerd door gedragsveranderingen en een progressieve cognitieve en neurologische achteruitgang, die vaak binnen drie jaar tot totale invaliditeit leidt. Het cerebrale fenotype wordt niet alleen waargenomen op de kinderleeftijd, maar kan zich ook later op adolescentie ('adolescent cerebral ALD') of zelfs op de volwassen leeftijd ('adult cerebral ALD') manifesteren. Er is een opmerkelijk verschil tussen de cerebrale fenotypes en AMN, aangezien de cerebrale fenotypes een ontstekingsreactie laten zien in de cerebrale witte stof die enigszins lijkt op multipale sclerose. In AMN is de inflammatoire respons afwezig of mild; andere verschillen zijn een veel latere startdatum (28 ± 9 jaar) en een veel tragere progressie. Niettemin ontwikkelt 40% van de AMN-patiënten enige cerebrale achteruitgang. Tenslotte is belangrijk te vermelden dat ongeveer 40% van de vrouwelijke draagsters voor X-ALD op middelbare leeftijd of later AMN-achtige symptomen ontwikkelen.

Biochemie en moleculaire basis van X-ALD

Het biochemische kenmerk van X-ALD is een stapeling van zeer-langketen vetzuren in lipiden van plasma en cellen. Analyse van plasma-zeer-langketenvetzuren heeft een zeer hoge sensitiviteit en specificiteit (34). Dit geldt niet voor obligate heterozygoten, want in 15-20% van de obligate heterozygoten worden normale plasma-zeer-langketenvetzuren gevonden. Hoewel in eerste instantie gedacht werd dat het basale defect in X-ALD te maken had met een deficiënte activering van zeer-langketenvetzuren wijzen de huidige inzichten toch in een andere richting. Toen het X-ALD-gen geïdentificeerd werd in 1993 (35), liet het eiwit zoals voorspeld op basis van de genetische code geen homologie zien met acyl-CoA-synthetase, maar bleek het te behoren tot de superfamilie van ABC-transmembraan-transporteers. Om die reden werd de betreffende 'half ABC transporter' ALDp genoemd. Functioneel bezitten eukaryote ABC-transporters twee homologe helften met ieder een transmembraandomein en een ATP-bindingsdomein. In sommige gevallen wordt de gehele transporter gecodeerd door één gen, zoals het geval is voor het 'multi drug resistance' (MDR)-eiwit en het 'systic fibrosis transmembrane regulator' (CFTR)-eiwit. In andere gevallen is er sprake van zogenaamde 'half ABC transporters' die homodimeriseren of heterodimeriseren om aldus een functionele transporter te genereren. ALDp is zo'n 'half transporter' en kan volgens de huidige inzichten zowel een homodimeer als een heterodimeer vormen, waarbij de heterodimeer partner één van de drie andere peroxisomale 'half ABC transporters' kan zijn, te weten: ALDRP

(‘ALD related protein’), PMP-70 (‘70 kDa peroxisomal membrane protein’) en PMP-69 of PMP-70R (‘69/70 kDa peroxisomal membrane protein’). Hoewel het definitieve bewijs nog niet is geleverd, is het huidige idee dat ALDP ofwel als homodimeer of als heterodimeer, zeer-langketenvetzuren in de één of andere vorm over de peroxisomale membraan transporteert. In de afgelopen jaren zijn vele patiënten moleculair-biologisch onderzocht, wat geleid heeft tot de identificatie van een groot aantal over het algemeen solitaire mutaties (zie overzichtartikel van Kemp e.a. (32) en de mutatie database voor X-ALD; www.X-ALD.nl).

7. Acyl-CoA-oxidasedeficiëntie

Acyl-CoA-oxidasedeficiëntie is voor het eerst beschreven in 1988 door Poll-The e.a. (36) in twee kinderen, een jongetje en een meisje, uit een consanguïen huwelijk. Zij waren beiden hypotoon, hadden een vertraagde motorische ontwikkeling en een retinopathie met een uitgedoofd elektroretinogram. Er was geen sprake van cranio-faciale dysmorfie. Hoewel er enige ontwikkeling in de eerste twee jaar van het leven was, begon daarna een duidelijke progressieve neurologische regressie. Een craniale CT-scan was in eerste instantie zonder grote afwijkingen, maar liet op vierjarige leeftijd duidelijke afwijkingen zien in één van de twee patiënten. Op basis van deze waarnemingen werd de diagnose neonatale adrenoleukodystrofie (N-ALD) gesteld. Daarmee in samenspraak was de bevinding dat de plasma-zeer-langketenvetzuren verhoogd waren. Echter, in tegenstelling tot de andere gevallen van N-ALD (37, 38) werden normale spiegels van de andere peroxisomale metaboliëten gevonden, te weten: DHCA en THCA, fytaanzuur, pristaanzuur en pipecolinezuur. Bovendien werd bij morfologisch onderzoek de normale aanwezigheid van peroxisomen gevonden in leverbipten van de twee patiënten. Uiteindelijk is duidelijk geworden dat het in deze patiënten gaat om een enkelvoudig defect in de peroxisomale β -oxidatie op het niveau van acyl-CoA oxidase 1 (figuur 3), dat het eerste enzym is in de β -oxidatie van zeer-langketenvetzuren. De deficiëntie van dit enzym verklaart meteen alle gevonden afwijkingen, inclusief de normale waarden voor alle plasmameters, behalve de zeer-langketenvetzuren. Een tweede familie is later gerapporteerd door ons (39), waarna ook Suzuki e.a. (40) en Watkins e.a. (41) nieuwe patiënten met dit defect hebben beschreven, wat het totaal op dit moment brengt op acht acyl-CoA-oxidase-deficiënte patiënten uit zes families.

Metabole en moleculaire basis van Acyl-CoA-oxidasedeficiëntie

Zoals boven beschreven zijn de plasma-afwijkingen in patiënten met Acyl-CoA-oxidasedeficiëntie beperkt tot de stapeling van zeer-langketenvetzuren, hetgeen logisch volgt uit het schema in figuur 3. Er is voor wat betreft de moleculaire basis van acyl-CoA-oxidasedeficiëntie slechts één rapport in de literatuur bekend van Fournier e.a. (42), waarin een grote deletie in het acyl-CoA-oxidase-1-gen gemeld wordt in de twee patiënten beschreven door Poll-The e.a. (36).

8. ‘D-bifunctional protein’-deficiëntie

‘D-bifunctional protein’-deficiëntie werd voor het eerst beschreven door Watkins e.a. (43) in een jongen met ernstige hypotonie en neonatale convulsies. Er was geen aperte cranio-faciale dysmorfie, hoewel de fontanellen groot waren met open suturen. Analyse van de VER (‘visual evoked response’) en BAER (‘brainstem auditory evoked response’) lieten grove afwijkingen zien. Onderzoek van een hersenbipt liet een uitgesproken polymicrogyrie zien. De patiënt overleed op de leeftijd van vijf maanden, zonder enige ontwikkeling doorgemaakt te hebben. Gebaseerd op deze klinische bevindingen werd een peroxisomale ziekte vermoed, met name een N-ALD. In overeenstemming hiermee werden afwijkende plasma-zeer-langketenvetzuren gevonden, maar net zoals bij acyl-CoA-oxidasedeficiëntie werd een normale aanwezigheid van peroxisomen gezien. Inmiddels is duidelijk geworden dat het hier om ‘D-bifunctional protein’-deficiëntie gaat.

‘D-bifunctional protein’-deficiëntie blijkt één van de meest voorkomen peroxisomale defecten te zijn. Recente analyse van vierenveertig patiënten met een vastgestelde ‘D-bifunctional protein’-deficiëntie door ons (44), liet zien dat in het algemeen kinderen met dit defect ernstige afwijkingen van het centrale zenuwstelsel hebben, met een ernstige hypotonie (98%), niet te controleren convulsies (95%) en het niet bereiken van enige betekenisvolle ontwikkeling (100%). Aan de andere kant is er bij ‘D-bifunctional protein’-deficiëntie geen sprake van intra-uteriene groeiretardatie, terwijl er meestal wel duidelijke dysmorphe kenmerken zijn (kennelijk met uitzondering van de bovenbeschreven indexpatiënt), waaronder een macrocefalie, hoog voorhoofd, vlakke neusrug, laag ingezette oren, grote open fontanellen en micrognathie. Opvallend is dat in de meeste gevallen waarin het onderzocht is, een duidelijk neuronaal migratiedefect wordt gevonden met gebieden van polymicrogyrie en heterotope neuronen in het cerebrum en cerebellum.

Biochemie en moleculaire basis van ‘D-bifunctional protein’-deficiëntie (DBP)

Zoals boven beschreven is DBP betrokken bij de β -oxidatie van alle bekende peroxisomale vetzuursubstraten, inclusief zeer-langketenvetzuren, di- en trihydroxycoprostaanzuur en pristaanzuur, wat de stapeling van al deze peroxisomale metaboliëten in de meeste ‘D-bifunctional protein’-deficiënte patiënten verklaart. Opheldering van het werkelijke defect in de oorspronkelijke patiënt van Watkins e.a. (43) door Van Grunsven e.a. (45) verschaftte ook een verklaring voor de opmerkelijke bevinding gedaan door Van Grunsven e.a. (46), die rapporteerden dat binnen de groep van ‘D-bifunctional protein’-deficiënte patiënten verschillende subgroepen kunnen worden onderscheiden. Dit kan nu eenvoudig verklaard worden door het feit dat ‘D-bifunctional protein’ twee katalytische activiteiten bezit, te weten een hydratase en een 3-hydroxyacyl-CoA-dehydrogenaseactiviteit. Als gevolg daarvan valt te begrijpen dat in subgroep A ‘D-bifunctional protein’ compleet deficiënt is met het

verlies van zowel de hydratase als 3-hydroxyacyl-CoA-dehydrogenasecomponenten van DBP. De oorspronkelijke patiënt beschreven door Watkins e.a. (43) behoort tot deze groep (45). Subgroep B representeert 'D-bifunctional protein'-deficiëntie waarbij alleen de enoyl-CoA-hydratasecomponent deficiënt is terwijl in subgroep C juist de 3-hydroxyacyl-CoA-dehydrogenasecomponent van DBP functioneel inactief is, als gevolg van mutaties in het deel van het DBP-gen, dat codeert voor de dehydrogenaseactiviteit.

De patiënt beschreven door Van Grunsven e.a. (47) behoort tot subgroep C. Moleculaire studies zoals verricht in patiënten met DBP-deficiëntie hebben geleid tot de identificatie van een variëteit aan verschillende mutaties, inclusief een opvallend frequente G46>A mutatie, zoals gevonden in patiënten behorend tot subgroep C. De glycine op positie 16 is gelokaliseerd in een heel belangrijk deel van de zogenaamde 'Rossmann fold' die zorgdraagt voor de binding van NAD. Dit verklaart dan ook meteen waarom de dehydrogenasecomponent selectief inactief is in patiënten van subgroep C, terwijl de hydratasecomponent volledig normaal is.

Peroxisomale thiolasedeficiëntie (pseudo-Zellweger-syndroom) (MIM 261510): een misdiagnose en de opheldering van het werkelijk defect op het niveau van 'D-bifunctional protein'

In 1986 beschreven Goldfischer e.a. (48) een meisje van consanguïne ouders, dat zich bij de geboorte presenteerde met een cranio-faciale dysmorphie, spierzwakte en hypotonie. Convulsies begonnen al snel na de geboorte en patiënte vertoonde geen psychomotorische ontwikkeling. Bij autopsie werden niercysten gevonden, alsmede atrofie bijniëren. Bovendien was er een myelinetekort, neuronale heterotopie en een sudanofiele leukodystrofie. Op basis van deze bevindingen werd de diagnose Zellweger-syndroom overwogen. Morfologisch onderzoek in de lever leerde echter dat peroxisomen overvloedig aanwezig waren. Anderszins was er wel degelijk sprake van een stapeling van zeer-langketenvetzuren, hetgeen aangaf dat er sprake moest zijn van een peroxisomale stoornis. Daarnaast werden afwijkende galzuren gevonden in lichaamsvloeistoffen. Immunoblot-analyses zoals uitgevoerd door Schram e.a. (49) lieten zien dat het peroxisomale enzym 3-ketoacyl-CoA-thiolase bij deze patiënte deficiënt was. In de loop der tijd is groeiende ongerustheid ontstaan of dit allemaal wel klopte, om verschillende redenen. Allereerst liet mutatieanalyse van het bijbehorende gen géén mutaties zien. Daarnaast werd duidelijk dat het niet zo is dat er één thiolase in peroxisomen zit dat de β -oxidatie van alle componenten katalyseert, maar dat er sprake is van twee verschillende thiolasen en dat het tweede thiolase, genoemd SCPx, betrokken is bij de β -oxidatie van de galzuurintermediairen. Om deze redenen is deze patiënte door ons recent onderzocht en zoals gepubliceerd door Ferdinandusse e.a. (50) is het nu duidelijk dat het werkelijke defect bij deze patiënte niet ligt op het niveau van peroxisomaal thiolase, maar op het niveau van het peroxisomale 'D-bifunctional pro-

tein', wat dan ook meteen de afwijkingen verklaart zoals waargenomen in de patiënte, inclusief een stapeling van zeer-langketenvetzuren en trihydroxycholestaanzuur. Het blijft mysterieus hoe de resultaten van Schram e.a. (49) verklaard moeten worden. De onderliggende reden zou wellicht kunnen zijn dat we hier met sterk autolytisch materiaal te maken hebben gehad.

9. Peroxisomaal 2-methyl-acyl-CoA-racemase (AMACR)-deficiëntie

Recent hebben wij een nieuw defect in de peroxisomale vetzuur- β -oxidatieroute geïdentificeerd in een aantal patiënten met een sensorische motorneuropathie die pas op adulte leeftijd is ontstaan. Sensorische motorneuropathieën zijn geassocieerd met verschillende aangeboren ziekten, waaronder 'Charcot-Marie-Tooth disease', X-ALD en de ziekte van Refsum. In de laatste twee ziektebeelden wordt gedacht dat de neuropathie veroorzaakt wordt door de stapeling van respectievelijk zeer-langketenvetzuren en fytaanzuur. Analyse van plasma van twee patiënten met een adulte sensorische motorneuropathie met daarbij tekenen van de ziekte van Refsum (patiënt 1), respectievelijk X-gebonden adrenoleukodystrofie (patiënt 2), liet eenzelfde beeld zien: normale zeer-langketenvetzuren, marginaal verhoogde fytaanzuurniveaus en sterk afwijkende plasmawaarden voor de 2-methylvetzuren, pristaanzuur en di- en trihydroxycholestaanzuur (51). Dit suggereerde een specifiek defect in de peroxisomale β -oxidatie van vertakte-ketenvetzuren, maar niet in het α -oxidatiesysteem, waarvan het eerste enzym deficiënt is in de ziekte van Refsum (zie later). Studies in fibroblasten van deze twee patiënten lieten normale waarden zien voor alle gemeten parameters, behalve de pristaanzuur- β -oxidatie die gereduceerd was tot 20-30% van normaal. Zoals logisch te verklaren valt uit figuur 3 bleek de activiteit van het 'branched-chain acyl-CoA oxidase', het 'D-bifunctional protein' en het peroxisomale thiolase 2 (SCPx) normaal. Op dat moment was het volstrekt onduidelijk op basis waarvan de stapeling verklaard moest worden van pristaanzuur en di- en trihydroxycholestaanzuur, maar uit de literatuur was het bestaan bekend van een bepaald enzym genaamd 2-methyl-acyl-CoA-racemase (AMACR), dat niet zozeer betrokken is bij de β -oxidatie zelf, maar een essentiële rol speelt in de β -oxidatie van pristaanzuur en di- en trihydroxycholestaanzuur, omdat het enzym de interconversie van de (2R)- en (2S)-stereo-isomeren van 2-methyl-vertakteketen-acyl-CoA-esters katalyseert. Meting van racemaseactiviteit in fibroblasten van de patiënten liet een deficiënte activiteit zien, waarna moleculaire studies snel hebben geleid tot de identificatie van de mutaties in het gen coderend voor dit enzym (51).

Peroxisomale vetzuur- α -oxidatiedefecten

10. Ziekte van Refsum (MIM 266500)

De ziekte van Refsum is voor het eerst klinisch beschreven door Sigfald Refsum in de vroege jaren veertig en beschreven onder de naam hereditaire

atactica-polyneuritisformis. In zijn klassieke vorm wordt M. Refsum getypeerd door retinitis pigmentosa, cerebellaire ataxie, chronische polyneuropathie en een verhoogd eiwitniveau in liquor. Daarnaast worden andere afwijkingen gevonden zoals een sensorineuraal gehoorverlies, anosmie, ichtyose, skeletafwijkingen en hartafwijkingen. Het klinisch beeld van Refsum-patiënten is vaak dat van een langzaam progressieve perifere neuropathie met ernstige motorische terugval en spierzwakte met name van de onderste ledematen. Refsum-patiënten zijn over het algemeen geheel normaal op de kinderleeftijd; de symptomen presenteren zich pas op de adolescentie of volwassen leeftijd. De meeste patiënten hebben echter duidelijke afwijkingen voor de leeftijd van twintig jaar, met name anosmie en visusverlies.

Biochemie en moleculaire basis van M. Refsum

Hoewel de stapeling van fytaanzuur in Refsum-patiënten al gevonden werd in de vroege jaren zestig heeft het heel lang geduurd voordat het exact onderliggende defect ontdekt werd. De reden daarvoor is dat het mechanisme van fytaanzuur- α -oxidatie slechts onlangs is opgelost (52). Het is nu duidelijk dat het enzym fytanoyl-CoA-hydroxylase deficiënt is in M. Refsum. Inderdaad hebben enzymactiviteitsmetingen gevolgd door moleculaire analyses (53) duidelijk aangetoond dat fytanoyl-CoA-hydroxylase het missende enzym is in de ziekte van Refsum en dat de deficiëntie veroorzaakt wordt door mutaties in het corresponderende gen. Interessant genoeg hebben recente studies van ons laten zien dat er een subset van Refsum-patiënten is, waarbij fytanoyl-CoA-hydroxylase zelf normaal is, maar waarbij het gaat om mutaties in het *PEX7*-gen, waarvan we eerder vastgesteld hebben dat het gemuteerd is in rhizomele chondrodysplasia punctata type 1. Het is heel opvallend dat mutaties in één en hetzelfde gen, te weten *PEX7*, aanleiding kunnen geven tot dergelijke wijd uiteenlopende klinische fenotypes, variërend van RCDP type 1 tot M. Refsum (54).

Etherfosfolipide-synthesedefecten

11. Rhizomele chondrodysplasia punctata (RCDP) type 2 (MIM 222765)

Zoals reeds boven besproken is RCDP genetisch heterogeen. Dit werd duidelijk in 1992 toen wij het eerste geval van geïsoleerde DHAPAT-deficiëntie in een patiënt met alle klinische tekenen van RCDP publiceerden. In deze patiënt werden cranio-faciale afwijkingen gevonden bij de geboorte, inclusief een hoog voorhoofd, grote fontanellen, een lage brede neusrug, micrognathie en een hoog gewelfd palatum. De patiënt was extreem hypotoon, had cataract en een uitgesproken rhizomele verkorting van met name de bovenarmen. Daarnaast waren er opvallende radiologische afwijkingen consistent met RCDP, hoewel de typische calcificaties van de patellae en acetabulum niet aanwezig waren. Op basis hiervan stelden wij een volledige deficiëntie vast van de erythrocyt-plasmalogenen. Daarnaast werd een normaal fytaanzuurniveau gevonden in plasma. De betekenis van

deze bevinding was niet onmiddellijk duidelijk, aangezien fytaanzuur alleen uit exogene diëtaire bronnen komt en ook normaal kan zijn in jonge RCDP-type-1-patiënten, ondanks een volledige deficiëntie in de fytaanzuur- α -oxidatie. Gedetailleerde studies in fibroblasten van de patiënt werden daarna ingezet en dit leidde al snel tot de ontdekking van een geïsoleerde DHAPAT-deficiëntie met normale waarden voor alkyl-DHAP-synthase, fytaanzuur- α -oxidatie en ook een normale aanwezigheid van het peroxisomale thiolase 1 in zijn rijpe 41-kDa-vorm (55). Later zijn door Barr e.a. (56), Clayton e.a. (57), Sztriha e.a. (58), Moser e.a. (59) en Elias e.a. (60) een aantal nieuwe patiënten beschreven, zodat we op dit moment een 10-tal patiënten met dit defect kennen.

Biochemie en moleculaire basis van RCDP type 2

In alle patiënten met een bewezen RCDP type 2 is de activiteit van DHAPAT sterk deficiënt als gevolg van mutaties in het gen coderend voor DHAPAT, hetgeen verklaart waarom etherfosfolipiden inclusief plasmalogenen deficiënt zijn in geval van DHAPAT-deficiëntie. De identificatie van het humane DHAPAT-cDNA door Thai e.a. (61) en Ofman e.a. (62) maakte het mogelijk om de moleculaire basis van DHAPAT-deficiëntie te bestuderen. In de verschillende door ons geanalyseerde patiënten, beschreven door Ofman e.a. (62), vonden wij een aantal verschillende mutaties, waarvan door middel van expressiestudies werd vastgesteld dat het causale mutaties waren die het enzym DHAPAT inactief maakten.

12. Rhizomele chondrodysplasia punctata type 3 (alkyl-DHAP-synthasedeficiëntie) (MIM 600121)

Naast de DHAPAT-deficiëntie bestaat er ook de geïsoleerde alkyl-DHAP-synthasedeficiëntie, zoals door ons voor het eerst is beschreven in 1994 in een patiënt met alle klinische karakteristieken van rhizomele chondrodysplasia punctata (63). Naast deze patiënt en de door de Vet e.a. (64) beschreven patiënt, zijn er nog een drietal andere patiënten geïdentificeerd in samenwerking met de groep van dr. H.W. Moser, Baltimore, USA, waarmee het totale aantal patiënten op vijf komt.

Biochemie en moleculaire basis van rhizomele chondrodysplasia punctata type 3

In de oorspronkelijke patiënt (63) werd alkyl-DHAP synthase deficiënt gevonden terwijl DHAPAT, fytaanzuur- α -oxidatie en het peroxisomale thiolase normaal waren. In de patiënt, beschreven door De Vet e.a. (64), was alkyl-DHAP-synthase ook deficiënt, maar daarnaast werd ook DHAPAT sterk deficiënt gevonden in activiteit met een restactiviteit van ongeveer 15%, wat dicht bij de resultaten komt zoals gevonden in patiënten met RCDP type 1.

De verklaring voor deze merkwaardige heterogeniteit binnen RCDP type 3 werd gevonden toen duidelijk werd dat DHAPAT en alkyl-DHAP-synthase samen een complex vormen in het peroxisoom. Gedetailleerde studies hebben laten zien dat de deficiënte activiteit van DHAPAT in de patiënt, beschreven door De Vet e.a. (64), het secundaire gevolg is van het feit

dat het alkyl-DHAP-synthase-eiwit volledig afwezig was, als gevolg van een homozygote 128bp-deletie in het gen coderend voor alkyl-DHAP-synthase. Aan de andere kant was er bij patiënt, zoals door ons voor het eerst beschreven (63), sprake van een inactief alkyl-DHAP-synthase, waarbij het eiwit wel degelijk gewoon aanwezig was. In dit geval hadden wij te maken met een G1256A-mutatie, die leidde tot de verandering van de arginine op positie 419 door een histidine.

13. Hyperoxalurie type 1 (alanine: glyoxylaat-aminotransferasedeficiëntie) (MIM 259900)

Primaire hyperoxalurie is een algemene term die verschillende genetische ziektebeelden beschrijft, gekarakteriseerd door calciumoxalaat-nephrolithiasis en nefrocalcinose die frequent leiden tot een progressief verlies van nierfunctie die uiteindelijk tot de dood kan leiden. In hyperoxalurie type 1 is er sprake van een excessieve uitscheiding van glyoxylaat en glycolaat terwijl er in type 2 ('L-glyceric aciduria') sprake is van excretie van grote hoeveelheden L-glyceraat met normale glyoxylaat- en glycolaatspiegels. De enzymatische basis voor deze twee typen primaire hyperoxalurie is in de afgelopen jaren duidelijk geworden. Het betreft het peroxisomale enzym alanine: glyoxylaat-aminotransferase in PH1 en het cytosolische enzym D-glyceraatdehydrogenase / glyoxylaat-reductase in PH2.

Als we de discussie beperken tot primaire hyperoxalurie dan is het duidelijk dat we te maken hebben met een zeer heterogeen ziektebeeld met een sterke verscheidenheid in symptomen. Over het algemeen presenteren patiënten zich vóór het vijfde levensjaar met hematurie, hoewel benadrukt moet worden dat de leeftijd waarop de ziekte zich kan openbaren ook veel later in het leven kan zijn, tot zelfs in de vijfde decade. Het neerslaan van calciumoxalaat met name in het nierparenchym leidt tot renaal functieverlies wat uiteindelijk aanleiding geeft tot uremie en systemische oxalose. Het onvermogen om oxalaat uit het lichaam te verwijderen, leidt niet alleen tot het neerslaan van calciumoxalaat in de nier, maar ook in allerlei andere organen.

Biochemie en moleculaire basis van hyperoxalurie type 1 (PH1)

In primaire hyperoxalurie type 1 is alanine: glyoxylaat-aminotransferase deficiënt als het gevolg van mutaties in het betreffende AGT-gen. Een direct gevolg van de deficiëntie van AGT is dat glyoxylaat stapelt in het peroxisoom, waarna glyoxylaat geoxideerd kan worden tot oxalaat wat tot vorming van calciumoxalaat aanleiding geeft. Reductie van glyoxylaat, anderzijds, leidt tot glycolaat (figuur 6).

Diagnose van PH1 vereist een leverbiopt, aangezien het enzym alleen in de lever tot expressie komt. In de meeste patiënten (60%) is er bijna geen residuele AGT-activiteit, terwijl in de rest van de patiënten de activiteiten kunnen variëren tussen 2 en 48% (65).

De identificatie van het cDNA coderend voor AGT en het gen (66) hebben moleculaire studies mogelijk gemaakt en ook hier is weer sprake van een groot aantal

verschillende mutaties. Een heel opvallend aspect van hyperoxalurie type 1 is dat het niet alleen gaat om patiënten waarbij AGT deficiënt is als gevolg van mutaties die leiden tot het katalytisch inactief zijn van AGT, maar in een groot aantal patiënten hebben we ook te maken met het feit dat AGT niet in het peroxisoom gelokaliseerd is maar juist in mitochondriën. De onderliggende oorzaak van deze zeer opmerkelijke mislokalisatie van AGT in mitochondriën is opgehelderd (67).

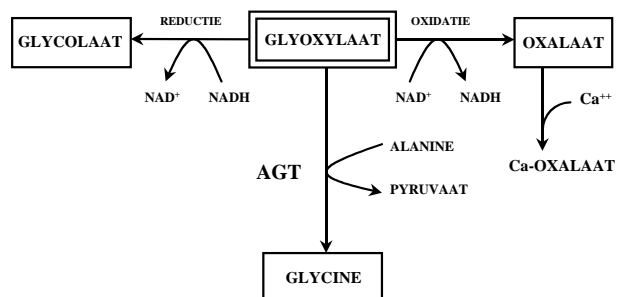
14. Glutaaracidurie type 3 (MIM 231690)

In 1991 beschreven Bennett e.a. (68) een patiënt met een aantal verschillende afwijkingen waarbij organischezurenanalyse een geïsoleerde glutaaracidurie liet zien. Studies in fibroblasten lieten een normale glutaryl-CoA-dehydrogenaseactiviteit zien en daarnaast werden er ook geen aanwijzingen gevonden voor een glutaaracidurie type 2 als gevolg van mutaties in het ETF of ETF-dehydrogenase.

Verder onderzoek leidde tot de vaststelling dat het peroxisomale enzym glutaryl-CoA-oxidase deficiënt is in deze patiënt. Tot op heden is dit de enige patiënt in de literatuur met dit defect.

15. Mevalonaatkinasedeficiëntie (MIM 251170 en MIM 260920)

Mevalonaatkinasedeficiëntie is tot nu toe de enige peroxisomale ziekte waarbij het isoprenoïdsynthesepad is betrokken. Interessant genoeg kent mevalonaatkinasedeficiëntie twee sterk verschillende uitingen. De klassieke vorm van mevalonaatkinasedeficiëntie uit zich met ernstige afwijkingen vroeg in het leven, waaronder een uitgesproken ontwikkelingsachterstand, cranio-faciale dysmorphie, cataract, hepatosplenomegalie, lymfadenopathie, en vroege dood. Een geheel andere beeld daarentegen vertoont mevalonaatkinasedeficiëntie geassocieerd met terugkerende koortsepisodes, geassocieerd met lymfadenopathie, artralgie, gastro-intestinale problemen en huiduitslag (hyperimmunoglobulinemie type D / periodieke koortssyndroom; HIDS) (69;70). In HIDS-patiënten is mevalonaatkinase niet zo deficiënt als in patiënten met de klassieke vorm van mevalonaatkinasedeficiëntie,



Figuur 6. Metabolisme van glyoxylaat tot glycine, glycolaat en oxalaat. Onder normale omstandigheden wordt glyoxylaat omgezet in glycine in het peroxisoom via het enzym alanine: glyoxylaat-aminotransferase (AGT). Als AGT inactief is als gevolg van mutaties in het structurele gen voor AGT, wat leidt tot het verlies van katalytische activiteit of mislokalisatie van AGT naar mitochondriën, hoopt glyoxylaat op, gevolgd door oxidatie tot oxalaat of reductie tot glycolaat.

waarbij het enzym restactiviteiten heeft tussen de 1,2-3,4 % van normaal laat zien.

De laboratoriumdiagnostiek start over het algemeen met de bevinding van verhoogde mevalonzuurspiegels in urine, gevolgd door analyse van mevalonaatkinase in leukocyten, bloedplaatjes of fibroblasten, waarna moleculaire analyse plaats kan vinden (zie voor een overzicht (71).

16. Akatalasemie (MIM 115500)

Akatalasemie is een uiterst zeldzame ziekte die eigenlijk alleen in Japan en Zwitserland is beschreven. In Japan is akatalasemie geassocieerd met ulcererende, vaak gangreneuze laesies in de mond, terwijl deze afwijkingen juist weer niet gezien werden in de Zwitserse patiënten (72).

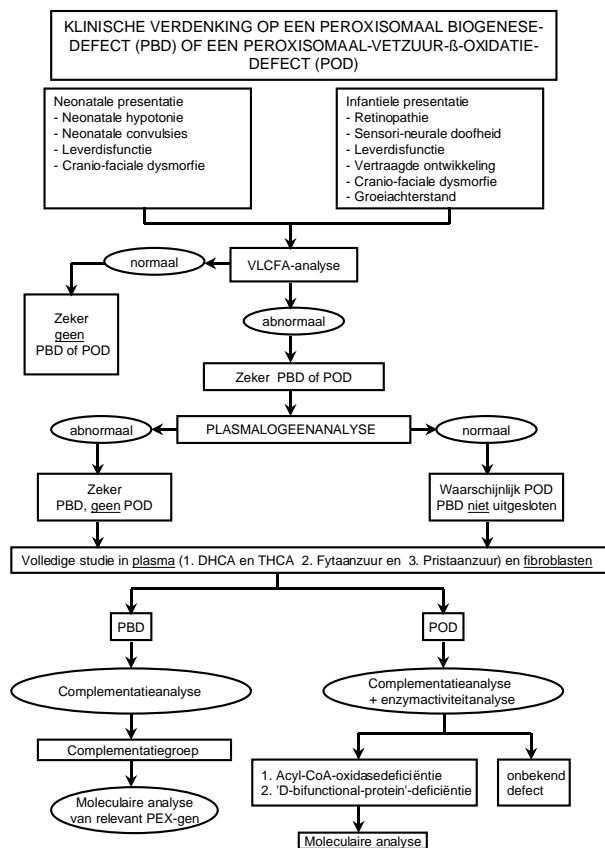
17. 'Mulibrey nanism' (MIM 253250)

'Mulibrey (muscle, liver brain, eye) nanism' (MUL) is een autosomaal recessieve ziekte met ernstige groeiachterstand, karakteristieke dysmorphe afwijkingen, pericardconstricties en hepatomegalie. De psychomotorische ontwikkeling van patiënten met 'Mulibrey nanism' is over het algemeen normaal. 'Mulibrey nanism' komt wereldwijd voor, maar is het meest beschreven in de Finse populatie. Van de honderd patiënten beschreven in de literatuur komen er tachtig uit Finland. Zoals voor het eerst aangetoond door Avela e.a. (73) wordt 'Mulibrey nanism' veroorzaakt door mutaties in het TRIM37-gen op chromosoom 17q22-23.

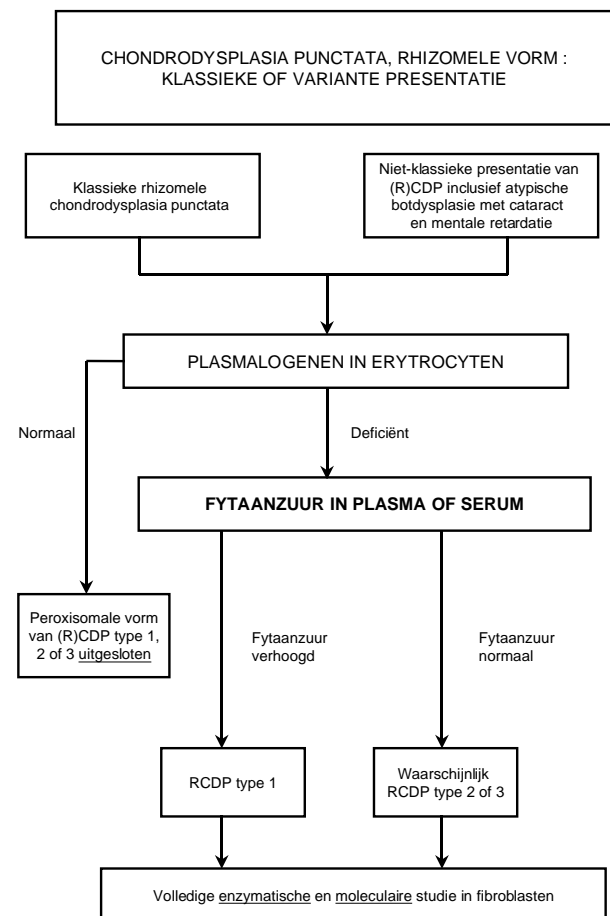
Het eiwit gecodeerd door het TRIM37-gen is een nieuw lid van de 'RING-B-box-Colled-coil' (RBCC) familie van 'zinc finger'-eiwitten. Recente studies van de hand van Kallijärvi e.a. (74) hebben laten zien dat het TRIM37-eiwit gelokaliseerd is in peroxisomen. Wat precies de functie van het TRIM37-eiwit in peroxisomen is, is geheel onduidelijk. Diepgaande studies hebben tot nu toe geen enkele peroxisomale abnormaliteit laten zien. Bij patiënten met 'Mulibrey nanism' worden normale plasma-zeer-langketenvetzuren, di- en trihydroxycholestaanzuur-, fytaanzuur-, pristaanzuur- en pipecolinezuurniveaus gevonden en ook de erythrocytoplasmalogenen zijn volstrekt normaal.

Laboratoriumdiagnostiek van peroxisomale ziekten

In de voorafgaande paragrafen zijn de klinische, biochemische en genetische aspecten van de verschillende peroxisomale ziekten besproken. Het zal duidelijk zijn dat er niet één simpele laboratoriumtest is, die in staat is om al deze peroxisomale ziekten te identificeren. Het is ook duidelijk dat de selectie van de juiste laboratoriumdiagnostiek gebaseerd moet zijn op de klinische presentatie van de patiënt. Om die reden hebben wij een aantal jaren geleden het concept van 'diagnostische groepen' (75) geïntroduceerd, om op die manier logische richtlijnen te gene-



Figuur 7. Flow-chart voor de differentiaaldiagnostiek van patiënten leidend aan een peroxisombiogenesedefect of een peroxisomaal vetzuur- β -oxidatiedefect.



Figuur 8. Flow-chart voor de differentiaaldiagnostiek van rhizome chondrodysplasia punctata (RCDP type 1, 2 en 3).

renen voor de juiste diagnostiek van peroxisomale ziekten. De diagnostische groepen zijn de volgende.

- De peroxisoombiogenesedefecten en de peroxisomale β -oxidatiedefecten met uitzondering van X-ALD en 2-methyl-acyl-CoA-racemasedeficiëntie: tot deze groep behoren Zellweger-syndroom, neonatale adrenoleukodystrofie, infantiele vorm van de ziekte van Refsum, acyl-CoA-oxidasedeficiëntie en 'D-bifunctional protein'-deficiëntie.
- Rhizomele chondrodysplasia punctata: tot deze groep behoren RCDP type I, II en III.
- X-gebonden adrenoleukodystrofiecomplex: tot deze groep behoren alle vormen van X-gebonden adrenoleukodystrofie, van de 'childhood cerebral'-vorm tot adrenomyeloneuropathie.
- De overgebleven peroxisomale ziekten: tot deze groep behoren de ziekte van Refsum, 2-methylacyl-CoA-racemasedeficiëntie, hyperoxalurie type 1, glutaryl-CoA-oxidasedeficiëntie en mevalonaatkinasedeficiëntie, akatalasemie en 'mulibrey nanism'.

Laboratoriumdiagnostiek van de peroxisomale ziekten behorend tot diagnostische groep I

De reden om de peroxisomale biogenesedefecten als ook acyl-CoA-oxidasedeficiëntie en 'D-bifunctional protein'-deficiëntie in een diagnostische groep samen te brengen is het feit dat de klinische presentatie van deze ziektebeelden sterke overeenkomsten vertoont, zoals boven beschreven.

Tabel 3 laat de afwijkingen zien gevonden in plasma, erythrocyten en fibroblasten van patiënten die door een van deze verschillende peroxisomale ziekten getroffen zijn. Bij het beschouwen van deze tabel valt op dat de zeer-langketenvetzuren afwijkend zijn in alle gevallen. In onze ervaring, die meer dan 500 bewezen patiënten betreft met ofwel een defect in de peroxisoombiogenese ofwel een defect in het peroxisomale β -oxidatie, zijn de zeer-langketenvetzuurspiegels te allen tijde afwijkend, zonder enige uitzondering. Dat maakt analyse van zeer-langketenvetzuren tot een zeer betrouwbare initiële test. Nor-

Tabel 3. Biochemische karakteristieken van de verschillende peroxisomale ziekten

Diagnostische groep	1				2			3
	ZS	NALD / IRD	AOXD	DBPD	RCDP Type 1	RCDP Type 2	RCDP Type 3	X-ALD
<i>Plasma</i>								
Zeer-langketenvetzuren	↑	↑	↑	↑	N	N	N	↑
Di- en trihydroxycholestaanzuur	↑	↑	N	↑ ^a	N	N	N	N
Fytaanzuur	N-↑ ^b	N-↑ ^b	N	N-↑ ^d	N-↑ ^b	N	N	N
Pristaanzuur	N-↑ ^c	N-↑ ^c	N	N-↑ ^c	N	N	N	N
<i>Erythrocyten</i>								
Plasmalogeenspiegel	↓	N	N	N	↓	↓	↓	N
<i>Lever</i>								
Peroxisomen	Deficiënt	Deficiënt	Aanwezig maar afwijkend	Aanwezig maar afwijkend	Aanwezig	Aanwezig	Aanwezig	Aanwezig
<i>Fibroblasten</i>								
Plasmalogeensynthese	↓	↓	N	N	↓	↓	↓	N
DHAPAT	↓	↓	N	N	↓	↓	↓ ^d	N
AlkylDHAP-synthase	↓	↓	N	N	↓	N	↓	N
C26:0- β -oxidatie	↓	↓	↓	↓	N	N	N	↓
Pristaanzuur- β -oxidatie	↓	↓	N	↓	N	N	N	N
Acyl-CoA-oxidase 1	↓	↓	↓	N	N	N	N	N
'D-bifunctional protein'	↓	↓	N	↓	N	N	N	N
Fytaanzuur- α -oxidatie	↓	↓	N	N	↓	N	N	N
Fytanoyl-CoA-hydroxylase	↓	↓	N	N	↓	N	N	N

Afkortingen: ZS = Zellweger syndroom; NALD = neonatale adrenoleukodystrofie; IRD = infantiele vorm van de ziekte van Refsum; AOXD = acyl-CoA-oxidase-1-deficiëntie; DBPD = 'D-bifunctional protein'-deficiëntie; RCDP = rhizomele chondrodysplasia punctata; ^a Di- en trihydroxycholestaanzuur zijn niet verhoogd in alle DBPD-patiënten (81); ^b Fytaanzuur komt alleen uit de voeding en kan daarom variëren van normaal tot verhoogd in patiënten waarin het fytaanzuur- α -oxidatie deficiënt is; ^c Pristaanzuur komt uit de voeding, direct ofwel indirect via fytaanzuur dat door middel van α -oxidatie afgebroken wordt, kan daarom variëren van normaal tot verhoogd als de pristaanzuur- β -oxidatie deficiënt is; ^d Fytaanzuur is vaak verhoogd als de pristaanzuur- β -oxidatie verlaagd is, zelfs als fytaanzuur- α -oxidatie per se normaal is.

male zeer-langketenvetzuurspiegels sluiten dan ook een PDB of een peroxisomaal β -oxidatiedefect uit. Als de zeer-langketenvetzuren afwijkend zijn, moeten additionele tests gedaan worden. In principe kan men meteen fibroblastenstudies inzetten omdat de bevinding van afwijkende plasma-zeer-langketenvetzuren eenduidig wijst op een defect op het niveau van de peroxisomale biogenese of op het niveau van de peroxisomale β -oxidatie.

Daarnaast is het ook nuttig om een volledige peroxisomale screening te doen in plasma en in erythrocyten, waarbij dan de galzuurintermediären, pristaanzuur en fytaanzuur en de plasmalogenen bepaald worden. Als er in de erythrocyten namelijk een deficiëntie vastgesteld wordt van plasmalogenen dan is de diagnose peroxisoombiogenesedefect zeker.

Indien de erythrocytoplasmalogeenniveaus niet afwijkend zijn, dan betekent dat niet onmiddellijk dat er sprake is van een peroxisomaal β -oxidatiedefect, omdat in de mildere peroxisoombiogenesedefecten de plasmalogenen normaal kunnen zijn. Hoe dan ook: gedetailleerde studies in fibroblasten dienen gedaan te worden om inzicht te krijgen over de werkelijk aard van het defect op het niveau van peroxisoombiogenese of peroxisomale β -oxidatie. Indien er een defect vastgesteld wordt op het niveau van de peroxisomale biogenese dan dienen aanvullende complementatieanalyses gedaan te worden om te achterhalen tot welke complementatiegroep het defect bij de patiënt behoort om daarna moleculaire analyse van het betreffende PEX-gen te doen, zoals eerder besproken.

Aan de andere kant, als we te maken hebben met een defect in de β -oxidatie met een normale peroxisoombiogenese dan dienen de activiteiten van de verschillende enzymen gemeten te worden, met name acyl-CoA-oxidase en 'D-bifunctional protein' -methoden die in ons laboratorium operationeel zijn. Ook hier kan, zoals eerder besproken, moleculaire diagnostiek geschieden.

Laboratoriumdiagnostiek van de peroxisomale ziekten behorend tot diagnostische groep II

Aangezien de klinische karakteristieken van RCDP type I (PTS2-receptordefect), type 2 (DHAPAT-deficiëntie), en type 3 (alkyl-DHAP-synthasedeficiëntie) zeer vergelijkbaar zijn, verklaart dit waarom er drie verschillende vormen van RCDP in één enkelvoudige diagnostische groep zitten. De biochemische karakteristieken van deze ziektebeelden zijn weergegeven in tabel 3. Het feit dat de erythrocytoplasmalogenen deficiënt zijn in alle drie de typen betekent dat analyse van erythrocytoplasmalogenen een zeer betrouwbare initiële laboratoriumtest is, waarbij vastgesteld kan worden of we te maken hebben met één of andere vorm van RCDP. In het verleden zijn wij betrokken geweest bij de diagnostiek van meer dan honderd RCDP-patiënten en de erythrocytoplasmalogeenniveaus zijn in alle gevallen deficiënt gebleken, zelfs in de milder aangedane patiënten, zoals de patiënt beschreven door Smeitink e.a. (76). Dit impliceert dat indien de erythrocytoplasmalogeenniveaus normaal zijn, RCDP type 1, 2 of 3 uitgesloten is.

Gedetailleerde studies in fibroblasten zijn nodig om

onderscheid te kunnen maken tussen RCDP type 1, 2 of 3. Onderscheid tussen type 1 aan de ene kant en type 2 en 3 aan de andere kant is simpel omdat in type 1 de plasmalogeensynthese niet alleen gestoord is, maar ook andere peroxisomale functies, waaronder de fytaanzuur- α -oxidatie. Bovendien komt het peroxisomale thiolase voor in zijn 44-kDa-precursorm vorm in RCDP type 1, maar in zijn mature 41-kDa-vorm in type 2 en type 3.

Om RCDP type 1 te bevestigen dient moleculaire analyse van het *PEX7*-gen uiteindelijk te geschieden (77-79). Onderscheid tussen type 2 en type 3 vereist meting van zowel DHAPAT als alkyl-DHAP-synthase in fibroblasthomogenaten, gevolgd door moleculaire analyse van de genen coderend voor ofwel DHAPAT of alkyl-DHAP-synthase (44).

Laboratoriumdiagnostiek van de peroxisomale ziekten behorend tot diagnostische groep III

Zoals boven beschreven is er klinische heterogeniteit binnen X-gebonden adrenoleukodystrofie met CCALD en AMN als meest frequente fenotypen. Studies in honderden patiënten hebben laten zien dat de analyse van plasma-zeer-langketenvetzuren wederom een zeer betrouwbare initiële test is om na te gaan of een patiënt aangedaan is met X-ALD. Als de zeer-langketenvetzuren afwijkend zijn, gaan wij meestal door met een volledige studie in fibroblasten, gevolgd door moleculaire analyse in bloedcellen of fibroblasten. Fibroblastenstudies zijn echter niet strikt noodzakelijk en men kan op basis van de afwijkende zeer-langketenvetzuren ook meteen moleculaire diagnostiek inzetten.

Het opsporen van heterozygoten is niet zo eenvoudig als van homozygoten. Plasma-zeer-langketenvetzuren analyse in obligate heterozygoten heeft uitgewezen dat deze normaal kunnen zijn in ongeveer 15% van de gevallen, wat de analyse van zeer-langketenvetzuren in ieder geval voor heterozygotendetectie onbetrouwbaar maakt. Om deze redenen adviseren wij moleculaire diagnostiek in families waarin de indexpatiënt moleculair-biologisch onderzocht is. Bij vraagstellingen waarbij de indexpatiënt niet bekend is, stellen wij een breder pakket voor waarbij ook aanvullende studies in fibroblasten van patiënten plaats hebben, temeer daar op die manier ook gebruik gemaakt kan worden van immunofluorescentiemicroscopie, waarbij de aanwezigheid of afwezigheid van het ALD-eiwit bestudeerd kan worden. Het is belangrijk te vermelden dat een opvallend aspect van X-gebonden adrenoleukodystrofie is dat het product van het mutante X-ALD-allel vaak (>70%) aanleiding geeft tot een instabiel eiwit dat bij immunofluorescentiemicroscopie een negatief signaal geeft. Hierdoor is bij heterozygoten de kans groot dat een mozaïek gevonden wordt met positieve en negatieve cellen (32).

Laboratoriumdiagnostiek van de peroxisomale ziekten behorend tot diagnostische groep IV

De peroxisomale ziekten behorend tot groep IV zijn klinisch heterogeen en de diagnostiek is in alle gevallen anders.

Ziekte van Refsum

In de meeste maar niet in alle Refsum-patiënten is fytanoyl-CoA-hydroxylase deficiënt als gevolg van mutaties in het gen coderend voor het hydroxylase, wat aanleiding geeft tot een gestoorde afbraak van fytaanzuur. Aangezien fytaanzuur alleen voorkomt in diëtaire producten en niet *de novo* gesynthetiseerd wordt, kunnen fytaanzuurspiegels in plasma sterk variëren. In de literatuur zijn er overigens geen overtuigende publicaties van normale fytaanzuurspiegels in bewezen Refsum-patiënten. Op basis hiervan wordt algemeen aangenomen dat analyse van fytaanzuur in plasma een betrouwbare initiële test is voor M. Refsum.

Definitieve diagnose vereist het meten van fytanoyl-CoA-hydroxylase in fibroblasten, gevolgd door moleculaire analyse op het niveau van het cDNA of genomisch niveau (53).

Primaire hyperoxalurie type 1

In patiënten met hyperoxalurie type 1 is alanine: glyoxylaat-aminotransferase deficiënt wat leidt tot een blokkade in de glyoxylaatafbraak. Als gevolg daarvan kan glyoxylaat geoxideerd worden tot oxalaat of gereduceerd tot glycolaat, zoals eerder besproken. Dit verklaart waarom in urine in de meeste patiënten met PH1 een verhoogde excretie is van deze twee organische zuren (glycolzuur en oxaalzuur), alhoewel dit niet noodzakelijkerwijs het geval is voor alle PH1-patiënten. Definitieve diagnostiek van PH1 vereist een leverbiopsie voor meting van AGT-activiteit, gevolgd door moleculaire analyse van het AGT-gen in bijvoorbeeld witte bloedcellen.

Glutaaracidurie type 3 (glutaryl-CoA-oxidasedeficiëntie)

In de literatuur is slechts één patiënt met dit defect beschreven. In deze patiënt was een sterk toegenomen excretie van glutaarzuur in de urine die niet het gevolg bleek te zijn van een deficiëntie op het niveau van glutaryl-CoA-dehydrogenase of ETF / ETF-dehydrogenase (glutaaracidurie type 2).

Gezien het onduidelijke karakter van dit defect wordt dit hier verder niet besproken.

Mevalonaatkinasedeficiëntie

De klassieke vorm van mevalonaatkinasedeficiëntie wordt gekenmerkt door de sterk verhoogde excretie van mevalonzuur in de urine van alle patiënten, op basis waarvan analyse van mevalonzuur in urine een betrouwbare initiële test is voor identificatie van patiënten. Als verhoogde mevalonzuuruitscheiding gevonden wordt dient de mevalonaatkinaseactiviteit bepaald te worden in bloedcellen (leukocyten, lymfocyten, trombocyten) of fibroblasten, gevolgd door moleculaire studies (80). In hyper-IgD / periodieke koortssyndroom (HIDS) is mevalonaatkinase ook deficiënt, hoewel niet zo extreem als in de klassieke vorm van mevalonaatkinasedeficiëntie. Dat leidt er toe dat de mevalonzuurspiegels in urine van deze patiënten marginaal verhoogd kunnen zijn, wat betekent dat de diagnostiek van hyper-IgD / periodieke koortssyndroom niet eenvoudig is. Bij voorkeur dient dan

ook niet alleen diagnostiek gedaan te worden op basis van de meting van mevalonzuur in urine, maar ook door meting van het enzym in bloedcellen.

Peroxisomaal 2-methylacyl-CoA-racemase-(AMACR)-deficiëntie

Patiënten met een deficiëntie van AMACR zijn niet in staat om pristaanzuur- en galzuurintermediären af te breken. Om deze reden zijn pristaanzuur en DHCA en THCA sterk verhoogd in patiënten, terwijl de zeerlangketenvetzuurspiegels normaal zijn. Hoewel de ervaring beperkt is, is het waarschijnlijk veilig om te zeggen dat postnatale diagnostiek van zulke patiënten gebaseerd kan worden op de analyse van: 1) pristaanzuur met behulp van GC/MS en/of 2) de galzuurintermediären, bij voorkeur met behulp van tandem-MS. Hierna kunnen meer gedetailleerde studies in fibroblasten volgen, inclusief meting van de activiteit van 2-methylacyl-CoA-racemase en tenslotte moleculaire studies (51).

Prenatale diagnostiek

Als gevolg van de ontwikkelingen in de laatste jaren is prenatale diagnostiek van praktisch alle peroxisomale ziekten op dit moment mogelijk. Veelal op het niveau van chorionvilliubiopsiemateriaal waarmee het risico op bijvoorbeeld het niet aanslaan van de kweek voorkomen kan worden.

Voorbeelden uit de praktijk

Patiënt 1: Een meisje, het tweede kind van gezonde niet-consanguïene ouders, werd geboren na een onopvallende zwangerschap (geboortegewicht: 3270 gram). Het kind was uitgesproken hypotoon en vertoonde ook dysmorphe kenmerken, wat ertoe leidde dat het kind op de zesde dag naar een ziekenhuis werd verwezen, waar een cranio-faciale dysmorfie (grote, open fontanellen, hoog voorhoofd, uitpuilende ogen, bilaterale epicanthus, laagstaande oren), neurologische afwijkingen (hypotonie, nauwelijks spontane bewegingen, afwezige Moro- en peesreflexen) en oogafwijkingen (cataract, nystagmus) werden vastgesteld. Daarnaast werden gestippelde calcificaties in de knieschijven en gehoorbeentjes gevonden. Een CT-scan liet wijde ventrikels zien alsook een corticale atrofie, links temporaal. Er waren veelvuldige epileptische insulten. Ook was er een progressieve hepatomegalie met afwijkende leverfuncties. Op de leeftijd van drie maanden is het patiëntje overleden, onder het beeld van een bilaterale bronchopneumonie en een ernstige gastro-intestinale bloeding. Bij autopsie werd een uitgesproken leverfibrose gevonden met intrahepatische cholestase als ook polycystische nieren.

Bespreking: Patiënte is een klassiek voorbeeld van het Zellweger-syndroom, waarbij de combinatie van neurologische afwijkingen en cranio-faciale dysmorfie meteen wees in die richting. Onderzoek van een bloedmonster bevestigde dat vermoeden met enerzijds afwijkende zeer-langketenvetzuren en galzuurintermediären, en anderzijds een deficiëntie van de erythrocytoplasmalogenen, wat tot de conclusie peroxisoombiogenesedefect leidde. Fibroblastenonderzoek

bevestigde dit. Er werd een volledig verlies van peroxisomale functies gevonden, met een deficiënte synthese van plasmalogenen, een deficiënte β -oxidatie van C26:0 en pristaanzuur en een deficiënte α -oxidatie van fytaanzuur. In overeenstemming hiermee werd een volledige afwezigheid van peroxisomen vastgesteld met behulp van catalase-immunofluorescentieonderzoek. Aan de andere kant werd met behulp van antilichamen gericht tegen een peroxisomaal membraaneiwit (ALDP) vastgesteld dat er wel sprake was van zogenaamde peroxisomale 'ghosts'. Aanvullende complementatie analyses hebben geleid tot identificatie van PEX1 als het defecte gen. Moleculair-biologisch onderzoek van het PEX1-gen leidde tot de identificatie van twee niet-identieke mutaties.

Patiënt 2: Een jongen, het derde kind van niet-consanguïene ouders, werd na een normale zwangerschap geboren. Zijn zus en broer waren gezond. Lichamelijk onderzoek bij de geboorte liet weinig opmerkelijks zien, met uitzondering van een viervingerlijn en een bilaterale paardenvoet. In de eerste maanden na de geboorte werd een progressieve hepatomegalie vastgesteld, terwijl er ook sprake was van een opmerkelijke groeiachterstand. In verband met tekenen van psychomotore retardatie en een verticale nystagmus werd de patiënt op de leeftijd van acht maanden in het ziekenhuis onderzocht, waarbij ook een abnormale retinale pigmentatie werd geconstateerd. Routine laboratoriumonderzoek liet geen afwijkingen zien, met uitzondering van licht verhoogde transaminasen. Hoewel zijn gehoor ogenschijnlijk goed was, werd toch op basis van de achterstand in neurologische ontwikkeling en de retinopathie peroxisomaalonderzoek ingezet. Analyse van de zeerlangketenvetzuren gaf aan dat het inderdaad om een peroxisomaal defect ging. Analyse van plasmalogenen liet aan de andere kant normale spiegels zien. Patiënt is op dit moment twaalf jaar oud en mentaal geretardeerd, maar heeft wel degelijk een zekere progressie in ontwikkeling doorgemaakt, zodanig dat er sprake is van enige visuele en auditieve perceptie. Daarnaast is het mogelijk met hem te communiceren en is er geen sprake van hypotonie.

Bespreking: De bevinding van verhoogde zeerlangketenvetzuren tezamen met normale erythrocytoplasmalogen leidde in eerste instantie tot de suggestie van een peroxisomaal β -oxidatiedefect. Daarmee in lijn werd een stapeling van galzuurintermediären gevonden. In het fibroblastenonderzoek werd echter toch een gegeneraliseerd verlies van peroxisomale functies gezien, met name een gestoorde *de novo* plasmalogeensynthese, vetzuur- β -oxidatie en fytaanzuur- α -oxidatie. Bij immunofluorescentiemicroscopisch onderzoek, gebruikmakend van antilichamen tegen catalase, werd een uitgesproken deficiënte van peroxisomen gevonden, hoewel die niet zo extreem was als in geval van patiënt 1. Inmiddels is duidelijk dat bij patiënten met een milder peroxisoombiogenesedefect, erythrocytoplasmalogenen volstrekt normaal kunnen zijn, wat in dit geval dus in eerste instantie tot de verkeerde conclusie heeft geleid.

Patiënt 3: In deze achtendertigjarige patiënt werd voor het eerst een slecht gezichtsvermogen vastgesteld op de leeftijd van zeven jaar. In de daarop volgende jaren is haar visus achteruitgegaan, waarbij met name de nachtelijke blindheid in de eerste jaren domineerde, later gevolgd door het ontwikkelen van een tunnelvisie. Op dertigjarige leeftijd werd er een progressief neurologische teruggang geconstateerd met een progressieve verlamming van met name de onderste extremiteiten. Op basis van de associatie afwijkend gezichtsvermogen en progressieve neurologische achteruitgang werd op deze leeftijd aan de diagnose 'Refsum disease' gedacht. Oogheelkundig onderzoek op de leeftijd van achtendertig jaar liet zien dat de patiënte praktisch blind was, met een uitgesproken en een uitgedoofd elektroretinogram (E.R.G.).

Bespreking: De combinatie tussen enerzijds verlies van gezichtsvermogen en anderzijds ontwikkeling van neurologische uitval, leidde pas op de leeftijd van dertig jaar tot de diagnose M. Refsum. Hiermee in overeenstemming werd een sterk verhoogd plasmafytaanzuur gevonden (780 $\mu\text{mol/l}$; ref. < 10 $\mu\text{mol/l}$). Fibroblastenonderzoek bevestigde de deficiënte fytaanzuur- α -oxidatie, welke bij nader enzymologisch onderzoek bleek te worden veroorzaakt door een sterk verlaagde fytanoyl-CoA-hydroxylaseactiviteit. Moleculair-biologisch onderzoek toonde dat de patiënt twee verschillende mutaties in het fytanoyl-CoA-hydroxylasegen had.

Patiënt 4: De beschreven jongen ontwikkelde zich normaal, totdat hij op zesjarige leeftijd doof werd, gevolgd door een daling van het gezichtsvermogen in het rechteroog. Op hetzelfde moment begon hij slingerend te fietsen en slordiger te schrijven. Naar aanleiding hiervan werd een CT-scan gemaakt van het ruggenmerg, waarop het beeld te zien was van mergverlies rondom de achterhoorns. Twee broers van de moeder hadden vanaf jongvolwassen leeftijd de ziekte van Addison. Bij opname van patiënt werd verlies van gezichtsvermogen in beide ogen geconstateerd. Beiderzijds werd bij funduscopie papilatrofie, auditieve agnosie (geen doofheid), spastische paraparese en ataxie gezien. Er was hyperpigmentatie zichtbaar op de strekzijde van de kniegewrichten en de handpalmen. Bij neurofysiologisch onderzoek werd naast een gemiddeld op de ondergrens liggende intelligentie, een groot aantal functiestoornissen ontdekt, waaronder een beperkt kortetermijngeheugen, zwak visueel geheugen en apraxie van de linkerarm / -hand. Bespreking: Bovengenoemde patiënt vertoont een klassiek beeld van X-gebonden adrenoleukodystrofie, waarbij er in de eerste fase van het leven geen enkele afwijking was, gevolgd door een plotselinge knik in de ontwikkelingscurve met gezichtsverlies, gehoorverlies en gedragsveranderingen. Zeerlangketenvetzuuranalyse in plasma liet sterk afwijkende waarden zien voor zowel C26:0 absoluut als C26:0/C22:0. Fibroblastenonderzoek liet een gestoorde peroxisomale β -oxidatie zien alsook stapeling van zeerlangketenvetzuren en een volledige afwezigheid van het ALD-eiwit bij immunofluorescentiemicroscopisch onderzoek. Moleculaire diagnostiek op het niveau

van *ABCD1*, het gen coderend voor het ALD-eiwit, liet een éénduidige mutatie zien die bij de moeder in heterozygote vorm werd aangetroffen.

Dankzegging

De auteurs danken mevrouw S.M. Gersen-van Zadel voor het gereedmaken van het manuscript en de heer J.P.N. Ruiter voor het maken van de figuren. Het werk in het laboratorium van de auteurs werd financieel ondersteund door het Prinses Beatrix Fonds, NWO projectnummer 901-03-159 en nummer 901-03-133 en de Europese Unie, projectnummer QLGI-CT-2001-1277 en nummer QIG3-CT-2002-00696.

Literatuur

- Gould SJ, Valle D. Peroxisome biogenesis disorders: genetics and cell biology. *Trends Genet* 2000; 16: 340-345.
- Wanders RJA, Jakobs C, Skjeldal OH. Refsum Disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill, 2001; 3303-3321.
- Krisans SK. Cell compartmentalisation of cholesterol biosynthesis. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 804: 142-164.
- Wanders RJA, Romeyn GJ, Schutgens RBH, Tager JM. L-pipecolate oxidase: a distinct peroxisomal enzyme in man. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 164: 550-555.
- Mihalik SJ, Moser HW, Watkins PA, Danks DM, Poulos A, Rhead WJ. Peroxisomal L-pipecolic acid oxidation is deficient in liver from Zellweger syndrome patients. *Pediatr Res* 1989; 25: 548-552.
- Bowen P, Lee CSM, Zellweger H, Lindenberg R. A familial syndrome of multiple congenital defects. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1964; 114: 402-414.
- Heymans HSA. Clinical and biochemical consequences of peroxisomal dysfunction. University of Amsterdam, 1984.
- Wanders RJA, Heymans HSA, Schutgens RBH, Barth PG, van den Bosch H, Tager JM. Peroxisomal disorders in neurology. *J Neurol Sci* 1988; 88: 1-39.
- Wilson GN, Holmes RD, Custer J, Lipowitz JL, Stover J, Datta N et al. Zellweger syndrome: diagnostic assays, syndrome delineation and potential therapy. *Am J Med Genet* 1986; 24: 69-82.
- Ulrich J, Herschkowitz N, Heitz P, Sigrist T, Baerlocher P. Adrenoleukodystrophy: Preliminary report of a connatal case. Light and electron microscopical, immunohistochemical and biochemical findings. *Acta Neuropathol* 1978; 43: 77-83.
- Scotto JM, Hadchouel M, Odievre M, Laudat MH, Saudubray JM, Dulac O et al. Infantile phytanic acid storage disease, a possible variant of Refsum's disease: three cases, including Ultrastructural studies of the liver. *J Inherit Metab Dis* 1982; 5: 83-90.
- Poll-The BT, Saudubray JM, Ogier HA, Odievre M, Scotto JM, Monnens L et al. Infantile Refsum disease: an inherited peroxisomal disorder. Comparison with Zellweger syndrome and neonatal adrenoleukodystrophy. *Eur J Pediatr* 1987; 146: 477-483.
- Gatfield PD, Toller E, Hinton GG, Wallace AC, Abdelnour GM, Haust MD. Hyperpipecolatemia: A new metabolic disorder associated with neuropathy and hepatomegaly: A case study. *Can Med Assoc J* 1968; 99: 1215-1233.
- Burton BK, Reed SP, Remy WT. Hyperpipecolic acidemia: clinical and biochemical observations in two male siblings. *J Pediatr* 1981; 99: 729-734.
- Thomas GH, Haslam RH, Batshaw ML, Capute AJ, Neidengard L, Ransom JL. Hyperpipecolic acidemia associated with hepatomegaly, mental retardation, optic nerve dysplasia and progressive neurological disease. *Clin Genet* 1975; 8: 376-382.
- Lee TC. Biosynthesis and possible biological functions of plasmalogens. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1394: 129-145.
- Roesel RA, Carroll JE, Rizzo WB, van der Zalm T, Hahn DA. Dyggve-Melchior-Clausen syndrome with increased pipecolic acid in plasma and urine. *J Inherit Metab Dis* 1991; 14: 876-880.
- Vallat C, Denis S, Bellet H, Jakobs C, Wanders RJA, Mion H. Major hyperpipecolatemia in a normal adult. *J Inherit Metab Dis* 1996; 19: 624-626.
- IJlst L, de Kromme I, Oostheim W, Wanders RJA. Molecular cloning and expression of human L-pipecolate oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 270: 1101-1105.
- Kerckaert I, Poll-The BT, Espeel M, Duran M, Roeleveld AB, Wanders RJA et al. Hepatic peroxisomes in isolated hyperpipecolic acidemia: evidence supporting its classification as a single peroxisomal enzyme deficiency. *Virchows Arch* 2000; 436: 459-465.
- Lazarow PB, Moser HW. Disorders of peroxisome biogenesis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, 1995; 2287-2324.
- Wanders RJA, Purvis YR, Heymans HSA, Bakkeren JA, Parmentier GG, Van Eldere J et al. Age-related differences in plasmalogen content of erythrocytes from patients with the cerebro-hepato-renal (Zellweger) syndrome: implications for postnatal detection of the disease. *J Inherit Metab Dis* 1986; 9: 335-342.
- Brul S, Westerveld A, Strijland A, Wanders RJA, Schram AW, Heymans HSA et al. Genetic heterogeneity in the cerebrohepatorenal (Zellweger) syndrome and other inherited disorders with a generalized impairment of peroxisomal functions. A study using complementation analysis. *J Clin Invest* 1988; 81: 1710-1715.
- Roscher AA, Hoefler S, Hoefler G, Paschke E, Paltauf F, Moser A et al. Genetic and phenotypic heterogeneity in disorders of peroxisome biogenesis--a complementation study involving cell lines from 19 patients. *Pediatr Res* 1989; 26: 67-72.
- Yajima S, Suzuki Y, Shimozaawa N, Yamaguchi S, Orii T, Fujiki Y et al. Complementation study of peroxisome-deficient disorders by immunofluorescence staining and characterization of fused cells. *Hum Genet* 1992; 88: 491-499.
- Reuber BE, Germain-Lee E, Collins CS, Morrell JC, Ameritunga R, Moser et al. Mutations in *PEX1* are the most common cause of peroxisome biogenesis disorders. *Nat Genet* 1997; 17: 445-448.
- Maxwell MA, Nelson PV, Chin SJ, Paton BC, Carey WF, Crane DI. A common *PEX1* frameshift mutation in patients with disorders of peroxisome biogenesis correlates with the severe Zellweger syndrome phenotype. *Hum Genet* 1999; 105: 38-44.
- Heymans HSA, Oorthuys JW, Nelck G, Wanders RJA, Schutgens RBH. Rhizomelic chondrodysplasia punctata: another peroxisomal disorder. *N Engl J Med* 1985; 313: 187-188.
- Braverman N, Chen L, Lin P, Obie C, Steel G, Douglas P et al. Mutation analysis of *PEX7* in 60 probands with rhizomelic chondrodysplasia punctata and functional correlations of genotype with phenotype. *Hum Mutat* 2002; 20: 284-297.
- Motley AM, Brites P, Gerez L, Hogenhout EM, Haasjes J, Benne R et al. Mutational spectrum in the *PEX7* gene and functional analysis of mutant alleles in 78 patients with rhizomelic chondrodysplasia punctata type 1. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 612-624.
- Beznan L, Moser AB, Raymond GV, Rinaldo P, Watkins PA, Smith KD et al. Adrenoleukodystrophy: incidence, new mutation rate, and results of extended family screening. *Ann Neurol* 2001; 49: 512-517.
- Kemp S, Pujol A, Waterham HR, van Geel BM, Boehm CD, Raymond GV et al. *ABCD1* mutations and the X-linked adrenoleukodystrophy mutation database: role in diagnosis and clinical correlations. *Hum Mutat* 2001; 18: 499-515.

33. Moser HW, Loes DJ, Melhem ER, Raymond GV, Bezman L, Cox CS et al. X-Linked adrenoleukodystrophy: overview and prognosis as a function of age and brain magnetic resonance imaging abnormality. A study involving 372 patients. *Neuropediatrics* 2000; 31: 227-239.
34. Moser AB, Kreiter N, Bezman L, Lu S, Raymond GV, Naidu S et al. Plasma very long chain fatty acids in 3,000 peroxisome disease patients and 29,000 controls. *Ann Neurol* 1999; 45: 100-110.
35. Mosser J, Douar AM, Sarde CO, Kioschis P, Feil R, Moser H et al. Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* 1993; 361: 726-730.
36. Poll-The BT, Roels F, Ogier H, Scotto J, Vamecq J, Schutgens RBH et al. A new peroxisomal disorder with enlarged peroxisomes and a specific deficiency of acyl-CoA oxidase (pseudo-neonatal adrenoleukodystrophy). *Am J Hum Genet* 1988; 42: 422-434.
37. Kelley RI, Datta NS, Dobyns WB, Hajra AK, Moser AB, Noetzel MJ et al. Neonatal adrenoleukodystrophy: new cases, biochemical studies, and differentiation from Zellweger and related peroxisomal polydystrophy syndromes. *Am J Med Genet* 1986; 23: 869-901.
38. Aubourg P, Scotto J, Rocchiccioli F, Feldmann-Pautrat D, Robain O. Neonatal Adrenoleukodystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1986; 49: 77-86.
39. Wanders RJA, Schelen A, Feller N, Schutgens RBH, Stellaard F, Jakobs C et al. First prenatal diagnosis of acyl-CoA oxidase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 1990; 13: 371-374.
40. Suzuki Y, Shimozawa N, Yajima S, Tomatsu S, Kondo N, Nakada Y et al. Novel subtype of peroxisomal acyl-CoA oxidase deficiency and bifunctional enzyme deficiency with detectable enzyme protein: identification by means of complementation analysis. *Am J Hum Genet* 1994; 54: 36-43.
41. Watkins PA, McGuinness MC, Raymond GV, Hicks BA, Sisk JM, Moser AB et al. Distinction between peroxisomal bifunctional enzyme and acyl-CoA oxidase deficiencies. *Ann Neurol* 1995; 38: 472-477.
42. Fournier B, Saudubray JM, Benichou B, Lyonnet S, Munnich A, Clevers H et al. Large deletion of the peroxisomal acyl-CoA oxidase gene in pseudoneonatal adrenoleukodystrophy. *J Clin Invest* 1994; 94: 526-531.
43. Watkins PA, Chen WW, Harris CJ, Hoefler G, Hoefler S, Blake DC jr. et al. Peroxisomal bifunctional enzyme deficiency. *J Clin Invest* 1989; 83: 771-777.
44. Wanders RJA, Barth PG, Heymans HSA. Single Peroxisomal Enzyme Deficiencies. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill, 2001; 3219-3256.
45. Grunsven EG van, van Berkel E, Mooijer PAW, Watkins PA, Moser HW, Suzuki Y et al. Peroxisomal Bifunctional Protein Deficiency Revisited: Resolution of Its True Enzymatic and Molecular Basis. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 99-107.
46. Kemp S, Mooijer PAW, Bolhuis PA, van Geel BM, Mandel JL, Barth PG et al. ALDP expression in fibroblasts of patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *J Inherit Metab Dis* 1996; 19: 667-674.
47. Grunsven EG van, van Berkel E, IJlst L, Vreken P, de Klerk JB, Adamski J et al. Peroxisomal D-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: resolution of the enzyme defect and its molecular basis in bifunctional protein deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 2128-2133.
48. Goldfischer S, Collins J, Rapin I, Neumann P, Neglia W, Spiro AJ et al. Pseudo-Zellweger syndrome: deficiencies in several peroxisomal oxidative activities. *J Pediatr* 1986; 108: 25-32.
49. Schram AW, Goldfischer S, van Roermund CWT, Brouwer-Kelder EM, Collins J, Hashimoto T et al. Human peroxisomal 3-oxoacyl-coenzyme A thiolase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 2494-2496.
50. Ferdinandusse S, van Grunsven EG, Oostheim W, Denis SW, Hogenhout EM, IJlst L et al. Reinvestigation of Peroxisomal 3-Ketoacyl-CoA Thiolase Deficiency: Identification of the True Defect at the Level of D-Bifunctional Protein. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 1589-1593.
51. Ferdinandusse S, Denis SW, Clayton PT, Graham A, Rees JE, Allen JT et al. Mutations in the gene encoding peroxisomal alpha-methylacyl-CoA racemase cause adult-onset sensory motor neuropathy. *Nat Genet* 2000; 24: 188-191.
52. Wanders RJA, Jansen GA, Skjeldal OH. Refsum disease, peroxisomes and phytanic acid oxidation: a review. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; 60: 1021-1031.
53. Jansen GA, Hogenhout EM, Ferdinandusse S, Waterham HR, Ofman R, Jakobs C et al. Human phytanoyl-CoA hydroxylase: resolution of the gene structure and the molecular basis of Refsum's disease. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 1195-1200.
54. Brink DM van den, Brites P, Haasjes J, Wierzbicki AS, Mitchell J, Lambert-Hamill M et al. Identification of PEX7 as the Second Gene Involved in Refsum Disease. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 471-477.
55. Wanders RJA, Schumacher H, Heikoop J, Schutgens RBH, Tager JM. Human dihydroxyacetonephosphate acyltransferase deficiency: a new peroxisomal disorder. *J Inherit Metab Dis* 1992; 15: 389-391.
56. Barr DG, Kirk JM, al Howasi M, Wanders RJA, Schutgens RBH. Rhizomelic chondrodysplasia punctata with isolated DHAP-AT deficiency. *Arch Dis Child* 1993; 68: 415-417.
57. Clayton PT, Eckhardt S, Wilson J, Hall CM, Yousuf Y, Wanders RJA et al. Isolated dihydroxyacetonephosphate acyltransferase deficiency presenting with developmental delay. *J Inherit Metab Dis* 1994; 17: 533-540.
58. Sztriha LS, Nork MP, Abdulrazzaq YM, al-Gazali LI, Bakalinova DB. Abnormal myelination in peroxisomal isolated dihydroxyacetonephosphate acyltransferase deficiency. *Pediatr Neurol* 1997; 16: 232-236.
59. Moser AB, Rasmussen M, Naidu S, Watkins PA, McGuinness M, Hajra AK et al. Phenotype of patients with peroxisomal disorders subdivided into sixteen complementation groups. *J Pediatr* 1995; 127: 13-22.
60. Elias ER, Mobassaleh M, Hajra AK, Moser AB. Developmental delay and growth failure caused by a peroxisomal disorder, dihydroxyacetonephosphate acyltransferase (DHAP-AT) deficiency. *Am J Med Genet* 1998; 80: 223-226.
61. Thai TP, Heid H, Rackwitz HR, Hunziker A, Gorgas K, Just WW. Ether lipid biosynthesis-isolation and molecular characterization of human dihydroxyacetonephosphate acyltransferase. *FEBS Lett* 1997; 420: 205-211.
62. Ofman R, Hettema EH, Hogenhout EM, Caruso U, Muijsers AO, Wanders RJA. Acyl-CoA-dihydroxyacetonephosphate acyltransferase - cloning of the human cDNA and resolution of the molecular basis in rhizomelic chondrodysplasia punctata type 2. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 847-853.
63. Wanders RJA, Dekker CJM, Horvath VA, Schutgens RBH, Tager JM, Van Laer P et al. Human alkyl-dihydroxyacetonephosphate synthase deficiency: a new peroxisomal disorder. *J Inherit Metab Dis* 1994; 17: 315-318.
64. Vet EC de, IJlst L, Oostheim W, Dekker CJM, Moser HW, van den Bosch H et al. Ether lipid biosynthesis. Alkyl-dihydroxyacetonephosphate synthase protein deficiency leads to reduced dihydroxyacetonephosphate acyltransferase activities. *J Lipid Res* 1999; 40: 1998-2003.
65. Danpure CJ, Purdue PE. Primary hyperoxaluria. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. McGraw-Hill, 1995; 2385-2426.
66. Purdue PE, Lumb MJ, Fox M, Griffio G, Hamon-Benais C, Povey S et al. Characterization and chromosomal mapping of a genomic clone encoding human alanine:glyoxylate aminotransferase. *Genomics* 1991; 10: 34-42.

67. Danpure CJ, Purdue PE, Fryer P, Griffiths S, Allsop J, Lumb MJ et al. Enzymological and mutational analysis of a complex primary hyperoxaluria type 1 phenotype involving alanine:glyoxylate aminotransferase peroxisome-to-mitochondrion mistargeting and intraperoxisomal aggregation. *Am J Hum Genet* 1993; 53: 417-432.
68. Bennett MJ, Pollitt RJ, Goodman SI, Hale DE, Vamecq J. Atypical riboflavin-responsive glutaric aciduria, and deficient peroxisomal glutaryl-CoA oxidase activity: a new peroxisomal disorder. *J Inherit Metab Dis* 1991; 14: 165-173.
69. Drenth JP, Cuisset L, Grateau G, Vasseur C, van de Velde-Visser SD, de Jong JG et al. Mutations in the gene encoding mevalonate kinase cause hyper-IgD and periodic fever syndrome. International Hyper-IgD Study Group. *Nat Genet* 1999; 22: 178-181.
70. Houten SM, Kuis W, Duran M, de Koning TJ, van Royen-Kerkhof A, Romeijn GJ et al. Mutations in MVK, encoding mevalonate kinase, cause hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome. *Nat Genet* 1999; 22: 175-177.
71. Waterham HR. Inherited disorders of cholesterol biosynthesis. *Clin Genet* 2002; 61: 393-403.
72. Eaton JW, Mouchou MA. Acatlasemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. McGraw-Hill, 1995; 2371-2383.
73. Avela K, Lipsanen-Nyman M, Idanheimo N, Seemanova E, Rosengren S, Makela TP et al. Gene encoding a new RING-B-box-Coiled-coil protein is mutated in mulibrey nanism. *Nat Genet* 2000; 25: 298-301.
74. Kallijarvi J, Avela K, Lipsanen-Nyman M, Ulmanen I, Lehesjoki AE. The TRIM37 gene encodes a peroxisomal RING-B-box-coiled-coil protein: classification of mulibrey nanism as a new peroxisomal disorder. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 1215-1228.
75. Wanders RJA, Barth PG, Schutgens RBH, Heijmans HSA. Peroxisomal disorders: Post- and prenatal diagnosis based on a new classification with flowcharts. *Int Pediatr* 1996; 11: 203-214.
76. Smeitink JA, Beemer FA, Espeel M, Donckerwolcke RA, Jakobs C, Wanders RJA et al. Bone dysplasia associated with phytanic acid accumulation and deficient plasmalogen synthesis: a peroxisomal entity amenable to plasmapheresis. *J Inherit Metab Dis* 1992; 15: 377-380.
77. Braverman N, Steel G, Obie C, Moser AB, Moser HW, Gould SJ et al. Human PEX7 encodes the peroxisomal PTS2 receptor and is responsible for rhizomelic chondrodysplasia punctata. *Nat Genet* 1997; 15: 369-376.
78. Motley AM, Hetteema EH, Hogenhout EM, Brites P, ten Asbroek AL, Wijburg FA et al. Rhizomelic chondrodysplasia punctata is a peroxisomal protein targeting disease caused by a non-functional PTS2 receptor. *Nat Genet* 1997; 15: 377-380.
79. Purdue PE, Zhang JW, Skoneczny M, Lazarow PB. Rhizomelic chondrodysplasia punctata is caused by deficiency of human PEX7, a homologue of the yeast PTS2 receptor. *Nat Genet* 1997; 15: 381-384.
80. Houten SM, Romeijn GJ, Koster J, Gray RGF, Darbyshire P, Smit GPA et al. Identification and characterization of three novel missense mutations in mevalonate kinase cDNA causing mevalonic aciduria, a disorder of isoprene biosynthesis. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1523-1528.
81. Grunsven EG van, Mooijer PAW, Aubourg P, Wanders RJA. Enoyl-CoA hydratase deficiency: identification of a new type of D-bifunctional protein deficiency. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1509-1516.

Summary

Peroxisomal diseases: metabolic and molecular basis and laboratory diagnosis. Wanders RJA, Duran M, Poll-The BT, Waterham HR. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2004; 29: 2-23

Peroxisomal disorders are relative newcomers in the area of inborn errors of metabolism. In recent years much has been learned about these disorders as a consequence of the increased knowledge about the functions and biogenesis of peroxisomes in humans. This has led to the identification of the metabolic and molecular basis of a range of peroxisomal disorders as discussed in this review article.

Keywords: peroxisomes; genetic diseases; phospholipids; fatty acids; Zellweger syndrome