

Stoornissen in de oxidatieve fosforylering: kliniek, biochemie en moleculaire biologie

T R E F W O O R D E N

ELECTRONENTRANSPORTKETEN, COMPLEX I, LEIGH SYNDROOM, MITOCHONDRIEEL DNA, NUCLEAIR DNA, MUTATIE-ANALYSE, DIAGNOSTIEK.

door J.A.M. Smeitink, L.P. van den Heuvel, J.M.F. Trijbels, E.C.M. Mariman, H.J. ter Laak, B.G.M. van Engelen en R.C.A. Sengers

Samenvatting

Een belangrijke functie van mitochondriën is de oxydatieve fosforylering (OXFOS). Hieronder wordt verstaan de oxidatie van brandstoffen en de productie van energie in de vorm van adenosine-trifosfaat (ATP). Stoornissen in de oxidatieve fosforylering geven aanleiding tot een groep van ziekten welke bekend staan als mitochondriële ziekten. De meeste patiënten ontwikkelen symptomen op de vroege kinderleeftijd, zoals met name spierzwakte, een beperkt uithoudingsvermogen en retardatie. De lactaatconcentratie in lichaamsvloeistoffen is zeker niet altijd verhoogd. Histopathologisch en met name biochemisch onderzoek van de spier en fibroblasten vormen een essentieel onderdeel van het diagnostisch proces. Moleculair biologisch onderzoek van deze groep van ziekten heeft in de afgelopen jaren belangrijke nieuwe inzichten opgeleverd. In dit artikel worden de klinische symptomen, de initiële diagnostiek, het spieronderzoek, de moleculaire biologie en de genetische classificatie van OXFOS-defecten beschreven. De nadruk ligt hierbij op OXFOS-defecten met eerste presentatie op de kinderleeftijd. (*Ned Tijdschr Neurol 2000;2:75-83*)

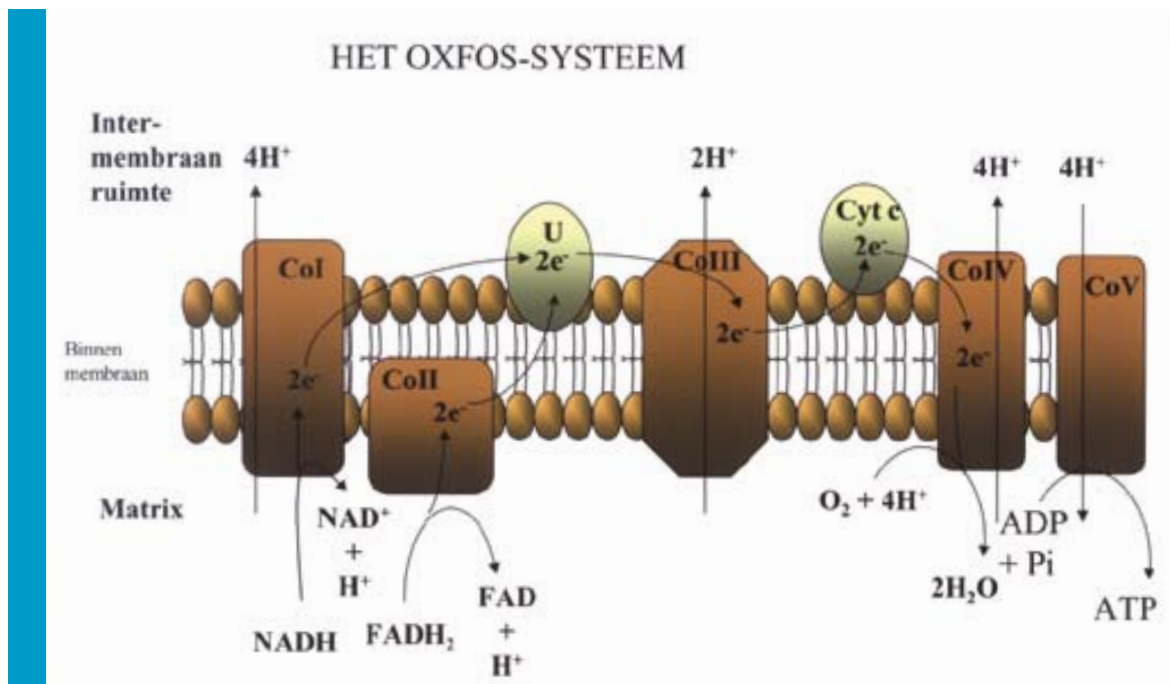
Inleiding

Mitochondriën zijn subcellulaire organellen die voorkomen in alle kernhoudende cellen. Ze be-

staan uit een glad buitenmembraan, een intermembraanruimte, een geplooid binnenmembraan en een matrix. Het buitenmembraan heeft poriën waardoor kleine moleculen vrij kunnen diffunderen. Het binnenmembraan is ondoorlaatbaar voor de meeste moleculen, maar bezit translocatoren voor transport van onder andere ionen en eiwitten. Tevens bevat dit membraan de vijf multi-eiwit enzym complexen die tezamen met de electronencarriers, Co-enzym Q en cytochroom c, het OXFOS-systeem vormen (zie *Figuur 1 op pagina 76*).

Het OXFOS-systeem

De electronentransportketen (complex I – IV, Co-enzym Q en cytochroom c) en het ATP-synthase (complex V), vormen gezamenlijk het OXFOS-systeem (*Figuur 1*). Het via de citroenzuurcyclus en andere metabole routes (zoals de β -oxidatie van Knoop) gevormde NADH en FADH₂ worden gedehydrogeneerd via respectievelijk complex I en II van de electronentransportketen tot NAD⁺ en FAD. De hierbij vrijkomende electronen worden via de diverse electronentransportketen complexen en de beide electronencarriers getransporteerd en reduceren uiteindelijk zuurstof tot water. Dit electronentransport bevordert tevens de uitstoot van protonen uit de matrix door het binnenmembraan naar de intermembraanruimte. Deze protonen keren terug door middel van complex V, bestaande uit een protonenkanaal en het ATP-synthase, het enzym dat de synthese van ATP uit adenosine-difosfaat (ADP) en anorganisch fosfaat (Pi) katalyseert. Een gedeelte van het ATP wordt in de matrix gebruikt voor energie vereisende processen.¹ Het grootste deel wordt geëxporteerd naar het cytoplasma. De bij de omzetting van het ATP vrijkomende energie is nodig voor de vele cellulaire processen, zoals spiercontractie via de actine-myosine interactie.² De subunits van de complexen van het OXFOS-systeem worden, met uitzondering van complex II (volledig kern DNA), gecodeerd door zowel mitochondriële DNA (mtDNA)-als kern DNA (nDNA)-genen.



Figuur 1. Schematische weergave van de mitochondriële binnenmembraan met het OXFOS-systeem. De bij de dehydrogenering van NADH en FADH₂ vrijkomende elektronen worden via de vier complexen van de elektronentransport keten (CoI tot en met CoIV) getransporteerd, waarbij uiteindelijk vanuit zuurstof water wordt gevormd. Het electronentransport zorgt voor een protonengradiënt (export) over de mitochondriële binnenmembraan van de mitochondriële matrix naar de intermembraan ruimte. De import van deze protonen via complex V (CoV) levert de energie voor de vorming van ATP uit ADP en anorganisch fosfaat. De enzymactiviteiten van de verschillende complexen kunnen separaat in o.a. skeletspier onderzocht worden. U: ubiquinon (coenzym Q); Cyt c: cytochroom c; e: electron.

Mitochondrieel DNA en het OXFOS-systeem

MtDNA, een cirkelvormig chromosoom met een grootte van 16.659 base-paren bevat 13 genen welke coderen voor net zoveel eiwitten van het OXFOS-systeem (zeven subunits voor complex I, 1 subunit voor complex III, 3 subunits voor complex IV en 2 subunits voor complex V). Het bestaat verder uit 2 ribosomale RNAs (12 en 16 S rRNA) en 22 transfer RNAs (tRNAs). Ieder mitochondrion bevat 2-10 kopieën van het mtDNA. Slechts bij uitzondering zijn mtDNA mutaties homoplasatisch (100% mutant mtDNA), zoals bij de Leber's Hereditaire Opticus Neuropathie (LHON). Meestal is er nog een hoeveelheid normaal ('wild-type') mtDNA aanwezig in de mitochondriën. De verhouding tussen dit wild-type en het mutante type mtDNA ('heteroplasmie') bepaalt of de cel (weefsel/orgaan) hiervan hinder ondervindt (drempelwaarde). Mitochondrieel DNA wordt exclusief via de eicel doorgegeven bij de conceptie. Men spreekt van maternale erfing omdat de fout wordt overgedragen

van de moeder op ieder kind. Dit betekent overigens niet dat iedere mtDNA mutatie ook per definitie maternaal overerft. Zo is bijvoorbeeld de erfing van multipale mtDNA deleties, bij een bepaalde vorm van externe ophthalmoplegie, autosomaal dominant. De verantwoordelijke fout ligt op een nog niet nader gekarakteriseerd nucleair gen wat verantwoordelijk is voor het ontstaan van de multipale mtDNA deleties. In dit kader spreekt men van een fout op het nivo van de nucleo-mitochondriële communicatie (zie ook *Tabel 1 en 3, op pagina 78, resp. 81*).⁴

Kern DNA en het OXFOS-systeem

Tot nu toe zijn ongeveer 70 nucleaire genen bekend, welke direct coderen voor structurele eiwitten van het OXFOS-systeem.^{1,5} De meeste van deze 70 genen coderen de vorming van de 36 kerngecodeerde subunits van de Goliath van de elektronentransportketen, het complex I. Dit complex bestaat uit 43 sub-

units, 7 gecodeerd door het mtDNA, de rest vanuit het kern DNA. Complex II bestaat uit 4 subunits welke volledig door het nDNA worden gecodeerd. Complex III bestaat uit 10, complex IV uit 10 en complex V uit 12 nDNA gecodeerde subunits. Deze genen zijn 'at random' verdeeld over de chromosomen.

Genetische classificatie van OXFOS-defecten

De tot nu toe veelgebruikte classificaties van OXFOS-defecten, klinisch, morfologisch of biochemisch, worden meer en meer verlaten en vervangen door een genetische classificatie (*Tabel 1*).⁶

Klinische presentatie van OXFOS-defecten

Algemeen

De leeftijd waarop de eerste symptomen van OXFOS-defecten duidelijk worden is zeer uiteenlopend en het beloop van deze aandoeningen varieert buitengewoon. Dit wordt ten dele verklaard door de verschillen in de genetische oorzaak. Daar mitochondriën in alle kernhoudende cellen voorkomen kan in principe ieder weefsel of orgaan zijn aangedaan. De meest frequent aangedane weefsels en organen zijn die, welke een hoge energie-behoefte hebben, zoals hersenen, hartspier en skeletspier. Vandaar dat deze groep van ziekten in het verleden ook wel als mitochondriële encephalomyopathieën omschreven werden. Meer en meer wordt duidelijk dat deze omschrijving te beperkt is, daar in principe alle organen en weefsels kunnen zijn aangedaan (*Tabel 2, op pagina 80*).⁷ Vandaar dat hier de voorkeur gegeven wordt aan de omschrijving OXFOS-defecten. De meeste patiënten vertonen de eerste symptomen op de vroege kinderleeftijd (< 2 jaar). Het beloop is over het algemeen progressief en fataal. Deze bijdrage beperkt zich met name tot de vroege presentaties van OXFOS-defecten waarvan globaal de volgende fenotypen onderscheiden kunnen worden⁸:

1. Leigh en Leigh-like syndroom
2. Fatale infantiele lactaatacidose
3. Neonatale cardiomyopathie met lactaatacidose
4. Macrocephalie met leukodystrofie
5. Niet nader gespecificeerde encephalomyopathie

Van deze groep komen het Leigh en Leigh-like syndroom (idem aan Leigh, doch niet neuropathologisch bewezen) het meest frequent voor (50% van het totaal). Aan de hand van dit in 1951 door

Leigh beschreven syndroom⁹ wordt, ter illustratie, nader ingegaan op de klinisch chemische, morfologische, biochemische en moleculair biologische diagnostiek van OXFOS-defecten. Er zijn wetenschappelijk sterke aanwijzingen dat bij de meerderheid van deze patiënten het genetisch defect in één van de kerngenen gelokaliseerd is. Defecten in het mitochondrieel DNA presenteren zich over het algemeen op latere leeftijd (> 10 jaar).

Uitzonderingen op deze regel zijn echter beschreven in de literatuur. MtDNA defecten hebben over het algemeen een klinisch goed herkenbaar fenotype. De meest frequent voorkomende, klinische presentaties zijn: Mitochondriële Encephalopathie met Lactaatacidose en Stroke-like episoden (MELAS); Myoclonie Epilepsie en 'Ragged Red Fibers' (MERRF); Neuroopathie, Ataxie en Retinitis Pigmentosa (NARP) syndromen; het Kearns Sayre Syndroom (KSS) en de Chronische Progressieve Externe Ophthalmoplegie (CPEO), een in vergelijking met het KSS minder precies omschreven syndroom, dat evenwel vele kenmerken van KSS, zij het op latere leeftijd (> 15 jaar), kan vertonen (*Tabel 3, op pagina 81*).

Het Leigh syndroom

Het Leigh syndroom (subacute, necrotiserende encefalomyelopathie) is een progressieve, subcorticale aandoening met stoornissen van diencefale, mesencefale en hersenstamfuncties.¹⁰ De eerste symptomen zijn meestal vóór het tweede levensjaar aanwezig. Leigh syndroom patiënten overlijden meestal binnen enkele jaren na het debuut van de ziekte. Het beloop wordt veelal gekenmerkt door partiële remissies en exacerbaties. Deze laatste worden vaak uitgelokt door virale infecties. De symptomatologie is zeer gevarieerd doch hersenzenuw-uitval (vooral opticusatrofie en oogspierparesen), spierhypotonie en ataxie staan op de voorgrond. Epilepsie daarentegen is zeldzaam. Opvallend is voorts de frequente aandoening van het neuromusculaire systeem. Polyneuropathie en myopathie zijn vaak aanwezig. Juist deze aantasting van het neuromusculaire systeem geeft een goed houvast bij onderscheid van een encephalitis door infectieuze oorzaken.¹¹ Cerebrale beeldvorming vertoont veelal karakteristieke symmetrische laesies in de thalami, basale ganglia (meestal putamina), het visuele systeem, de substantia nigra en de hersenstam. Histopathologisch is er sprake van een spongiforme necrose met gliosis en vasculaire proliferatie. De neuronen blijven relatief gespaard in de necro-

Tabel 1. Oxidatieve fosforyleringsstoornissen.

I. Mitochondriële DNA defecten

a. Rearrangements (deleties en duplicaties; meer dan 100 geïdentificeerd)

- Chronische progressieve externe ophthalmoplegie (CPEO)
- Kearns-Sayre syndroom
- Diabetes en doofheid
- Pearson syndroom

b. Puntmutaties (meer dan 50 geïdentificeerd)

Structurele OXFOS gen defecten

- Leber's hereditaire opticus neuropathie (G11778A, T14484C, G3460A)
- Leber's hereditaire opticus neuropathie/dystonie (G14459A, T14569A)
- Neurogene zwakte, ataxie en retinitis pigmentosa (T8993G/C) (NARP)
- Leigh syndroom (T8993G/C)

tRNA genen

- Mitochondriële encephalopathie met lactaat acidose en stroke-like episoden (A3243G, T3271C, A3251G) (MELAS)
- Myoclonie epilepsie met ragged-red vezels (A8344G, T8356C) (MERRF)
- CPEO (A3243G, T4274C)
- Myopathie (T14709C, A12320G)
- Cardiomyopathie (A3243G, A4269G)
- Diabetes en doofheid (A3243G, C12258A)
- Encephalomyopathie (G1606A, T10010C)
- Leigh syndroom (G1644T)

rRNA genen

- Niet-syndromale sensorineurale doofheid (A7445G)
- Aminoglycoside geïnduceerde niet-syndromale doofheid (A1555G; deltaT961Cn)

II. Nucleaire DNA defecten

a. Structurele OXFOS gen defecten

- Complex I deficiënties (Leigh en Leigh-like syndroom mutaties in NDUFS4, -7 en -8 gen; Macrocephalie, Leucodystrofie en Myoclonie Epilepsie, mutaties in NDUFV1 gen)
- Complex II deficiënties (Leigh en Leigh-like syndroom, mutaties in Fp gen)

b. Niet-structurele OXFOS gen defecten

1. Import defecten

- Dystonia Deafness Protein syndroom (mutaties in DDP gen)

2. Assemblage defecten

- Complex IV deficiënties (Leigh syndroom, mutaties in SURF gen; cardioencephalomyopathie; mutaties in SCO2 gen; Leigh en De Toni-Fanconi-Debre syndroom mutaties in COX10 gen)
- Gecombineerde deficiënties (hsp60)

c. Nucleaire DNA – mtDNA communicatie defecten (multipole deletie-defecten)

- Autosomaal dominante, externe ophthalmoplegie (chromosoom 10q23.3-q24.3; 3p14.1-21.2)
- Mitochondriële, neuro-gastrointestinale, encephalomyopathie (thymine phosphorylase deficiency);
- Mutaties in het thymidine phosphorylase gen op chromosoom 22q13.32-qter

tische gebieden. Myeline afbraak hierin is vrijwel altijd aanwezig. De oorzaak van het Leigh syndroom blijkt in die gevallen waar deze is opgehelderd, altijd een stoornis in de mitochondriële energieproductie te zijn (pyruvaat dehydrogenase complex deficiëntie of OXFOS-defecten). Zowel mutaties in het mtDNA als in het nDNA zijn beschreven.^{12,13}

Initieel onderzoek bij patiënten verdacht van een OXFOS-defect

Defecten van de OXFOS geven klinisch-chemisch vaak aanleiding tot verhoogde melkzuur (lactaat) concentraties in lichaamsvloeistoffen. Bij verdenking op een OXFOS-defect dient dan ook altijd de lactaat concentratie bepaald te worden. Omgekeerd dient bij een verhoogde lactaatconcentratie gedacht te worden aan een OXFOS-defect. Resultaten verkregen uit metabool onderzoek van organische zuren (urine portie verzameld tussen 8 uur 's ochtends en 17 uur 's middags) en aminozuren in serum, liquor en urine kunnen de waarschijnlijkheidsdiagnose ondersteunen.¹⁴ Indien bij (sterke) klinische verdenking, met klinisch-chemisch en oriënterend metabool onderzoek geen afwijkingen worden gevonden, is de volgende diagnostische stap een glucose tolerantietest. Recent konden wij bij volwassenen met een CPEO, met behulp van NIRS (Near-InfraRed Spectroscopie) van de onderarm een significant verminderde zuurstof consumptie in rust en bij inspanning vaststellen.¹⁵ Deze kwantitatieve, non-invasieve, in-vivo test kan in de toekomst als screeningstest bij verdenking op OXFOS-defecten een rol gaan spelen.

MRS (proton spectroscopie) onderzoek van de hersenen is een non-invasieve methode voor het aantonen van lactaatconcentratie verhogingen in bepaalde hersencompartimenten. Alhoewel bovenstaande onderzoeken veelal afwijkend zijn, blijkt bijvoorbeeld dat bij de geïsoleerde complex I deficiëntie bij 15% van de patiënten geen lactaatverhogingen worden gevonden, zelfs niet tijdens belasting (glucose, pyruvaat) of inspannings-onderzoek.¹⁶ Daar lactaatverhoging tot nu toe als obligaat verschijnsel werd opgegeven is het waarschijnlijk zo dat het aantal OXFOS-defecte patiënten biochemisch/ moleculair biologisch ondergediagnostiseerd is.

De auteurs zijn op grond hiervan de mening toegedaan dat ook bij patiënten, die geen lactaatverhoging hebben, maar fenotypisch van een OXFOS-defect verdacht worden, nadere invasieve diagnostiek noodzakelijk is. Met name omdat de

consequenties van dergelijke onderzoeken van groot belang zijn voor begeleiding en prenatale diagnostiek.

Spieronderzoek bij OXFOS-defecten

Indien uit anamnese, lichamelijk onderzoek, het onderzoek van lichaamsvloeistoffen en in-vivo functietesten voldoende aanwijzingen zijn verkregen ter ondersteuning van het vermoeden van een OXFOS-defect, wordt overgegaan tot invasief onderzoek. Meestal wordt hiervoor een spierbiopsie genomen uit de musculus vastus lateralis dextra, waarin de volgende onderzoeken altijd dienen te worden verricht:

1. *Microscopisch en histochemisch onderzoek*
2. *Biochemisch onderzoek*

Ad 1. Microscopisch en histochemisch spieronderzoek

Het spierweefsel van een patiënt met een stoornis in het OXFOS-systeem kan er bij oriënterend onderzoek geheel normaal uitzien. De spiervezels die een afwijkend aantal mitochondriën bevatten of die een afwijkend verdelingspatroon vertonen, zijn met de gebruikelijke kleurmethoden (toegepast op paraffinemateriaal) niet gemakkelijk te herkennen. Met speciale histologische of (enzym-) histochemische technieken zijn deze vezels wel goed te identificeren. Veel gebruikt wordt de Gomoritrichroomkleuring. Met deze kleuring worden de subsarcolemmale ophopingen van de mitochondriën rood aangekleurd zodat de afwijkende vezels in dwarse aansnijding een onregelmatig gerafelde (rode) randzone gaan vertonen. Op grond hiervan worden deze vezels 'ragged red' genoemd. Ragged-red vezels worden, in tegenstelling tot bij oudere kinderen en volwassenen, bij jonge kinderen vrijwel nooit waargenomen. De ragged-red vezels zijn niet specifiek voor een OXFOS-defect. Ze kunnen ook bij andere neuromusculaire ziekten worden aangetroffen zoals bij inclusion-body myositis, dystrophia myotonica of zure maltase deficiëntie. Ook met kleuringstechnieken voor de activiteit van de OXFOS-enzymen (zoals SDH, COX en NADH-dehydrogenase) kan men de afwijkende vezels goed herkennen.

Bij electronenmicroscopisch onderzoek worden naast veranderingen in aantal of in de intracellulaire verdeling van mitochondriën afwijkingen gezien in de ultrastructuur van deze mitochondriën. Ook kunnen in de mitochondriën kristallen worden gevonden. Wij toonden aan dat deze kristallen bestaan uit het mitochondrieel enzym creatine kinase.¹⁷

Tabel 2. Klinische symptomen bij OXFOS-defecten.

Hersenen	<ul style="list-style-type: none"> - Convulsies - Hypotonie, Hypertonie - Spasticiteit - Transiënte paraparese - Lethargie, Coma - Psychomotore retardatie, regressie - Extrapiramidale verschijnselen - Ataxie (episodisch) - Dyspraxie - Centrale hypoventilatie - Deceleratie, acceleratie schedelgroei - Corticale blindheid - Perceptieve doofheid
Skeletspier	<ul style="list-style-type: none"> - Inspanningsintolerantie, snelle vermoeibaarheid - Spierzwakte
Hart	<ul style="list-style-type: none"> - Cardiomyopathie (hypertrofisch, congestief) - Geleidingsstoornissen
Ogen	<ul style="list-style-type: none"> - Ptosis - Abnormale oogbewegingen, - dubbelbeelden - Strabisme - Cataract - Retinopathie - Opticus atrofie
Lever	<ul style="list-style-type: none"> - Insufficiëntie
Nier	<ul style="list-style-type: none"> - Tubulusfunctiestoornissen - Interstitiële nefritis
Endocrien	<ul style="list-style-type: none"> - Diabetes mellitus - Diabetes insipidus - Hypothyreoïdie - Hypoparathyreoïdie - Exocriene pancreas-dysfunctie - Primaire ovariële dysfunctie
Gastrointestinaal	<ul style="list-style-type: none"> - Diarree (villus atrofie) - Intestinale pseudo obstructie
Diversen	<ul style="list-style-type: none"> - 'Failure to thrive' - Geringe lichaamslengte - Bleek uiterlijk - Dystrofie

Ad 2. Biochemisch spieronderzoek

In het afgelopen decennium zijn de mogelijkheden van biochemisch spieronderzoek sterk uitgebreid.^{18,19,20} De volgende biochemische bepalingen, waarvoor ongeveer 300 mg spierweefsel nodig is, worden routinematig uitgevoerd in ons centrum:

2a. *Meting van substraatoxidatie snelheden met behulp van radioactief gelabelde substraten en ATP productiesnelheid*

2b. *Activiteitsmetingen van de OXFOS-complexen*

2c. *Activiteitsmetingen van "post-OXFOS" enzymen en immunoblotting van transporteiwitten*

2d. *2-dimensionale electroforese van enzymcomplexen*

Ter verkrijging van de benodigde hoeveelheid spierweefsel is bij kinderen een open spierbiopsie nodig. Bij volwassenen is in Nijmegen de naald-biopsie techniek zodanig ontwikkeld dat het mogelijk is bij volwassenen met deze techniek voldoende materiaal te verkrijgen. Bij de eerste twee methodieken wordt het functioneren van één of meer enzymcomplexen van het OXFOS-systeem onderzocht. Bij de laatste twee methoden wordt gekeken naar de activiteit van één specifiek enzym (-complex) en/of dit, of een deel hiervan, in de normale hoeveelheid/vorm aanwezig is.

Ad 2a. Meting van substraatoxidaties

Indien vers spiermateriaal (niet ingevroren) beschikbaar is (wat sterk geadviseerd wordt), kan het functioneren van de mitochondriële energiehuishouding vastgesteld worden via metingen van de oxidatiesnelheden van verschillende substraten (zoals radioactief [1-14C] pyruvaat). De gebruikte methoden geven een eerste indruk van het functioneren van de verschillende "stappen" betrokken bij de ATP productie. Bij 30-40% van de verse bipten worden stoornissen in de oxidatiesnelheden gevonden zonder dat één van de routinematig gemeten enzymen of enzym-complexen afwijkend zijn! Nader onderzoek is dan noodzakelijk om het onderliggende defect op te sporen.¹⁹

Bij deze patiënten is er dus wel degelijk sprake van een mitochondriële aandoening, welke gemist zou worden indien alleen ingevroren materiaal onderzocht wordt. Onderzoek in vers spiermateriaal is nog mogelijk indien de tijd tussen afname en de eerste bewerkingen van het biopt in een diagnostisch centrum niet langer dan 2 uren bedraagt.

Ad 2b. Activiteitsmetingen van de OXFOS-complexen

Voor een exacte lokalisatie van een OXFOS-stoornis is het noodzakelijk een aantal enzymatische bepalingen

Tabel 3. Karakteristieken van frequent voorkomende mutaties in mitochondrieel DNA (mtDNA).

	MELAS	MERRF	NARP	KSS
<i>Karakteristieken</i>				
Ophthalmoplegie	-	-	-	+
Retina degeneratie	-	-	+	+
AV-blok	-	-	-	+
Liquor eiwit > 1gr/l	-	-	-	+
Myoclonieën	-	+	-	-
Ataxie	-	+	+	+
Spierzwakte	+	+	+	+
Convulsies	+	+	+	-
Dementie	+	+	+	+
Korte lengte	+	+	-	+
Periodiek braken	+	-	-	-
Corticale blindheid	+	-	-	-
Hemiparese, -anopsie	+	-	-	-
Sensorineurale doofheid	+	+	+	+
Lactaat acidemie	+	+	+	+
Positieve familie anamnese	+	+	+	-
Ragged-red vezels	+	+	-	+
Spongiforme degeneratie	+	+	+/-	+

te verrichten, waarmee separaat gedeelten van de electronentransportketen en het ATP-synthase onderzocht kunnen worden (*Figuur 1, op pagina 76*). Deze bepalingen kunnen zowel met vers als met -direct na afname - ingevroren spiermateriaal uitgevoerd worden. Bij activiteitsmetingen wordt gekeken naar de snelheid waarmee een enzym een substraat kan omzetten. Dit geeft aanwijzingen voor de activiteit (werking) van het enzym in de spiercel.

Ad 2c. Activiteitsmetingen van post-OXFOS enzymen en immunoblotting

Daar met bovenstaande enzymatische metingen niet alle stoornissen in de substraatoxidatie opgespoord dan wel verklaard kunnen worden, wordt het diagnostisch pakket continu uitgebreid met bepalingen van enzymen en eiwitten 'downstream' van het OXFOS-systeem en van eiwitten betrokken bij het transport over de mitochondriële membranen. De volgende "post-OXFOS" eiwitten worden min of meer routinematig bepaald: mitochondrieel creatine kinase, de Voltage Dependent Anion Channel (VDAC), de Adenine Nucleotide Translocator (ANT), de anorganisch

fosfaat carrier en de alfa-ketoglutaraat carrier. Inmiddels zijn de eerste patiënten met ANT en VDAC deficiëntie opgespoord. Het belang van onderzoek op vers spiermateriaal, bij voorkeur afgenomen in het centrum waar ook al deze bepalingen operationeel zijn, is hiermee voldoende duidelijk gemaakt.¹⁹

Ad 2d. Twee-dimensionale elektroforese

Indien er een deficiëntie wordt gevonden van één of meer complexen van het OXFOS-systeem is het via 2-dimensionale elektroforese mogelijk om, met behulp van specifieke antilichamen gericht tegen de verschillende OXFOS en post-OXFOS eiwitten, te onderzoeken of één of meer subunits van dergelijke complexen ontbreken of verminderd worden aangemaakt. Dergelijk onderzoek heeft bij patiënten met een COX-deficient Leigh syndroom recent tot exacte opheldering geleid van de stoornis in de assemblage van complex IV.^{21,22,23}

In-vitro fibroblasten onderzoek

Aanbevolen wordt om tijdens de open spierbiopsie tevens huid af te nemen voor het kweken en nader

biochemisch onderzoeken van fibroblasten. Het grootste belang van dit onderzoek is dat indien een defect in fibroblasten tot expressie komt, dit meestal ook het geval is in een chorion villus biopsie (10e – 12e zwangerschapsweek). Fibroblasten onderzoek is derhalve van belang voor prenatale diagnostiek. Verder wordt uit het vergelijken van onderzoek in spier en fibroblasten een eerste indruk verkregen over de weefsel specifieke expressie van de ziekte. OXFOS-deficiënte cellijnen worden tevens gebruikt ter differentiatie van de onderliggende genetische oorzaak (mtDNA versus nDNA) en voor pathofysiologische en therapeutische studies.

Moleculair biologisch onderzoek

Het moleculair biologisch onderzoek van patiënten met een defect in één of meer complexen van het OXFOS-systeem heeft in de afgelopen jaren sterke vooruitgang geboekt. Met uitzondering van complex II worden alle andere complexen deels door mtDNA, deels door nDNA gecodeerd.¹⁶ Onderzoek heeft aangetoond dat slechts bij ongeveer 5% van de onderzochte kinderen met een OXFOS-defect de oorzaak gelegen is in een mutatie van het mtDNA. Het valt dan ook te verwachten dat de meeste patiënten met een vroeg debuut (< 2 jaar) van hun ziekte een mutatie zullen hebben in één van de kerngecodeerde genen: genen direct of indirect betrokken bij de vorming en functie van deze complexen. Het moleculair biologisch onderzoek van OXFOS-patiënten is ondermeer van groot belang voor de begeleiding en eventuele prenatale diagnostiek bij deze patiënten en hun familie.

In de afgelopen jaren zijn, bij min of meer specifieke ziektebeelden, mutaties gevonden in het mtDNA en het nDNA, waardoor een genetische classificatie van deze ziekten mogelijk is geworden (zie *Tabel 1*).

Therapie van OXFOS-defecten

De ontwikkelingen op het gebied van het spiermetabolisme onderzoek gaan snel. Vooralnog moeten we constateren dat er, enkele bijzondere uitzonderingen daargelaten, zoals de recent beschreven co-enzym Q deficiëntie, nog geen behandeling voor OXFOS-defecten mogelijk is. Op dit moment vormt ondersteunende behandeling het enig mogelijke. Nader inzicht in de celbiologische consequenties van OXFOS-defecten zal hierin hopelijk in de toekomst verandering brengen.

Verwijsadressen

Kinderen: Dr. J.A.M. Smeitink,
kinderarts metabole ziekten
Afdeling Kindergeneeskunde
Centrum voor Mitochondriële
Ziekten Nijmegen
Universitair Medisch Centrum
Nijmegen
Postbus 9101
6500 HB Nijmegen
Tel: 024-3614430

Volwassenen: Dr. B.G.M. van Engelen, neuroloog
Afdeling Neurologie
Centrum voor Mitochondriële
Ziekten Nijmegen
Universitair Medisch Centrum
Nijmegen
Postbus 9101
6500 HB Nijmegen
Tel: 024-3615202

Referenties

1. Saraste M. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* 1999; 283: 1488-1493.
2. Smeitink J, Ruitenbeek W, Sengers R, Wevers R, van Lith T, Trijbels F. Mitochondrial creatine kinase activity in patients with disturbed energy generation in muscle mitochondria. *J Inher Metab Dis* 1994; 17 (1):67-73.
3. Taanman J-W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1410:103-123.
4. Zeviani M, Tiranti V, Piantadosi C. Mitochondrial disorders. *Medicine* 1998; 77:59-72.
5. Smeitink JAM, Loeffen JLCM, Triepels RH, Smeets RJP, Trijbels JMF, van den Heuvel LP. Nuclear genes of human complex I of the mitochondrial electron transport chain: state of the art. *Human Mol Genet* 1998; 7(10): 1573-1579.
6. Chinnery PF, Turnbull DM. Mitochondrial DNA and disease. *Lancet* 1999; 354(suppl I): 17-21.
7. Flier JS, Underhill LH, Johns DR. Mitochondrial DNA and disease. *New Eng J Med* 1995; 333 (10): 638-644.
8. Loeffen JLCM, Smeitink JAM, Trijbels JMF, Janssen AJM, Triepels RH, Sengers RCA et al. Isolated complex I deficiency in children: clinical, biochemical and genetic aspects. *Hum Mut* 2000; in press.
9. Leigh D. Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1951; 14:216-221.
10. Erven van PMM. Leigh syndrome. Thesis Nijmegen 1987.
11. Barth PG. Mitochondriën en mitochondriële encefalopathieën. *Soma en Psyche wereldwijd*. 1986; 12 (1): 1-6.

- 1 Defecten van de OXFOS geven klinisch-chemisch vaak aanleiding tot verhoogde melkzuur (lactaat) concentraties in één of meer lichaamsvloeistoffen. Bij verdenking op een OXFOS-defect dient dan ook altijd de lactaat concentratie bepaald te worden. Omgekeerd dient bij een verhoogde lactaatconcentratie gedacht te worden aan een OXFOS-defect.
- 2 De klinische heterogeniteit van OXFOS-defecten is groot, zowel op kinder- als op volwassen leeftijd.
- 3 Slechts een gering percentage van de kinderen met een OXFOS-defect heeft een mutatie van het mitochondrieel DNA. De meesten hebben een mutatie in het kern DNA.
- 4 Mitochondriële diagnostiek wordt bij voorkeur verricht in een centrum waar de gehele cascade van klinische/biochemische/morfologische en moleculair biologische expertise voorhanden is.

12. Loeffen J, Smeitink J, Triepels R, Smeets R, Schuelke M, Sengers R et al. The first nuclear-encoded complex I mutation in a patient with Leigh syndrome. *Am J Hum Genet* 1998; 63 (6): 1598-1608.

13. Triepels RH, van den Heuvel LP, Loeffen JLCM, Buskens CAF, Smeets RJP, Rubio Gozalbo ME et al. Leigh syndrome associated with a mutation in the NDUF57 (PSS1) nuclear encoded subunit of complex I. *Ann Neurol* 1999; 45 (6): 787-790.

14. Trijbels JMF, Sengers RCA, Ruitenbeek W, Fischer JC, Bakkeren JAJM, Jansen AJM. Disorders of the mitochondrial respiratory chain: clinical manifestations and diagnostic approach. *Eur J Ped* 1988; 148: 92-97.

15. Beekvelt van MC, van Engelen BG, Wevers RA, Collier WN. Quantitative near-infra-red spectroscopy discriminates between mitochondrial myopathies and normal muscle. *Ann Neurol* 1999; 46 (4): 667-670.

16. Smeitink J, van den Heuvel L. Human mitochondrial complex I in health and disease. *Am J Hum Genet* 1999; 64:1505-1510.

17. Smeitink J, Stadhouders A, Sengers R, Ruitenbeek W, Wevers R, ter Laak et al. Mitochondrial creatine kinase containing crystals, creatine content and mitochondrial creatine kinase activity in chronic progressive external ophthalmoplegia. *Neuromuscul Disord* 1992; 2(1):35-40.

18. Trijbels JM, Scholte HR, Ruitenbeek W, Sengers RCA, Jansen AJ, Busch HF. Problems with the biochemical diagnosis in mitochondrial (encephalo-) myopathies. *Eur J Pediatr* 1993; 152 (3):178-184.

19. Trijbels F, Huizing M, Ruitenbeek W, Sengers R, Smeitink J, DePinto V et al. Disturbances in mitochondrial transport systems leading to encephalomyopathies. *Biofactors* 1998; 7(3): 225-227.

20. Bentlage HA, Jansen AJ, Chomyn A, Attardi G, Walker JE, Schagger H et al. Multiple deficiencies of mitochondrial DNA- and nuclear DNA encoded subunits of respiratory NADH dehydrogenase detected with peptide- and subunit-specific antibodies in mitochondrial myopathies. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1234 (1):63-73.

21. Zhu Z, Yao J, Johns T, Fu K, De Bie I, Macmillan C et al. SURF1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in Leigh syndrome. *Nat Genet* 1998; 20 (4): 337-343.

22. Tiranti V, Hoertnagel K, Carrozzo R, Galimberti C, Munaro M, Granatiero M et al. Mutations of SURF-1 in Leigh disease associated with cytochrome c oxidase deficiency. *Am J Hum Genet* 1998; 63 (6): 1609-1621.

23. Coenen MJH, van den Heuvel LP, Nijtmans LGJ, Morava E, Marquardt I, Girschick HJ et al. Surfeit-1 gene analysis and two-dimensional blue native gel electrophoresis in cytochrome c oxidase deficiency. *Biochim Biophys Res Commun* 1999; 265 (2): 339-344.

Correspondentie-adres auteurs:

Dr. J.A.M. Smeitink, kinderarts/metaboloog
 Dr. L.P. van den Heuvel, moleculair bioloog
 Prof. Dr. J.M.F. Trijbels, klinisch chemicus
 Dr. E.C.M. Mariman, moleculair bioloog*
 Dr. H.J. ter Laak, patholoog anatoom**
 Dr. B.G.M. van Engelen, neuroloog**
 Prof. Dr. R.C.A. Sengers, kinderarts/metaboloog

Centrum voor Mitochondriële Ziekten
 Nijmegen, Afdelingen Kindergeneeskunde,
 Antropogenetica* en Neurologie**
 Universitair Medisch Centrum Nijmegen,
 Geert Grooteplein 10
 P.O. Box 9101, 6500 HB Nijmegen

Correspondentie gaarne richten aan:

Dr. J.A.M. Smeitink,
 Tel: 024-3614430, Fax: 024-3616428,
 E-mail: J.Smeitink@ckskg.azn.nl
 Website: <http://go.to/ncmd>