

Syllabus

PAOKC-cursus Klinische Chemie en Laboratoriumgeneeskunde

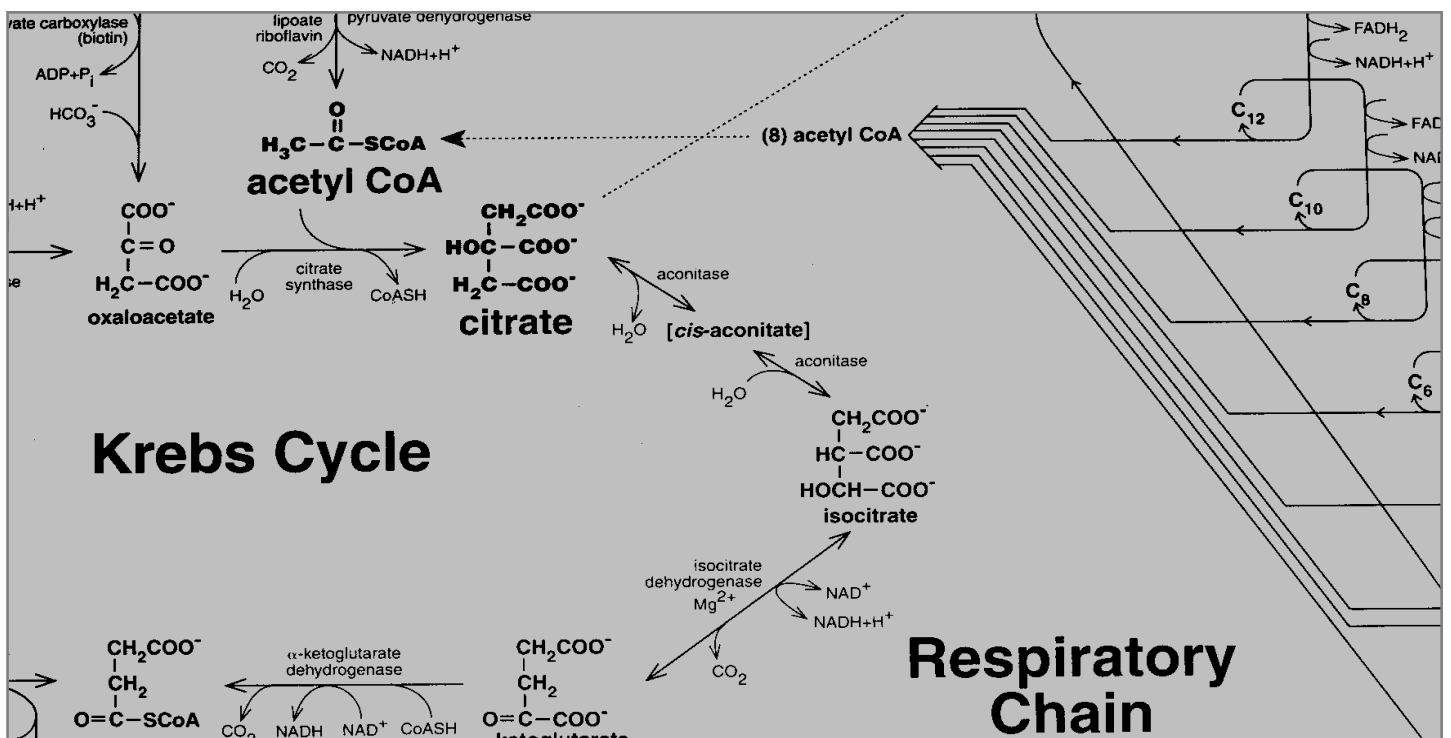
Een metabole stoornis?
Opsporing verzocht!



Nederlandse Vereniging
voor Klinische Chemie
en Laboratoriumgeneeskunde

Dinsdag 16 december 2003

Dish Hotel, Enschede



Programma

09.00 – 09.50 **Koffie en Inschrijving**

09.50 – 10.00 **Opening**
Dr. A.A.J. van Landeghem

OCHTENDPROGRAMMA
Voorzitter: Dr. F.A.J.T.M. van den Bergh

10.00 – 12.00 **Het ernstig zieke kind met een inborn error: initiële diagnostiek en behandeling**
Dr. F.A. Wijburg en Dr. M. Duran

12.00 – 13.00 **Lunch**

MIDDAGPROGRAMMA
Voorzitter: Dr. B.J.H.M. Poorthuis

13.00 – 13.40 **Toepassing van tandem-massaspectrometrie voor de diagnostiek van erfelijke stofwisselingsziekten**
Dr. A.H. van Gennip

13.45 – 14.10 **Prospective neonatal screening for inborn errors of metabolism with tandem mass spectrometry in Bavaria, Germany**
Prof. Dr. A. Roscher

14.10 – 14.15 **Algemene discussie**

14.15 – 14.45 **Koffie/Thee**

14.45 – 15.20 **Metabolomics in clinical chemistry**
Prof. Dr. R.A. Wevers

15.20 – 16.00 **DNA chips en micro-arrays: werkingsprincipe en toepassingen**
Dr. J.T. den Dunnen

16.00 – 16.15 **Afsluiting**

16.15 – 17.00 **Drankje en hapje**

Sprekers

Dr. F.A. Wijburg, Kinderarts Metabole Ziekten
Academisch Medisch Centrum
Amsterdam

Dr. M. Duran, Klinisch Chemicus EMZ
Academisch Medisch Centrum
Amsterdam

Dr. A.H. van Gennip, Klinisch Chemicus EMZ
Stichting Klinisch Genetica Z.O. Nederland
Maastricht

Prof. Dr. A. Roscher, M.D.
Professor of Biochemical Genetics
Director Children's Research Center
University of Munich, Department of Pediatrics
München

Prof. Dr. R.A. Wevers, Klinisch Chemicus EMZ
Universitair Medisch Centrum St Radboud
Nijmegen

Dr. J.T. den Dunnen, Biochemicus
Leids Universitair Medisch Centrum
Leiden

Organisatie

Organisatiecommissie

Drs. N.G.G.M. Abeling	Academisch Medisch Centrum Amsterdam
Dr. F.A.J.T.M. van den Bergh	Medisch Spectrum Twente Enschede
Dr. Ir. A.W.H.M. Kuypers	Universitair Medisch Centrum St Radboud Nijmegen
Dr. A.A.J. van Landeghem	St. Elisabeth Ziekenhuis Tilburg
Dr. B.J.H.M. Poorthuis	Leids Universitair Medisch Centrum Leiden

Inhoud

	pagina
Het ernstig zieke kind met een inborn error: initiële diagnostiek en behandeling <i>Dr. F.A. Wijburg en Dr. M. Duran</i>	1
Toepassing van tandem-massaspectrometrie voor de diagnostiek van erfelijke stofwisselingsziekten <i>Dr. A.H. van Gennip</i>	21
Prospective neonatal screening for inborn errors of metabolism with tandem mass spectrometry in Bavaria, Germany <i>Prof.dr. A. Roscher, B. Liebl, R. Fingerhut, B. Olgemöller</i>	26
Metabolomics in clinical chemistry <i>Prof.dr. R.A. Wevers</i>	31
DNA chips en micro-arrays: werkingsprincipe en toepassingen <i>Dr. J.T. den Dunnen</i>	39

HET ERNSTIG ZIEKE KIND MET EEN INBORN ERROR: INITIËLE DIAGNOSTIEK EN BEHANDELING

*Dr F.A. Wijburg & Dr M. Duran
Afdeling Metabole Ziekten en Laboratorium Metabole Ziekten
Emma Kinderziekenhuis/AMC
Amsterdam*

In deze syllabus worden stofwisselingziekten besproken die zich met een acuut ziektebeeld kunnen presenteren.

De presentatie van stofwisselingsziekten kan zeer divers zijn en vaak duurt het geruime tijd voordat een etiologische diagnose gevonden kan worden. Voor acuut zieke kinderen is echter het aantal stofwisselingsziekten wat bij de differentiaal diagnose in aanmerking komt beperkt en is de initiële diagnostiek zeer overzichtelijk.

Zuigelingen hebben slechts beperkte mogelijkheden om op ziekteprocessen te reageren. De uitingen van een stofwisselingsziekte in de eerste levensweken zijn dan ook vaak zeer aspecifiek en bestaan uit:

- Ademhalingsproblemen
- Hypotonie
- Slecht drinken
- Voedsel weigeren
- Apathie
- Convulsies

Veel van de symptomen van een stofwisselingziekte lijken op de klachten van neonatale infecties. Kan bij een zuigeling, welke verdacht wordt van een neonatale sepsis de ziekteverwekker niet vlot worden aangetoond, dan zal serieus met de mogelijkheid van een stofwisselingsziekte rekening gehouden moeten worden.

Bij oudere kinderen kunnen de klachten waarmee de stofwisselingsziekte zich openbaart veel diverser zijn. Van belang is dat aanvullende informatie, bijvoorbeeld familie anamnese zoals verwantschap van de ouders, of eerdere kinderen in het gezin welke zijn overleden, een belangrijke steun zijn voor de verdenking op een stofwisselingziekte.

Verder is het van groot belang om bij acuut zieke kinderen zonder duidelijke oorzaak, naast noodzakelijke eerste laboratoriumdiagnostiek materiaal (bloed en urine) in te vriezen, zodat op eventueel later tijdstip nog diagnostiek kan plaatsvinden.

Neonatale presentatie van stofwisselingsziekten

1. Neurologische verslechtering.

Dit is de grootste groep. Het betreft over het algemeen zuigelingen die zich bij de kinderarts presenteren met een neurologische verslechtering na een symptoomvrij interval. De neurologische verslechtering wordt veelal vooraf gegaan door voedingsproblemen, zoals slecht drinken en spugen, waarna er onverwacht een coma, dan wel convulsies op treden. In tegenstelling tot de meeste oorzaken van coma is bij een metabole oorzaak vaak sprake van een hypotonie van de romp, in combinatie met een hypertonie van de extremiteiten. Het coma kan veroorzaakt worden door aandoeningen die endogene intoxicatie dan wel cellulair energie tekort veroorzaken en zal in de volgende paragraaf uitvoeriger besproken worden.

2. Convulsies

Er zijn een beperkt aantal aandoeningen die zich karakteristiek presenteren met neonatale convulsies in de eerste levensuren, dan wel levensdagen. Dit zijn pyridoxine afhankelijke convulsies, non-ketotische hyperglycinemie, sulfietoxidase deficiëntie en peroxisomale stoornissen. De convulsies zijn therapieresistent en het falen van gangbare therapie maakt een stofwisselingsziekte heel waarschijnlijk. Men dient er bedacht op te zijn dat ernstige aanlegstoornissen van de hersenen eveneens met convulsies gepaard gaan. Daarnaast kunnen convulsies optreden bij patiënten met hypoglycemieën op grond van hyperinsulinisme of in uitzonderlijke gevallen op basis van vetzuuroxidatiestoornissen of glycogeenstapelingsziekten.

3. Hypotonie

Hypotonie is een frequent symptoom van zieke zuigelingen en bij de meerderheid van patiënten is de hypotonie van centrale origine, dat wil zeggen dat een encephalopathie de oorzaak van de hypotonie is. Alle aandoeningen die een encephalopathie geven, zoals bijvoorbeeld de organische acidemieën en ureumcyclus defecten, kan de hypotonie de andere neurologische verschijnselen vooraf gaan. Slechts in uitzonderlijke gevallen is de hypotonie een ware spierzwakte, zoals bij vetzuuroxidatiestoornissen, ademhalingsketendefecten of zeer vroege presentatie van de ziekte van Pompe. Daarnaast dient serieus rekening gehouden te worden met andere aandoeningen, dan metabole ziekte, zoals bijvoorbeeld het Prader-Willi-syndroom, welke met ernstige hypotonie gepaard gaan.

4. Hepatische presentatie

Hepatomegalie en hypoglycemieën kunnen zich in de eerste levensdagen voordoen ten gevolge van galactosemie, vetzuuroxidatiestoornissen en uitzonderlijk bij glycogeenstapelingsziekten. Daarnaast kunnen aandoeningen welke gepaard gaan met leverfunctiestoornissen en leverfalen ook gepaard gaan met hypoglycemieën. De belangrijkste aandoeningen zijn galactosemie, neonatale hemochromatose, ademhalingsketendefecten en tyrosinemie type 1 (meestal niet in de eerste levensweken).

5. Cardiale presentatie

Ook stofwisselingsziekten kunnen primair in de neonatale fase zich presenteren met een cardiomyopathie. Vrijwel alle patiënten met cardiomyopathie presenteren zich met een hypertrofische cardiomyopathie, los van de onderliggende oorzaak. In een eindstadium van het ziektebeeld wanneer er een ernstig falen van de hartspier is, zal het beeld overgaan in een gedilateerde cardiomyopathie. De cardiomyopathie kan de primaire uiting zijn van ademhalingsketen defecten en vetzuuroxidatiestoornissen. Lysosomale stapelingsziekten zoals bijvoorbeeld de ziekte van Pompe presenteren zich eveneens met een hypertrofische cardiomyopathie dan wel verdikkingen van de

kleppen, maar zullen vrijwel nooit evalueren tot een gedilateerde cardiomyopathie. Daarnaast zijn met name de CDG-syndromen berucht om hun cardiale problemen, bestaande uit hart falen en recidiverende pericardefussies.

Initieel onderzoek bij zieke zuigelingen verdacht van een stofwisselingsziekte.

Binnen iedere groep van klachten zal men met behulp van routine biochemische diagnostiek een bepaalde diagnose of groep van diagnoses proberen waarschijnlijk te maken. Het routine biochemisch onderzoek is een belangrijke eerste stap in de diagnostiek en kan richtinggevend zijn. Bij de initiële diagnostiek hoort het verrichten van bloed, urine en soms liquor diagnostiek. Van belang is het meten van een:

- Bloedgas
- Volledig bloedbeeld
- Bepalen van anion-gap
- Glucose
- Triglyceride
- Lactaat
- Ammoniak
- Lever- nierfuncties
- Insuline bij hypoglycemieën
- Indien mogelijk het plasma ketonlichamen en vrije vetzuren

Urine diagnostiek dient naast eventueel normaal routine onderzoek een sticktest te omvatten op ketonlichamen, reductie en de aanwezigheid van sulfiet. Indien een lumbaal punctie wordt verricht in het kader van infectie diagnostiek verdient het aanbeveling glucose lactaat en eiwit te bepalen (monster bewaren voor aminozuur diagnostiek). Daarnaast is het zinvol om in de acute fase in ieder geval een thorax foto te maken, zonodig een echografie van het cerebrum en EEG.

Met behulp van hier bovenstaande routine diagnostiek kan een zieke zuigeling met klachten in 1 van de 7 volgende diagnosegroepen worden ingedeeld.

Groep 1: Neurologische verschijnselen door hypoglycemieën

Neonatale hypoglycemieën komen frequent voor en worden doorgaans niet veroorzaakt door een stofwisselingsziekte. Meestal wordt incidenteel een lage bloedsuiker gevonden en is verdere diagnostiek niet noodzakelijk. Naar alle waarschijnlijkheid worden hypoglycemieën bij neonaten vaker door endocriene stoornissen veroorzaakt dan door stofwisselingsziekten. Hypoglycemieën bij zuigelingen vanaf 3 maanden worden daarentegen vaker door een stofwisselingsziekte veroorzaakt. Om op een eenvoudige manier een classificatie van hypoglycemieën mogelijk te maken is slechts beperkt onderzoek nodig. Met behulp van de leeftijd van de patiënt het tijdstip van de lage bloedsuiker in relatie tot de laatste voeding, de grootte van de lever en beperkt laboratorium onderzoek (lactaat, insuline, ketonen in urine) kunnen vrijwel alle patiënten in een diagnose categorie ingedeeld worden. Zo is bijvoorbeeld bij een neonaat met frequent hypoglycemieën op onverwachte momenten, zonder grote lever, zonder ketonen hyperinsulinisme het meest waarschijnlijk. Echter bij patiënten met een grote lever en verhoogd lactaat is de oorzaak vrijwel altijd een stofwisselingsziekte de oorzaak (nadat een secundaire verhoging van het lactaat door sepsis of cor vitium werd uitgesloten)

Groep 2: Neurologische deterioratie met ernstige ketose

Binnen de groep van zieke zuigelingen met ketose is maple syrup urine disease (MSUD) de belangrijkste aandoening. In de ons omliggende landen is dit een van de meest frequente aminozuurstoornissen. Met de toename van kinderen van allochtone afkomst wordt MSUD in ons land steeds vaker gezien. Kenmerkend is dat er een ernstig neurologisch probleem is met convulsies en coma en dat bij de routine diagnostiek slechts een geringe metabole acidose aanwezig is. De patiënt hyperventileert meer dan op grond van de bloedgas verwacht zou kunnen worden. Vaak is de fontanel gevuld tgv hersenoedeem. Indien een ketostick in de urine wordt gestopt, dan blijkt dat er een zeer sterke ketose aanwezig is. De definitieve diagnose kan bevestigd worden middels aminozuur analyse en organische zuren analyse.

Groep 3: Neurologische deterioratie (intoxicatie) met acidose en hyperammonemie.

Deze groep wordt gevormd door de organische acidemieën. Binnen deze groep zijn methylmalonacidurie, propionacidurie en hydroxyisovaleriaan acidurie de meest voorkomende ziektebeelden. Daarnaast kunnen multiple-acyl-CoA dehydrogenase deficiëntie en biotinidase deficiëntie soortgelijke klachten geven. De zuigelingen worden ziek na een symptoom vrij interval met voedsel weigeren, convulsies en coma. Basis diagnostiek laat zien dat er sprake is van een metabole acidose met verhoogd melkzuur en een sterk verhoogd ammoniak en een toegenomen anion-gap. Er is sprake van een circulerend organisch zuur wat niet enkel lactaat betreft en dat zijn meestal ketonlichamen. Patiënten zijn vaak gedehydrateerd door een geforceerde diurese. Het ammoniak kan zeer hoge waarden bereiken tot 2000 μM per liter. De definitieve diagnostiek vindt plaats door middel van organische zuuranalyse in urine.

Groep 4: Neurologische deterioratie met lactaat acidose (Cellulair energie tekort)

De klinische presentatie van zuigelingen met een ziektebeeld binnen deze groep kan sterk wisselen, maar de overeenkomst is dat er sprake is van een ernstige lactaat acidose. Het spreekt voor zich dat veel andere ziekteprocessen zoals bijvoorbeeld hypoxie, cardiocirculatoire falen eveneens gepaard gaan met ernstige lactaat acidose. Alvorens stofwisselingsonderzoek te verrichten dienen met name de cardiale oorzaken te zijn uitgesloten. Anderzijds kunnen met name de ademhalingsdefecten zich primair met een cardiomyopathie presenteren. Binnen de groep van stofwisselingsziekten met lactaat acidose zijn het met name pyruvaat dehydrogenase complex deficiëntie, pyruvaat carboxylase deficiëntie en de ademhalingsketen defecten. Daarnaast kan biotinidase deficiëntie eveneens een soortgelijke ziektebeeld geven. De diagnostiek bestaat uit het bepalen van lactaat en pyruvaat in urine, plasma en zonodig liquor. Sluitstuk van de biochemische diagnostiek is het verrichten van weefseldiagnostiek in het hetzij fibroblasten dan wel spierweefsel.

Groep 5: Neurologische deterioratie (intoxicatie) met hyperammonemie en geen ketose.

Deze groep bestaat voornamelijk uit de ureum cyclusdefecten. Eveneens zijn dit vaak patiënten die na een symptoom vrij interval ziek worden met verlaagd bewustzijn, convulsies en uiteindelijk in coma geraken. Er is een zeer sterke oploop van het ammoniak, en indien dit nog niet is bepaald wijst het sterk verlaagde ureum in de richting van deze groep aandoeningen. De ureum cyclus defecten kunnen van andere defecten met hyperammonemie. onderscheiden worden vanwege het feit dat er geen acidose is en het lactaat normaal is, er is frequent een alkalose veroorzaakt door het verhoogde ammoniak. De transaminasen zijn vaak verhoogd. In uitzonderlijke gevallen kunnen vetzuuroxidatie stoornissen een identieke presentatie hebben als ureum cyclus defecten. Belangrijk onderscheidt is dat vetzuur oxidatiestoornissen gepaard gaan met frequente hypoglycemieën en vaak een verhoogd CK.

Groep 6: Neurologische deterioratie zonder acidose en zonder hyperammonemie.

Binnen deze groep zijn het voornamelijk zuigelingen die zich presenteren met onbehandelbare convulsies startend enkele uren na de geboorte of in de eerste levensdagen. Belangrijkste vertegenwoordigers van deze groep zijn de non-ketotische hyperglycinemie, sulfietoxidase deficiëntie en vitamine B6 responsieve convulsies. Daarnaast kunnen ook peroxisomale stoornissen zich presenteren neonatale convulsies. Bij de laatste groep wordt er bij beeldvorming van de hersenen frequent aanlegstoornissen gezien. Daarnaast zijn er een veelvoud aan stofwisselingsziekten die wel sporadisch geassocieerd zijn met convulsies in de neonatale periode. De bevindingen bij lichamelijk onderzoek zouden dan richting moeten geven aan deze mogelijke diagnoses. Voor de stoornissen die gepaard gaan met neonatale convulsies is het noodzaak zowel aminozuren in liquor te verrichten (non-ketotische hyperglycinemie.), urine onderzoek (sulfietoxidase) en plasmaonderzoek (peroxisomale ziekten). Neurotransmitter diagnostiek kan eveneens geïndiceerd zijn. Bij vitamine B-6 responsieve convulsies worden verlaagde

waarden van GABA in liquor gevonden. Dit is echter niet obligaat en ook met normale GABA concentraties dient vitamine B-6 responsieve convulsies te worden overwogen. Vitamine B-6 responsieve convulsies worden waarschijnlijk onder gediagnosticeerd. Het geven van 100 mg B-6 intraveneus en simultane registratie van het EEG is geenszins de gouden standaard voor vitamine B-6 responsieve convulsies. Tegenwoordig wordt er voor gepleit de vitamine B-6 niet enkel intraveneus te geven, maar deze eveneens oraal voort te zetten (10 mg/kg) en een trial met folinezuur (5mg/kg) te overwegen.

Groep 7: Leverstoornissen

Een groot aantal metabole stoornissen is geassocieerd met leverproblematiek in de neonatale periode. De bevinden van het lichamelijk onderzoek en de routine biochemie zijn eveneens richtinggevend voor de uiteindelijke diagnose. Belangrijk is of de lever en ook de milt vergroot zijn en of er slechts hypoglycemieën zijn of dat ook cholestase, gestoorde transaminasen en stollingsstoornissen zijn. Grote lever en hypoglycemieën zijn kenmerkend voor glycogeenstapelingsziekten en gluconeogenese defecten. Grote lever en cholestase en levercelschade past bij galactosemie, fructose intolerantie, ademhalingsketen defecten, hemochromatose en tyrosinemie. Een grote lever met cholestase en eventueel malabsorptie horen bij α -1-antitrypsine deficiëntie, peroxisomale stoornissen en CDG syndromen. En een grote lever in combinatie met vergroting van andere organen, zoals bijvoorbeeld de milt zijn richtinggevend voor lysosomale stapelingsziekten. Voor de uiteindelijke diagnostiek, zijn nogmaals het routine onderzoek richtinggevend en zal zich beperken tot plasma en urine onderzoek, of is er de noodzaak voor belastingtesten en eventueel weefseldiagnostiek.

Groep 8: Cardiomyopathie

De oorzaken voor een cardiomyopathie kort na de geboorte zijn vooral infectieziekten en in mindere mate metabole stoornissen. Vooral ademhalingsketendefecten, vetzuuroxidatiestoornissen en lysosomale stapelingsziekten kunnen een cardiomyopathie geven. Bij kinderen met een lysosomale

stapelingsziekte zijn er vaak ook tekenen van hydrops en orgaanvergroting. De diagnostiek is vaak lastig omdat veelal er circulatiestoornissen zijn en daarmee zijn het lactaat en CK al hoog door het hartfalen. De vetzuuroxidatiestoornissen leiden naast cardiale klachten vaak (maar zeker niet altijd!) ook tot hypoglycemieën.

Het is bij deze groep patiënten zeer zinvol de oogarts in consult te vragen. Bij lysosomale stapelingsziekten is er frequent corneatroebeling en bij ademhalingsketendefecten is er soms een cataract aanwezig. In toenemende mate wordt duidelijk dat ademhalingsketendefecten ook gepaard kunnen gaan met structurele hartafwijkingen, soms in combinatie met andere aanlegstoornissen en het bestaan van een structurele hartafwijking pleit niet tegen de aanwezigheid van een metabole stoornis.

Metabole diagnostiek

Zoals al reeds genoemd zou met het bovenstaande schema een indeling in diagnosegroep mogelijk moeten zijn. Voor vrijwel alle aandoeningen is het mogelijk door middel van het insturen van 2 ml heparine bloed, 10-15 ml urine en 1-2 ml hersenvocht, de volledige diagnostiek voor nadere classificatie van een mogelijke acute metabole stoornis te verrichten. Initiële diagnostiek (bloedgas, anion-gap, ammoniak, laktaat, glucose, urine keto-stick, urine reductie, leverenzymen, bloedbeeld) kan al snel een aanwijzing in de goede richting geven. Afhankelijk van de verdenking zal dan vervolgens voor een definitieve diagnose hetzij enzymdiagnostiek, hetzij DNA-diagnostiek worden verricht. Het is dan wel van belang om hiervoor eerst uitvoering te overleggen met een specialist voor metabole ziekten.

Behandeling zieke zuigelingen

Een groot aantal van de ondersteunde maatregelen kan reeds ter plaatse worden ingesteld. Patiënten kunnen gedehydriseerd raken (dehydratie door ketose), de eiwit intake dient direct gestaakt te worden (hyperammonemie), er zal een glucose infuus gestart moeten worden met royaal vocht en met een

voldoende glucose intake (7-10 mg glucose per kg per minuut) en een eventuele acidose dient gecorrigeerd te worden. Voor alle stoornissen van de intermediaire stofwisseling is glucose toediening de behandeling van eerste keus. De enige uitzondering hierop zijn de congenitale lactaatacidemiën (mn pyruvaatdehydrogenase deficiëntie). Bij deze patiënten is het lactaat vaak al bij het eerste onderzoek zeer hoog (20-40 mmol/L) en zal bij ruime glucose toediening het lactaat verder stijgen. Alleen voor deze groep patiënten wordt aanbevolen om de glucose intake relatief laag te houden (3-4 mg/kg/min) en met intralipid te starten. Zo nodig zal antibiotica toegediend moeten worden en bij convulsies kan een trial met pyridoxine reeds ondernomen worden. Het is van groot belang het laboratoriumonderzoek cito te laten verlopen en zeer regelmatig te herhalen, zodat een indruk verkregen wordt over de progressie van het ziektebeeld.

Het definitieve behandelplan hangt af van de onderliggende diagnose en om deze reden zal voorrang verricht worden bij het uitvoeren van metabole diagnostiek bij bovenstaande categorieën van patiënten. Overleg met de afdeling Metabole Ziekten voor cito diagnostiek is van groot belang.

Presentatie van stofwisselingsziekten op de oudere kinderleeftijd

Ook voor oudere kinderen zal op basis van de klinische presentatie in combinatie met het routine biochemisch onderzoek geprobeerd moeten worden de patiënt in te delen in een van de diagnostische groepen. Zoals al eerder genoemd is het voor oudere kinderen soms minder voor de hand liggend om aan een metabole stoornis te denken. Reden hiervoor zijn bijvoorbeeld het intermitterend voorkomen van de klachten of het samengaan van de klachten met intercurrente infecties.

Een aparte groep patiënten zijn de patiënten bekend met een stofwisselingsziekte, die een acute ontregeling krijgen en dientengevolge in het dichtst bijzijnde ziekenhuis worden opgenomen. Van deze patiënten zullen veelal de ouders een noodplan bij zich hebben met de eerste instructies.

Groep 1: Neurologische verslechtering

Ook bij patiënten die na de zuigelingen periode een acuut neurologisch beeld ontwikkelen, zal doorgaans een stofwisselingsziekte worden overwogen. Uiteraard zal vooral eerst een neurologische evaluatie moeten plaatsvinden met daarbij, op basis van anamnese, lichamelijk onderzoek en beeldvormend onderzoek het stellen van een waarschijnlijkheidsdiagnose. Indien dat uit de diagnostiek blijkt dat er sprake is van een acuut opgetreden encephalopathie, dan wel dystonie of bewegingsstoornis al of niet gepaard gaan met convulsies, dan zullen stofwisselingsziekten als mogelijke oorzaken moeten worden overwogen. Alle organische academiën kunnen zich ook na de zuigelingenleeftijd presenteren. Echter, de presentatie is vaak anders en de hyperammonemie staat minder op de voorgrond, maar de ziektebeelden geven vaak een acuut neurologisch beeld zonder tekenen van intoxicatie (spugen, voedsel weigeren). In het bijzonder patiënten met glutaaracidurie type-1 presenteren zich tussen het eerste en tweede levensjaar. Zij hebben vaak een macrocephalie en in aansluiting aan een intercurrent infect ontwikkelen zij een acute encephalopathie eindigend in een neurologisch ziektebeeld met dystonie. Ook andere stofwisselingsziekten met een endogene intoxicatie, zoals bijvoorbeeld ureumcyclus defecten, kunnen zich na een intercurrent infect presenteren met een acute encephalopathie. Meten van de ammoniak levert dan de diagnose. Bovenstaande groepen kunnen in uitzonderlijke gevallen ook intermitterend klachten geven. Tenslotte kunnen stoornissen in de cellulaire energievoorziening, zoals ademhalingsketendefecten en vetzuuroxidatiestoornissen zich presenteren met een acuut neurologisch ziektebeeld. Voor de ademhalingsketendefecten geldt dat er een encephalopathie, convulsies en soms myopathie met rhabdomyolyse. In uitzonderlijke gevallen is er leverfalen met encephalopathie. Voor de vetzuuroxidatiestoornissen geldt dat de encephalopathie berust op hypoglycemieën eventueel in combinatie met cardiomyopathie en skeletspier problemen.

Groep 2: Convulsies

Metabole stoornissen met convulsies op de kinderleeftijd worden over het algemeen veroorzaakt door een acute encephalopathie of worden veroorzaakt door hypoglycemieën. Daarnaast is er een groep patiënten met psychomotore retardatie die in het beloop van hun ziekte, epilepsie gaan ontwikkelen. Voor de convulsies geldt hetzelfde als voor de bovenstaande groep van aandoeningen die een encephalopathie geven. Endogene intoxicaties, zoals organische acidemiën, dan wel ureumcyclusdefecten of aandoeningen gepaard gaande met hypoglycemieën kunnen convulsies op de kinderleeftijd veroorzaken. Voor de laatste categorie, de hypoglycemieën, is het tijdstip waarop de convulsies optreden en een anamnese van slecht eten of gastro-enteritis het meest richting gevend. Daarnaast is er een grote groep stofwisselingsziekten die psychomotore retardatie al dan niet met convulsies kan veroorzaken. Het onderzoek bij de laatste groep patiënten is vaak tijdrovend en voor veel klinici demotiverend. Voor de meeste patiënten kan volstaan met het zogenoemde 'screenen' metabool onderzoek in urine en plasma. Bij patiënten die zogenaamde "intractable seizures" ontwikkelen is vaak gericht onderzoek, inclusief neurotransmitter diagnostiek aangewezen, omdat stofwisselingsziekten een belangrijke oorzaak voor moeilijk behandelbare convulsies zijn.

Groep 3: Psychiatrische presentatie

Ook al op de kinder- en adolescentenleeftijd kunnen acute veranderingen van stemming en gedrag veroorzaakt worden door een stofwisselingsziekte. Evenals bij de twee bovenstaande categorieën kunnen aandoeningen met endogene intoxicatie en dan de groep ureumcyclusdefecten in het bijzonder, zich met gedragsveranderingen presenteren. Bij patiënten met een intermitterend verhoogd ammoniak kan dit zelfs de enige klacht zijn. Voorts is bekend dat klassieke homocystinurie en varianten van dit ziektebeeld zich met psychiatrische verschijnselen kunnen presenteren en ook stoornissen in de neurotransmitter synthese geven psychiatrische ziektebeelden. Daarnaast is er een grote groep aandoeningen bij wie gedragsproblemen de eerste uiting zijn van het ziekteproces, zoals bijvoorbeeld de ziekte van San Filippo

(Mucopolysaccharidose type-3) en geslachtsgebonden adrenoleukodystrofie. Voor deze laatste aandoeningen geldt doorgaans wel dat er zelden een acuut debuut van de gedragsproblemen is.

Groep 4: Cardiale presentatie

Onderzoek naar cardiomyopathie op de kinderleeftijd is een moeilijk diagnostisch probleem, er zijn zeer veel oorzaken voor cardiomyopathie. Grofweg vallen deze oorzaken in drie grote groepen. 1. Infecties, 2. Familiaire cardiomyopathieën, 3. Stofwisselingsziekten.

Van de stofwisselingsziekten zijn er velen beschreven waarbij incidenteel een cardiomyopathie optrad en het merendeel van deze aandoeningen wordt ontdekt bij het urineonderzoek. De aandoeningen waar cardiomyopathie zeer frequent bij gezien wordt zijn met name de vetzuuroxidatiestoornissen (mn stoornissen van het langketenvet), de ademhalingsketendefecten, mucopolysaccharidosen (MPS), CDG(1a)-syndroom en het Barth syndroom. Alle bovenstaande aandoeningen met uitzondering van de ademhalingsketendefecten kunnen relatief eenvoudig met het standaard stofwisselingsonderzoek aangetoond worden (urine en plasma), eventueel aangevuld met enzymdiagnostiek. Ademhalingsketendefecten vormen een bijzonder diagnostisch probleem indien de stoornis zich beperkt tot het weefsel van de hartspier. In deze gevallen is de diagnose slechts met een myocard biopsie te stellen. De anamnese en het lichamelijk onderzoek zijn heel belangrijk om de diagnose te kunnen stellen. Vetzuuroxidatiestoornissen gaan frequent gepaard met hypoglycemieën en of myopathie, MPS en CDG syndromen gaan gepaard met orgaanvergroting of dysmorphieën en het Barth syndroom (geslachtsgebonden overervend) geeft eveneens myopathie en neutropenie.

Groep 5: Hepatische presentatie

Op de kinderleeftijd zal bij een acuut lever falen al snel een stofwisselingsziekte worden overwogen. Veelal worden het syndroom van Reye en acuut lever falen door elkaar gebruikt. De aandoeningen die op de zuigelingen leeftijd acuut lever falen geven kunnen nog steeds op de kinderleeftijd acuut lever falen

geven, zij het dat een late presentatie uitzonderlijk is. Op de kinderleeftijd wordt leverfalen frequent veroorzaakt door met name stoornissen van de cellulaire energievoorziening, zoals vetzuuroxidatiestoornissen en ademhalingsketen-defecten. Indien het lever falen later op de kinderleeftijd of adolescentie optreedt, zal eveneens de ziekte van Wilson overwogen moeten worden. Voor hypoglycemieën op de kinderleeftijd kan met hetzelfde eenvoudige schema van het tijdstip waarop de hypoglycemie optreedt, de grootte van de lever, en beperkt laboratorium onderzoek (Lactaat en ketonlichamen) het onderscheidt gemaakt worden of de hypoglycemieën veroorzaakt worden door een defect in glycogeen afbraak en gluconeogenese (bij beide groepen is de lever vergroot en het lactaat bij de hypoglycemie verhoogd), dan wel veroorzaakt wordt door een vetzuuroxidatiestoornis (lever normaal tot licht vergroot en geen tot nauwelijks ketonlichamen in de urine). Daarnaast zijn er een tweetal stofwisselingsziekten met hyperinsulinisme en lage bloedsuikers welke zich op de kinderleeftijd kunnen presenteren. Als eerste het hyperinsulinisme hyperammonemie. syndroom. Dit is het ziektebeeld dat in de oude literatuur bekend staat als leucine gevoelige hypoglycemieën. Hypoglycemieën treden op 1 tot 2 uur na een eiwit rijke maaltijd en het ammoniak is licht tot matig verhoogd. Daarnaast is het CDG-syndroom type- 1b wat een gastrointestinale/-hepatische presentatie heeft, een oorzaak van hypoglycemieën met verhoogde insuline.

Metabole diagnostiek zieke kinderen

Net als bij zuigelingen zou idealiter met het lichamenlijk onderzoek en algemeen biochemisch onderzoek een groep van stofwisselingsziekten aannemelijk gemaakt of uitgesloten moeten kunnen worden. De bepalingen van het routine biochemisch onderzoek zijn identiek als bij zuigelingen. Indien er een sterke verdenking bestaat op een stofwisselingsziekte is het nodig 2 ml heparine bloed, 10-15 ml urine en op indicatie 1-2 ml hersenvocht in te sturen. Met bovengenoemde materialen is het merendeel van de stofwisselingsziekten te diagnosticeren. Afhankelijk van de verdenking zal voor een definitieve diagnose hetzij enzymdiagnostiek, hetzij DNA-diagnostiek worden verricht.

Behandeling zieke kinderen

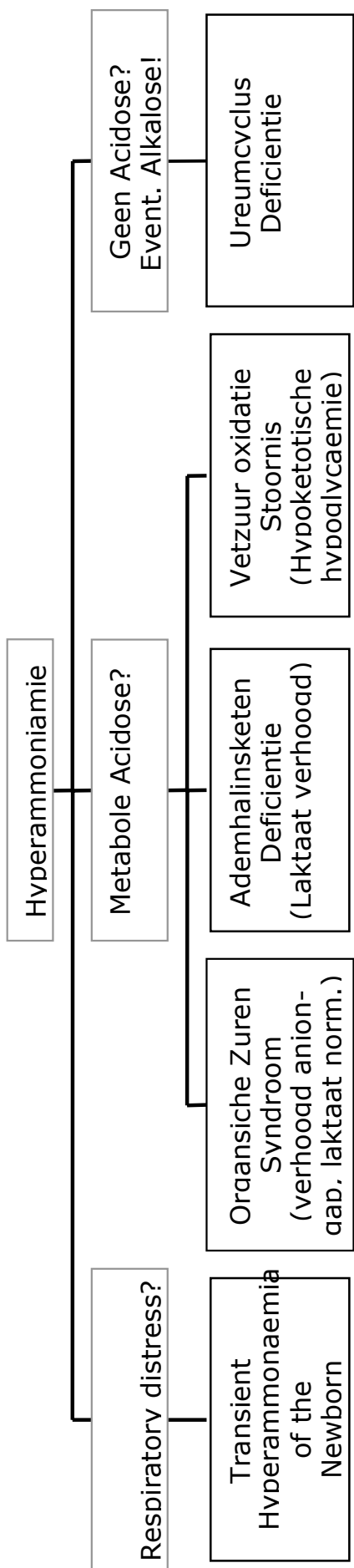
De initiële behandeling voor zieke kinderen verschilt niet van die van zuigelingen. Een groot aantal van de ondersteunde maatregelen kan reeds ter plaatse worden ingesteld.

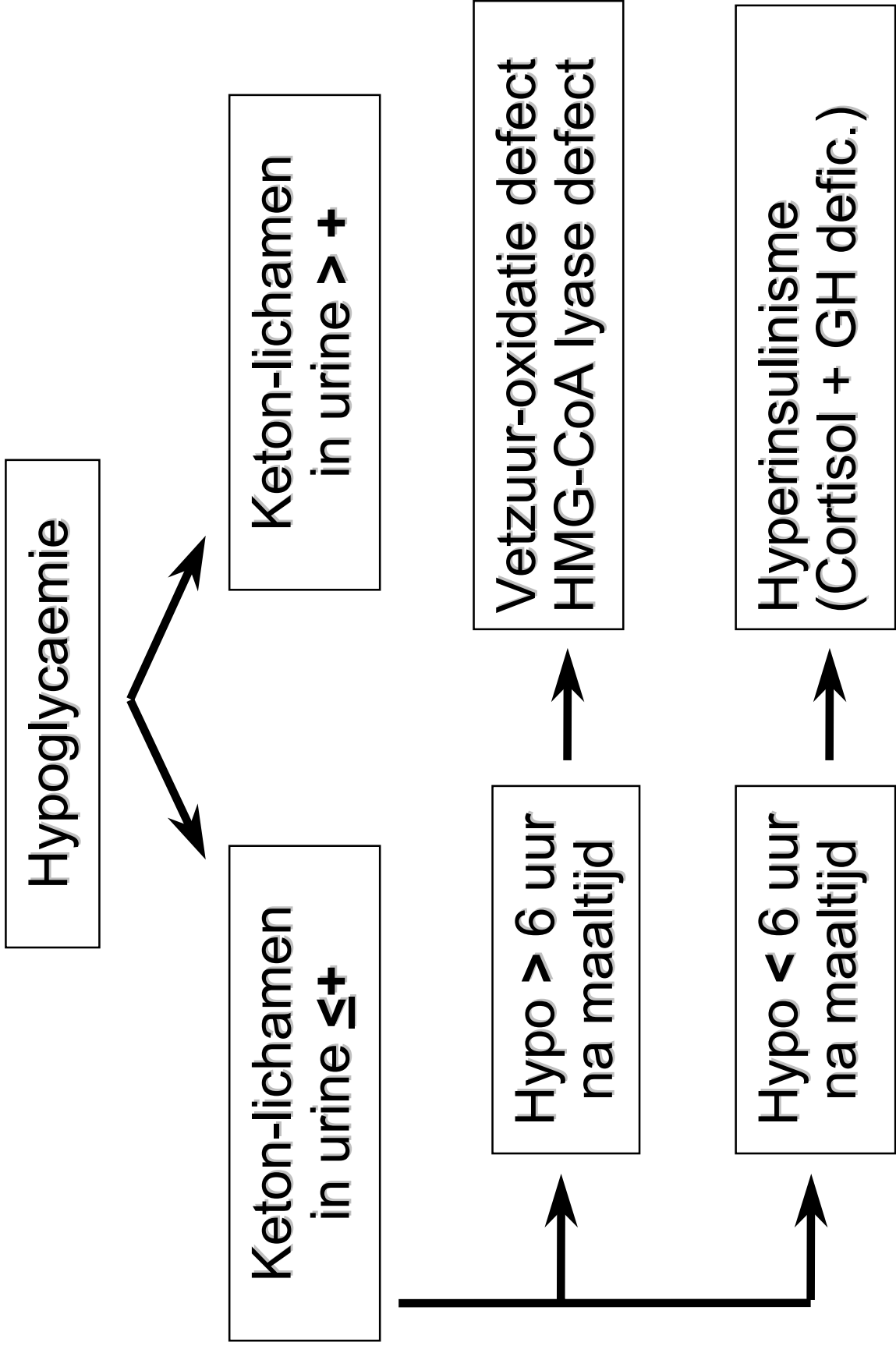
Staak bij onverklaarde encephalopathie en convulsies de eiwitintake, geef een royale vochtintake en een glucose infuus (7-10 mg glucose per kg per minuut) en corrigeer een eventuele acidose. Voor patiënten met leverfalen en cardiomyopathie zijn ondersteunende maatregelen om de symptomen van het orgaanfalen te bestrijden van het allergrootste belang.

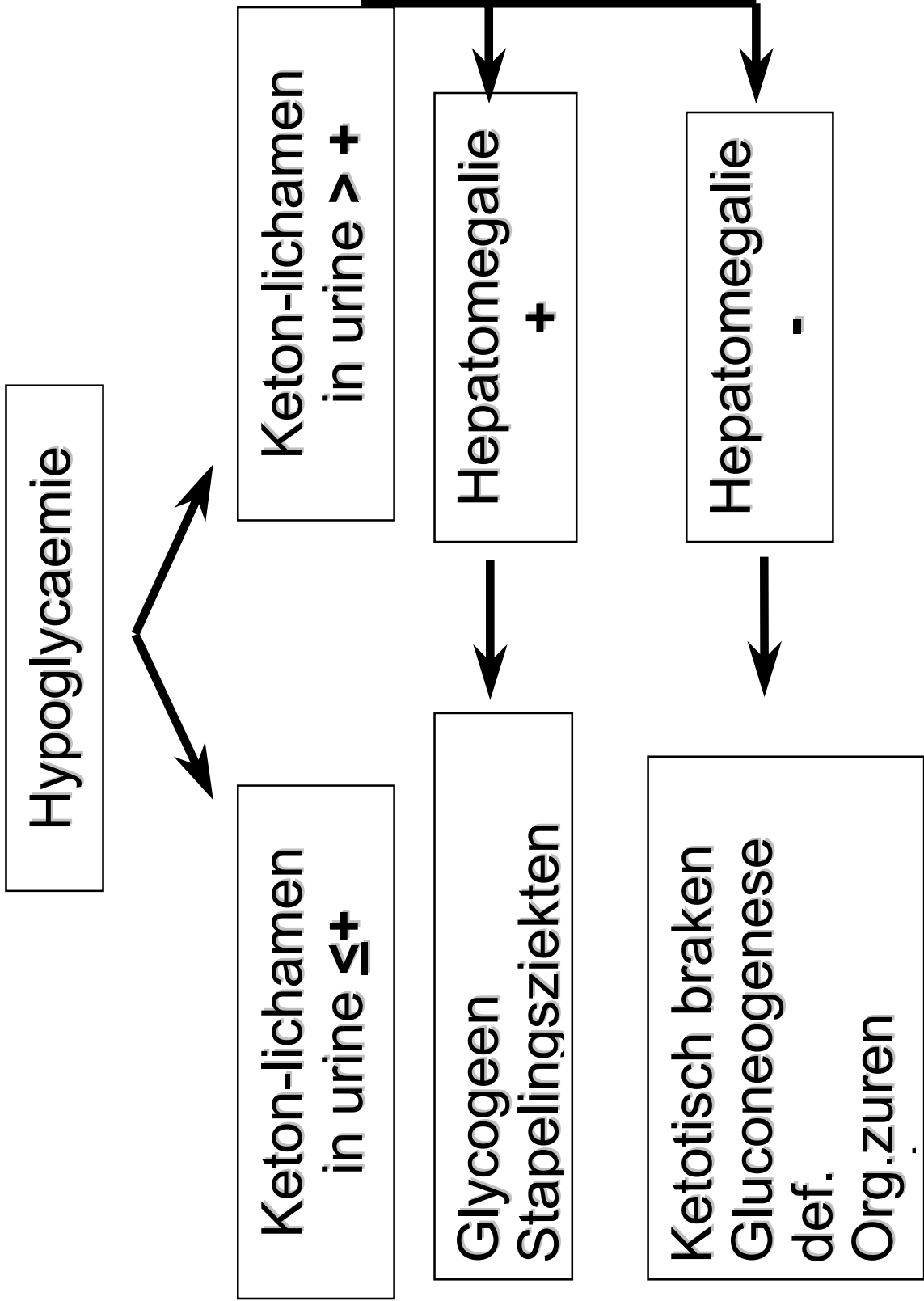
Ook voor zieke kinderen is het belangrijk het laboratoriumonderzoek cito te laten verlopen en regelmatig te herhalen, zodat een indruk verkregen wordt over de progressie van het ziektebeeld. Het definitieve behandelplan hangt af van de onderliggende diagnose en om deze reden zal voorrang verricht worden bij het uitvoeren van metabole diagnostiek bij bovenstaande categorieën van patiënten.

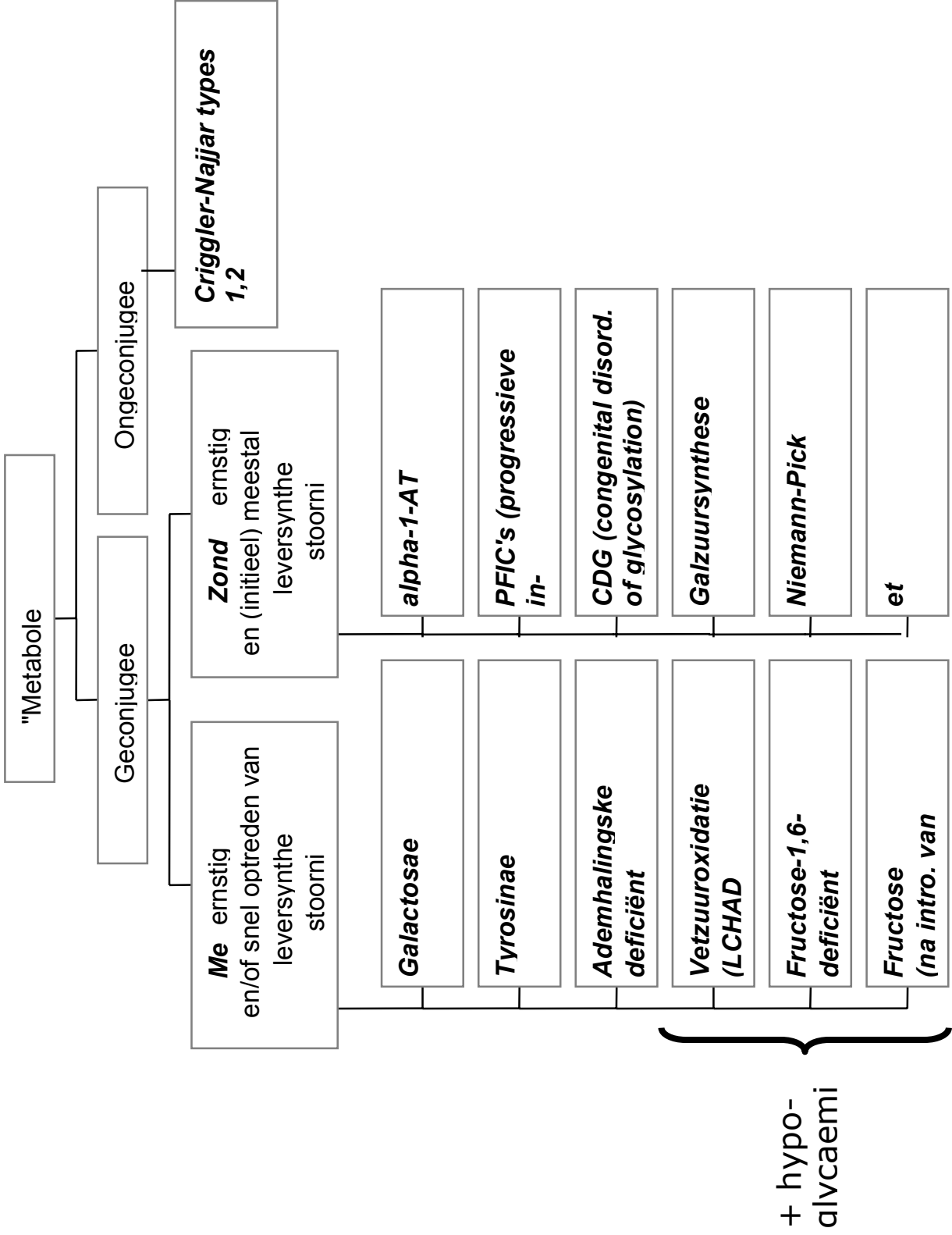
Conclusie

De afgelopen jaren is de prognose van patiënten met stofwisselingsziekten aanzienlijk verbeterd en dit hangt voor een groot deel samen met het vroeg onderkennen van metabole stoornissen en een agressieve behandeling van ontregelingen van het metabolisme. De eerste opvang, het initiëren van de juiste behandeling en snel komen tot een definitieve diagnose zijn voor de patiënt van levensbelang. Inmiddels rechtvaardigen de lange termijn prognoses voor de meeste metabole stoornissen de grote inspanningen die op de zuigelingen en kinderleeftijd gedaan moeten worden om de acute zieke patiënt te helpen.









Aanbevolen literatuur

J Fernandes, JM Saudubray, G van den Berge. Inborn metabolic diseases; diagnosis and treatment. Springer Verlag, 3^e editie, 2000.

GF Hoffmann et al. Inherited metabolic diseases, Lippincott, Williams & Wilkins, 1^e editie 2001.

TOEPASSING VAN TANDEM-MASSASPECTROMETRIE VOOR DE DIAGNOSTIEK VAN ERFELIJKE STOFWISSELINGSZIEKTEN

*A.H. van Gennip
Klinisch Chemicus EMZ
AZM Maastricht*

De laboratoriumdiagnostiek van erfelijke stofwisselingsziekten begon in 1908, toen Garrod in "The Croonian Lectures" veronderstelde dat congenitale alkaptonurie het gevolg was van het ontbreken van de activiteit van een speciaal enzym dat in gezonde personen zorgt voor de splitsing van de benzeenring van homogentisinezuur. Het ontbreken van de activiteit van dit enzym "homogentisinezuuroxidase" leidt tot ophoping van het zuur in diverse weefsels en urine, waar het onder invloed van polyphenoloxidasen polymeriseert tot een okerkleurig pigment (ochronosis). In 1958 werd Garrods theorie bevestigd door analyse van de activiteit van het betreffende enzym in de lever van alkaptonuriepatiënten. De door Garrod ontwikkelde filosofie dat veranderingen in de activiteiten van enzymen weerspiegeld worden in de metaboliëpatronen van de lichaamsvloeistoffen vormde de basis voor de laboratoriumdiagnostiek van erfelijke stofwisselingsziekten.

Patiënten met een erfelijke stofwisselingsziekte presenteren zich met een grote variatie van klinische symptomen. Vanwege dit brede klinische spectrum zijn multicomponent-analyse technieken het meest geschikt voor de diagnostiek. Voor dit doel zijn vele methoden beschikbaar als papier- en dunnelaag chromatografie, hoogspanningselectroforese, vloeistofchromatografie en gaschromatografie. De eerste 3 technieken zijn redelijk specifiek, maar niet kwantitatief en zeer tijdrovend. De beide andere technieken zijn kwantitatief en, door nieuwe kolomtechnologie, verbeterde pompen en verdere mechanisering, tegenwoordig redelijk snel. Door koppeling met detectiemethoden als diodearray en massaspectrometrie zijn ze ook specifiek. Vrij recent is een geheel nieuwe techniek beschikbaar gekomen voor onderzoek op metaboliënniveau, de tandem-massaspectrometrie.

Tandem-massaspectrometrie is een snelle, specifieke, gevoelige en kwantitatieve techniek, die de mogelijkheid biedt om analyses op verschillende manieren uit te voeren. Hierbij kunnen in één analyse vele metabolieten worden geanalyseerd en een groot aantal ziekten worden gedetecteerd. Er kunnen zowel vloeibare monsters worden gebruikt als filtreerpapierspots, waardoor postorderdiagnostiek gemakkelijk is. De techniek leent zich daarom goed voor zowel neonatale screening als voor screening van patiënten “at risk” voor een erfelijke metabole ziekte.

Een tandem-MS machine bestaat uit twee massaspectrometers verbonden door een botsingscel, dus drie quadripolen. Het gebruik van twee massaspectrometers biedt de mogelijkheid van meerdere scan procedures zoals een product- of dochterion spectrum, een voorloper- of ouderion spectrum, een “neutral loss” spectrum en “multiple reaction monitoring” (MRM). Bij een dochterionspectrum wordt MS-1 statisch gehouden en gebruikt voor de selectie van een moleculair ion, dat na botsing in de botsingscel een fragmentatiepatroon oplevert dat door MS-2 wordt opgenomen. Bij een ouderion spectrum is MS-2 statisch en selecteert een dochterion, terwijl MS-1 de moleculaire ionen registreert waaruit dit dochterion is ontstaan. Bij een “neutral loss” spectrum wordt in MS-1 een spectrum verkregen van alle ionen die in de botsingscel een neutraal fragment hebben verloren volgens registratie in MS-2. Bij MRM wordt gekeken naar een in MS-1 geselecteerd ion met een specifieke m/z waarde en een in MS-2 geselecteerd ion met een specifieke m/z waarde, dus naar een specifieke transitie tussen MS-1 en MS-2. In vele gevallen wordt tandem-MS gekoppeld aan een HPLC systeem, waarbij de HPLC pomp wordt gebruikt als injector. Bovendien kan het systeem dan, indien voorzien van een geschikte kolom, worden gebruikt voor het scheiden van metabolieten met dezelfde fragmentatie van elkaar en van interfererende ionen bijvoorbeeld zouten. Scheiding van interfererende ionen is van belang omdat die door quenching van het signaal de gevoeligheid voor de te analyseren metaboliet aanzienlijk kunnen verlagen. In sommige gevallen wordt een splitter gebruikt vóór dat het monster wordt geïntroduceerd in de probe van de tandem-MS. In onze laboratoria gebruiken

we Electro-Spray-Ionisation (ESI) om de te analyseren metabolieten te ioniseren. Voor kwantitatieve analyse worden stabiele isotopen van de te analyseren verbindingen gebruikt als interne standaarden. Zijn dergelijke standaarden niet beschikbaar dan wordt een interne standaard van een in het chromatogram qua retentietijd en chemische structuur verwante verbinding gebruikt voor calibratie.

Er zijn al methoden ontwikkeld voor de analyse van aminozuren en acylcarnitinen (Rashed et al.), voor totaal plasma homocysteïne (Abeling et al.), voor purinen en pyrimidinen (Ito et al.) voor fosfolipiden (Valianpour et al.), voor plasmenylethanolaminen (Vreken et al.), voor galzuren (Vreken et al.), voor carnitine biosynthese intermediaire metabolieten (Vaz et al.), voor zeer-lange-keten vetzuren (Johnson et al.), voor fytaanzuur en pristaanzuur (Kemp et al.), voor porfyrienen (Ford et al.), voor glycolipiden (Whitfield et al.), voor sterolen (Johnson et al.), voor hemoglobinen (Johnson et al.), voor hexose monofosfaten (Jensen et al.) en vele andere metabolieten. Afhankelijk van de toepassing kunnen verschillende lichaamsmaterialen worden geanalyseerd, zoals urine, plasma, liquor, weefsel- of celhomogenaten, maar ook in bloed- of urinespots op filtreerpapier. Alleen al in één bloedspot kunnen 32 verschillende erfelijke stofwisselingsziekten worden opgespoord: 15 aminoacidopathieën, 8 vetzuur-oxidatiedefecten en 9 organoacidemieën. De analyses, inclusief de dataverwerking, kunnen volledig geautomatiseerd worden uitgevoerd, hetgeen deze techniek zeer geschikt maakt voor de analyse van grote aantallen monsters zoals het geval is bij (neonatale) screening.

De procedures zijn relatief eenvoudig vergeleken met de klassieke methoden. Voor de analyse van het acylcarnitine profiel worden de noodzakelijke gedeutereerde interne standaarden (d₃-vrij carnitine, d₃-C₂- of d₃-C₃ carnitine, d₃-C₈- en d₃-C₁₆ carnitine toegevoegd aan plasma, bloedspot, weefsel of medium. Vervolgens wordt gebutyleerd en daarna geïnjecteerd in de tandem-MS machine. Er wordt een ouderion scan gemaakt door MS-1 van fragment m/z = 85+, dat wordt geselecteerd in MS-2. In de ouderionscan worden alle acyl-

carnitines gedetecteerd, omdat deze alle het fragment m/z 85 opleveren. Op analoge wijze kunnen de aminozuren worden geanalyseerd door een “neutral loss” scan van 102, 119 of 56. De methode is snel en kwantitatief. De voorbereiding van het monster kost ongeveer 30 tot 45 minuten en kan volledig worden geautomatiseerd; de analyse inclusief dataverwerking duurt ongeveer 2 minuten.

De analyse van acylcarnitines in plasma of bloedspots is zeer belangrijk voor de detectie van vetzuuroxidatiedefecten, die op andere wijze moeilijk zijn te detecteren. De vetzuur-CoA esters moeten alvorens zij het mitochondrium kunnen binnen gaan door carnitinepalmitoyltransferase-I (CPT-I) aan de buitenmembraan worden omgezet in de overeenkomstige acylcarnitine esters die door een translocase, dat zich bevindt tussen binnen- en buitenmembraan, het mitochondrium in worden getransporteerd. Nadat de acylcarnitines beide membranen zijn gepasseerd worden ze door CPT-II aan de binnenmembraan weer omgezet in acylCoA esters ten behoeve van de β -oxidatie. In geval van een deficiënt enzym van de β -oxidatie zal de accumulerende acylCoA ester weer worden omgezet in de corresponderende carnitine ester, die het mitochondrium kan verlaten en uiteindelijk in het bloed kan worden gedetecteerd. Op dezelfde manier als de accumulerende vetzuren worden ook accumulerende organische zuren omgezet in de corresponderende carnitine esters, waardoor ze polairder worden en gemakkelijker kunnen worden uitgescheiden. Het acylcarnitine profiel in plasma of bloedspot is relevant voor de diagnostiek van de volgende vetzuuroxidatiedefecten: deficienties van short-, medium- en very-long chain acylCoA dehydrogenase (SCAD, MCAD, VLCAD), long-chain hydroxyacylCoA dehydrogenase (LCHAD), carnitine- palmitoyl-transferase-I en -II (CPT-I en CPT-II), carnitine-acylcarnitine translocase (CAC) en multi-pele acylCoA dehydrogenase (MAD). De organoacidopathieën die kunnen worden opgespoord zijn: propion-, methylmalon- en isovaleriaan-acidemie; deficienties van β -methylcrotonyl CoA carboxylase, hydroxymethylglutaryl (HMG)CoA lyase, multi-pele carboxylase en β -ketothiolase; glutaraacidurie type I en type II.

In het gebutyleerde extract van de bloedspot kunnen behalve de acylcarnitines ook de aminozuren worden geanalyseerd. Een dergelijke aanpak is niet alleen geschikt voor neonatale screening, maar ook voor de citoscreening van ernstige zieke patiënten met een verdenking op een erfelijke metabole ziekte. De combinatie van tandem-MS analyse van plasma c.q. bloedspots en urine c.q. urinespots of in urine gedrenkte filtreerpapierstrookjes biedt mogelijkheden om een groot deel van het basisdiagnostiekpakket voor erfelijke metabole ziekten met tandem-MS uit te voeren. De kosten per monster zijn afhankelijk van het totaal aantal monsters dat wordt geanalyseerd, de kosten per geteste ziekte zijn afhankelijk van het aantal ziekten waarop getest wordt en het aantal monsters.

PROSPECTIVE NEONATAL SCREENING FOR INBORN ERRORS OF METABOLISM WITH TANDEM MASS SPECTROMETRY IN BAVARIA, GERMANY.

A Roscher¹, B Liebl², R Fingerhut³, B Olgemöller³

¹Children's Hospital Research Center, University of Munich, ²Public Health Screening Center, Oberschleissheim, Germany, ³Screening LABOR, Munich, Germany

The potential of MS-MS to be used for population newborn screening (NBS) was realized when it was demonstrated that butyl ester formation of numerous marker metabolites for amino acid, organic acid, and fatty acid disorders make these compounds amenable to soft ionization (electrospray) and subsequent analysis by MS-MS in a single analytical run [1,2]. This enables the presymptomatic identification of more than 20 inborn errors of metabolism (IEM) simultaneously, and this method is currently introduced into many NBS programs throughout the world [3,4].

Organization

The legal surroundings of NBS in Germany, requesting voluntary screening after written consent [5], enabled earlier utilization of this technology as compared to countries where NBS is mandated legally (UK, USA etc.). A prospective MS-MS-based NBS study was outlaid in Bavaria, Germany (125,000 births/year). Prior to the start in 1999 a consensus with legal, ethical, scientific and medical bodies was developed. Specific features were: Voluntary participation, written consent, extensive information policies, early screening (day 3), standardized operation under rigid quality assurance rules, laboratory accreditation and scientific surveillance and follow up. The organization comprises a public-private partnership with participation of universities (science, hot-lines), a central privat screening laboratory and the public health screening coordination center (information, tracking of results, register, surveillance) [6,7]

Disease selection

Since the technology enables to detect, in addition to phenylketonuria, multiple other disorders with only minor or no additional effort, the application of MS/MS in NBS challenged traditional screening criteria. and requires careful

considerations for disease selection [5,8]. Frequency of a disease was no longer considered an issue and harm/benefit weighing for aggregate disease collections was judged as a better handle for decision making than cost/benefit considerations for individual diseases.

Results

During 3½ years a total of 524.287 newborn were screening in Bavaria under the provisions of prospective study (participation rate 98.8%); additional 400.000 newborns from other parts of Germany were screened outside the controlled study. In Bavaria we identified confirmed cases of IEM that required treatment or counseling at a cumulative rate of 1 : 2.700 (out of 525.000 newborns). This rate is considerably higher than previously recognized by combined data from traditional NBS and high risk clinical screening of symptomatic patients in the same area. The major gain was achieved in the highly specific (<0.03% recall) and frequent (1 : 7.800) detection of treatable defects of fatty acid transport and mitochondrial oxidation (FATMO) with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency (59 cases) being most prevalent. Amino acid disorders, including classical phenylketonuria (PKU), maple syrup urine disease (MSUD) and others occurred slightly less frequent (1 : 11.000, not including mild non PKU hyperphenylalaninemia), while organic acid disorders (methymalonic-, propionic-, isovaleric-, glutaric acidemia type I, and 3-methylcrotonyl CoA carboxylase deficiency, 3-MCC) were found at a cumulative rate of 1 : 20.000.

Expanded NBS has also revealed that a high genetic and phenotypic variance might equally be present in some „new“ diseases as already experienced in traditional NBS for PKU and galactosemia. One example is 3-MCC, which turned out to be the most frequent organic acidemia detected by NBS (8 confirmed cases out of 525.000), though many of the cases are hoped to take a benign course. In three occasions the follow-up investigations revealed that the mothers of the infants are homozygous for the disease with no apparent clinical symptoms. Systematic genotyping of 3-MCC and MCAD patients detected by NBS was introduced to elaborate a scientific basis for prognostic counseling [9].

Asymptomatic disease detection in mothers as a consequence of following abnormal NBS results of infants was also observed in glutaric acidemia, type I and vitamin B₁₂ deficiency. Except for a case of hypertyrosinemia type I no false-negative cases were noted so far.

Technically the MS/MS NBS process needs to be restricted to the m/z ratios of marker metabolites that signify only predefined treatable inherited diseases. In contrast to high-risk screening the generation of ambiguous metabolite patterns must be minimized to achieve acceptable recall rates in the general newborn population. Due to the high-dimensional data sets produced by MS/MS this is difficult to achieve by traditional fixed cut-off values unless compromising on diagnostic sensitivity. A major advantage of MS/MS utilization in screening resides in its capability to indicate a particular disease by multiple markers simultaneously. This feature enables to greatly enhance diagnostic specificity for disease detection by suitable multivariant statistical methods [10]. We therefore developed a new data interpretation concept (multianalyte pattern recognition analysis) aiming at highest possible sensitivity while at the same time ensuring an overall low MS/MS related false-positive rate (<0.45%). As an example, the ratio of free carnitine to the sum of palmitoylcarnitine and stearoylcarnitine [C0/(C16 + C18)] turned out to be highly specific for carnitine-palmitoyl transferase type I (CPT-I) deficiency [11]. Obviously, the demands on analytical validation, reproducibility, quality assurance and proper interpretation are extraordinarily high and require further improvement and standardization. In the Bavarian prospective NBS study the requested criteria for proper technical performance (based on arginine, low concentrations of methionine, citrulline, and free carnitine) and/or for safe interpretation (based on ornithine, butyrylcarnitine) were not met for population screening.

Nevertheless, the overall highly favorable interim outcome data of the Bavarian model program [12] resulted in a general recommendation of German health authorities to introduce MS/MS in NBS as a „standard medical care” procedure provided that recommendations outlined by the National Screening Committee are followed [13]. The recommendations of this committee on disease selection at the present stage of development are depicted in the table.

Recommended Diseases (printed in bold, Category I) and
Conditionally Recommended Diseases (printed in plain, Category II)

	Diseases
Amino Acid Metabolism	Hyperphenylalaninemia (including Phenylketonuria, PKU) Maple syrup urine disease (MSUD)
	Hypertyrosinemia type I, II (HYPER TYR I, II) Citrullinemia (Argininosuccinic synthetase deficiency, ASS)
Fatty Acid Oxidation	Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency Long-chain-3-hydroxy acyl-CoA dehydrogenase (LCHAD) deficiency Very long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) deficiency
Carnitine Cycle	Carnitine-palmitoyl transferase type I (CPT-I) deficiency Carnitine-palmitoyl transferase type II (CPT-II) deficiency Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency (CACT)
Organic Acid Metabolism	Glutaric acidemia type I (GA-I) Isovaleric acidemia (IVA)
	Methylmalonic acidemia (MMA)
	Propionic acidemia (PA)
	3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency (3-MCC)

Category I refers to the diseases considered being sufficiently safe for inclusion in routine programs due to documented low burden by recall and presumed favorable benefit/risk relationship. Category II refers to those disorders that are encouraged to be further investigated in scientifically supervised programs with availability of specific expertise and follow-up resources.

References

1. Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clin Chem* 2003 Nov;49(11):1797-817.
2. Röschinger W, Olgemoller B, Fingerhut R, Liebl B, Roscher AA. Advances in analytical mass spectrometry to improve screening for inherited metabolic diseases. *Eur J Pediatr* 2003 Nov 13
3. Wilcken B, Wiley V, Hammond J, Carpenter K. Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. *N Engl J Med* 2003 Jun 5;348(23):2304-12.
4. Zytkovicz TH, Fitzgerald EF, Marsden D, Larson CA, Shih VE, Johnson DM, Strauss AW, Comeau AM, Eaton RB, Grady GF. Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: a two-year summary from the New England Newborn Screening Program. *Clin Chem* 2001 Nov;47(11):1945-55.
5. Liebl B, von Kries R, Nennstiel U, Muntau AC, Röschinger W, Olgemöller B, Zapf A, Roscher AA. Ethical and legal aspects in newborn screening. *Monatsschr Kinderheilkd* 2001; 149:1326-1335.
6. Liebl B, Nennstiel-Ratzel U, von Kries R, Fingerhut R, Olgemoller B, Zapf A, Roscher AA. Expanded newborn screening in Bavaria: tracking to achieve requested repeat testing. *Prev Med* 2002 Feb;34(2):132-7.
7. Liebl B, Nennstiel-Ratzel U, von Kries R, Fingerhut R, Olgemoller B, Zapf A, Roscher AA. Very high compliance in an expanded MS-MS-based newborn screening program despite written parental consent. *Prev Med* 2002 Feb;34(2):127-31.
8. Wilcken B. Ethical issues in newborn screening and the impact of new technologies. *Eur J Pediatr* 2003 Nov 14
9. Holzinger A, Roschinger W, Lagler F, Mayerhofer PU, Lichtner P, Kattenfeld T, Thuy LP, Nyhan WL, Koch HG, Muntau AC, Roscher AA. Cloning of the human MCCA and MCCB genes and mutations therein reveal the molecular cause of 3-methylcrotonyl-CoA: carboxylase deficiency. *Hum Mol Genet* 2001 Jun 1;10(12):1299-306.
10. Mendes P. Emerging bioinformatics for the metabolome. *Brief Bioinform* 2002; 3:134-145.
11. Fingerhut R, Roschinger W, Muntau AC, Dame T, Kreischer J, Arnecke R, Superti-Furga A, Troxler H, Liebl B, Olgemoller B, Roscher AA. Hepatic carnitine palmitoyltransferase I deficiency: acylcarnitine profiles in blood spots are highly specific. *Clin Chem*. 2001 Oct;47(10):1763-8.
12. Roscher AA, Fingerhut R, Liebl B, Olgemöller B. Expanded newborn screening using tandem mass spectrometry. *Monatsschr Kinderheilkd*. 2002; 149:1297-1303.
13. Harms E, Roscher AA, Grüters A, Heinrich U, Genzel-Boroviczény O, Rossi R, Schulze A, Zabransky S. Neue Screening-Richtlinien. *Monatsschr Kinderheilkd*. 2002; 150:1424-1429.

METABOLOMICS IN CLINICAL CHEMISTRY

*RA. Wevers
Klinisch Chemicus EMZ
UMC St Radboud*

Introduction

Genomics, proteomics and metabolomics refer to new technical approaches that have become available to study genes proteins and metabolites during the last decade. Each of these techniques provides a wealth of information at its own level. For metabolomic strategies NMR spectroscopy is often used. This lecture will show the use of NMR as a complementary technique to diagnose inborn errors of metabolism [1-3]. Proton NMR spectroscopy of body fluids shows the majority of proton-containing compounds. Therefore it provides an overall view on metabolism. In the diagnostics of hereditary metabolic diseases this is a great advantage compared to other techniques. NMR spectroscopy on body fluids may be considered as an alternative analytical approach for diagnosing known but also as yet unknown inborn errors of metabolism.

Background of body fluid proton NMR spectroscopy

Protons of a compound leave a characteristic fingerprint behind in the ^1H -NMR spectrum. Signals derive from all proton-containing small molecules. Several spectral parameters are useful for body fluid analysis. These are the peak area, the resonance position and the splitting of resonances. The peak area is important for quantification. The technique provides reliable quantitative data about proton-containing metabolites in the sample. Sensitivity is in the low micromolar range. The resonance position and the splitting pattern help identifying the compound and give structural information on the molecule. The signal from a particular proton or group of equivalent protons may consist of one or more peaks (=splitting) under the influence of its chemical environment. Singlet, doublet, triplet, quartet or multiplet resonances may occur. Figure 1 gives a schematic presentation of the NMR spectra of lactate and alanine to illustrate that molecules with a high degree of similarity can be observed as

separate resonances in the spectrum. The methyl groups of lactate and alanine show as doublet resonances. The proton from their methylene groups gives a quartet in the spectrum. The multiplicity is determined by the number of protons attached to neighboring carbon-atoms. The doublets originating from the methyl protons of lactic acid and alanine have a slightly dissimilar resonance position (0.10 ppm) caused by differences in the chemical environment of the methyl group in the two molecules (NH₂ group versus OH group). This explains how the two substances, in spite of their partial structural similarity, can be distinguished in the spectrum. Peak areas in the NMR spectrum are proportional to the concentration of a metabolite. The areas of the doublet and the quartet resonances are in the proportion of three to one, because three protons contribute to the signal of the methyl group against one proton of the methylene group.

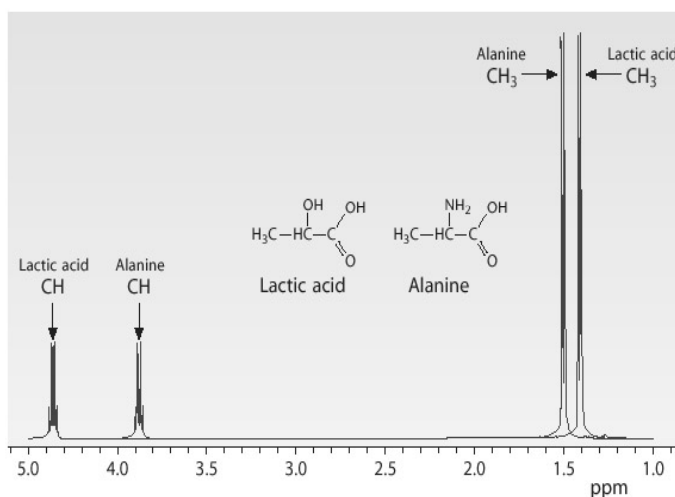


Fig. 1. ¹H-NMR spectrum of lactic acid and alanine illustrating the “fingerprint” of both molecules in the spectrum.

Potential of the method

Proton NMR spectroscopy of body fluids is a powerful new tool in diagnosing known and novel inborn errors of metabolism. Potentially it may replace some of the conventional diagnostic techniques in metabolic screening laboratories in future. At the moment the technique should be used mainly diagnostically in those cases where the metabolic specialist is convinced that a patient suffers from a metabolic disease but cannot find the diagnosis with conventional techniques. An important advantage of NMR spectroscopy over conventional techniques that are being used in basic screening of hereditary diseases is the non-selective character of the technique.

Table 1. Body fluid NMR spectroscopy

Indications
<p>Clinical There is a strong clinical suspicion that this patient has an as yet undiagnosed inborn error of metabolism:</p> <ul style="list-style-type: none">- Two or more children in the same family with unexplained similar clinical signs and symptoms.- Unusual body odour.- Unknown metabolite observed by in vivo NMR spectroscopy (or other technique).
<p>Biochemical There is a strong biochemical suspicion that this patient has an as yet undiagnosed inborn error of metabolism:</p> <ul style="list-style-type: none">- An abnormal unknown metabolite (μmolar range or higher) observed repeatedly in body fluids with other technique. Medication as origin of this metabolite has already been excluded. As the NMR spectrum also contains structural information on metabolites it may be possible to derive the structure of the compound directly from the NMR spectrum.- Confirmation of a special diagnosis with an independent technique.- Reliable quantification of a metabolite that otherwise is difficult to quantify.

Indications for NMR spectroscopy

Optimal results from NMR analysis of body fluids requires close cooperation between the referring clinician or chemist and the NMR spectroscopy group. Detailed information on the patient and the medication of the patient should be provided to result in an optimal interpretation of the NMR data. As the available measurement time on the NMR machines is limited samples can only be accepted on specific clinical or biochemical indications (Table 1).

Sample choice, sample preparation and measurement

Traditionally urine is the body fluid of choice to find the way towards the diagnosis in inborn errors of metabolism. Often urine is used as a first approach. Urine NMR spectra are very complex. Moreover, some metabolites are rapidly excreted but others remain preferentially in the blood. In relevant cases it is advised also to investigate the serum (or heparinised plasma). It may be necessary to use CSF in diseases affecting the central nervous system. Minimal sample volumes require 1 ml for all body fluids.

For a proper interpretation of the spectrum, the request to do NMR spectroscopy should include information on the medication. As the technique requires no derivatisation or extraction there is no loss of metabolites in sample pretreatment. Sample preparation is limited to the removal of proteins from serum and CSF samples on a 10 kD filter, pH standardisation of samples and

addition of an internal standard.

The measurement itself requires adjustment per sample of the magnetic field in order to achieve good homogeneity (“shimming”). Automatic sample changers and automatic shimming programs take care of efficient measurement of larger series of samples. The actual measurement takes up about 30 minutes. The signal is recorded by the computer and can be further analyzed later on by means of software programs that have been especially designed for this purpose. The software required to interpret a spectrum of a body fluid and to quantify it has not yet been developed to the level of complete automation.

The resulting spectrum and its interpretation

In complex matrices like body fluids many resonances will be present in the NMR spectrum. The spectrum provides an overall view on metabolism. Basically, all proton containing small molecules (MW<500) can be observed with proton NMR spectroscopy. Under the conditions used, however, –NH₂ and –COOH protons may actually be NMR-invisible as they exchange rapidly. Protons from proteins and from molecules that are protein bound are also largely invisible. It is impossible to give a full list of metabolites that can be observed in body fluid NMR spectra. For various body fluids such lists are available in literature [4–7]. Typically spectra from urine samples contain well over 300 resonances while the number of resonances in a CSF sample is limited to approximately 100. At least 50 compounds were identified in CSF samples. From NMR spectra it could be concluded that 3-hydroxyisovaleric acid turned out to be a normal constituent of CSF samples. Up till now this has been unknown [6]. In this way ¹H-NMR spectroscopy provides new insight. The spectrum (Fig. 2) is an example of a normal CSF. The right panel magnifies part of the spectrum showing more details of that specific part.

Table 2 summarizes the metabolites that are observed with NMR in more than 50% of the samples in a body fluid *and* remain undetected when routine metabolic screening techniques are applied. It is assumed that routine screening comprises measurement of 1. Urine: organic acids, amino acids, purines and pyrimidines, monosaccharides and polyols, mucopolysaccharides,

oligosaccharides; 2. Plasma: aminoacids, carnitine (esters), glucose, lactate, pyruvate; 3. CSF: amino acids and glucose.

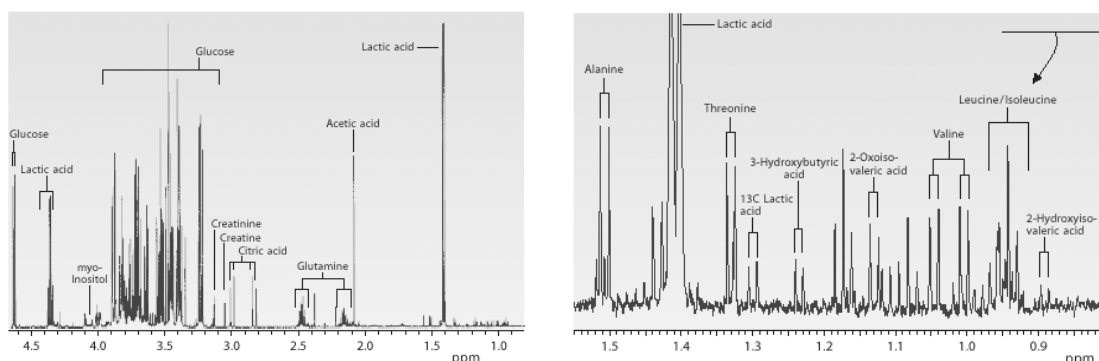


Fig. 2. A normal proton NMR spectrum (600 MHz) of cerebrospinal fluid. *Left panel:* overall view; *right panel:* expanded view of a part of the spectrum.

Table 2. Metabolites observed with NMR in more than 50% of the samples in a body fluid which may be undetectable with routine metabolic screening techniques.

Urine	Plasma	Cerebrospinal fluid
2-Oxoisovaleric acid	2-Hydroxyisovaleric acid	2-Hydroxyisovaleric acid
Dimethylamine	2-Oxoisovaleric acid	2-Oxoisovaleric acid
Dimethylglycine	3-Hydroxyisovaleric acid	3-Hydroxybutyric acid
Creatine	Acetoacetic acid	3-Hydroxyisovaleric acid
Creatinine	Citric acid	Acetoacetic acid
Choline	Creatine	Citric acid
Carnitine (esters)	Creatinine	Creatine
Betaine		Creatinine
Trimethylamine N-oxide		Choline
1-Methylnicotinamide		Myoinositol
Allantoin		N-acetylneuraminic acid (tentative)
Urocanic acid		Glycolic acid
Indoxyl sulphate		Ascorbic acid
		Lactate
		Pyruvate

Quantification, sensitivity and reproducibility

Quantification of a metabolite can be performed by adding an internal standard to the sample (plasma and CSF). In practically all studies trimethylsilyl-2,2,3,3-tetradeuteriopropionic acid (=TSP), which provides a singlet resonance from 9 equivalent methyl-protons, is used as such. Metabolites in urine can be expressed per creatinine without using an internal standard. For various compounds good correlations have been obtained with conventional techniques. The sensitivity obtained with 1 H-NMR spectroscopy depends on the strength of the magnetic field that is available. It depends on the number of protons contributing to the resonance(s) and on the multiplicity of the

resonance. Furthermore the region of the spectrum where the compound resonates and the measuring time play a part. Examples of the sensitivity level that can be reached are (600 MHz apparatus and 30 min measuring time per sample): 2 $\mu\text{mol/L}$ for betaine (singlet, 9 protons), 10 $\mu\text{mol/L}$ for lactic acid (doublet, 3 protons) and 30 $\mu\text{mol/L}$ for glucose (doublet, one proton). For molecules where the detection relies on a multiplet resonance the sensitivity may be significantly lower. A representative coefficient of variation has a value of 2.5% (1.2 mmol alanine/l).

NMR spectroscopy in inborn errors of metabolism

NMR spectroscopy on body fluids can be successfully applied to diagnose more than 60 of the known inborn errors of metabolism including most organoacidurias, aminoacidurias and diseases in purine- and pyrimidines metabolism. A list of diseases that can be diagnosed is available on <http://www.azn.nl/fmw/neuro/lab/chem/nmr.htm>

NMR spectroscopy can be used to find inborn errors of metabolism characterised by the presence of metabolites that cannot be detected with conventional screening methods. Trimethylaminuria or “fish odour syndrome” may serve as an example [8]. It is a hereditary disease based on an enzyme deficiency in the liver. Trimethylamine (=TMA) derives from bacteria that convert it from dietary choline. Normally there is an enzyme in the liver that oxidizes TMA efficiently. TMA and trimethylamine N-oxide (=TMAO) are both secreted in the urine. TMA has the smell of rotten fish causing a social problem for the patient. Until recently no technique could measure TMA and TMAO simultaneously to prove this deficiency at the metabolic level. This is very well possible with NMR spectroscopy.

Until now in vitro NMR spectroscopy was used in the detection of three novel inborn errors of metabolism. These are dimethylglycine dehydrogenase deficiency [9], ureidopropionase deficiency [10] and a defect in polyolmetabolism where increased arabitol and ribitol characterise this disease at the metabolite level [11,12]. The characteristic metabolites in these diseases cannot be picked up with conventional screening techniques (dimethylglycine,

ureidopropionic acid, ureidoisobutyric acid) or can only be detected with techniques that are not commonly used in metabolic screening laboratories (the detection of arabitol and ribitol requires GC of monosaccharides and polyols). The urine NMR spectrum in Fig. 3 shows the characteristic resonances of dimethylglycine in dimethylglycine dehydrogenase deficiency (Fig. 3: left panel) and of both ureidocompounds in ureidopropionase deficiency (Fig. 3: right panel). The examples of these novel diseases clearly illustrate the advantage of the non-selective character of NMR spectroscopy and the power of the overall view on metabolism that it provides. Conventional techniques used in the screening for inborn errors of metabolism provide information on roughly 15–20% of metabolites known to play a role in human metabolism. Considering that most of the other metabolites actually contain protons that make them visible with NMR, it is to be expected that NMR spectroscopy will be able to open new perspectives for the field of inborn errors of metabolism.

In case a high concentration of an unknown metabolite is found with conventional screening techniques proton NMR spectroscopy may help to identify the compound. The ¹H-NMR spectrum contains structural information on the molecules in the sample. Of course medication will first have to be excluded as a source. In such cases the 1-dimensional NMR spectrum already may help to identify the unknown. Additional two-dimensional NMR techniques are available and may be used for further structure analysis.

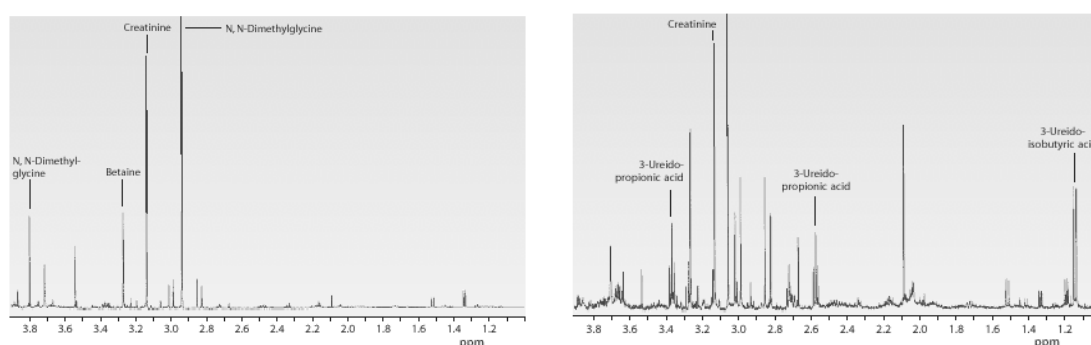


Fig. 3. NMR spectra of urine from patients with dimethylglycine dehydrogenase deficiency (left panel) and ureidopropionase deficiency (right panel).

References

1. Bell JD, Brown JCC, Sadler PJ. NMR studies of body fluids [Review]. *NMR Biomed* 1989;2:246–256.
2. Lehnert W, Hunkler D. Possibilities of selective screening for inborn errors of metabolism using high-resolution ¹H-FT-NMR. *Eur J Pediatr* 1986;145:260–266.
3. Nicholson JK, Wilson ID. High resolution proton magnetic resonance spectroscopy of biological fluids. *Prog NMR Spectrosc* 1989;21:449–501.
4. Foxall PJ, Spraul M, Farrant RD, Lindon LC, Neild GH, Nicholson JK. 750 MHz ¹H-NMR spectroscopy of human blood plasma. *J Pharmaceut Biomed Anal* 1993;11: 267–276.
5. Wevers RA, Engelke U, Heerschap A. High-resolution ¹H-NMR spectroscopy of blood plasma for metabolic studies. *Clin Chem* 1994;40:1245–1250.
6. Wevers RA, Engelke U, Wendel U, de Jong JGN, Gabreëls FJM, Heerschap A. Standardized method for high-resolution ¹H-NMR of cerebrospinal fluid. *Clin Chem* 1995;41:744–751.
7. Lindon JC, Nicholson JK, Everett JR. NMR spectroscopy in body fluids. *Ann reports on NMR spectroscopy* 1999;38:1–88.
8. Abeling NGGM, van Gennip AH, Bakker HD, Heerschap A, Engelke U, Wevers RA. Diagnosis of a new case of trimethylaminuria using direct proton NMR spectroscopy of urine. *J Inher Metab Dis* 1995;18:182–184.
9. Moolenaar SH, Poggi-Bach J, Engelke UFH, Corstiaensen JMB, Heerschap A, de Jong JGN, Binzak BA, Vockley J, Wevers RA. Defect in dimethylglycine dehydrogenase, a new inborn error of metabolism: NMR spectroscopy study. *Clin Chem* 1999;45:459–464.
10. Moolenaar SH, Göhlich-Ratmann G, Engelke UFH, Spraul M, Humpfer E, Dvortsak P, Voit T, Hoffmann GF, Bräutigam C, van Kuilenburg AB, van Gennip A, Vreken P, Wevers RA. Beta-ureidopropionase deficiency: a novel inborn error of metabolism discovered using NMR spectroscopy on urine. *Mag Res Med* 2001;46:1014–1017.
11. Knaap MS van der, Wevers RA, Struys EA, Verhoeven NM, Pouwels PJ, Engelke UF, Feikema W, Valk J, Jakobs C. Leukoencephalopathy associated with a disturbance in the metabolism of polyols. *Annals of Neurology* 1999;46:925–928.
12. Moolenaar SH, van der Knaap MS, Engelke UFH, Pouwels PJW, Janssen-Zijlstra FSM, Verhoeven NM, Jakobs C, Wevers RA. In vivo and in vitro NMR spectroscopy reveal a putative novel inborn error involving polyol metabolism. *NMR Biomed*. 2001;14:167–176.

DNA CHIPS EN MICRO-ARRAYS: WERKINGSPRINCIPE EN TOEPASSINGEN

*J. T. den Dunnen
Biochemicus*

Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden

DNA array technieken maken gebruik van verzamelingen DNA moleculen die in grote dichtheid zijn aangebracht op een vaste drager. De recente ontwikkeling van deze technieken biedt het huidige onderzoek en de diagnostiek een revolutionaire nieuwe mogelijkheid om de bestaande vraagstellingen te benaderen en dat op een schaal waarvan men tot voor kort alleen maar kon dromen. De techniek is gebaseerd op het principe van hybridisatie: het gegeven dat DNA bestaat uit twee unieke complementaire strengen die het vermogen hebben elkaar terug te vinden. In dit geval wordt de ene streng, de "probe", aangebracht op de array en de andere streng, de "target", gehaald uit het te onderzoeken monster. De target wordt voorzien van een detecteerbare marker. Na hybridisatie van de target op de probe-array kan m.b.v. een scanner bepaald worden of er een complementaire DNA streng op de array gebonden heeft, en dus in het te analyseren monster aanwezig was. Vaak wordt hierbij gebruik gemaakt van een "twee-kleuren methodologie", d.w.z. de target bestaat uit een mengsel van twee verschillend gemarkeerde monsters. Eén is afkomstige van een controle (normaal) monster, het andere van een te analyseren monster (aangedaan). De controle wordt gemarkeerd met een groen, het te onderzoeken monster met een rood label. Na hybridisatie geeft alles wat niet geel is (d.w.z. een even sterk rood als groen signaal geeft) aan of er verschillen tussen de monsters bestaan en waar deze zich bevinden. De sterkte van het signaal is een maat voor de concentratie van de target in het uitgangsmonteer.

Binnen de micro-array technologie wordt onderscheid gemaakt tussen DNA-chips en DNA micro-arrays. **DNA-chips** hebben een oppervlak van 1,28 x 1,28 cm waarop via een fotolithografisch proces een enorm aantal korte, onderling verschillende DNA-strengen ("oligonucleotiden") zijn gesynthetiseerd; momen-

teel tot zo'n 1,000.000 met een lengte van 25 nucleotiden. DNA-chips worden geproduceerd door de firma Affymetrix. Het aantal verkrijgbare chips is de laatste jaren sterk gegroeid.

DNA micro-arrays worden geproduceerd via een gerobotiseerd proces waarbij een DNA-bevattende oplossing m.b.v. een "arrayer" op een glazen drager wordt gedeponereerd; momenteel tot een dichtheid van ongeveer 1.000 per cm², meestal PCR-fragmenten of oligonucleotiden. Het aantrekkelijke van de micro-arrays is dat men ze zelf kan maken. Dit geeft een enorme flexibiliteit voor de samenstelling ervan en dus voor het ontwerpen van vrij goedkope op een specifieke vraagstelling gerichte arrays.

De DNA chip en micro-array technologie staat nog in de kinder-schoenen, maar het aantal toepassingen is zich stormachtig aan het ontwikkelen. We onderscheiden o.a. arrays voor mutatiedetectie (re-sequencing en genomic arrays), genexpressie analyse, genotyperingen en weefsel-analyse.

Mutatiedetectie

Voor het opsporen van mutaties in DNA monsters met behulp van micro-arrays onderscheiden we twee typen; de "re-sequencing arrays" voor het opsporen van puntmutaties en de "genomic arrays" voor het opsporen van kwantitatieve veranderingen (deleties en duplicaties / amplificaties).

Re-sequencing arrays bevatten grote aantallen oligonucleotiden die de normale sequentie van een bepaald gen bestrijken. Hierop wordt DNA van het te onderzoeken monster gehybridiseerd, meestal een m.b.v. PCR verkregen product. Of de normale en/of een veranderde sequentie in het monster aanwezig is, kan op verschillende manieren worden bepaald. De hybridisatie op zich kan als maat genomen worden; signaal wil zeggen de sequentie is aanwezig, geen signaal wil zeggen de sequentie is afwezig. Een nieuwere methode is de zogenaamde mini-sequencing of "Sequencing By Extension (SBE)". Hierbij wordt na hybridisatie op de array een één-staps sequentie reactie uitgevoerd; signaal geeft wederom aan de sequentie is aanwezig.

De genomic arrays zijn bedoeld om kwantitatieve veranderingen in het genomische DNA op te sporen. Hiervoor worden zoveel mogelijke verschillende stukken DNA uit het genoom op de array gebracht, meestal in de vorm van DNA geïsoleerd uit PAC-, BAC- of cosmid klonen van het te onderzoeken organisme. Op deze array wordt via de twee-kleuren methode een mix gehybridiseerd van DNA van het te onderzoeken monster (in rood) en een controle (in groen); een signaal met teveel groen wijst op een deletie, met teveel rood op een duplicatie / amplificatie.

Genotypering

Een recentere ontwikkeling is de toepassing van micro-arrays voor genotyperingen (linkage- en associatiestudies). Deze arrays zijn gebaseerd op het gebruik de zogenaamde "Single Nucleotide Polymorphisms". SNP's zijn frequent in de populatie voorkomende één basepaar veranderingen in de DNA- volgorde van verschillende individuen. Meestal bevinden deze veranderingen zich in de niet eiwit-coderende delen van het genoom (intergene gebieden en intronen) en hebben ze geen enkel fenotypisch gevolg. Op een "genotyping array" worden grote hoeveelheden van deze SNP's gezet en vervolgens wordt deze gehybridiseerd met DNA van de te onderzoeken monsters. Het genereren van het signaal wordt gedaan zoals beschreven bij de re-sequencing; direct door hybridisatie of door een één-staps verlenging op de array. Uit het signaal wordt de aanwezigheid van één of beide allelen afgeleid (homo- of heterozygoot). Een vergelijking van het genotype tussen de verschillende monsters dient aan te geven of er een verband bestaat met een bepaald fenotype. Het enorme voordeel array-gebaseerde genotypering is natuurlijk dat in één keer op (tien)duizenden plaatsen tegelijkertijd een bepaling wordt gedaan.

Expressie analyse

De meest populaire toepassing van de array technologie is de "expression array". Hierbij worden op de array probes aangebracht voor duizenden verschillende genen. Door nu uit cellen RNA te isoleren, dit fluorescent te

markeren en op de array te hybridiseren kan men de expressie van vele duizenden genen tegelijkertijd meten. Wanneer hierbij de twee-kleuren methodiek wordt toegepast levert dit direct een algeheel overzicht op van de verschillen in genexpressie in de twee gebruikte monsters. Daarnaast is de intensiteit van het signaal een maat voor de hoogte van de genexpressie.

In vergelijking met bestaande technieken om genexpressie te meten zorgt de expressie array voor een werkelijk revolutionaire ontwikkeling. Ineens is men in staat om door middel van één simpele hybridisatie een volledig overzicht te krijgen van het "transcriptoom", de expressiestaat waarin een cel zich op het moment van monsteren bevindt. De verwachting is dat hieruit op termijn valt af te leiden welke genetische veranderingen de oorzaak zijn van verstoringen van het normale functioneren van een cel, alsmede aan welke externe invloeden (omgevingsfactoren) de cel recent heeft blootgestaan. In de eerste plaats zal deze kennis, d.w.z. het expressie-patroon op zich, gebruikt kunnen worden als diagnosticum; in welke categorie valt deze verstoring, dus om welke invloed (aandoening) gaat het. De tweede stap is het expressiepatroon te koppelen aan opgebouwde gegevens van behandeling en succes daarvan. Zijn deze data verzameld dan kan men zoeken naar overeenkomsten tussen expressiepatroon en succes van behandeling en, indien gevonden, daarvan voor nieuwe gevallen gebruik maken om de beste behandeling te kiezen. Naarmate de kennis over de interacties die tussen de verschillende cellulaire pathways bestaan toeneemt, kunnen we de verstoring gaan begrijpen en daaruit uiteindelijk direct afleiden hoe het probleem aan te pakken, de aandoening te behandelen en/of genezen.

Weefsel analyse

In vergelijking met de bovengenoemde arrays is de "tissue array" van een heel ander type. Op de tissue array worden monsters van verschillende weefsels in grote dichtheid aangebracht, tot een 1000 op een objectglaasje. Vervolgens worden deze gebruikt om DNA, RNA of eiwitmoleculen te detecteren waarvan men wil weten of ze in afwijkende hoeveelheden voorkomen of op afwijkende

plaatsen aanwezig zijn. Met deze techniek is vooral ervaring opgedaan bij de analyse van monsters uit tumoren, met name om na te gaan of bepaalde veranderingen frequent voorkomen en dus als diagnostische marker gebruikt kunnen worden. Een interessante combinatie hierbij is het analyseren van de genomische of expressie arrays in combinatie met de tissue array.

Een zeer recente ontwikkeling is de **protein-array** (de eiwit-chip). Op deze array worden geen DNA moleculen aangebracht maar eiwitten, meestal antilichamen. Het werkingsprincipe hier is hetzelfde als dat van de DNA-array allen werken we hier met eiwitten uit het monster (target) die aan eiwitten op de array (probes) binden. Het idee is deze arrays te gebruiken voor allerlei eiwit-bindingstudies op grote schaal. De meest in het oog springende toepassing daarvan is die waarbij op de array antibodies staan, ieder gericht tegen één van alle genen (eiwitten). Met een fluorescent gemarkeerd eiwitextract kan men dan vergelijkbare studies doen als met RNA-extracten op een DNA-array.

De micro-array technologie is een jonge technologie. Dit heeft verschillende gevolgen. In de eerste plaats is daar het kostenaspect - alles wat nieuw is, is relatief duur en veroudert zeer snel. Naast de kosten voor de aanschaf van het instrumentarium, ligt het kostbaarste onderdeel van de chip-technologie met name in de aanschaf van de chips (disposables) terwijl deze bij de micro-arrays ligt in de aanschaf van de te gebruiken probe-collecties (oligonucleotiden en DNA-bibliotheken) en de logistiek verbonden aan het opwerken daarvan (10,000^{en} DNA-isolaties, PCR's en opzuiveringen). Dit betekent in de praktijk dat men voor het gebruik van de techniek in het begin vooral aangewezen is op facilitaire services, bijv. via het Leiden Genome Technology Center (LGTC - <http://www.LGTC.nl/>).

Een tweede niet onbelangrijk aspect ligt in de verwerking van de gegevens; het werken met en analyseren van (tien)duizenden datapunten. De hiervoor noodzakelijke kennis en software (BioInformatica) kent enorme beperkingen en is nog grotendeels in ontwikkeling. Met name bij het analyseren van de data

verkregen met de expressie-arrays, komen deze beperkingen prominent aan het licht. Het is zeer moeilijk een goed overzicht te krijgen van het eigenlijke "resultaat" en om de gevonden verschillen op waarde te schatten; met welk gegeven ga je het eerste verder?

Deze nascholingsdag is mede mogelijk gemaakt door financiële ondersteuning van Menarini, Waters en Sigma-Tau