

Overzichten

Het Smith-Lemli-Opitz syndroom: een stoornis in de cholesterol biosynthese

P.E. JIRA¹, J.G.N. de JONG², M. de METZ³, C.M. AALFS⁴, R.C.M. HENNEKAM⁴, R.J.A. WANDERS⁵, J.A.M. SMEITINK¹ en R.A. WEVERS²

Het Smith-Lemli-Opitz syndroom (SLOS) wordt veroorzaakt door een blok in de laatste stap van de cholesterol biosynthese, de omzetting van 7-dehydrocholesterol naar cholesterol. SLO-patiënten hebben een sterk verlaagde 7-dehydrocholesterol- Δ^7 -reductase activiteit resulterend in lage plasma- en weefsel cholesterolconcentraties met hoge concentraties 7-dehydrocholesterol. Kenmerkende fenotypische afwijkingen zijn mentale retardatie, een afwijkend karakteristiek gelaat, orgaan-, geslachts-, en extremiteitsafwijkingen. De diagnose wordt bij SLO patiënten gesteld door middel van gaschromatografische sterolanalyse van het plasma. In sommige gevallen kan een laag plasma cholesterolgehalte al richtinggevend zijn al sluit een laag normaal cholesterolgehalte de diagnose niet uit. Prenatale diagnostiek in vruchtwater en chorion villi is mogelijk. Methoden om Δ^7 -reductase enzymactiviteit en de cholesterolbiosynthese snelheid vanuit gelabeld acetaat te meten in gekweekte fibroblasten zijn ontwikkeld. Daarnaast worden in dit artikel pathofysiologische aspecten en behandelingsmogelijkheden van het SLOS besproken.

Trefwoorden: Smith-Lemli-Opitz syndroom; 7-dehydrocholesterol; cholesterol; diagnose

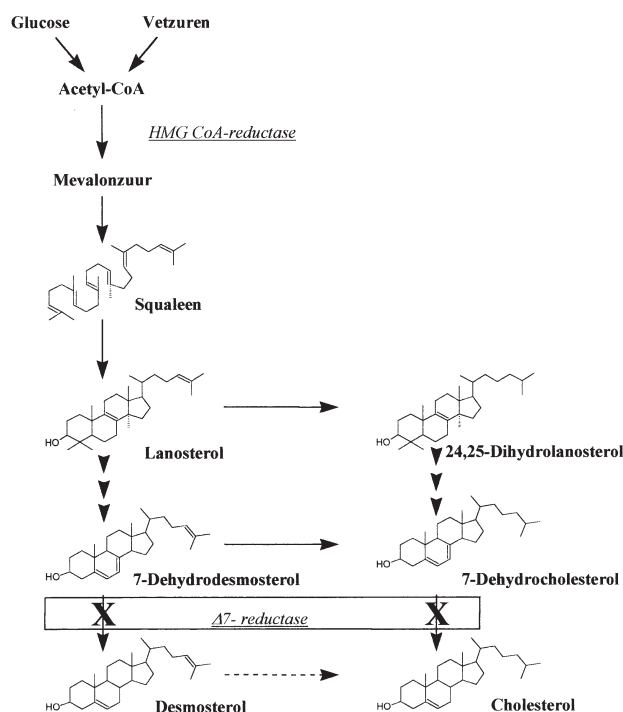
In 1964 beschreven Smith, Lemli en Opitz 3 niet-verwante jongens met opvallend overeenkomstige kenmerken, waaronder mentale retardatie, een karakteristiek gelaat, microcephalie, groeiretardatie en afwijkingen aan de extremiteiten en genitaliën (1). In de literatuur zijn inmiddels ruim 120 patiënten met dit autosomaal recessief overervende ziektebeeld beschreven. De incidentie wordt geschat op 1:20.000 tot 1:40.000 levendgeboren kinderen. Recent werd aangetoond dat het SLO-syndroom ver-

Academisch Ziekenhuis Nijmegen, Afdeling Kindergeneeskunde: Metabole ziekten¹, Laboratorium voor Kindergeneeskunde/Neurologie²; Canisius Wilhelmina Ziekenhuis Nijmegen, Klinische Chemie³; Academisch Medisch Centrum Amsterdam, Instituut voor Antropogenetica⁴, Klinische chemie⁵

Correspondentie: Dr. R.A. Wevers, Academisch Ziekenhuis, Laboratorium voor Kindergeneeskunde/Neurologie, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen
Ingekomen: 21.05.97

oorzaakt wordt door een deficiëntie van het laatste enzym in de cholesterol biosynthese: het 7-dehydrocholesterolreductase (figuur 1). Dit geeft aanleiding tot een verlaagde concentratie van cholesterol in combinatie met een sterk verhoogde spiegel van de directe voorloper van cholesterol, het 7-dehydrocholesterol (7-DHC) in plasma en weefsels (2-4). Naast 7-dehydrocholesterol is bij SLO-patiënten de isomere vorm 8-dehydrocholesterol (8-DHC) aantoonbaar (5). De ontdekking van het metabole defect bij het SLO-syndroom heeft belangrijke diagnostische, pathogenetische en therapeutische implicaties en zal leiden tot een grotere kennis omtrent het cholesterolmetabolisme in het algemeen.

Cholesterol vormt een belangrijke structurele component van celmembranen en celorganellen en speelt tevens een essentiële rol bij het metabolisme van vitamine D, galzuren, myeline, geslachtshormonen, mineraal- en glucocorticoïden.



Figuur 1. Schematisch overzicht van de cholesterolbiosynthese bij de mens. Door het ontbreken van het enzym Δ^7 -dehydrocholesterolreductase, dat 2 verschillende synthesesreacties katalyseert, is bij patiënten met het Smith-Lemli-Opitz-syndroom de cholesterolbiosynthese geblokkeerd (doorgekruiste pijlen).

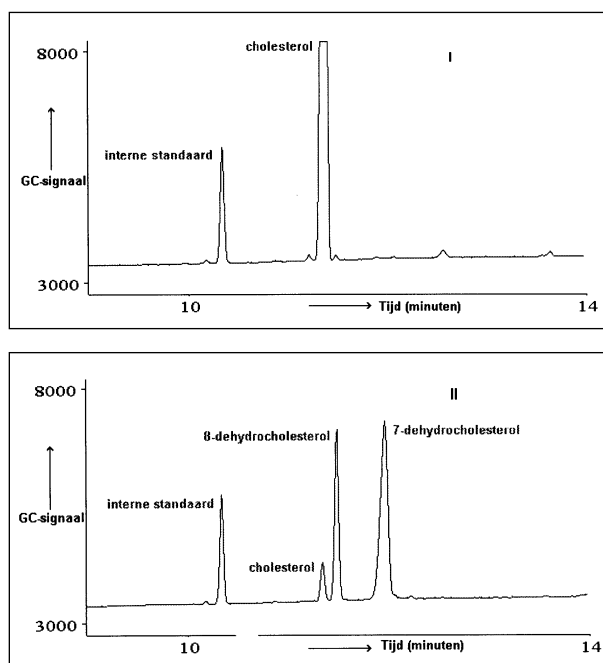
Tabel 1. Hoofdkenmerken van het Smith-Lemli-Opitz syndroom*

1. Mentale retardatie
2. Microcephalie
3. Pré- en postnatale groeiachterstand (ernstige voedingsproblemen)
4. Afwijkende gelaatskenmerken:
 - ptosis
 - anteversio narium
 - palatoschisis / hoog palatum
 - micrognatie
5. Afwijkende genitalia externa
 - hypospadie
 - micropenis
 - cryptorchisme
 - intersexualiteit
6. Syndactylie van de 2e en 3e teen

*: Een cholesterolbepaling door middel van gaschromatografie is geïndiceerd, indien 2 van de 6 kenmerken aanwezig zijn bij een patiënt met de sporadische vorm van de ziekte, of indien 1 kenmerk aanwezig is bij een positieve familieanamnese.

Een aantal symptomen bij patiënten met het SLO-syndroom kunnen thans op basis van kennis omtrent het metabole defect beter worden begrepen. Cholesterol bindt tijdens de embryogenese aan “Hedgehog Signaling Proteins” en heeft daardoor een sturende functie op deze eiwitten. Hedgehog-proteïnen omvatten een familie signaalmoleculen essentieel voor een breed scala differentiatie van lichaamsstructuren en organen die intra-uterien worden aangelegd (6). Voedings- en groei problemen van patiënten met SLO berusten tenminste deels op het tekortschieten van de galzuursynthese vanuit cholesterol waardoor malabsorptie optreedt (7). 7-DHC en 8-DHC verdelen zich evenredig over de cholesterolsubfracties zodat de lipidsamenstelling van het plasma wordt beïnvloed (8). Voorts kan de inbouw van 7-DHC en 8-DHC in plaats van cholesterol in afwijkende membranen, myeline en steroïden resulteren. Het neurologische beeld kan dus naast een aanlegstoornis verklaard worden uit een myelinisatiestoornis daar normaal myeline voor ongeveer 25% uit cholesterol bestaat, dat lokaal in het centraal zenuwstelsel wordt gesynthetiseerd (9). De abnormale geslachtelijke ontwikkeling wordt mogelijk veroorzaakt door een verstoord metabolisme van steroïdhormonen. Verder onderzoek wordt verricht om de pathogenese van de verschillende symptomen nader te analyseren.

Het klinisch beeld bij de patiënten met het SLO-syndroom is zeer variabel en gecorreleerd aan de 7-DHC/cholesterol ratio in plasma (10). Op enzymniveau vormt het verschil in residuele activiteit tussen patiënten mogelijk een verklaring voor de variabiliteit in de klinische symptomatologie. Klinische hoofdkenmerken van het ziektebeeld staan in tabel 1 weergegeven. De mentale retardatie kan variëren van mild tot zéér ernstig. Hoewel SLO-patiënten een karakteristiek gelaat hebben wordt dit gezien het zeldzame voorkomen niet altijd herkend. De voedingsproblemen zijn meestal uitgesproken, waardoor kinderen gedurende jaren zijn aangewezen op sondevoeding, veelal via een percutane gastrostomie.



Figuur 2. Gaschromatografische analyse van plasma sterolen van een gezond individu (I) en een patiënt met het Smith-Lemli-Opitz syndroom (II: patiënt 1, tabel 2), waarbij een sterk verlaagde cholesterolpiek, naast opvallende pieken van 7-dehydrocholesterol en de isomere variant 8-dehydrocholesterol te zien zijn.

Afwijkingen aan interne organen, zoals hart, longen en nieren, komen regelmatig voor en variëren in vorm en ernst. Minder frequent worden onder andere oogafwijkingen (cataract), pylorushypertrofie en postaxiale polydactylie gevonden. Alle beschreven symptomen zijn op zich specifiek. Kenmerkend is de syndactylie van de tweede en derde teen die bij meer dan 95 % van de patiënten wordt gezien (inclusief bij zeer milde vormen). De grote variabiliteit van het klinische beeld, zelfs binnen één familie, bemoeilijkt de herkenning van het SLO-syndroom.

Biochemische diagnostiek

De klinische diagnose “SLO-syndroom” kan worden bevestigd door middel van gaschromatografische analyse van cholesterol en 7-dehydrocholesterol in plasma waarvan het karakteristieke spectrum wordt getoond in Figuur 2. Naast een verlaagde cholesterolpiek verschijnen twee (normaal niet aanwezige) pieken: 7-DHC en 8-DHC. Een verminderde 7-dehydrocholesterol- Δ^7 -reductase activiteit is onder meer in gekweekte huidcellen of fibroblasten en in leverweefsel van SLO-patiënten aangetoond (11,12).

Dat de ontdekking van het onderliggende metabole defect 30 jaar op zich heeft laten wachten, heeft allereerst te maken met het feit dat de afwijkende precursors (7-DHC en 8-DHC) worden meegemeten in de enzymatische bepalingsmethode van cholesterol met behulp van cholesteroloxidase zoals die routinematig in vrijwel alle laboratoria wordt uitgevoerd. Het cholesteroloxidase accepteert beide precursors als substraat waardoor te hoge cholesterol waarden worden gevonden zoals tabel 2 laat zien (13). De tweede reden is dat in de literatuur beperkt referentiewaarden

Tabel 2. Plasmaconcentraties van cholesterol(CH), 7-dehydrocholesterol(7-DHC) en 8-dehydrocholesterol(8-DHC) in $\mu\text{mol/l}$ van tien patiënten met het Smith-Lemli-Opitz syndroom en leeftijdsgereleerde controles. Gaschromatografische bepaling vergeleken met enzymatische (cholesteroloxidase) bepaling, die de precursors (7-DHC en 8-DHC) meebepaalt.

Patiënten	(lft)	Methode					
		CHOD-PAP (enzymatisch)	GAS CHROMATOGRAFIE				
		CH	CH	7-DHC	8-DHC	Totaal*	Ratio**
1 v	2 w	700	20	430	266	716	34,8
2 v	3 m	1800	1038	379	298	1715	0,7
3 m	7 m	1000	260	300	385	945	2,6
4 m	8 m	2700	2054	334	255	2643	0,3
5 m	7 j	1820	975	280	264	1519	0,6
6 m	26 j	1560	1118	182	127	1427	0,3
7 m	27 j	1300	884	143	107	1134	0,3
8 m	28 j	1700	1170	220	284	1674	0,4
9 v	29 j	2080	1261	442	308	2011	0,6
10 v	33 j	3800	2030	848	555	3433	0,7
<i>Controles</i> n = 20		1900-6300	1870-6000	<8	<10	1850-6000	<0.004

*: Totaal = CH + 7-DHC + 8-DHC; **: Ratio = 7-DHC + 8-DHC / Cholesterol.

Tabel 3. Plasma cholesterolconcentratie* (mmol/l) bij gezonde zuigelingen in de eerste levensweek (A) en op latere leeftijd (B). Referenties 23, 24

A	Levensdag	p10	p50	p90	aantal	
	Navelstreng	1,10	1,60	2,30	132	
	dag 1	0,96	1,90	2,50	10	
	dag 2	1,80	2,31	2,88	30	
	dag 3	1,58	2,40	3,10	36	
	dag 4	2,06	2,69	3,54	22	
	dag 5	1,84	2,70	3,54	16	
	dag 6	1,95	2,88	4,00	14	
	dag 7-18	2,11	2,72	3,97	13	
B	Leeftijd	-2SD	p50	+2SD	aantal	ref
	2 maanden				192	23
	borstvoeding	2,18	3,80	5,42		
	flesvoeding	2,01	2,91	3,81		
	4 maanden				192	23
	borstvoeding	2,20	3,90	5,60		
	flesvoeding	2,47	3,27	4,07		
	6 maanden				190	23
	borstvoeding	2,13	4,01	5,89		
	flesvoeding	2,44	3,54	4,64		
	9 maanden				188	23
	borstvoeding	3,00	4,46	5,92		
	flesvoeding	2,60	4,14	5,68		
	7 jaar	3,03	4,47	5,91	148	24

* Cholesterolconcentratie in plasma bepaald met behulp van de standaard enzymatische (cholesteroloxidase) methode.

voor plasmacholesterol op de jonge kinderleeftijd beschikbaar zijn. Wij vonden bij gezonde pasgeborenen fysiologisch lage cholesterolwaarden die stijgen in de eerste levensweek (tabel 3).

Defecten in de cholesterol biosynthese maken het noodzakelijk ook acht te slaan op verlaagde spiegels van cholesterol. Dit geldt niet alleen voor de kinderleeftijd zoals geïllustreerd door patiënten 6 t/m 10 uit tabel 2. Bij een plasma cholesterolwaarde kleiner dan 2,0 mmol/l bij een kind ouder dan een week dient een cholesterolbiosynthesedefect overwogen te worden. Een cholesterolconcentratie hoger dan 2,0 mmol/l sluit een cholesterolbiosynthesedefect niet uit zoals moge blijken uit de gegevens van patiënten 4 en 10 uit tabel 2. Als vervolgonderzoek is in eerste instantie een gaschromatografische cholesterolbepaling in plasma aangewezen. Deze bepaling dient ook te worden verricht bij iedere patiënt met minimaal 2 van de 6 SLO-hoofdkenmerken (uit tabel 1) of bij aanwezigheid van één kenmerk bij een positieve familieanamnese.

Het aanwezige cholesterol in ons lichaam is grotendeels uit "de novo" synthese afkomstig en niet zoals gedacht wordt uit het dieet. De cholesterol biosynthese is enzymatisch gecompliceerd. Zo verloopt de omzetting van lanosterol in cholesterol in ruim 20 biochemische stappen. De verwachting is dat in de komende jaren patiënten met cholesterol biosynthese defecten zullen worden gevonden waarbij het enzymatische defect in één van de andere enzymreacties is gelegen, zoals de recent beschreven desmosterolæmie (14). Klinisch chemisch zullen dergelijke patiënten kunnen opvallen door een laag plasma cholesterol. Van oudsher is de meeste aandacht uitgegaan naar de bovengrens van het referentiewaardengebied

voor cholesterol in plasma. Wanneer onverwacht een verlaagde cholesterol plasmawaarde wordt gevonden is het aan te bevelen contact op te nemen met één der klinisch genetische centra voor vervolgonderzoek. Dit vervolgonderzoek zal in eerste instantie bestaan uit gaschromatografische analyse van het plasma ter bevestiging of uitsluiting van de bekende defecten in de cholesterol biosynthese. In tweede instantie uit het doormeten van de cholesterol biosynthese in gekweekte fibroblasten met isotoop gelabelde precursors zoals hieronder beschreven om daarmee een mogelijk in de literatuur nog onbekend defect in de cholesterol biosynthese op te sporen.

Cholesterolbiosynthese in fibroblasten

- De diagnose SLO kan worden bevestigd door aan gekweekte fibroblasten radioactiefgelabeld [¹⁴C]-7-dehydrocholesterol toe te voegen en de omzetting tot cholesterol te meten. Na wassen van de cellen en lipidenextractie worden cholesterol en 7-dehydrocholesterol middels dunne laag chromatografie gescheiden. De radioactieve spots van beide stoffen kunnen worden gekwantificeerd op basis waarvan de 7-dehydrocholesterol- Δ^7 -reductase enzymactiviteit in de cellen kan worden bepaald. In fibroblasten van SLO-patiënten is er vrijwel geen omzetting meetbaar vergeleken met de inbouw van het [¹⁴C]-label in cholesterol door fibroblasten van gezonde controles (15).
- Andere tot op heden niet beschreven defecten in de gecompliceerde cholesterolbiosyntheseroute kunnen worden opgespoord door de vorming van gelabeld cholesterol te meten na incubatie van fibroblasten met radioactief of stabiel isotoop gelabeld acetaat of mevalonaat. De cellen worden voor dit doel in een speciaal lipidenvrij medium gekweekt om de cholesterol biosynthese te stimuleren. Op deze wijze wordt de gehele cholesterol biosynthese doorgemeten. Deze techniek biedt tevens de mogelijkheid om een intermediair van de cholesterol biosynthese dat zich in deze cellen zou stapelen met gaschromatografie/massaspectrometrie te bestuderen en te identificeren.

Erfelijkheid

Het SLO-syndroom erft autosomaal recessief over. Inmiddels zijn enkele SLO-patiënten beschreven met een cytogenetische afwijking, bij wie het breukpunt in eenzelfde gebied op de lange arm van chromosoom 7 ligt (16,17). Langs deze weg zal mogelijk het betrokken gen spoedig gevonden kunnen worden waarna mutatie-analyse in aangedane families mogelijk zal worden. Het vaststellen van het gedefect kan belangrijke consequenties hebben voor onder meer dragerschapbepaling en prenatale diagnostiek.

Prenatale diagnostiek

Voor het SLO-syndroom wordt momenteel prenatale diagnostiek verricht door middel van het aantonen van een abnormaal hoge concentratie 7-DHC en 7-DHC / cholesterol ratio in vruchtwater of chorionvilli met behulp van GC/MS (18,19). Recent werd in ons land de eerste afwijkende concentratie 7-DHC in villi

gedurende de 11e zwangerschapsweek gemeten waarna de zwangerschap werd afgebroken. De diagnose werd vervolgens bevestigd in foetale fibroblasten en andere weefsels.

Therapie

Korte tijd na de ontdekking van het metabole defect werd gestart met behandeling van enkele SLO-patiënten met een cholesterol verrijkt dieet en galzuren (20,21). Bij drie in Nederland behandelde patiënten steeg de plasmaconcentratie van cholesterol binnen enkele maanden na het begin van het cholesterol verrijkt dieet van 0.3 - 0.9 tot 1.5 - 2.0 mmol/l met een lichte daling van de 7- en 8-dehydrocholesterolconcentratie. Enige subjectieve klinische verbetering werd bij twee van de drie kinderen waargenomen. Verder onderzoek zal moeten uitwijzen in hoeverre deze en nieuw ontwikkelde behandelingsvormen het ziektebeloop in deze heterogene patiëntengroep gunstig kunnen beïnvloeden (22).

Werkgroep

In 1995 werd in Nederland een SLO-werkgroep opgericht. Doel is het in kaart brengen van SLO-patiënten in Nederland en het stimuleren van klinisch biochemisch, moleculair en therapeutisch onderzoek. Nederlandse patiënten kunnen worden aangemeld bij de secretaris, Dr. R.A. Wevers, Academisch Ziekenhuis, Laboratorium voor Kindergeneeskunde/Neurologie, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen.

Literatuur

1. Smith DW, Lemli L, Opitz JM. A newly recognized syndrome of multiple congenital anomalies. *J Pediatr* 1964; 64: 210-7.
2. Irons M, Elias ER, Salen G, Tint GS, Batta AK. Defective cholesterol biosynthesis in Smith-Lemli-Opitz syndrome [Letter]. *Lancet* 1993; 341: 1414.
3. Tint GS, Irons M, Elias ER. Defective Cholesterol biosynthesis associated with the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *N Eng J Med* 1994; 330: 107-13.
4. Tint GS, Seller M, Hughes-Benzie R, Batta AK, Shefer S, Genest D, Irons M, et al. Markedly increased tissue concentrations of 7-dehydrocholesterol combined with low levels of cholesterol are characteristic of the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Lipid Res* 1995; 36: 89-95.
5. Batta AK, Tint GS, Shefer S, Abuelo D, Salen G. Identification of 8-dehydrocholesterol (cholesta-5,8-dien-3 beta-ol) in patients with Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Lipid Res* 1995; 36: 705-13.
6. Porter JA, Young KE, Beachy PhA. Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science* 1996; 274: 255-9.
7. Natowicz MR, Evans JE. Abnormal bile acids in the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Med Genet* 1994; 50: 364-7.
8. Pierquin G, Peeters P, Roels F, Vamos E, Brucher JM, Tint GS, Honda A, et al. Severe Smith-Lemli-Opitz syndrome with prolonged survival and lipid abnormalities. *Am J Med Genet* 1995; 56: 276-80.
9. Jurevics H, Morell P. Cholesterol for synthesis of myelin is made locally, not imported into brain. *J Neurochem* 1995; 64: 895-901.
10. Tint GS, Salen G, Batta AK, Shefer S, Irons M, Elias ER, Abuelo DN, et al. Correlation of severity and outcome with plasma sterol levels in variants of the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Pediatr* 1995; 127: 82-7.
11. Lund E, Starck L, Venizelos N. Detection of defective 3 β -hydroxysterol Δ^7 -reductase activity in cultured human fibroblasts: a method for the diagnosis of Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Inher Metab Dis* 1996; 19: 59-64.

12. Shefer S, Salen G, Batta AK, et al. Markedly inhibited 7-dehydrocholesterol- Δ^7 -reductase activity in liver microsomes from Smith-Lemli-Opitz syndrome homozygotes. *J Clin Invest* 1995; 96: 1779-85.
13. Jira PE, de Jong JGN, Janssen-Zijlstra FSM, Wendel U, Wevers RA. Pitfalls in measuring plasma cholesterol in the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Clin Chem* 1997; 43: 129-31.
14. Clayton P, Mills K, Keeling J, FitzPatrick D. Desmosterolosis: a new inborn error of cholesterol biosynthesis [Letter]. *Lancet* 1996; 348: 404.
15. Wanders RJA, Romeijn GJ, Wijburg F, Hennekam RCM, de Jong J, Wevers RA, Dacremont G. Smith-Lemli-Opitz (SLO) Syndrome: deficient Δ^7 -reductase activity in cultured skin fibroblasts and chorionic villous fibroblasts and its application to pre- and postnatal detection. *J Inher Metab Dis* 1997 (In press).
16. Wallace M, Zori RT, Alley T, Whidden E, Gray BA, Williams CA. Smith-Lemli-Opitz syndrome in a female with a de novo, balanced translocation involving 7q32: probable disruption of a SLOS gene. *Am J Med Genet* 1994; 50: 368-74.
17. Alley TL, Gray BA, Lee SH, Scherer SW, Tsui LC, Tint GS, Williams CA, et al. Identification of a yeast artificial chromosome clone spanning a translocation breakpoint at 7q32.1 in a Smith-Lemli-Opitz syndrome patient. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 1411-6.
18. Abuelo DN, Tint GS, Kelley R, Batta AK, Shefer S, Salen G. Prenatal detection of the cholesterol biosynthetic defect in the Smith-Lemli-Opitz syndrome by the analysis of amniotic fluid sterols. *Am J Med Genet* 1995; 56: 281-5.
19. Mills K, Mandel H, Montemagno R, Soothill P, Gershoni-Baruch R, Clayton P. First trimester prenatal diagnosis of Smith-Lemli-Opitz syndrome (7-dehydrocholesterol reductase deficiency). *Pediatr Res* 1996; 39: 816-819.
20. Irons M, Elias ER, Tint GS, Salen G, Frieden R, Buie TM, et al. Abnormal cholesterol metabolism in the Smith-Lemli-Opitz syndrome; report of clinical and biochemical findings in four patients and treatment in one patient. *Am J Med Genet* 1994; 50: 347-52.
21. Ullrich K, Koch HG, Meschede D, Flotmann U, Seedorf U. Smith-Lemli-Opitz syndrome: treatment with cholesterol and bile acids. *Neuropediatrics* 1996; 27: 111-12.
22. Jira P, Wevers R, de Jong J, Rubio-Gozalbo E, Smeitink J. New treatment strategy for Smith-Lemli-Opitz syndrome [Letter]. *Lancet* 1997; 349: 1222.
23. Kallio MJT, Salmenperä L, Siimes MA, Perheentupa J, Miettinen TA. Exclusive breast-feeding and weaning: effect on serum cholesterol and lipoprotein concentrations in infants during the first year of life. *Pediatrics* 1992; 89: 663-666.
24. Larsson B, Vaara I. Cholesterol screening of seven-year-old children. How to identify children at risk. *Acta Paediatr* 1992; 81: 315-18.

Summary

Smith-Lemli-Opitz syndrome: an inborn error of cholesterol biosynthesis. Jira PE, Jong JGN de, Metz M de, Aalfs CM, Hennekam RCM, Wanders RJA, Smeitink JAM, Wevers RA. Ned Tijdschr Klin Chem 1997; 22: 175-179.

Smith-Lemli-Opitz Syndrome (SLOS) is caused by a block in the penultimate step in the cholesterol biosynthetic pathway, the conversion of 7-dehydrocholesterol to cholesterol. SLO-patients have strongly reduced 7-dehydrocholesterol Δ^7 -reductase activity resulting in low plasma and tissue cholesterol with high 7-dehydrocholesterol levels. Characteristic phenotypical features are mental retardation, facial dysmorphism, organ- and limb congenital anomalies.

Diagnosis in SLO-patients is made by gas chromatographic sterol analysis of plasma. Prenatal diagnosis in amniotic fluid and chorionic villi is possible. Techniques to measure Δ^7 -reductase activity and overall cholesterol biosynthesis rate from labelled acetate in cultured fibroblast are described. Pathophysiological mechanisms and treatment in SLOS are discussed.

Key-words: Smith-Lemli-Opitz Syndrome; 7-dehydrocholesterol; cholesterol; diagnosis

Lipoproteïne (a): een risicofactor voor hart- en vaatziekten ?

Y.Y. van der HOEK*

Eind jaren tachtig werd Lipoproteïne (a) of Lp(a) met veel enthousiasme ontvangen als mogelijke nieuwe risicofactor voor hart- en vaatziekten (HVZ). Lp(a) bestaat uit een low density lipoprotein (LDL) gedeelte en een glycoproteïne, apolipoproteïne (a) [apo(a)] genaamd. Dit apo(a) eiwit vertoont een grote mate van homologie met plasminogeen. Mede daardoor werd gedacht dat de link was gelegd tussen atherosclerose en fibrinolyse. Na velen jaren van intensief onderzoek bestaat er nog veel onduidelijkheid over Lp(a). Er zijn inmiddels meerdere hypothesen gelanceerd hoe Lp(a) betrokken kan zijn bij het ontstaan van HVZ.

In vele "case-control" studies is aangetoond dat Lp(a) een onafhankelijke risicofactor is voor HVZ, daarnaast zijn er twee grote prospectieve studies gepresenteerd waar Lp(a) niet naar voren komt als onafhankelijke risicofactor.

Voor een juiste inschatting van Lp(a) als risicofactor dient men eerst tot standaardisatie te komen, daarna kan men pas goed het effect bestuderen van Lp(a) op HVZ.

Trefwoorden: lipoproteïne (a), atherosclerose

Atherosclerose en de daarbij behorende hart- en vaatziekten zijn nog steeds de meest voorkomende oorzaak van overlijden in de Westerse wereld. Daarom werd in 1987 Lipoproteïne (a) of Lp(a) als nieuwe risicofactor voor hart- en vaatziekten met veel enthousiasme ontvangen. Eindelijk zou dan de relatie gevonden zijn tussen atherosclerose en fibrinolyse. In veel klinisch-chemische laboratoria werd een methode geïntroduceerd om Lp(a) te kunnen bepalen.

Mede door gebrek aan fundamentele kennis over dit plasma eiwit is dat enthousiasme echter inmiddels aanzienlijk bekoeld.

Lp(a) als risicofactor

Lipoproteïne (a) is voor het eerst beschreven in 1963 door Kåre Berg (1). In het begin van de jaren zeventig werden de eerste studies gepubliceerd waarin een relatie werd aangetoond tussen het voorkomen van

hart- en vaatziekten (HVZ) en de aanwezigheid van Lp(a) (2,3). Naarmate de gevoeligheid van vooral de immunochemische technieken toenam kon ook Lp(a) worden aangetoond in atherosclerotische plaques (4). Daarmee werd het vermoeden bevestigd dat Lp(a) mogelijk betrokken is bij de atherogenese. Nadat de moleculaire structuur in 1987 bekend was geworden en de homologie met plasminogeen was aangetoond (5), kwam dit plasma eiwit uitvoerig in de belangstelling als mogelijke nieuwe risicofactor voor HVZ. Inmiddels is uit tientallen "case-control" studies gebleken dat Lp(a) in verhoogde concentratie geassocieerd is met zowel coronair-, cerebraal- als perifere vaatlijden (6). In 1991 en 1993 zijn twee grote prospectieve studies (The Helsinki Heart Study (7) en The Physicians Health Study (8)) gepubliceerd die hebben aangetoond dat Lp(a) niet verhoogd is bij patiënten met HVZ. Er zijn in die twee studies methodologische verschillen, zoals niet gestandaardiseerde bewaartemperaturen en bewaartijden, die de grote analytische verschillen zouden kunnen verklaren. De vraag die deze studies hebben opgeroepen, in hoeverre Lp(a) concentraties kunnen stijgen ten gevolge van het atherosclerotisch proces zelf, waarvan resultaten wel zichtbaar zijn in een "case-control" studie en niet in een prospectieve studie, blijft nog onbeantwoord.

Met behulp van verschillende logistieke modellen is geprobeerd te berekenen bij welke concentratie Lp(a) een onafhankelijke risicofactor vormt voor HVZ. Gebleken is dat het relatieve risico voor HVZ significant toeneemt bij Lp(a) concentraties boven 300 mg/l (9). Maar liefst 20 % van de blanke bevolking heeft Lp(a) concentraties die boven deze waarde uitkomen. Bij mensen van het negroïde ras ligt dit percentage zelfs nog iets hoger (10) (figuur 1).

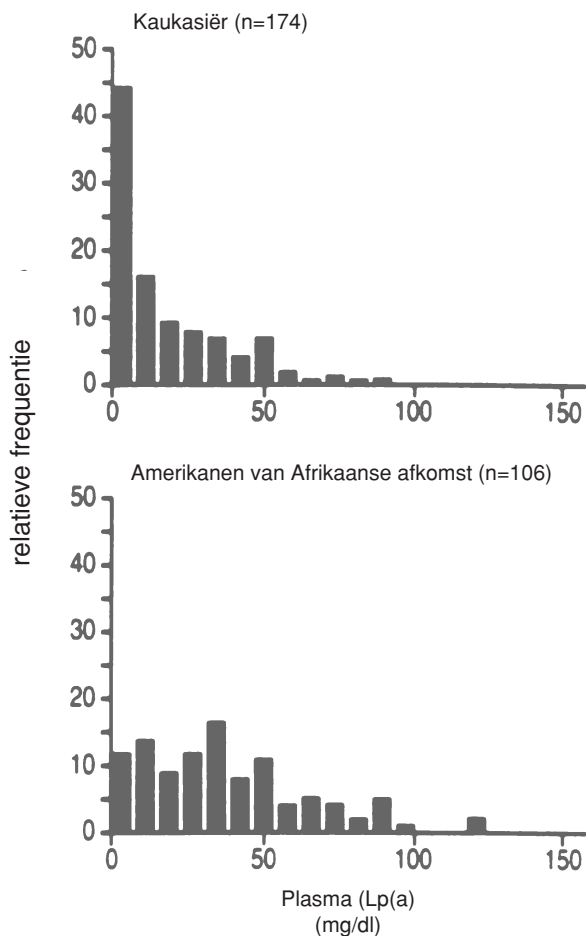
Lp(a) concentraties worden sterk genetisch gecontroleerd (11), blijven gedurende een mensenleven vrijwel constant en zijn niet te verlagen door lichaamsbeweging of dieet, dit in tegenstelling tot low density lipoprotein (LDL). Ook LDL-verlagende middelen, zoals 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductaseremmers, cholestyramine en fibraten hebben verrassend genoeg niet of nauwelijks effect op Lp(a) concentraties. De enige medicamenten die tot nu toe tot enige resultaten hebben geleid zijn nicotinezuurderivaten alleen of in combinatie met neomycine en oestrogeen therapieën (stanozolol). De beschreven Lp(a) verlagingen zijn niet erg groot (12).

Overigens is het bewijs dat atherosclerotische processen verminderen door het verlagen van Lp(a) spiegels tot op heden nog niet geleverd.

Afdeling Klinische Chemie, St. Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein

**Mw. Dr. Y.Y. van der Hoek is winnaar van de Orthoprijs 1996*

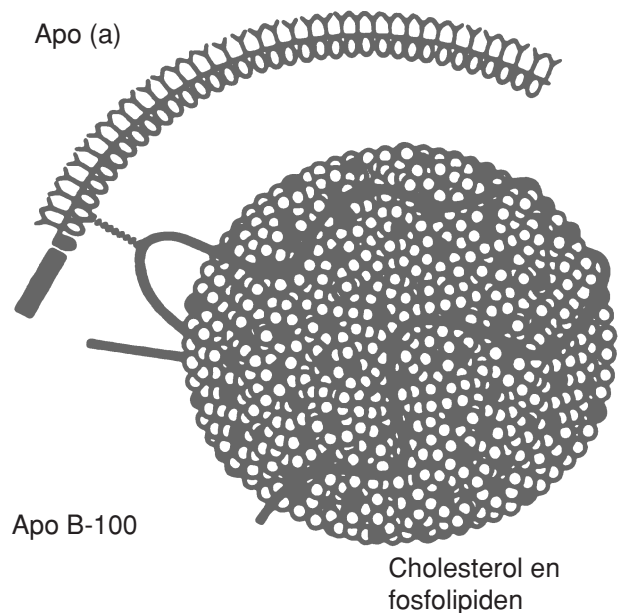
Correspondentie: Mw. Dr. Y.Y. van der Hoek, St. Antonius Ziekenhuis, Klinische Chemie, Koekoekslaan 1, 3435 CM Nieuwegein
Ingekomen: 12.12.96



Figuur 1. De verdeling van Lp(a) concentraties bij Kaukasiërs en Afro-Amerikanen (Bron: Hobbs et al, J Clin Invest 1994; 93: 2526-2534)

De structuur van Lp(a)

Lp(a) lijkt qua structuur veel op LDL maar bezit tevens een groot uniek glycoproteïne; apolipoproteïne (a) [apo(a)] genaamd, welke door middel van een disulfidebrug (13) verbonden is met het apolipoproteïne B100 [apoB100] eiwit van LDL (figuur 2). Het apo(a) bestaat net als plasminogeen uit zogenaamde kringel-structuren. Deze “krakeling”-achtige eiwit structuren worden bij meer eiwitten gevonden die betrokken zijn bij stolling en fibrinolyse. Plasminogeen bestaat uit 5 verschillende type kringles; I, II, III, IV en V, die elk van elkaar verschillen door de aminozuur volgorde. Apo(a) bestaat uit een variabel aantal kringles type IV en één kringle type V. Tevens is er een protease aanwezig zoals bij plasminogeen, welke overigens niet geactiveerd kan worden door tissue plasminogeen activator (tPA). De variabiliteit van het aantal kringles IV in apo(a) is groot; deze kan variëren van 12 tot ongeveer 50 kringles type IV. Meestal wordt de grootte van het apo(a) molecuul weergegeven volgens de classificatie van Utermann (14); uitgaande van de elektroforetische snelheid ten opzichte van het apoB100 eiwit. Men onderscheidt de F (fast), B (zelfde snelheid als apoB100) en de S1 tot S4 (slow) isovormen. De kleine isovormen F, B, S1 en S2 zijn geassocieerd met hoge Lp(a) spiegels. De



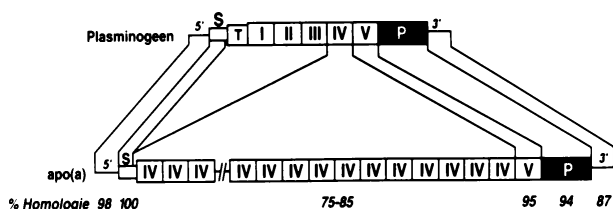
Figuur 2. Model van het Lp(a) molecuul (Bron: Scanu et al. Ann Int Med 1991; 115: 209-218)

meest voorkomende isovormen S3 en S4 zijn geassocieerd met lage Lp(a) concentraties. Lp(a) kent verschillende isovormen die zowel op eiwit als DNA niveau zijn terug te vinden. Zoals hierboven beschreven wordt de concentratie van het Lp(a) mede bepaald door de grootte van het apo(a) eiwit. Er bestaat een omgekeerde relatie tussen de grootte van het eiwit en de concentratie van Lp(a) in plasma. Met andere woorden, hoe kleiner het eiwit, hoe hoger de Lp(a) concentratie in plasma (14).

Lp(a) en atherosclerose

Ondanks vele jaren van onderzoek is er nog steeds veel onduidelijkheid over Lp(a) als risicofactor. Op epidemiologisch niveau zijn het vooral “case-control” en prospectieve studies die elkaar tegen spreken. Op biochemisch niveau blijft de vraag nog steeds onbeantwoord in hoeverre Lp(a) werkelijk van belang is bij de vorming van atherosclerotische plaques. Lp(a) kan waarschijnlijk op meerdere manieren betrokken zijn bij hart- en vaatziekten. Inmiddels zijn drie hypothesen gelanceerd. De meest voor de hand liggende hypothese komt voort uit de grote mate van homologie tussen plasminogeen en Lp(a) (figuur 3). In tegenstelling tot plasminogeen kan Lp(a) niet geactiveerd worden door tPA. Door een enkele aminozuur substitutie in het protease gedeelte van Lp(a) is activatie niet meer mogelijk. Bij hoge Lp(a) concentratie zou het eiwit kunnen interfereren met de fibrinolyse, doordat Lp(a) kan remmen bij de activatie van fibrinegebonden tPA. Doordat het Lp(a) een sterke affiniteit heeft voor fibrine-oppervlakken, kan dit oppervlak bezet raken met Lp(a) moleculen waardoor plasminogeen niet meer in staat is om zich te hechten en vervolgens het stolsel af te breken met behulp van tPA (figuur 4) (15).

Bij individuen met een hoog Lp(a) gehalte is er bovendien Lp(a) aangetroffen in atherosclerotische pla-



Figuur 3. De homologie tussen apo(a) en plasminogeen (Bron: referentie 5).

ques, hetgeen aantoonde dat Lp(a) mogelijk een rol speelt bij de atherogenese. Waarschijnlijk kan Lp(a) worden geoxydeerd en opgenomen door macrofagen die op hun beurt weer veranderen in schuimcellen. Ook is uit onderzoek gebleken dat Lp(a) een sterke affiniteit heeft voor allerlei extracellulaire matrix-eiwitten zoals fibronectine en fibrinogeen. Door een interactie aan te gaan met deze eiwitten kan Lp(a) bijdragen tot de vorming van atherosclerotische plaques doordat Lp(a) cholesterol en fosfolipiden bevat in de zelfde hoeveelheden als LDL (16).

Ook is beschreven dat een hoge Lp(a) concentratie, de proliferatie van gladde spiercellen, welke betrokken zijn bij de atherogenese, kan bevorderen (17).

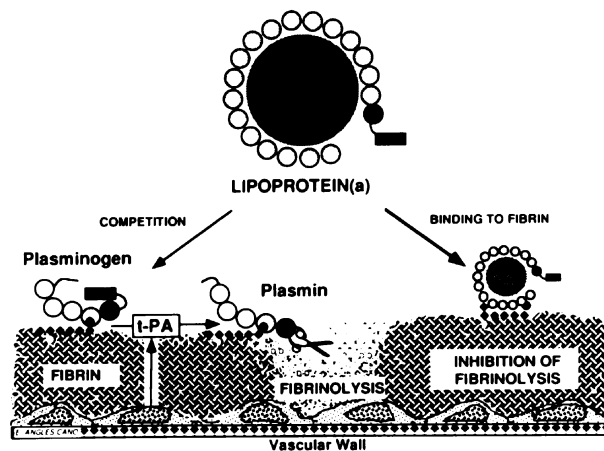
De functie van Lp(a)

Ondanks intensief onderzoek is ook de fysiologische functie van Lp(a) nog steeds onbekend. Een van de hypothesen is dat Lp(a) mogelijk een rol kan spelen bij het herstellen van weefselbeschadiging; hetzij in de bloedvaten, hetzij in de weefsels zelf. Lp(a) concentraties blijken namelijk licht te stijgen na operaties en hartinfarcten. Ook lange afstand lopers en gewichtheffers hebben kort na hun prestatie hogere Lp(a) spiegels (18). Lp(a) kan blijkbaar fungeren als een acute fase eiwit. Door te binden aan het beschadigde weefsel kan Lp(a) een bron zijn van cholesterol en fosfolipiden, die noodzakelijk zijn voor de opbouw van nieuwe cellen.

Deze mogelijke fysiologische functie zou wel eens als neveneffect kunnen hebben dat bij arteriële beschadigingen door bijvoorbeeld hypercholesterolemie, hypertensie en roken, de Lp(a) concentraties stijgen; hetgeen resulteert in een depositie van Lp(a) in atherosclerotische plaques (19).

Lp(a) in de toekomst

Nu, 10 jaar nadat de moleculaire structuur is ontdekt is het enthousiasme voor deze nieuwe onafhankelijke risicofactor voor hart- en vaatziekten aanmerkelijk afgenomen. Een ander aspect wat nogal wat problemen heeft veroorzaakt is het bepalen van Lp(a) concentraties in plasma. Vanaf het begin van de ontdekking van Lp(a) is de concentratie bepaling een gecompliceerde bezigheid geweest. Een grote heterogeniteit van het apo(a) eiwit en de homologie met plasminogeen zijn de voornaamste oorzaken hiervan. Ook blijkt de manier van bewaren van plasma, grote invloed te hebben op de Lp(a) concentratie. Lp(a) kan namelijk "verdwenen" zijn uit plasma als dit een week wordt bewaard bij 4 °C. Ook bij een temperatuur van - 20 °C blijkt de Lp(a) concentratie sterk te



Figuur 4. De remmende effecten van Lp(a) op de binding van plasminogeen aan fibrine en de remming van activatie van fibrine-gebonden tPA (Bron: Angles-Cano et al, Chem Phys of Lipids 1994; 67/68: 369-380)

verminderen. Waarschijnlijk wordt dit fenomeen veroorzaakt door precipitatie (20).

In de loop van de jaren is vooral de gevoeligheid van de testen sterk verbeterd. In 1965 was Lp(a) te detecteren in maar 30% van de bevolking. Tegenwoordig kan met gevoelige enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) technieken bij vrijwel iedereen Lp(a) worden aangetoond. Op veel klinisch-chemische laboratoria wordt Lp(a) turbidimetrisch of nefelometrisch gemeten. De verschillende technieken die gebruikt worden, zijn onderling moeilijk met elkaar te vergelijken. Het meten van Lp(a) wordt dan ook internationaal gestandaardiseerd. Daarvoor is door de IFCC een commissie in het leven geroepen om dit te bewerkstelligen.

Pas als Lp(a) goed gestandaardiseerd gemeten kan worden, is men in staat aan te tonen of Lp(a) inderdaad een onafhankelijke risicofactor is voor HVZ. Vervolgens is er meer onderzoek noodzakelijk naar Lp(a)-verlagende middelen om tot een behandelingsplan te komen en hiervan het effect op HVZ te bestuderen.

Literatuur

1. Berg K. A new serum type in man: the Lp system. Acta Pathol Microbiol Scand 1963; 59: 369-382.
2. Dahlen G, Berg K, Gillnas T, Ericson C. Lp(a) lipoprotein/pre β 1-lipoprotein in Swedish middle-aged males and patients with coronary heart disease. Clin Genet 1975; 7: 334-341.
3. Dahlen G, Ericson C, Furberg C, Lundkvist L, Svardsudd K. Angina of effort and an extra beta lipoprotein fraction. Acta Med Scand 1972; 531(suppl): 6-15.
4. Walton KW, Hitchens J, Magnani HN, Khan M. A study of methods of identification and estimation of Lp(a) lipoprotein and of its significance in health, hyperlipidemia and atherosclerosis. Atherosclerosis 1974; 20: 323-346.
5. McLean JW, Tomlinson JE, Kuang W, Eaton DL, Chen EY, Fless GM, Scanu AM, Lawn RM. cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. Nature 1987; 330: 132-137.
6. Dahlen G. Lp(a) lipoprotein in cardiovascular disease. Atherosclerosis 1994; 108: 111-125.

7. Jauhiainen M, Koskinen P, Ehnholm C. Lipoprotein (a) and coronary heart disease risk: a nested case-control study of the Helsinki Heart Study participants. *Atherosclerosis* 1991; 89: 59-76.
8. Ridker PM, Hennekens CH, Stampfer MJ. A prospective study of lipoprotein(a) and the risk of myocardial infarction. The Physicians Health Study. *J Am Med Assoc* 1993; 270: 2195-2199.
9. Kostner GM, Avogaro P, Cazzolato G, Marth E, Bittolo-Bon G, Qunici GB. Lipoprotein Lp(a) and the risk for myocardial infarction. *Atherosclerosis* 1981; 38: 51-61.
10. Gaw A, Boerwinkle E, Cohen JC, Hobbs HH. Comparative analysis of the apo(a) gene, apo(a) glycoprotein, and plasma concentrations of Lp(a) in three ethnic groups. *J Clin Invest* 1994; 93: 2526-2534.
11. Kraft HG, Kochl S, Menzel HJ, Sandholzer, Utermann G. The apolipoprotein(a) gene: a transcribed hypervariable locus controlling plasma lipoprotein(a) concentration. *Hum Genet* 1992; 90: 220-230.
12. Berglund L. Diet and drugs therapy for lipoprotein(a). *Curr Opin Lipidol* 1995; 6: 48-56.
13. Koschinsky ML, Côté GP, Gabel B, Hoek YY van der. Identification of the cysteine residue in apolipoprotein(a) that mediates extracellular coupling with apolipoprotein(a). *J Biol Chem* 1993; 268: 19819-19825.
14. Utermann G, Kraft HG, Menzel HJ, Hopferweiser T, Seitz C. Genetics of the quantitative Lp(a) lipoprotein trait: Relation of Lp(a)-glycoprotein phenotypes to Lp(a) lipoprotein concentration in plasma. *Hum Genet* 1988; 78: 41-46.
15. Miles LA, Plow EF. Lp(a): an interloper into the fibrinolytic system ? *Thromb Haemost* 1992; 63: 331-335.
16. Hoek YY van der, Sangrar W, Côté GP, Kastelein JJP, Koschinsky ML. Binding of recombinant apolipoprotein(a) to extracellular matrix proteins. *Arterioscl Thromb* 1995; 14: 1792-1798.
17. Grainger DJ, Kemp PR, Liu AC et al. Activation of transforming growth factor- β is inhibited in transgenic apolipoprotein(a) mice. *Nature* 1994; 370: 460-462.
18. Craig WY, Ledue TB. Lipoprotein(a) and the acute phase response. *Clin Chim Acta* 1992; 210: 231-232.
19. Lawn RM. Lipoprotein(a) in heart disease. *Sci Am* 1993; Spec Issue: 12-22.
20. Ende A van den, Hoek YY van der, Kastelein JJP, Koschinsky ML, Labeur C, Rossenu M. Lipoprotein(a). *Advances in Clin Chem* 1996; 32: 73-134.

Summary

Lipoprotein(a): a risk factor for coronary artery disease ?
Hoek YY van der. Ned Tijdschr Klin Chem 1997; 22: 180-183.
 Lipoprotein(a) or Lp(a) was discovered in the late eighties as a new independent risk factor for the development of coronary artery disease (CAD). Lp(a) consist of a low density lipoprotein (LDL) particle and an apolipoprotein(a) moiety. The apo(a) glycoprotein shows a remarkable homology with plasminogen. This was one of the reasons that it was thought that Lp(a) could be the link between atherosclerosis and fibrinolysis. After many years of research, it is still not clear how Lp(a) is involved in the development of CAD.
 Many case-control studies have shown that Lp(a) is an independent risk factor for CAD, but large prospective studies have shown that Lp(a) is not involved in CAD. One of the major problems is the difficulty of quantifying Lp(a) in clinical- and research laboratories. Therefore measuring Lp(a) should be standardised, to investigate what the real effect of Lp(a) is on CAD.

Key-words: atherosclerosis, lipoprotein(a)