

hoeveelheid fluorescentie van stof B is dan een maat voor de enzymactiviteit in het monster.

Niet altijd is het mogelijk op deze manier de directe enzymactiviteit te meten, maar wordt bijvoorbeeld de inbouw van een bepaald aminozuur in eiwit gemeten, dat het eindresultaat is van een keten van omzettingen en waarvan de omzetting van stof A in stof B een onderdeel is. Hierbij wordt de voorloper van het aminozuur, stof A, vaak ook weer radioactief gemerkt en meet men de radioactiviteit van het eiwit in de vruchtwatercellen of vlokken, nadat men deze een poosje de gelegenheid heeft gegeven om eiwitten te maken, na het aanbieden van de radioactief gemerkte stof A. Ook hier wordt de proef tegelijkertijd met een negatieve en een positieve controle uitgevoerd. Afwezigheid van radioactiviteit in het eiwit van het onderzochte monster wijst erop dat geen radioactief aminozuur is ingebouwd en dat dus stof A niet omgezet is in stof B (en stof B uiteindelijk niet in het betreffende aminozuur). Voor het maken van eiwitten en de inbouw daarin van gemerkte stoffen, zijn intacte, levende cellen nodig. Deze tests kunnen dus alleen op intacte, levende cellen uitgevoerd worden.

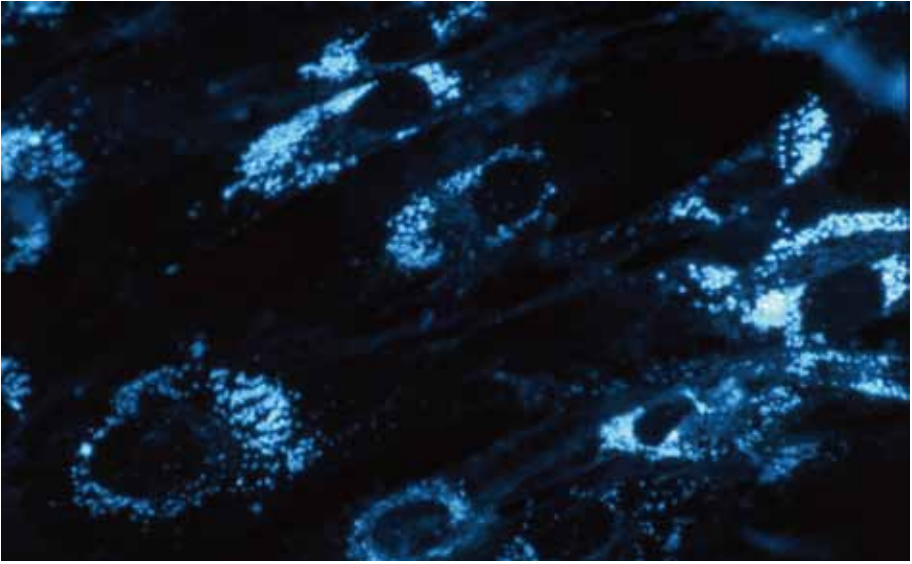
Soms moet een teveel aan stof A gemeten worden, omdat een te weinig aan stof B niet zonder meer meetbaar is. Bij een aantal ziektes is het mogelijk deze te hoge gehalten in vruchtwatersupernatant te meten (zie laboratoriumonderzoek in vruchtwatersupernatant).

Is het gehalte aan stof A normaal, dan werkt het enzym kennelijk normaal en zal de foetus niet ziek zijn. Is het gehalte verhoogd of zeer sterk verhoogd, dan werkt het enzym niet en is de foetus lijdende aan de ziekte. Soms leidt het afwezig zijn van omzetting van stof A in stof B tot de stapeling van stof A in grote hoeveelheden in de cel wat tot verstoringen in celfunctie leidt. In Figuur VI-27 is zo'n voorbeeld van de stapeling van een bepaalde vorm van cholesterol in bepaalde celorganelletjes (lysosomen) van gekweekte cellen te zien bij een erfelijke stofwisselingsziekte (**ziekte van Niemann-Pick type C**).

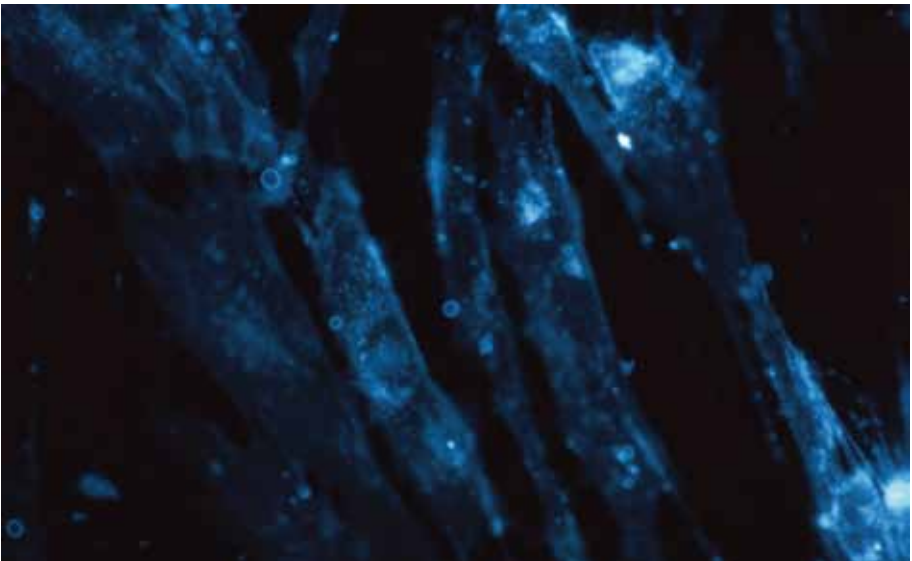
## **Biochemisch onderzoek in vruchtwatercellen**

Zoals al eerder gezegd bij het afbreken of voortzetten van de celkweken, zijn voor biochemisch onderzoek veel meer cellen nodig dan voor het chromosoomonderzoek. De kweekflesjes dienen dus helemaal vol gegroeid te zijn, voordat met de eigenlijke biochemische proef kan worden begonnen.

Met prenataal biochemisch onderzoek worden altijd, tegelijk met het vruchtwater van de zwangere vrouw, een positieve controle, cellen van een patiënt met de te onderzoeken ziekte, en een negatieve controle, vruchtwatercellen van een verondersteld gezonde foetus, onderzocht ter controle op het juist verlopen van de chemische reacties en de metingen. Ter verdere controle, vooral gericht op de vitaliteit van



**Figuur VI-27A.** Filippine-kleuring van een celkweek van een patient met de zeer zeldzame, autosomaal recessief erfelijke stofwisselingsziekte **Niemann-Pick type C**. Bij deze ziekte is er een stoornis in de stofwisseling van cholesterol en daardoor in het transport van cholesterol het lysosoom uit: het blijft erin zitten, er is sprake van stapeling van cholesterol in de lysosomen. De ziekte van Niemann-Pick type C behoort daarom tot de **lysosomale stapelingsziektes**. Met behulp van de stof filippine kunnen we dit cholesterol prachtig zichtbaar maken (Foto ter beschikking gesteld door Dr. W.J. Kleijer, sectie Prenatale Biochemie, afdeling Klinische Genetica, Erasmus MC, Rotterdam).



**Figuur VI-27B.** Filippine-kleuring van een celkweek van een controle-persoon. We zien wel enige blauwe fluorescentie van de lysosomen, maar het beeld is toch volledig anders dan dat van Figuur VI-27A (Foto ter beschikking gesteld door Dr. W.J. Kleijer, sectie Prenatale Biochemie, afdeling Klinische Genetica, Erasmus MC, Rotterdam).

het ingestuurde monster, wat soms een probleem kan zijn bij verzending vanuit het buitenland, wanneer een monster lang onderweg geweest is, wordt altijd ook een ander, tweede enzym van een andere zeldzame stofwisselingsziekte onderzocht. Op deze laatste stofwisselingsziekte bestaat voor het te onderzoeken monster geen verhoogd risico: de kans dat een foetus ook aan die tweede ziekte zou lijden, is verwaarloosbaar klein. De controle-monsters worden eveneens op dit tweede enzym onderzocht. Zowel het vruchtwater als de beide controles, zowel de positieve als de negatieve, moeten in deze simultane testen van die tweede aandoening de verwachte, normale resultaten laten zien.

De cellen van de positieve controles betreffen, zoals al gezegd, gekweekte bindweefselcellen van patiënten of foetus die lijden of leden aan de betreffende ziekte: deze cellen worden bewaard in de celbank. Bij binnenkomst van een vruchtwatermonster voor prenataal biochemisch onderzoek, worden cellen van een positieve controle uit de celbank gehaald en opgekweekt. Voor dit doel was oorspronkelijk de celbank in het Rotterdamse Klinisch Genetisch Centrum in het begin van de jaren 70 in het leven geroepen. Deze functie heeft de celbank nog steeds, maar later werd het vooral ook een verzamelplaats van kostbare cellen van patiënten met allerlei, vaak zeer zeldzame aandoeningen voor wetenschappelijk onderzoek.

De cellen van de negatieve controle betreffen vruchtwatercellen van een willekeurig vruchtwatermonster van een zwangere, die niet voor prenataal biochemisch onderzoek haar vruchtwaterpunctie onderging, maar bijvoorbeeld vanwege haar leeftijd. Van zo'n vruchtwatermonster mogen we aannemen dat de te onderzoeken ziekte niet toevallig aanwezig is. De kans op toevallig dragerschap voor de aandoening is uiteraard veel hoger en gelijk aan de bevolkingskans op dragerschap, in de orde van 1%.

## **Biochemisch onderzoek in vlokken**

Prenataal biochemisch onderzoek vindt in de meerderheid der gevallen plaats op vlokken. Gezien het vaak hoge risico op de bevinding van een aangedane foetus, meestal 25%, is een vroeg in de zwangerschap plaatsvindende en snelle test (de vlok-kentest) te prefereren boven een late en veel langzamere test (vruchtwaterpunctie).

De biochemische onderzoeksmethoden zijn voor vlokken en vruchtwatercellen in principe hetzelfde, behoudens soms kleine verschillen in verband met de iets andere levensomstandigheden en celdichtheden der cellen in beide monsters. Bovendien kan er soms ook een ander activiteitsniveau van het te onderzoeken enzym in vlokken en vruchtwatercellen bestaan.

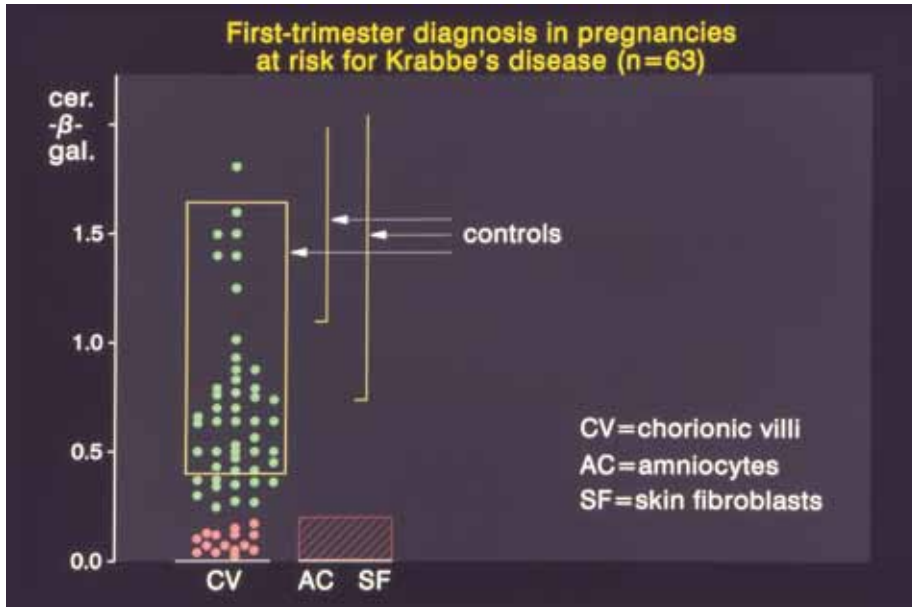
De meeste erfelijke stofwisselingsziektes kunnen uitstekend en zeer betrouwbaar in vlokken onderzocht worden. Wanneer van een bepaalde stofwisselingsziekte nog nooit een aangedane foetus werd gevonden in vlokken, is evenwel grote voorzichtig-

heid geboden en dient het resultaat in vlokken bevestigd te worden in vruchtwater. De kans zou namelijk kunnen bestaan dat varianten van het enzym in de placenta de omzetting in vlokken wel doen plaats vinden, waar deze varianten bij de foetus zelf en dus bij vruchtwatercellen niet vóórkomen. Een normaal resultaat zou dan een gezonde, niet-aangedane foetus suggereren, terwijl deze wel degelijk aan de ziekte kan lijden. Een voorbeeld van deze situatie is het enzym **aryl sulfatase B** bij de **ziekte van Maroteaux-Lamy**, waarbij een normaal resultaat in vlokken gevolgd werd door een afwijkend resultaat in vruchtwatercellen. Aan de hand hiervan hebben aanpassingen in de methodiek geleid tot het uitschakelen van de 'vals-positieve' omzettingen door de variant-aryl sulfatasen: daarna kon de prenatale diagnose wel goed in vlokken worden gesteld.

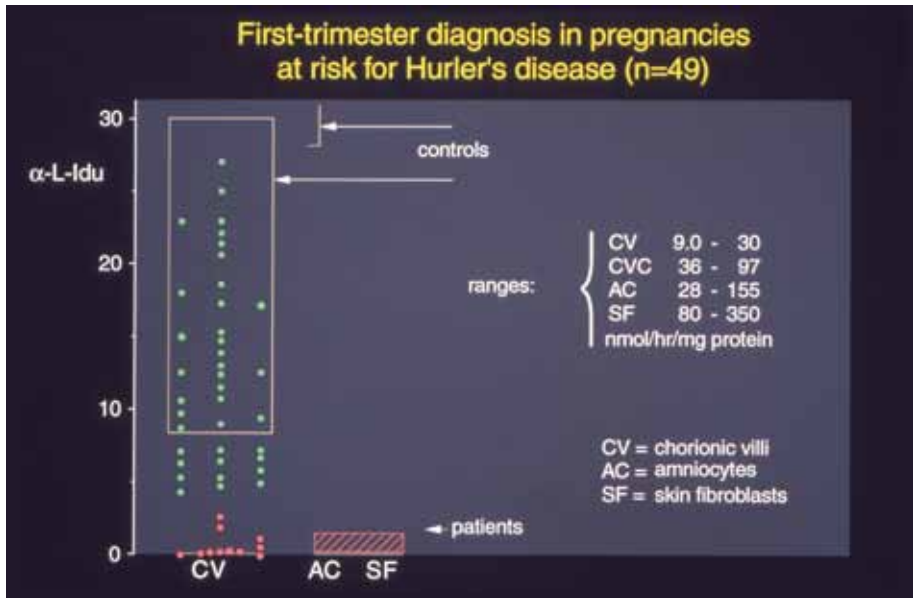
Enkele erfelijke stofwisselingsziekten kunnen niet in vlokken onderzocht worden, omdat het betreffende enzym in vlokken van normale foetus al niet meetbaar is. Dit komt doordat het gen van het betreffende enzym in de vlokken niet 'gebruikt' wordt en het corresponderende DNA dus niet wordt afgelezen en het eiwit er dus gewoon niet is. In deze gevallen moet vruchtwateronderzoek verricht worden, of kan prenataal DNA-onderzoek uitkomst bieden.

Bij sommige erfelijke stofwisselingsziekten is de normale activiteit van de betrokken enzymen in vlokken lager dan in vruchtwatercellen. Hierdoor kan het vóórkomen dat bij een foetus, die uiteindelijk waarschijnlijk dragerschap voor de stofwisselingsziekte zal vertonen en dus niet ziek zal zijn, een heel erg lage enzymactiviteit (**lage heterozygoot-activiteit**) wordt gevonden. Deze kan zelfs zo laag zijn dat het onderscheid met die van een aangedane foetus moeilijk te maken is. In dit soort gevallen is een bevestigend onderzoek in gekweekte vlokken nodig en soms herhaling van het biochemisch onderzoek in gekweekte vruchtwatercellen. In vruchtwatercellen is namelijk, door de grotere enzymactiviteit van het betreffende enzym daarin dan in vlokken, de afstand tussen afwezige activiteit en een zeer lage heterozygoot-activiteit groter (Figuur VI-28). Soms is deze afstand ook al groter in de gekweekte vlokken (cellen van het EEM-compartiment, de LTC-vlokken) dan in verse (ongekweekte) vlokken (mix van trofoblast- en EEM-cellen) en vindt bevestiging in eerste instantie plaats in de gekweekte vlokken. De bevinding van een enzymactiviteit die te hoog is voor een aangedane foetus en te laag voor een niet-aangedane, zal dan vermoedelijk passen bij een heterozygote foetus. Dit is een potentiële probleem, dat goed aangeeft waarom een buitengewone expertise vereist is voor de prenatale biochemie.

Ook de omgekeerde situatie kan zich bij een enkele stofwisselingsziekte voordoen: de afstand tussen normale en daardoor ook heterozygote enzymactiviteiten en afwezige enzymactiviteit kan in vlokken groter zijn dan in gekweekte vruchtwatercellen (Figuur VI-29).



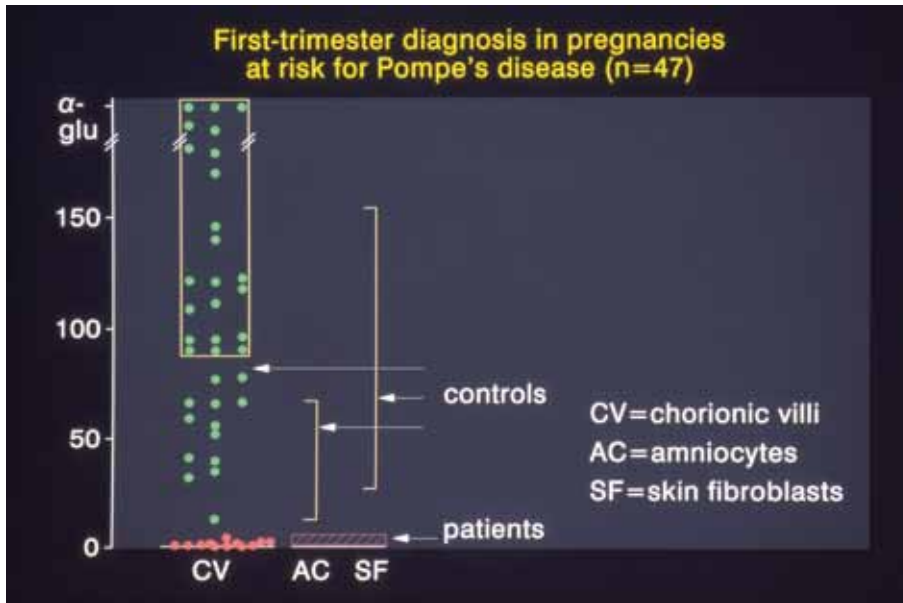
**Figuur VI-28A.** Prenataal biochemisch onderzoek naar de **ziekte van Krabbe**. Bij de ziekte van Krabbe is het enzym cerebroside- $\beta$ -galactosidase (cer- $\beta$ -gal), dat zich in de lysosomen bevindt, afwezig of niet werkzaam. De ziekte van Krabbe behoort ook tot de lysosomale stapelingsziekten. Omdat de stof, die normaal afgebroken wordt door het enzym cer- $\beta$ -gal, het vet-suikercomplex galactosylceramide, alleen voorkomt in de cellen die in het zenuwstelsel de schedes om de zenuwuitlopers vormen (de witte stof), vindt de stapeling alleen plaats in die cellen. Door de stapeling gaan deze cellen uiteindelijk verloren, waardoor de witte stof verdwijnt. Het verdwijnen van de witte stof van het zenuwstelsel leidt tot ernstige functiestoornissen daarvan. De ziekte van Krabbe is een zeer ernstige ziekte, die op de jonge kinderleeftijd tot de dood leidt, na een afschuwelijk ziekbed. De normale activiteit van het enzym cer- $\beta$ -gal (in de gele kaders aangegeven: de controle-range) is in vlokken veel lager dan in gekweekte vruchtwatercellen en onderhuidse bindweefselcellen (fibroblasten). Fraai is te zien dat de individuele activiteiten van niet-aangedane foetus, gevonden tijdens prenataal biochemisch onderzoek (groene bolletjes), gemiddeld lager liggen dan de controle-activiteiten in het gele kader. Immers, twee van de drie niet-aangedane foetus vertonen dragerschap met 'heterozygote' enzymactiviteit en één van de drie vertoont 'homozygoot normale' activiteit. Bij de controle-range gaat het om de gemeten activiteiten in willekeurige vlokken/vruchtwater/fibroblasten, waarin gemiddeld niet meer dan in 1:100 monsters dragerschap is te verwachten. Soms komt de in vlokken gemeten activiteit van het enzym cer- $\beta$ -gal van een normale foetus met dragerschap dicht in de buurt van die van een aangedane foetus (rode bolletjes): het is dan op het eerste gezicht niet duidelijk of er sprake is van een 'patient'-waarde of een 'laag-heterozygote' waarde. In deze gevallen moet nader onderzoek gedaan worden in gekweekte vlokken of zelfs in vruchtwatercellen, waarin de 'zieke' range (rood gestreepte kader) en controle-range veel verder uit elkaar liggen en de afstand tussen de enzymactiviteit bij (laag-) heterozygote en aangedane foetus navenant groter is (Illustratie ter beschikking gesteld door Dr. W.J. Kleijer, sectie Prenatale Biochemie, afdeling Klinische Genetica, Erasmus MC, Rotterdam).



**Figuur VI-28B.** Een ander voorbeeld van prenataal biochemisch onderzoek waar de 'aangedane' enzymactiviteiten (rode bolletjes) en de normale (groene bolletjes) in vlokken dicht bij elkaar kunnen liggen. In dit geval gaat het om de **ziekte van Hurler**, eveneens een lysosomale stapelingsziekte. Het enzym, dat bij de ziekte van Hurler niet werkt, is het  $\alpha$ -L-Iduronidase ( $\alpha$ -L-Idu). Dit enzym zit in een keten van enzymen die betrokken zijn bij de afbraak van grote suikerketens, waarin zich bijzondere suikers bevinden (**mucopolysacchariden**). Een voorbeeld van zo'n speciaal suiker is glucosamine, dat tegenwoordig wel gepropageerd wordt als middel tegen stijve gewrichten. Mucopolysacchariden zijn bestanddelen van bindweefsel en komen dus overal in het lichaam voor. Stapeling treedt dan ook overal op. Verschijnselen van de ziekte van Hurler zijn: korte gestalte, groot hoofd met grove gelaatstreken, bot- en gewrichtsafwijkingen, grote tong, vergrote lever en milt en geestelijke achterstand. Overlijden vindt over het algemeen plaats op het eind van de kinderleeftijd ten gevolge van hartfalen en complicaties van infecties.

Voor de activiteiten van het enzym  $\alpha$ -L-Idu geldt precies hetzelfde als het enzym cer- $\beta$ -gal uit Figuur VI-28A. Ook bij de prenatale diagnostiek van de ziekte van Hurler in vlokken kan het vóórkomen dat het niet duidelijk is of een lage activiteit de rest-activiteit van een aangedane foetus vertegenwoordigt, of een lage heterozygoot-activiteit van een heterozygote foetus. Nader onderzoek is dan nodig in gekweekte vlokken en eventueel zelfs in vruchtwatercellen (Illustratie ter beschikking gesteld door Dr. W.J. Kleijer, sectie Prenatale Biochemie, afdeling Klinische Genetica, Erasmus MC, Rotterdam).

Sommige erfelijke stofwisselingsziekten kunnen alleen onderzocht worden op delende cellen. In dat geval worden dan geen verse vlokken, maar gekweekte vlokken gebruikt. Zoals al eerder opgemerkt, is het meekweken van moederlijke cellen een potentiële probleem bij het kweken van vlokken: **maternale celcontaminatie (MCC)**. Dit geldt zeker bij de relatief langduriger kweken voor biochemisch onderzoek om voldoende cellen te krijgen. Een geringe bijmenging van moederlijke



**Figuur VI-29.** Bij de ziekte van Pompe komt het omgekeerde voor: de normale activiteit van het enzym  $\alpha$ -glucosidase ( $\alpha$ -glu) is in vlokken groter dan in vruchtwatercellen. Bij de ziekte van Pompe prefereren we daarom, afgezien van allerlei andere redenen, ook om laboratorium-technische redenen vlokken boven vruchtwater. Bij de ziekte van Pompe is het enzym  $\alpha$ -glu in de lysosomen niet werkzaam. Dit enzym splitst glucose af van **glycogeen**, dat bestaat uit vele aan elkaar gezette glucose-moleculen in een bepaald vertakkingspatroon, steeds tot aan het begin van een vertakking. Een ander enzym splitst de glucose dan bij de vertakking, waarna het enzym  $\alpha$ -glu weer verder kan gaan. Bij de ziekte van Pompe treedt stapeling van glycogeen op in de lysosomen van spieren en in het hart (ook spierweefsel). Kinderen met de ziekte van Pompe vertonen een snel progressieve en zeer ernstige spierzwakte en overlijden op jonge peuterleeftijd aan ademhalingsmoeilijkheden en hartfalen. De ziekte van Pompe is bij het publiek bekend geworden door de experimentele enzymtherapie, die in het Erasmus MC werd ontwikkeld door de biochemicus Dr. A.J.J. Reuser en de kinderarts Prof. Dr. A.T. van der Ploeg, in samenwerking met de farmaceutische industrie (Illustratie ter beschikking gesteld door Dr. W.J. Kleijer, sectie Prenatale Biochemie, afdeling Klinische Genetica, Erasmus MC, Rotterdam).

cellen met een in principe normale of heterozygote activiteit aan de cellen van de vlokken zonder activiteit kan de interpretatie van de uitkomst van de vlokcentest fataal beïnvloeden. Bij een echt afwezige activiteit is het resultaat altijd wel duidelijk, maar bij de bevinding van een (zeer) lage activiteit is bevestiging op gekweekte vruchtwatercellen noodzakelijk.

Het komt in de praktijk van de prenatale diagnostiek van erfelijke stofwisselingsziekten een enkele keer dus voor dat na een vlokcentest een vruchtwaterpunctie nodig is ter bevestiging.