

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

**ÚSTAV DĚDIČNÝCH METABOLICKÝCH PORUCH**



**MOLEKULÁRNÍ ANALÝZA VYBRANÝCH DĚDIČNĚ  
PODMÍNĚNÝCH ONEMOCNĚNÍ**

**Dizertační práce**

**Ing. Lenka Steiner Mrázová**

**školitel: Ing. Stanislav Kmoch, CSc.**

**PRAHA 2008**

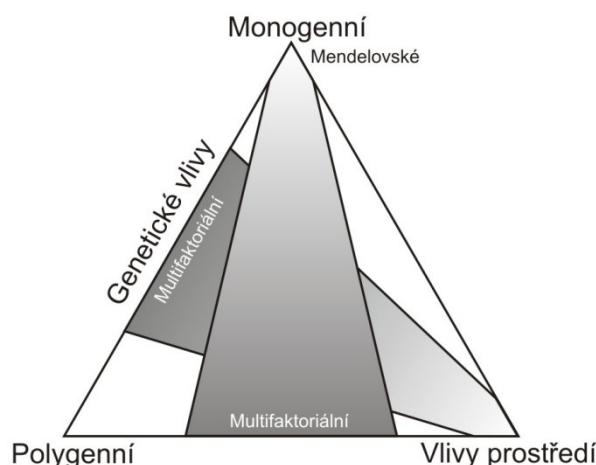
# Obsah

1	Úvod do řešené problematiky .....	4
1.1	Rozdělení dědičně podmíněných onemocnění.....	5
1.2	Identifikace odpovědných genů dědičně podmíněných onemocnění .....	9
2	Téma dizertační práce a její členění do jednotlivých kapitol:.....	16
3	Kapitola 1: Klinická, biochemická a molekulárně biologická analýza vybraných dědičných onemocnění metabolismu organických kyselin .....	17
3.1	Dědičné poruchy metabolismu ketonových látek .....	17
3.1.1	Metabolismus ketonových látek .....	17
3.1.2	Studie hyperketotických a hypoketotických stavů .....	21
3.1.3	Komentář a diskuse k přiložené publikaci #1 .....	22
3.1.4	Komentář a diskuse k přiložené publikaci #2.....	25
3.2	Methylmalonová acidémie.....	27
3.2.1	Formy izolované MMA: .....	28
3.2.2	Komentář a diskuse k přiložené publikaci #3 .....	32
3.3	Souhrn kapitoly 1 .....	40
4	Kapitola 2: Charakterizace syndromu spojeného s delecí několika genů na chromozómu X.....	41
4.1.1	X- chromozóm a repetitivní sekvence .....	41
4.1.2	Identifikace rozsáhlých delecí .....	42
4.1.3	Komentář a diskuse k přiložené publikaci #4.....	42
5	Kapitola 3: Studium molekulární podstaty mukopolysacharidózy typu IIIC .....	46
5.1	Mukopolysacharidóza IIIC (Sanfilippo C syndrom) .....	47
5.2	Komentář a diskuse k přiložené publikaci #5 .....	49
5.2.1	Identifikace genu HGSNAT .....	49
5.2.2	Diskuze .....	54
5.3	Souhrn kapitoly 3 .....	58

6	Závěr.....	59
7	Podíl autora na řešené problematice a poděkování .....	60
8	Publikace .....	62
9	Seznam použitých zkratk a nomenklatura .....	63
10	Reference.....	64
11	Kopie publikovaných prací .....	72
	Přiložená publikace #1.....	72
	Přiložená publikace #2.....	81
	Přiložená publikace #3.....	83
	Přiložená publikace #4.....	92
	Přiložená publikace #5.....	99

# 1 Úvod do řešené problematiky

Život každého jedince je ovlivněn působením dvou vlivů: genů a vnějšího prostředí. Některé aspekty života jsou podmíněny především geneticky, např. řada monogenních onemocnění nebo chromozómových aberací, jiné jsou dány působením převážně vnějšího prostředí. Mezi těmito dvěma póly se nachází řada dalších aspektů, které jsou ovlivněny současným působením obou těchto vlivů. U některých multifaktoriálních onemocnění je genetický vliv větší, např. diabetes, rakovina, u některých je tento vliv méně výrazný, např. obezita.<sup>1</sup> (Obr. 1)



**Obr. 1 Podíl genetických vlivů a vlivů vnějšího prostředí na život jedince.**

Obr. podle Strachan & Read (2004): Human molecular genetics 3, str.109.

Genetická onemocnění jsou podmíněna sekvenčními změnami genomu – mutacemi.<sup>2</sup>

Mutace u dědičně podmíněných onemocnění mají různý rozsah, od chromozomálních abnormalit po jednobázové změny, a různý projev. Mutace mají vliv na úroveň transkripce, translace, nebo mění vlastnosti genového produktu.

Rozsáhlé mutace jako inzere, duplikace, inverze, delece, vedou nejčastěji ke ztrátě nebo snížení transkripce postižených genů. Mutace, které mění otevřený čtecí rámeček (ORF – open reading frame) např. mutace v sestřihových místech, malé inzere, delece, nonsense mutace, vedou k tvorbě abnormálního transkriptu. Transkript je zpravidla okamžitě odbouráván vlivem opravného mechanismu NMD (nonsense mediated decay) nebo pokud transkript není odbourán, genový produkt obvykle není funkční. Mutace zpravidla zásadně mění vlastnosti

genového produktu, jsou jimi některé rozsáhlé delece, které vedou k tvorbě fúzního genu,<sup>3</sup> dále sestřihové mutace a inzere, delece, inverze nebo jednobázové missense mutace, které nemění otevřený čtecí rámeček.<sup>4-6</sup>

## 1.1 Rozdělení dědičně podmíněných onemocnění

**Chromozomální.** Většina chromozomálních onemocnění jako aneuploidie, uniparentální disomie, strukturní aberace nebo izochromozómy vzniká *de novo*. Výjimku tvoří některé translokace, kde jeden z rodičů je nosičem balancované translokace, u potomků však dochází k nevyvážené chromozomální výbavě, vzniku částečných trizomií.

**Monogenní.** Monogenně podmíněná onemocnění jsou způsobena mutacemi v jednom genu. Dnes je známo přes 2300 těchto poměrně vzácných onemocnění. (Tab.1) (Obr.2) Incidence souboru všech těchto onemocnění v populaci je zhruba 1:200 narozených.<sup>7</sup> Dělíme je na autozomálně dominantní, autozomálně recesivní, X-vázané a mitochondriální.<sup>4,8</sup>

**Tab.1 Počet záznamů dědičných onemocnění v databázi OMIM k 29.květnu 2008**

	Autozomální	X-vázaná	Y-vázaná	Mitochondriální	Celkem
* Geny se známou sekvencí	11691	538	48	37	<b>12314</b>
+ Geny se známou sekvencí a fenotypem	358	30	0	0	<b>388</b>
# Fenotyp se známým molekulárním základem	2103	196	2	26	<b>2327</b>
% Mendelovský fenotyp nebo lokus, molekulární základ není znám	1477	136	5	0	<b>1618</b>
Ostatní, především fenotypy s pravděpodobným Mendelovským základem	1944	140	2	0	<b>2086</b>
<b>Celkem</b>	<b>17573</b>	<b>1040</b>	<b>57</b>	<b>63</b>	<b>18733</b>

Zdroj: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM):  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/mimstats.html>.

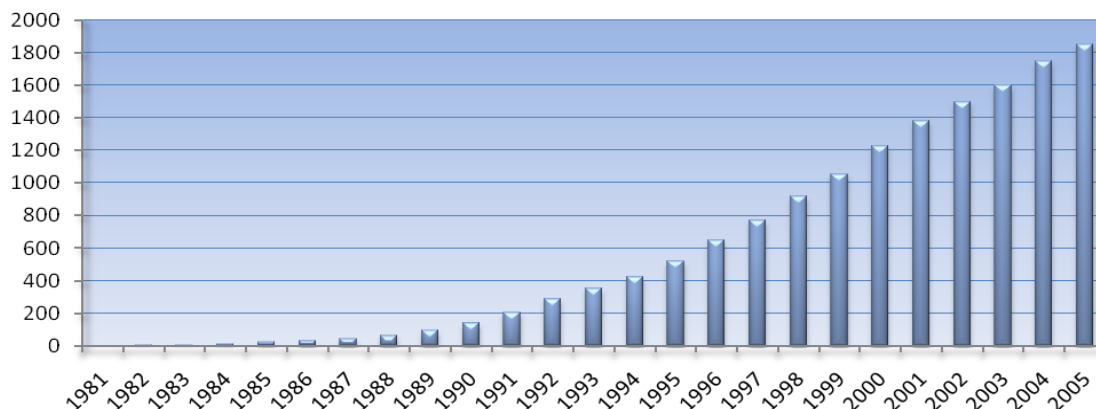
**Autozomální onemocnění.** U autozomálních onemocnění se dominance či recesivita zpravidla váže ke klinickému fenotypu onemocnění. Z molekulárního hlediska k projevu dominantního onemocnění obvykle stačí výskyt mutace již na jedné z alel, naopak recesivní onemocnění se projeví, pouze pokud mutaci nesou obě alely. U recesivních onemocnění se zpravidla heterozygoti - přenašeči - klinicky neliší od zdravých jedinců. Mohou však vykazovat rozdíly na biochemické (např. rozdílné koncentrace metabolitů), proteinové (např. pokles enzymové aktivity) nebo molekulární úrovni (např. snížená transkripce genu).

V některých případech dochází u heterozygotů vlivem vnějších podmínek k selektivní výhodě, např. heterozygoti pro srpkovitou anémii jsou více rezistentní k malárii, nebo heterozygoti pro cystickou fibrózu byli odolnější při epidemiích cholery. Mutace, které svým vlivem přinášejí selektivní výhodu heterozygotům, se pak stávají prevalentními mutacemi v postižené populaci. Autozomálně dominantní onemocnění se projevují různou expresivitou a penetrancí. Expresivita je míra intenzity projevu alely ve fenotypu, penetrance je frekvence projevu znaku u osob se stejným genotypem, obvykle vyjadřovaná procenty. Expresivita a penetrance je zpravidla ovlivněna dalšími genetickými faktory, vlivy prostředí, či věkem jedince. Postižení heterozygotů u autozomálně dominantních onemocnění je většinou méně závažné než postižení u homozygotů, např. u achondroplázie apod.<sup>9</sup>

**X-vázaná** recesivní onemocnění jsou dána mutacemi na chromozómu X. U mužů, kteří nesou pouze jeden chromozóm X (jsou hemizygoty pro mutace v genech na chromozómu X), se onemocnění projeví vždy. U žen, které nesou dva X chromozómy by projevy onemocnění měly být stejné jako u ostatních autozomálních poruch. Vzhledem k nerovnováze objemu genetické informace u mužů a žen, dochází u žen k X-inaktivaci, umlčení jednoho X chromozómu v každé buňce. Tím je vyrovnáno kvantum exprese X-vázaných genů. X-inaktivace se děje více méně náhodně již v raném stádiu embryogeneze, čímž dochází k mozaicismu, např. různé tkáně, nebo jejich části mají umlčený jiný X chromozóm. Mozaicismus vede k rozdílnému projevu onemocnění u heterozygotek. Např. u Fabryho choroby, která byla dříve popisována u žen jako recesivní, dnes sledujeme různě závažné formy onemocnění dané právě X-inaktivací zdravého X chromozómu v některých tkáních.<sup>10</sup>

11

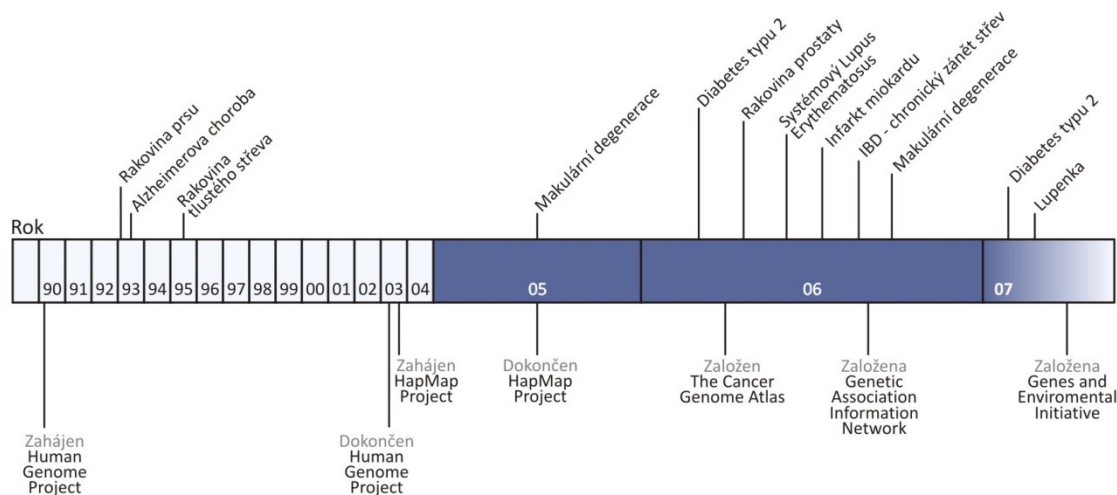
**Mitochondriální.** Mitochondriální, maternálně dědičná onemocnění jsou způsobena mutacemi v mitochondriální DNA. Expresivita onemocnění je určena stupněm heteroplazmie (počet kopií mutované a nemutované mtDNA) v mitochondrii, buňce nebo tkáni.



**Obr. 2 Vyrůstající počet odpovědných genů dědičných onemocnění nalezených během let 1981 - 2005.**

Zdroj: Online Mendelian Inheritance in Man a National Human Genome Research Institute (National Institutes of Health - NIH) <http://www.genome.gov/>

**Multifaktoriální.** Multifaktoriální onemocnění jsou dána kombinací změn v různých genech v nezávislých lokusech a vlivem vnějšího prostředí. Změny v genomu nejsou v tomto případě „pravými mutacemi“, neboť samy o sobě obvykle nemají vliv na vznik onemocnění, jejich účinek se projeví až v kombinaci s dalšími faktory. Mezi multifaktoriální onemocnění patří řada tzv. civilizačních chorob jako diabetes, ateroskleróza apod.<sup>2, 12, 13</sup>



**Obr. 3 Vývoj studia molekulární podstaty komplexních onemocnění**

Zdroj: National Human Genome Research Institute (National Institutes of Health - NIH) <http://www.genome.gov/>

Původně se předpokládalo, že multifaktoriální onemocnění jsou podmíněna kombinací populačně frekventních polymorfismů. Dnes se ukazuje, že by mohla být způsobena privátními, relativně těžkými mutacemi s nízkou expresivitou, která se projeví až vlivem dalších genetických a vnějších faktorů.

**Epigenetika.** Epigenetické jevy souvisí se strukturními i chemickými modifikacemi chromatinu – především DNA (metylací CpG dinukleotidů) a nukleozomálních histonů (acetylace, metylace). Epigenetika se zabývá mitotickým i meiotickým vznikem a přenosem informací, které nejsou kódovány v primární struktuře DNA. Epigenetické změny se šíří klonálně a souvisí s řízením diferenciací v průběhu ontogeneze. Dědičné epigenetické jevy představují výjimky z Mendelových zákonů, např. odlišná exprese alel v jednom buněčném jádře v případě parentálního imprintingu nebo vznik paramutací. Při parentálním imprintingu dochází k umlčování některých alel v závislosti na pohlaví rodiče, to znamená, že některé geny jsou exprimovány pouze, jsou-li děděny paternálně jiné, jsou-li děděny maternálně. Parentální imprinting je přitom nezávislý na pohlaví potomstva a bývá stabilní po celý život. Během meiózy pak dochází k odstranění epigenetické modifikace a k jejímu znovunastavení podle pohlaví jedince.<sup>14</sup> Paramutace jsou výsledkem alelických interakcí na úrovni RNA, které vedou k dědičné změně exprese některých genů. Epigenetika může výrazně ovlivňovat penetranci a expresivitu dědičných onemocnění, jejich dědičnost, a je jedním z faktorů ovlivňujících multifaktoriální onemocnění. Epigenetické jevy přitom samy mohou být ovlivněny vnějším prostředím.<sup>15</sup>

Jedním z neobvyklých projevů dědičnosti, který vykazuje výjimku z Mendelových zákonů u monogenních onemocnění, je anticipace. Průběh a projev onemocnění se s každou nastávající generací stává závažnějším a/nebo dochází k jeho dřívějšímu nástupu. Anticipace je v současné době nejvíce spojována s nestabilní expanzí trinukleotidových opakování. Asymptomatictí rodiče nesou několikrát zvýšený počet tripletových opakování oproti normální populaci, ovšem u potomků dochází k mnohonásobnému zvýšení těchto opakování. Počet opakování, při kterém již dochází k projevům onemocnění, závisí na umístění trinukleotidových opakování. Pokud se opakování nachází v kódující oblasti, jako je tomu u Huntingtonova nebo Kennedyho onemocnění, je kritická hranice nestability již od 36, respektive 38 opakování; pokud se opakování nachází v nekódující oblasti genu, např. Syndrom fragilního X nebo Friedrichova ataxie, je tato hranice mnohem vyšší, přes 200 opakování.<sup>16</sup>



**Diagnostika genetických onemocnění.** Chromozomální onemocnění tradičně detekujeme cytogenetickým vyšetřením karyotypu, velký rozmach zaznamenala fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) a komparativní genomová hybridizace (CGH).<sup>17</sup> K detekci rozsáhlých mutací (delecí, inzercí, apod.) slouží obvykle Southern blotting nebo nově CGH a MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification). Většina mutací, kolem 90 %, <sup>18</sup> je svým rozsahem velmi malá a ovlivňuje pouze jeden gen. (Tab.2) K analýze těchto mutací se nejčastěji používají molekulárně genetické techniky, různé varianty PCR, sekvenování, RFLP, apod.

**Tab.2 Typ a počet mutací v databázi HMGD<sup>®</sup> k 29.květnu 2008**

	Veřejně přístupné záznamy:	Veškeré záznamy:
<b>Celkem mutací:</b>	<b>57294</b>	<b>79078</b>
Počet genů	2191	3000
Počet cDNA sekvencí	2145	2876
<b>Typy mutací:</b>		
Missense/nonsense	32847	44776
Sestřihové	5393	7640
Regulační	768	1227
Malé delece	9392	12722
Malé inzere	3756	5179
Malé indel	841	1155
Rozsáhlé delece	3240	4609
Rozsáhlé inzerce	497	886
Komplexní přestavby	414	667
Opakující se variace	146	217

Databáze zahrnuje mutace v jaderných genech, které jsou odpovědné za dědičná onemocnění. Neobsahuje somatické mutace a mutace v mitochondriálním genomu (databáze mitochondriálních mutací je uvedena na Mitomap <http://www.mitomap.org/>)

Zdroj: The Human Gene Mutation Database (HGMD<sup>®</sup>) at the Institute of Medical Genetics in Cardiff <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>

## 1.2 Identifikace odpovědných genů dědičně podmíněných onemocnění

Identifikace odpovědného genu, u kterého vlivem mutací dochází k významné změně na molekulární úrovni a následně k projevu onemocnění, se stala jedním z hlavních cílů lékařské genetiky. K dnešnímu dni je známo přes 2300 onemocnění, u kterých je znám

odpovědný gen. (Tab.1) Nalezení mutací v odpovědném genu u těchto onemocnění se tak stává součástí diagnostiky. U celé řady onemocnění však odpovědný gen doposud znám není. K identifikaci takového genu se používá několik postupů a jejich kombinace.

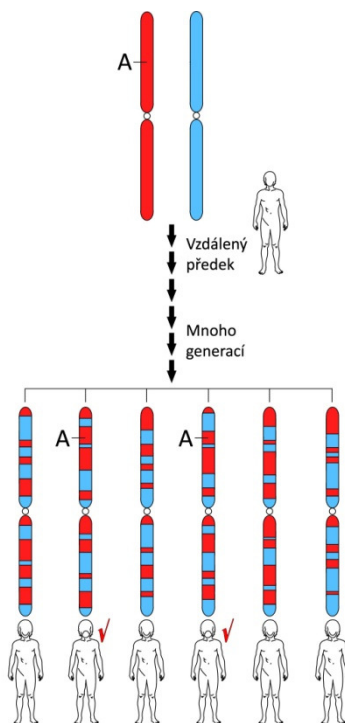
**Funkční klonování.** Funkční klonování je založeno na znalosti biochemické podstaty onemocnění, kdy je znám genový produkt (např. protein) a jeho funkce, která je detekovatelná (např. enzymová aktivita). Analýza genového produktu (např. sekvenováním proteinu) vede k určení genu a následně k jeho pozici v genomu. Takto byla odhalena velká část genů kódující enzymy.

**Sekvenování kandidátních genů.** Výběr kandidátních genů, které mohou souviset s daným onemocněním, je dán znalostmi na klinické, biochemické, popř. molekulárně biologické podstatě onemocnění. Např. u poruch růstu budou přednostně analyzovány geny, jejichž produkty jsou s růstem funkčně spjaty nebo v případě poruchy transmembránového přenosu budou analyzovány nejprve geny, u kterých byly nalezeny typické transmembránové domény. Kandidátní geny mohou být dále vybrány na základě porovnání s geny modelových organismů, u kterých je v případě jejich dysfunkce znám fenotyp onemocnění.<sup>19</sup> Funkce mnoha genových produktů v modelových organismech byla objasněna na základě náhodného nebo cíleného knock-outování genů.<sup>20</sup> Pouze málo odpovědných genů může být identifikováno přímo výběrem a sekvenováním kandidátních genů, většinou jde o doplňkovou metodu k jiným postupům, jako je funkční nebo poziční klonování.

**Obnovení nebo ztráta funkce genového produktu.** K obnovení funkce genového produktu se používá komplementační analýza. Zpravidla se jedná o postupnou *in vitro* transfekci klonů z cDNA knihoven do tkáňové kultury pacienta. Naopak při systematické RNA interferenci (RNAi), jsou pomocí malých interferujících RNA (siRNA- small interfering RNA) cíleně odbourávány mRNA a dochází tak ke sledované ztrátě funkce genového produktu.

## Poziční klonování a vazebná analýza.

Poziční klonování vychází přímo z analýzy primární struktury genomu, biologická podstata onemocnění nemusí být vůbec známa. Je založeno na určení fyzické vazby mutace v hledaném genu s dalšími polymorfními alelami na chromozómech postižených jedinců. Konfigurace polymorfních alel podél chromozómu se nazývá haplotyp. U jedince tedy existují dva haplotypy pro každou sadu autozómů. Variabilita haplotypů v populaci je způsobena mechanismem meiotické rekombinace. Princip pozičního klonování je založen na skutečnosti, že fyzicky blízké změny v genomu jsou děděny společně, jsou ve vazbě. To má za následek, že blízké okolí mutace, respektive genu, je stejné u všech rodinných příslušníků nesoucích stejnou mutaci. (Obr.4) K identifikaci odpovědného genu vede sledování segregace společně děděných oblastí s fenotypem onemocnění. Důležitým faktorem, který ovlivnil velký rozmach pozičního klonování, bylo genetické a později fyzické zmapování lidského genomu a detailní popis polymorfismů. Díky pozičnímu klonování mohly být na základě vlastností nalezeného genu (např. shodné motivy s jinými geny, transmembránové motivy, substrát vazebné motivy) zpětně popsány i samotné genové produkty a odhalena jejich funkce.

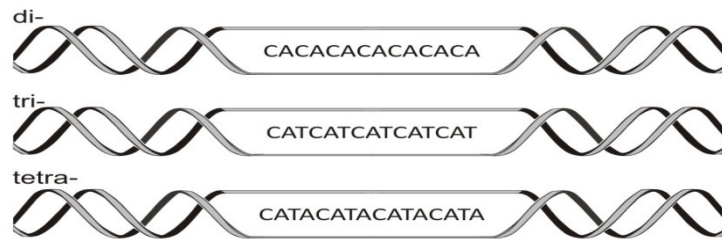


**Obr. 4 Dědičnost alel.** Během mnoha generací dochází vlivem rekombinace k náhodnému rozlámání původního chromozomu. Alela A je děděna spolu s nejbližším okolím.

Zdroj: International HapMap Project <http://www.hapmap.org/>,  
<http://www.hapmap.org/images002F>.

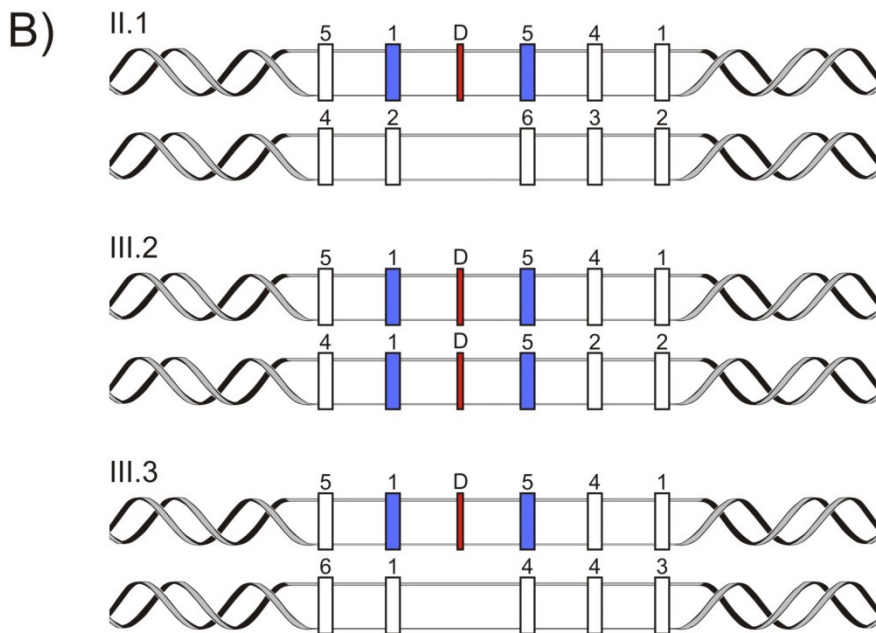
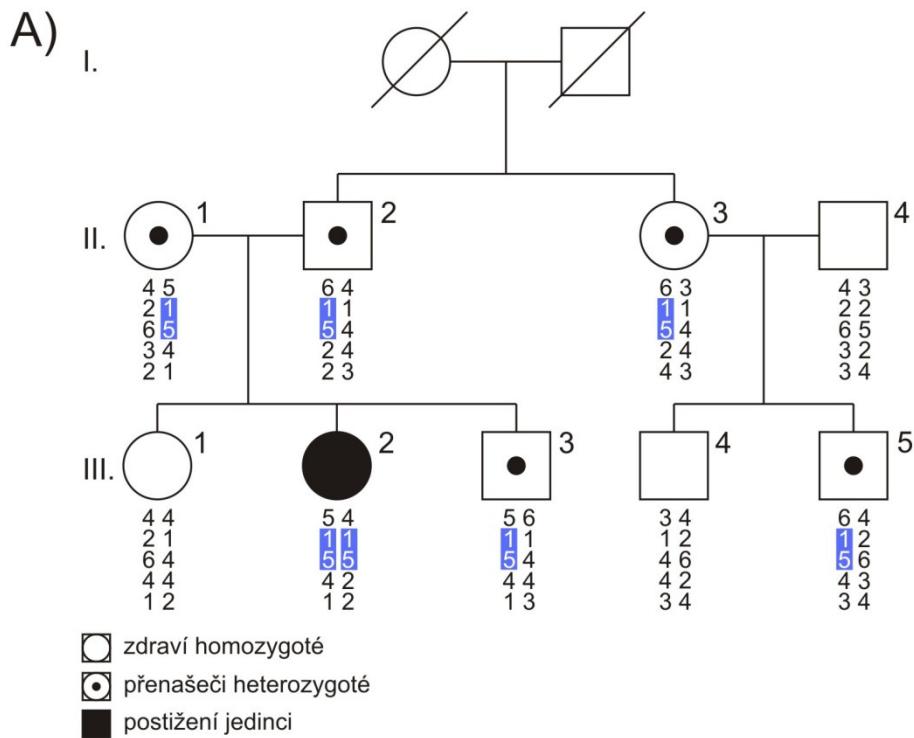
**Strategie pozičního klonování u monogenních onemocnění.** Strategií pozičního klonování je nejprve, shromáždit co nejvíce postižených rodin s co nejvíce členy a jasně vymežit sledovaný znak onemocnění. Obvykle je sledovaným znakem přímo klinický projev onemocnění, ale může jím být i kvantitativní znak, např. biochemická změna jako snížená enzymová aktivita, která se nemusí klinicky projevit. Následuje sestavení rodokmenu, popis přenosu sledovaného znaku: autozomálně dominantní, recesivní, s úplnou nebo neúplnou penetrancí a expresivitou apod. a genotypování pomocí genetických markerů. Genetickými markery jsou různé typy polymorfismů s jednoznačně definovanou pozicí na chromozómu: jednobázové změny (SNP), inzere, delece, opakující se sekvence (VNTR, STR). V současné době rozvoje čipových technik se, vzhledem k jejich ohromnému množství, využívá SNP markerů, jejich nevýhodou je, že jsou pouze bialelické. Naopak genotypování pomocí STR (short tandem repeats) má v tomto směru velkou výhodu. STR jsou krátké opakující se sekvence di-, tri- nebo tetranukleotidů, které jsou náhodně rozmístěny v genomu. (Obr.5) Jsou multialelické, vykazují tedy vysoký stupeň heterozygotie v populaci a existuje vysoká pravděpodobnost, že většina jedinců je heterozygotních, mají tak vysokou výpovědní hodnotu. Dalším krokem je sestavení haplotypu jednotlivých členů rodin na základě genotypování a dědičnosti. Následuje vazebná analýza, sledování segregace společně děděných oblastí na genomu. (Obr.6) Parametrem vazebné analýzy je LOD (logarithm of the odds) skóre. LOD skóre je dekadický logaritmus poměru relativních pravděpodobností, existence a neexistence vazby dvou alel u potomků. Jednoduše řečeno, LOD skóre udává, zda se dvě alely nacházejí ve vazbě a jsou děděny společně. Čím větší je LOD skóre, tím je větší pravděpodobnost, že jsou dvě alely ve vazbě, hranice od které předpokládáme vazbu mezi alelami je LOD skóre větší nebo rovno +3, naopak vazbu zcela vyloučíme, pokud je LOD skóre menší než -2. V oblastech s vysokým LOD skóre jsou na základě analýzy haplotypů určeny rekombinace u jednotlivých členů rodin. Snahou je takto postupně vymežit co nejmenší oblast na genomu, která segreguje s přenosem onemocnění v rodině. Výsledná kandidátní oblast je různě velká podle počtu informativních meióz v rodině, popř. rodinách a počtu genetických markerů. Přehled známých i predikovaných genů v kandidátní oblasti a jejich profily (tkáňové exprese, apod.) jsou uvedeny v internetových databázích (NCBI, Ensemble, UCSC, aj.). Predikce genů vychází z primární struktury DNA (charakteristické začátky transkripce - CpG ostrovy, TATA boxy, atd., charakteristické proteinové nebo RNA motivy, apod.), nebo porovnáním s genomy modelových organismů, vyhledáním konzervovaných oblastí, ORF's, EST (expressed sequence tag - expresní štítky), apod. Kandidátní oblast je možné přímo analyzovat sekvenováním pomocí nových technik rychlého

sekvenování (Roche, Illumina) a vyhledat odchylky v oblasti. Případně lze nejprve vytipovat kandidátní geny, u kterých by defekt jejich předpokládané funkce produktu mohl odpovídat sledovanému onemocnění.



**Obr. 5 Short tandem repeats (STR).** Několikanásobná opakování di- tri- nebo tetranukleotidů jsou náhodně rozmístěna v genomu.

**Asociační studie.** Jiná forma statistické analýzy se využívá v asociačních studiích, kdy je sledována rozdílná relativní frekvence alel genetických markerů v populaci postižených a nepostižených jedinců.<sup>21</sup> Tento typ studií se často uplatňuje k determinaci multifaktoriálních onemocnění.<sup>13</sup> Studiím založeným na analýze haplotypů má napomoci i International HapMap Project,<sup>22</sup> který si vzal za cíl sestavit mapu běžných haplotypů a popsat genetickou variabilitu u člověka. Ve studii je zahrnuto 270 osob ze 4 populací (Evropa, Čína, Japonsko, Nigérie).



**Obr. 6 Genotypování a vazebná analýza pomocí STR markerů.**

A) Rodokmen s vyznačenou dědičností onemocnění a haplotyp jedinců, sestavený pomocí genotypování STR markerů.

B) Haplotypy jedinců: matky pacienta - přenašečky II.1, pacienta - III.2 a sourozence pacienta - přenašeče III.3. Společně děděná oblast, která segreguje s onemocněním je vyznačena modře. Odpovědný gen D - červeně.

Obr. podle Knoch: Genomics in Medicine, přednáška.

Klíčovým bodem při identifikaci odpovědných genů je sestavení vypovídajícího souboru vstupních dat a vyhodnocení výsledků provedených analýz. Soubor postižených jedinců musí být jasně definován (klinicky, biochemicky) vzhledem ke kontrolní skupině. Především u multifaktoriálních onemocnění je důležitá správně postavená hypotéza vztahu sledovaných změn a výběru zkoumaných osob. Vyhodnocení velkého množství získaných výsledků se dnes neobejde bez složitých matematických modelů. Spolupráce s matematiky, statistiky a bioinformatiky je nezbytná.

Potvrzení vazby mezi nalezeným genem a onemocněním je možné přímo identifikací mutací v genu u postižených jedinců, které se nevyskytují u zdravé populace; obnovením funkce genového produktu *in vitro* v tkáňových kulturách, transfekcí zdravé alely, klonované do expresního vektoru; nebo vytvořením zvířecího modelu s knock-outovaným ortologním genem.

Determinace vztahu mezi onemocněním a jeho molekulární podstatou přináší řadu využití. Zpřesňuje klasifikaci onemocnění, mutace v různých nezávislých genech mohou vést ke stejnému klinickému fenotypu. Je možné určit funkci doposud neznámých genových produktů - proteinů, RNA, a tím lépe porozumět fungování lidského organismu. Přispívá k prognóze onemocnění, k jeho cílené léčbě<sup>23</sup> nebo k jeho prevenci. V budoucnu bude pravděpodobně možné u každého jedince zjistit kritický soubor genetických variant a odhalit tak dispozici k některým multifaktoriálním onemocněním. Na druhou stranu vzrůstají obavy o zneužití těchto citlivých informací v mnoha oblastech života (zaměstnání, pojištění, apod.).

## 2 Téma dizertační práce a její členění do jednotlivých kapitol:

Hlavním cílem dizertační práce „**Molekulární analýza vybraných dědičně podmíněných onemocnění**“ byla analýza, případně určení odpovědných genů u vybraných dědičně podmíněných onemocnění. Práce popisuje různé metodické postupy, které vedly k identifikaci a charakterizaci mutací u vybraných odpovědných genů.

Studie je rozdělena do tří kapitol:

- **Klinická, biochemická a molekulárně biologická analýza vybraných dědičných poruch metabolismu organických kyselin** se zabývá analýzou již známých genů u souboru pacientů a vyhodnocením vlivu nalezených mutací na stav a vývoj onemocnění.
- **Charakterizace syndromu spojeného s delecí několika genů na chromozómu X** uvádí příklad jednoduché molekulárně genetické metody, která vede k odhalení rozsáhlých delecí.
- **Studium molekulární podstaty mukopolysacharidózy typu IIIC** se věnuje metodám, které vedou k identifikaci odpovědného genu u monogenního onemocnění. A dále analýzou mutací tohoto genu u souboru pacientů.



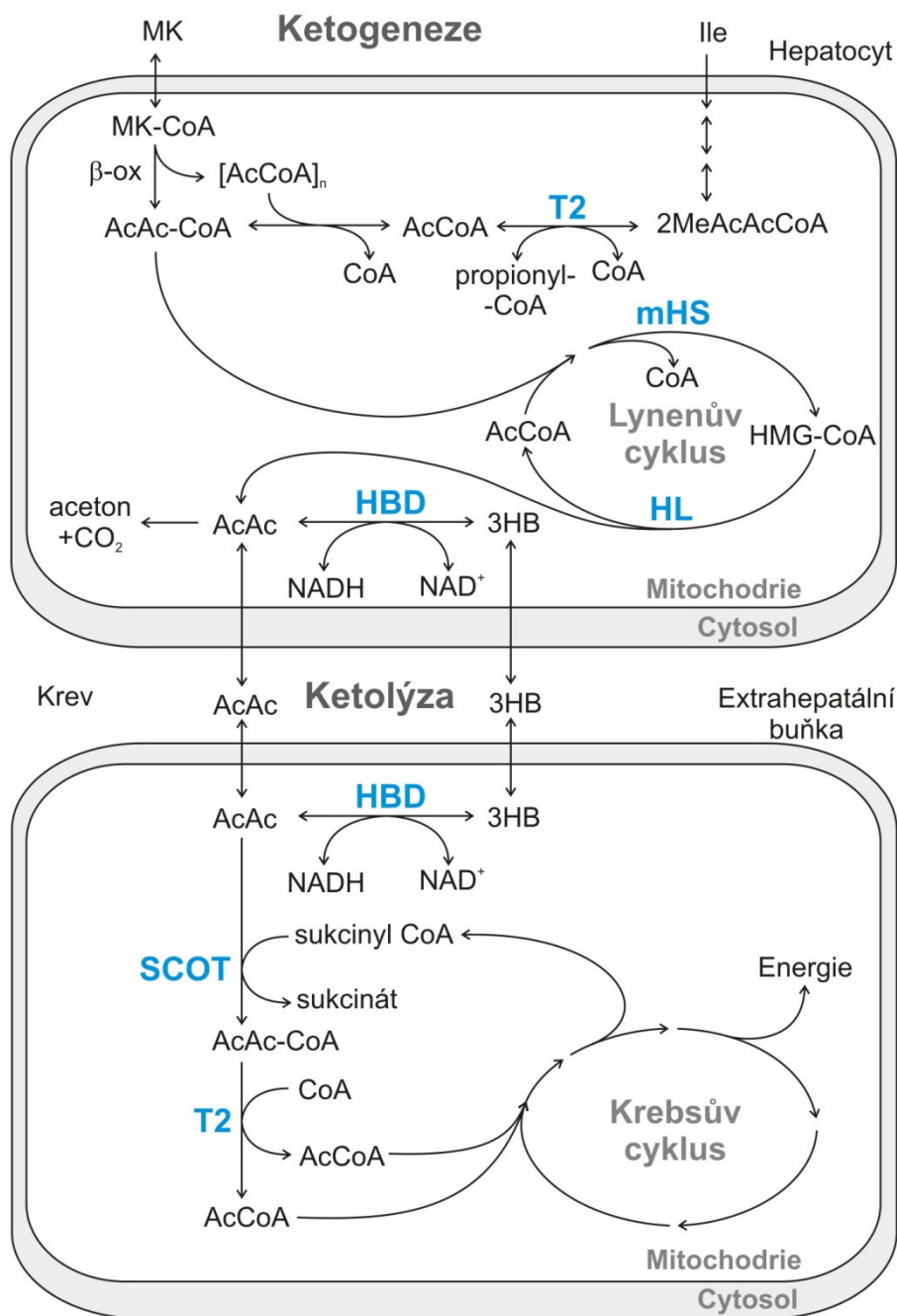
### **3 Kapitola 1: Klinická, biochemická a molekulárně biologická analýza vybraných dědičných onemocnění metabolismu organických kyselin**

V Ústavu dědičných metabolických poruch v Praze je každý rok přijato kolem pěti až šesti tisíc dětí s podezřením na některou dědičnou poruchu metabolismu. Cílem dvou studií bylo v rámci diferenciální diagnostiky vypracovat systém biochemických, enzymologických a molekulárně biologických metod pro pacienty s defekty v metabolismu ketonových látek a pacienty s methylmalonovou acidémií. Výsledky projektů jsou využity k časně a komplexní diagnostice pacientů a mají důležitý význam při individuální prognóze a léčbě onemocnění. V postižených rodinách je nyní umožněno genetické poradenství, popř. prenatální diagnostika.

#### **3.1 Dědičné poruchy metabolismu ketonových látek**

##### **3.1.1 *Metabolismus ketonových látek***

Metabolismus ketonových látek, kterými jsou acetoacetát (AcAc), 3-hydroxybutyrát (3HB) a aceton, zahrnuje jejich vznik – ketogenezi a jejich následnou utilizaci – ketolýzu. Ketogeneze i ketolýza jsou mitochondriální procesy, které probíhají v odlišných tkáních. Ketogeneze probíhá v jaterních buňkách a účastní se jí enzymy acetoacetyl-CoA thioláza (T2), 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA syntáza (HMGS), a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyáza (HMGL). Výchozí látkou ketogeneze je acetyl-CoA, produkt  $\beta$ -oxidace mastných kyselin a ketogenních aminokyselin, především isoleucinu. Ke ketolýze dochází v extrahepatálních tkáních, především v mozku, ledvinách, srdci a kosterním svalstvu a zahrnuje enzymy sukcinyl-CoA: 3-ketoacid-CoA transferázu (SCOT) a acetoacetyl-CoA thiolázu (T2). Acetoacetyl-CoA thioláza je jediným enzymem účastnícím se ketogeneze i ketolýzy.<sup>24</sup> (Obr.7)



**Obr. 7 Metabolismus ketonových látek.** Ketogeneze probíhá v játerních buňkách,  $\beta$ -oxidací mastných kyselin vzniká AcAc-CoA (acetoacetyl-CoA) a Ac-CoA (acetyl-CoA). T2 (mitochondriální acetoacetyl-CoA thiolasa) katalyzuje interkonverzi mezi Ac-CoA a AcAc-CoA. AcAc-CoA vstupuje do Lynenova cyklu, kde je přeměněn na AcAc (acetoacetát), pomocí enzymů mHS (mitochondriální 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA syntázy) a HL (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyázy). Ketolýza probíhá v extrahepatálních tkáních, AcAc je aktivován enzymem SCOT (sukcinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferázy) na AcAc-CoA, který je přeměněn pomocí T2 na Ac-CoA, ten vstupuje do Krebsova cyklu. Reverzibilní reakce mezi AcAc a stabilním netěkavým 3HB (R-3-hydroxybutyrátem) je katalyzována 3HBD (3-hydroxybutyrát dehydrogenázou).

Ketonové látky jsou důležitou součástí energetického metabolismu organismu,<sup>25</sup> v případě vyčerpání zásob buněčné glukózy, jako například při dlouhodobém hladovění, při stravě s vysokým obsahem tuků, při přechodu z prenatálního do kojeneckého stavu nebo při diabetu. Mozek využívá jako hlavní zdroj energie glukózu a její deriváty (laktát, glycerol), ale není schopen využívat mastné kyseliny.<sup>26</sup> Během lačnění jsou proto až dvě třetiny energetického zásobení mozku pokryty utilizací ketonových látek. Dalšími důležitými orgány, které využívají ketonové látky k energetickému zásobení, jsou srdce, kosterní sval a ledviny.

Koncentrace ketonových látek v organismu závisí na více faktorech, normálně jsou vyšší během lačnění, stejně tak jsou vyšší u malých dětí než u dospělých.<sup>25</sup> Abnormálně vysoké hodnoty v krvi a moči se nazývají ketózou, naopak nízké hodnoty během hypoglykémie se nazývají hypoketotickou hypoglykemií. Ketóza může být způsobena fyziologicky (hladověním, dlouhodobou fyzicky namáhavou prací nebo cvičením, ketogenní dietou) nebo může být důsledkem hormonálních poruch (diabetes, deficit glukokortikoidů, deficit růstového hormonu), infekcí, intoxikací organismu (především alkoholem), ketotickou hypoglykemií a dědičnými poruchami metabolismu. Hypoketotická hypoglykémie může být způsobena hyperinsulinismem nebo dědičnými poruchami metabolismu (oxidace mastných kyselin a ketogeneze).<sup>25</sup> U pacientů s poruchou metabolismu ketonových látek dochází k atakám Rey-like syndromu s hypoketotickou nebo hyperketotickou hypoglykemií nebo permanentní ketonurií, k atakám ketoacidózy s acetonemickým zvracením, důsledkem může být stav bezvědomí, orgánové selhání a náhlá smrt. Ataky následují zpravidla po dlouhodobém lačnění nebo zvýšeném přísunu bílkovin. Mezi atakami bývají pacienti často asymptomatictí.

### **3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyáza (HL) (deficit HL: OMIM +246450)**

3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyáza (HL) (EC 4.1.3.4) katalyzuje poslední krok ketogeneze a leucinového metabolismu, štěpení 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) na acetyl-CoA a acetoacetát. U člověka existuje HL ve dvou isoformách: mitochondriální (mHL) a peroxizomální. Prekursor lidské mHL (325 AK zbytků) je štěpen na 31.5-kDa monomer (298 AK zbytků). Maturovaná mHL je homodimer, který ke své aktivitě vyžaduje přítomnost divalentního kationtu  $Mg^{2+}$  nebo  $Mn^{2+}$ .<sup>27</sup> Enzym je vysoce evolučně konzervovaný. Nedávno byla publikována jeho krystalová struktura a popsána aktivní místa a funkční regiony.<sup>28, 29</sup> Aktivní místo tvoří aminokyselinové zbytky R41, E72, H233 a C266, k vazbě kationtu jsou nezbytné aminokyselinové zbytky D42 a H235. C-konec

enzymu tvoří tripeptid (Cys-Lys-Leu), což je hlavní motiv pro směrování bílkovin do peroxizomu. Peroxizomální izoforma lidské HL se vyskytuje asi v 6% v játrech a kolem 16-20% ve fibroblastech, lymfoblastech a buňkách HepG2.<sup>30, 31</sup> Její funkce není dosud známá.

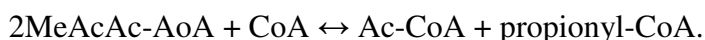
Gen *HMGCL* se nachází na chromozómu 1p35.1-36.1, obsahuje devět exonů a zaujímá oblast větší než 24 kb. Transkript je dlouhý ~1.7 kb a nachází se ve všech dosud studovaných tkáních.<sup>27</sup> K dnešku bylo publikováno 28 mutací u 93 pacientů.<sup>32</sup>

Pacienti a léčba: Deficit HL je vzácné autozomálně recesivní onemocnění neonatálního nebo dětského věku, které se projevuje těžkými hypoketotickými hypoglykémiami a metabolickou acidózou, hyperamonémií, zvracením a hypotonií, kolem 20 % případů je fatálních.<sup>33</sup> Organické kyseliny v moči ukazují vysoké hodnoty kyselin 3-hydroxy-3-methylglutarové, 3-hydroxy-isovalerové, 3-methylglutakonové a 3-methylglutarové. Během akutních episod je nitrožilně podávána glukóza, aby se zabránilo poškození mozku a dalších orgánů, které by mohlo vést k mentální retardaci, nebo smrti. Dlouhodobá léčba je založena na dietě s nízkým obsahem bílkovin a tuků, suplementaci karnitinem a zabránění hladovění. Během dospívání onemocnění ustupuje, a pokud bylo správně léčeno, v dospělosti příznaky úplně vymizí.

### **Mitochondriální acetoacetyl-CoA thioláza (T2) (deficit T2: OMIM \*607809)**

V savčích tkáních, včetně lidské, bylo nalezeno pět různých 3-oxothioláz: mitochondriální 3-ketoacyl-CoA thioláza (T1), mitochondriální acetoacetyl-CoA thioláza (T2), peroxizomální 3-ketoacyl-CoA thioláza (PT), cytosolová acetoacetyl-CoA thioláza (CT) a mitochondriální trifunkční protein. Thiolázy sdílejí 34-45% aminokyselinovou sekvenční podobnost a liší se v katalytických a imunochemických vlastnostech.<sup>24</sup>

Mitochondriální acetoacetyl-CoA thioláza (T2) (EC 2.3.1.9) je klíčovým enzymem metabolismu ketonových látek a isoleucinovém metabolismu. T2 je jediným enzymem nacházejícím se jak v ketolýze tak v ketogenezi, katalyzuje reverzibilní reakce:



Existence jaterního isoenzymu T2 byla předpovězena Middletonem a Huthem,<sup>24, 34</sup> později byla nalezena CoA- modifikovaná izoforma A, která se vyskytuje pouze v játrech, na rozdíl od nemodifikované izoformy B, která se nachází ve všech tkáních.<sup>35</sup> Obě izoformy jsou produktem jednoho genu a jsou aktivovány pouze v přítomnosti  $\text{K}^+$  iontů.

Maturovaný homotetramer lidské T2 vzniká v mitochondriích štěpením prekursoru na 41 kDa podjednotky (394 AK zbytků). Nedávno byla publikována krystalová struktura lidské mitochondriální T2.<sup>36</sup> Aktivní místo tvoří konzervované aminokyselinové zbytky C126, N353, H385, a C413. Na každé podjednotce jsou přítomna vazebná místa pro chloridové ionty a ionty kalcia.

Gen *ACAT1* se nachází na chromozómu 11q22.3-q23.1, skládá se z 12 exonů a je velký přes 27 kb. Transkript dlouhý ~1.7 kb<sup>37</sup> byl detekován ve všech dosud studovaných tkáních.<sup>38</sup> K dnešnímu dni je publikováno kolem 30 mutací v genu *ACAT1*.

Cytosolová acetoacetyl-CoA thioláza (CT) katalyzuje stejnou reakci jako mitochondriální T2 a sdílí stejné EC číslo, ale je kódována rozdílným genem *ACAT2*, který se nachází na chromozómu 6.<sup>39</sup> CT je prvním enzymem v syntéze cholesterolu a její aktivita není závislá na přítomnosti iontů kalcia.

Pacienti a léčba: Deficit 3-ketothiolázy (3KTD; T2 deficiencie) je autozomálně recesivní onemocnění isoleucinového katabolismu a metabolismu ketonových látek. K nástupu onemocnění dochází zpravidla v novorozeneckém věku a projevuje se intermitentními epizodami těžkých ketoacidóz spojenými se zvracením, průjmem a bezvědomím, které mohou vést až k úmrtí pacienta. Hladina glukózy během těžkých acidóz je často v normě. Profil organických kyselin vykazuje zvýšené vylučování tiglylglycinu, 2-methyl-3-hydroxybutyrátu, a 2-methylacetoacetátu. Pacienti s mírnější formou onemocnění mohou vylučovat tyto metabolity jen během akutní ataky onemocnění. Léčba je založena na nízkobílkovinné dietě s nízkým obsahem tuků, suplementaci karnitinem a zabránění dlouhodobému hladovění. Během akutních episod je podávána glukóza. Prognóza je závislá na včasné léčbě a zamezení vzniku masivních ketoacidotických episod.

### **3.1.2 Studie hyperketotických a hypoketotických stavů**

V rámci studie hyperketotických stavů byl vybrán soubor 39 dětí, u kterých bylo podezření na některou z poruch ketolýzy, a u kterých dosud žádná dostupná biochemická a enzymologická vyšetření neprokázala etiologii onemocnění. U pacientů byl zaveden diferenciatně diagnostický systém vyšetření. Dalším cílem projektu byla charakterizace onemocnění u pacientů s poruchou ketogeneze. Pro stanovení koncentrace metabolitů v tělních tekutinách byly použity techniky plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí (GC/MS), tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS), spektrofotometrie a vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Neradioaktivní spektrofotometrické a/nebo HPLC metody byly zavedeny ke stanovení enzymových aktivit

u všech enzymů metabolismu ketonových látek (SCOT, T2, HMGS a HMGL) a u jednoho enzymu  $\beta$ -oxidace (short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenázy - HADH, dříve SCHAD), při jehož deficitu lze očekávat podobný klinický obraz a laboratorní nálezy na úrovni metabolitů. V souboru 39 pacientů s hyperketotickými stavy byla pouze v jednom případě prokázána porucha ketolýzy (deficit mitochondriální acetoacetyl-CoA thiolázy). U ostatních pacientů bylo prokázáno jiné onemocnění nebo vysloveno podezření na něj (poruchy  $\beta$ -oxidace mastných kyselin, endokrinologické onemocnění, suspektní porucha glukoneogeneze). U třech pacientů s poruchou ketogeneze byl prokázán deficit 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyázy. Na základě enzymologických výsledků bylo zavedeno molekulárně genetické vyšetření u pacienta s deficitem T2 a u pacientů s deficitem HL. Vyšetření umožnilo genetické poradenství v rodinách, a u jedné z rodin s deficitem HL provedena prenatální diagnostika. Výsledky studie byly publikovány ve dvou článcích v odborném zahraničním časopise *Journal of Inherited Metabolic Disease*.

### **3.1.3 Komentář a diskuse k přiložené publikaci #1**

Pospisilova E, Mrazova L, Hrda J, Martincova O, Zeman J. (2003) **Biochemical and molecular analyses in three patients with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria**. *J Inherit Metab Dis* **26**, 433-41.

V roce 2003 (Pospíšilová a kol.) byly publikovány výsledky biochemické a molekulární analýzy u třech českých pacientů s deficitem 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyázy (HMG acidúrie). Jako odezvu na tuto publikaci, jsme byli požádáni o provedení molekulární analýzy dvou rakouských pacientů a jednoho německého pacienta. Souhrn výsledků molekulární analýzy u všech pacientů vyšetřovaných v naší laboratoři jsou uvedeny v Tab. 3. Detailní klinický popis českých pacientů a biochemické hodnoty laboratorního vyšetření metabolitů jsou uvedeny v přiložené publikaci #1. Pro měření enzymových aktivit byly na našem pracovišti zavedeny dvě neradioaktivní metody: spektrofotometrická<sup>40</sup> a HPLC<sup>41</sup>. Obě metody pro měření aktivity 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyázy jsou srovnatelné v lymfocytech a fibroblastech a pomocí obou metod je možné diagnostikovat homozygotní pacienty i heterozygotní přenašeče onemocnění. U pacientů byla enzymová aktivita nižší než 1 % oproti zdravým kontrolám, u přenašečů byly hodnoty v lymfocytech mezi 37-69 % u spektrofotometrické metody a mezi 36 – 48 % u HPLC metody ve srovnání se zdravými kontrolami.

U všech pacientů byly nalezeny mutace v genu *HMGCL*, nedávno publikovaná krystalová struktura a 3D model známých mutací potvrdily jejich patogenní charakter.<sup>29</sup> Dvě missense mutace p.R41Q a p.H233R a jedna delece p.R10fs byly nalezeny u tří českých pacientů. U rakouských pacientů byla nalezena jedna missense mutace p.D42E a jedna delece p.F305fs.

U německého pacienta byla na genomové DNA nalezena pouze jedna nová heterozygotní mutace. Substitute c.252G>A nemění aminokyselinový zbytek p.Q84Q, ale ovlivňuje donorové sestřihové místo exonu 3 (AG/gt). Druhá mutace nebyla sekvenováním exonových a přilehlých intronových oblastí nalezena. Přímé sekvenování PCR produktu kódující DNA (cDNA) zahrnujícího exony 1-5 ukázalo zdvojenou sekvenci v oblasti exonu 2 a 3. Na jedné alele byla patrná delece exonu 2, na druhé alele delece exonu 3. Následné sekvenování klonovaných PCR produktů potvrdilo tři typy sestřihu mRNA u tohoto pacienta: delecí exonu 2, delecí exonu 3, delecí exonu 2 plus exonu 3. Klony, u kterých byla sledována delece exonu 2, nenesly mutaci c.252G>A v exonu 3. Výsledky ukazují na pravděpodobnou existenci dvou sestřihových mutací. Jedna mutace c.252G>A (p.Q84Q) vede k vynechání exonu 3 a možná i částečně k vynechání exonů 2 plus 3 při sestřihu do mRNA. Druhá mutace, která nebyla nalezena v žádném z exonů ani v jejich okolí, se pravděpodobně nachází v intronu 2, popř. intronech 1 nebo 3. Tato mutace patrně vede k tvorbě dvou molekul mRNA, u nichž je vynechán exon 2, respektive exony 2 plus 3. Pie a kol. a Puisac a kol. publikovali výsledky vyšetření pacientů s mutací E37X, u kterých docházelo ke stejné chybnému sestřihu mRNA, vynechání exonu 2 a vynechání exonů 2 plus 3.<sup>32, 42</sup> Mutace p.E37X je častá středomořská mutace, avšak u námi vyšetřeného německého pacienta nebyla detekována. Tento rozpor by mohl být objasněn nalezením námi predikované intronové mutace a ověřením, zda se nachází i u pacientů s mutací p.E37X, která je v současnosti považována za příčinu chybného sestřihu.

Mutace p.R41Q (c. 122G>A) v exonu 2 je nejčastější mutací genu *HMGCL*. Objevuje se asi u 43 % všech studovaných alel. Nejčastějšími nosiči jsou Saudští Arabové (94 % alel), jeden homozygot je turecké a jeden heterozygot italské národnosti, jeden český pacient je homozygot.<sup>43, 44</sup> Výskyt mutace v rozdílných kulturách vede k domněnce, že ke vzniku mutace došlo nezávisle u více jedinců. Arg 41 je evolučně konzervovaným aminokyselinovým zbytkem a nachází se v aktivním místě HL.<sup>29</sup> Tuinstra předpokládá jeho roli v deprotonizaci nebo enolizaci acetyldithio-CoA při štepení substrátu. Reakčním místem je pozitivně nabitý postranní řetězec argininu, který při záměně za glutamin chybí.<sup>45</sup>

Mutace p.D42E (c. 126G>T) v exonu 2 byla detekována pouze u dvou rakouských pacientů, jeden z nich byl vyšetřen v naší laboratoři.<sup>44</sup> Na 42. aminokyselinové pozici byly nalezeny další dvě missense mutace p.D42H a p.D42G. Karboxylová skupina Asp 42 se

pravděpodobně účastní vazby s  $Mg^{2+}$  ionty.<sup>29</sup> Přestože je karboxylová skupina u mutantu Glu 42 i nadále přítomna, expresní analýza zde ukázala podstatné snížení aktivity enzymu HL.<sup>44</sup>

Mutace p.H233R (c. 698A>G) v exonu 7 byla nalezena u dvou českých pacientů (jednoho homozygota a jednoho heterozygota) a u jednoho heterozygotního francouzského pacienta.<sup>46</sup> His 233 se nachází v aktivním centru HL, záměnou histidinu za arginin pravděpodobně dochází ke strukturním změnám tohoto místa. Dříve byl His 233 pokládán za samotné aktivní místo enzymu,<sup>47</sup> pozdější práce Fu a kol. předpokládá spíše jeho roli ve vazbě s metalovými ionty.<sup>29</sup>

Mutace p.R10fsX24 (c. 27delG; původně pojmenovaná p.P9fs(-1)) je nově nalezenou mutací. Delece nukleotidu G v prvním exonu, v místě vedoucí mitochondriální sekvence polypeptidu, vede k posunu čtecího rámce (ORF) a předčasnému stop kodonu na 33 aminokyselinové pozici. Přestože mutace ovlivňuje ORF, vznikající mRNA není výrazně degradována. Vzhledem k charakteru mutace - posunu čtecího rámce - předpokládáme, že se jedná o mutaci patogenní.

Mutace p.F305fsX10 (c. 913\_915delTT) byla nalezena v homozygotním stavu u tří pacientů ze Saudské Arábie a jednoho homozygotního pacienta z Rakouska.<sup>43, 44</sup> Delece dvou nukleotidů TT v exonu 9 vede k posunu čtecího rámce a předčasnému stop kodonu na 314. aminokyselinové pozici. Vzhledem k tomu, že molekulární analýza byla provedena pouze na úrovni genomové DNA, není jisté, zdali dochází k degradaci mRNA (NMD-non mediated decay). Mutace postihuje region  $\alpha 11$ - a  $\alpha 12$ -helixu, kde se nachází aminokyselinový zbytek Cys 323, nezbytný pro dimerizaci enzymu<sup>29</sup> a AK zbytky N311 a L313, které jsou nutné pro aktivitu HL.<sup>48</sup>

Korelace genotypu a fenotypu u pacientů s deficitem HL je složitá, protože vývoj onemocnění závisí na časně diagnóze a předcházení metabolickému stresu. Například podle publikovaných dat některých saudskoarabských pacientů s nejčastější mutací p.R41Q byl nástup onemocnění zaznamenán ve třech dnech až v osmi měsících života.<sup>43</sup> U českého pacienta došlo k první atace onemocnění až v osmnácti měsících života.



**Tab.3 Mutace v genu HMGCL u pacientů s deficitem HL**

pacient č.	původ	alela 1	předpokládaná změna	alela 2	předpokládaná změna
1	Česká Rep.	c.698A>G	p.H233R	c.698A>G	p.H233R
2	Česká Rep.	c.698A>G	p.H233R	c.27delG	p.R10GfsX24 #
3	Česká Rep.	c.122G>A	p.R41Q	c.122G>A	p.R41Q
4	Rakousko	c.126G>T	p.D42E	c.126G>T	p.D42E
5	Rakousko	c.913_915delTT	p.F305YfsX10 ##	c.913_915delTT	p.F305YfsX10 ##
6	Německo	c.252G>A; r.145_252del <sup>\$</sup>	p.N49_Q84del	r.61_144del; r.61_252del <sup>\$\$</sup>	p.V21_K48del; p.V21_Q48del

<sup>\$</sup> exonová mutace c.252G>A nemění AK zbytek p.Q84Q, ale vede k vynechání exonu 3 r.145\_252del (p.N49\_Q84del)

<sup>\$\$</sup> nedetekovaná, pravděpodobně intronová mutace vede k vynechání exonu 2 r.61\_144del (p.V21\_K48del) a pravděpodobně i k vynechání exonu exon 2 plus 3 (p.V21\_Q48del)

# mutace p.R10GfsX24 a ## p.F305YfsX10, byly původně pojmenovány p.P9fs(-1), respektive p.F305fs(-2)

### 3.1.4 Komentář a diskuse k přiložené publikaci #2

Mrazova L, Fukao T, Halova K, Gregova E, Kohut V, Pribyl D, Chrastina P, Kondo N, Pospisilova E (2005) **Two novel mutations in mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase deficiency.** *J Inherit Metab Dis* **28**, 235-6.

V roce 2005 (Mrázová a kol.) byl publikován první případ pacienta z bývalého Československa s deficitem mitochondriální acetoacetyl-CoA thiolázy (T2). Pacient byl zachycen díky nově vytvořenému diferenciatně diagnostickému systému u pacientů s hyperketózou. Pacient byl hospitalizován ve 21 měsících života v bezvědomí, kterému předcházelo nechutenství, zvracení, poruchy vědomí s namáhavým dýcháním. Výsledky biochemických testů a profilu organických kyselin jsou shrnuty v přiložené publikaci #2. Enzymová aktivita v kultivovaných fibroblastech byla měřena spektrofotometrickou metodou zavedenou na našem pracovišti a potvrdila nulovou aktivitu tohoto enzymu u pacienta. Měření enzymové aktivity v lymfocytech nebylo průkazné.

Následná molekulární analýza prokázala složenou heterozygotii dvou nových mutací p.M193T a p.I347T. Expresní analýza těchto nových mutací potvrdila jejich patogenní vliv [Fukao, 2005].

Mutace p.M193T (c. 578T>C) v exonu 6: Met 193 je evolučně vysoce konzervovaný aminokyselinový zbytek u obou thioláz, T2 i CT. Met 193 mění konformaci v CoA modifikované izoformě T2 vzhledem k izoformě nemodifikované. Mutace v tomto místě

pravděpodobně ovlivňuje vazbu CoA, důležitého u specifické jaterní T2.<sup>36</sup> Přestože se exonová mutace c.578T>C nachází v sestřihovém místě exonu 6 (TG/gt), správný sestřih mRNA pravděpodobně neovlivňuje.

Mutace p.I347T (c. 1040T>C) v exonu 11: Ile 347 je vysoce konzervovaný aminokyselinový zbytek v T2, nachází se v  $\beta$ -listu v katalytickém místě T2.<sup>36</sup>

Enzymová a molekulární analýza potvrdila podezření na deficit T2. Byla zahájena dieta s omezením bílkovin a tuků ve stravě a antihypoglykemickým režimem. Chlapec je nyní ve věku 7 let v dobrém klinickém stavu a jeho psychomotorický vývoj je normální.

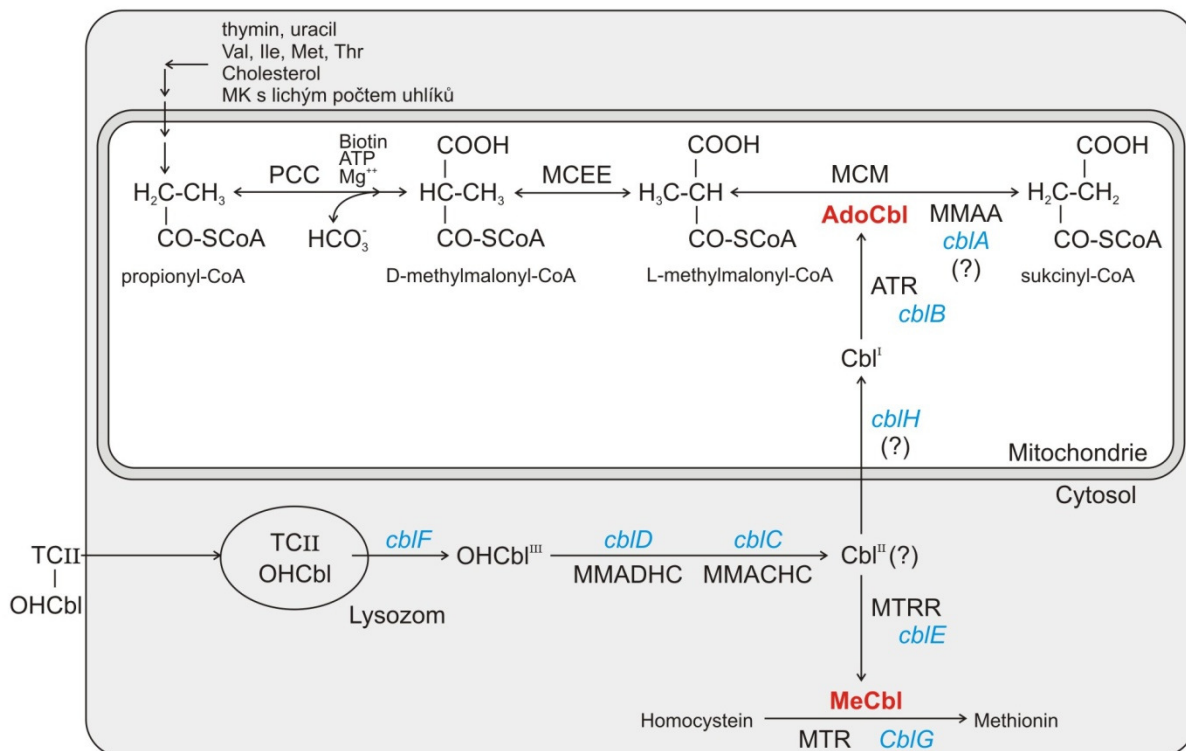
V souboru pacientů s hyperketotickými stavy byl pouze v jednom případě potvrzen deficit enzymu ketolýzy. Důvodem může být vzácný výskyt těchto poruch v populaci. Dalším důvodem může být tkáňová specifita sledovaných enzymů a existence tkáňových izoform, jejichž deficit nemusí být detekován v periferních buňkách. Ve většině případů, z důvodů snahy o co nejmenší zatížení pacienta, byla aktivita enzymů stanovena pouze v lymfocytech. Tato studie ukázala, že stanovení aktivit enzymů ketolýzy v lymfocytech nemusí být průkazné, v případech vysokého podezření na některou z poruch je nutné vyšetření kožních fibroblastů.

### 3.2 Methylmalonová acidémie

Methylmalonová acidémie (MMA) je dědičné autozomálně recesivní onemocnění způsobené poklesem enzymové aktivity methylmalonyl-CoA mutázy (MCM, EC 5.4.99.2). MCM katalyzuje reverzibilní reakci, izomerizaci L-methylmalonyl-CoA na sukcinyl-CoA, v metabolické cestě odbourávání propionyl-CoA na sukcinyl-CoA, intermediát Krebsova cyklu. MCM se účastní katabolismu aminokyselin valinu, isoleucinu, methioninu a threoninu, taktéž cholesterolu a katabolismu mastných kyselin s lichým počtem uhlíků. MCM je jedním ze dvou enzymů, jehož kofaktorem je derivát kobalaminu (vitaminu B<sub>12</sub>), v tomto případě adenosylkobalamin (AdoCbl). Druhým enzymem je methionin syntáza a kofaktorem methylkobalamin (MeCbl).<sup>49</sup>

Biochemické studie v tkáních pacientů s MMA *in vitro* odhalily bloky v syntéze těchto kofaktorů. Provedené komplementační studie rozdělily tkáně pacientů do osmi skupin (*cbIA* - *cbIH*). Bloky odpovídající komplementačním skupinám *cbIC*, *cbID* a *cbIF* se nacházejí na počátku přeměny kobalaminu a ovlivňují syntézu obou kofaktorů. U pacientů dochází ke zvýšenému vylučování homocysteinu i methylmalonátu. Komplementační skupiny *cbIE* a *cbIG* jsou specifické pro cytosolovou cestu syntézy MeCbl, u pacientů je zvýšené vylučování pouze homocysteinu. Tři komplementační skupiny *cbIA*, *cbIB* a *cbIH* odpovídají mitochondriální cestě syntézy AdoCbl, pacienti v tomto případě vylučují zvýšené množství methylmalonátu, koncentrace homocysteinu jsou normální.<sup>49</sup> Onemocnění způsobená funkčním defektem apoenzymu (formy *mut*) nebo defekty v syntéze adenosylkobalaminu (formy *cbIA*, *cbIB* and *cbIH*) se nazývají izolovanou methylmalonovou acidémií. Do dnešního dne byl publikován pouze jeden případ odpovídající komplementační skupině *cbIH*, nejsou známy žádné podrobnosti tohoto defektu.<sup>50, 51</sup>

Zvýšené vylučování methylmalonátu může být způsobeno i defektem DL-methylmalonyl-CoA racemázy (MCEE), který se projevuje mírnou nebo středně závažnou formou izolované MMA. Bobik a kol. identifikoval gen pro lidskou DL-methylmalonyl-CoA racemázu. Gen *MCEE* se nachází na chromozómu 2 a je překládán do 176 aminokyselin dlouhého proteinu.<sup>52</sup> U žádného pacienta v této studii nebyl prokázán defekt MCEE, ani není znám žádný případ v České republice s podezřením na toto onemocnění. Vzhledem k mírné formě onemocnění je možné, že je diagnóza u těchto pacientů podhodnocena a zvýšené vylučování methylmalonátu je zdůvodněno nedostatkem vitaminu B<sub>12</sub>. (Obr. 8)



**Obr.8 Metabolismus propionátu, methylmalonátu a kobalaminu.**

*Metabolismus propionátu a methylmalonátu.* Propionyl-CoA je produktem katabolismu některých aminokyselin, cholesterolu a mastných kyselin s lichým počtem uhlíků. PCC (propionyl-CoA karboxyláza) katalyzuje karboxylaci propionyl-CoA na D-methylmalonyl-CoA. PCC ke své aktivitě vyžaduje ATP,  $Mg^{++}$  ionty a kofaktor biotin. MCEE (DL-methylmalonyl-CoA racemáza) přeměňuje D-methylmalonyl-CoA na L-methylmalonyl-CoA. Reverzibilní reakci mezi L-methylmalonyl-CoA a sukcinyl-CoA katalyzuje MCM (methylmalonyl-CoA mutáza), která vyžaduje AdoCbl (adenosylkobalamin) jako kofaktor. Sukcinyl-CoA vstupuje do Krebsova cyklu.

*Metabolismus kobalaminu.* Kobalamin vstupuje do buňky v komplexu transkobalaminu II (TCII-OHCbl), který opouští v lysozómu. Poté je řadou reakcí přeměněn na MeCbl (methylkobalamin) v cytosolu nebo vstupuje do mitochondrie, kde je redukován a adenosylován na AdoCbl. MeCbl je kofaktorem methionin syntázy (MTR), AdoCbl je kofaktorem MCM. Poruchy v syntéze MeCbl a AdoCbl jsou rozděleny do osmi komplementačních skupin *cblA* - *cblH* (kurzívou, modře). Odpovědné geny a jejich (predikované) produkty (velkými písmeny) jsou známy u komplementačních skupin: *cblA* ~ MMAA, *cblB* ~ ATR (ATP : kobalamin(I) adenosyltransferáza), *cblC* ~ MMACHC, *cblD* ~ MMADHC, *cblE* ~ MTRR (methionin syntáza reduktáza) a *cblG* ~ MTR.

### 3.2.1 Formy izolované MMA:

**mut forma MMA** (deficit MUT: OMIM #251000)

Methylmalonyl-CoA mutáza je mitochondriální enzym kódovaný v jaderné DNA. Jeho struktura je vysoce konzervovaná od bakteriální po lidskou. Model lidské MCM byl vytvořen podle krystalové struktury  $\alpha$  -podjednotky MCM z *Propionibacterium shermanii*, se kterou

sdílí 65 % sekvenční podobu.<sup>53, 54</sup> Lidská MCM je homodimer se dvěma identickými podjednotkami ( $\alpha_2$ ) o velikosti 78.5 kDa.<sup>54</sup> Každá z podjednotek váže jeden adenosylkobalamin jako kofator.<sup>55</sup> N-koncový segment (AK zbytky 33-87) se účastní dimerizace enzymu, následuje doména vázající substrát - N-koncový ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub> barel (TIM-barel, AK zbytky 88-422). C-koncová ( $\beta\alpha$ )<sub>5</sub> doména vázající kofaktor (AK zbytky 578-750) je s N-koncovou částí spojena úsekem dlouhým 155 aminokyselin (AK zbytky 423-577).

Gen *MUT* pro lidskou MCM se nachází na chromozómu 6 (6p12-21.1), skládá se ze třinácti exonů a má velikost přes 35 kb. Transkript dlouhý ~2.7 kb je překládán do propeptidu o 750 aminokyselin, včetně 32 aminokyselinové vedoucí mitochondriální sekvence.<sup>56, 57</sup> V kultivovaných fibroblastech byly rozlišeny dva biochemické fenotypy: *mut*<sup>0</sup>, u kterého je enzymová aktivita vždy nulová, a *mut*<sup>-</sup>, u které je enzymová aktivita částečně zachovaná anebo k jejímu zvýšení dojde po přidání hydroxykobalaminu.<sup>58</sup> Nicméně u některých *mut*<sup>-</sup> tkání s nízkou enzymovou aktivitou po přidání kobalaminu k zvýšení aktivity téměř nedošlo.<sup>59</sup>

Většina mutací se nachází ve dvou hlavních funkčních doménách, v N-koncové doméně vázající substrát nebo C-koncové doméně vázající kofaktor. Mutace spjaté s *mut*<sup>-</sup> fenotypem se často vyskytují v doméně vázající adenosylkobalamin.<sup>60</sup>

Existuje pouze málo mutací, které se vyskytují u pacientů rekurentně: mutace N219Y u pacientů z kavkazské populace a mutace E117X u pacientů z japonské populace.<sup>61-63</sup>

### ***cblA* forma MMA (deficit MMAA: OMIM #251100)**

Na základě mikrobiálního modelového systému identifikovala Dobson a kol. lidský gen *MMAA*, a potvrdila, že mutace v tomto genu jsou zodpovědné za *cblA* formu MMA,<sup>64</sup> přesto funkce predikovaného proteinu MMAA zůstala neznámá. Studie Korotkové a kol. se zabývala metalochaperonem MeaB z *Methylobacterium extorquens*, který je členem GTPázové podrodiny a je z 67 % sekvenčně podobný k MMAA. Jeho funkcí je pravděpodobně chránit bakteriální MCM před nezvratnou inaktivací, pomocí stabilizace dimeru a/nebo chránit navázaný kofaktor před ataky kyslíku, vody nebo vysoce reaktivními volnými radikály.<sup>65</sup> Nedávno byla publikována krystalová struktura MeaB<sup>66</sup> a byl podpořen předpoklad pomocné role MeaB i MMAA proteinu pro správnou funkci MCM.<sup>66, 67</sup>

Gen *MMAA* je lokalizován na chromozómu 4q31.1-2, skládá se ze 7 exonů a je velký přibližně 17 kb. Transkript ~1.2 kb je překládán do predikovaného 418 aminokyselin velkého polypeptidu. MMAA protein obsahuje vedoucí mitochondriální aminokyselinovou sekvenci se signálním místem štěpení. Northern blot ukázal zvýšenou expresi v kosterním svalu

a játrech.<sup>64</sup> Do dnešního dne bylo publikováno přes 30 mutací v genu *MMAA*, většina z nich se nachází v prvních čtyřech exonech. Kolem 30 % z toho tvoří malé delece a inzere, většinou duplikace (61 %).<sup>68</sup>

### ***cblB* forma MMA (deficit MMAB: OMIM #251110)**

ATP:cob(I)alamin adenosyltransferáza (ATR) katalyzuje přenos skupiny adenosylu z ATP na kobalamin(I) za vzniku adenosylkobalaminu (AdoCbl).<sup>69</sup> Lidský gen *MMAB* pro ATR byl nezávisle objeven Dobsnovou a Lealem.<sup>70, 71</sup> Obě studie byly postaveny na mikrobiálním modelovém systému. Lidská ATR patří do PduO rodiny kobalaminových adenosyltransferáz. Saridakis a kol. popsala krystalovou strukturu ATR homologu z archebakterie *Thermoplasma acidophilum* (32 % sekvenčně podobný k lidské ATR).<sup>72</sup> Na tomto homologu demonstrovala, že mutace v *MMAB* nalezené u pacientů s *cblB* formou MMA vedou ke ztrátě aktivity ATR *in vitro*. Nedávno zveřejněná krystalová struktura lidské ATR ukázala, že enzym je složen ze tří identických podjednotek.<sup>73</sup>

Gen *MMAB* je lokalizován na chromozómu 12q24 a má 9 exonů. 750 bp dlouhý otevřený čtecí rámec je překládán do 250 aminokyselin velkého propeptidu, který je směřován 24 aminokyselinovou vedoucí sekvencí do mitochondrie.<sup>71</sup> Zde je štěpen a tvoří 27.3 kDa velký protein. Northern blot ukázal zvýšenou expresi v kosterním svalu a játrech, stejně jako u *MMAA*.<sup>70</sup> Kolem 20 mutací bylo nalezeno v genu *MMAB*. Většina známých mutací v genu *MMAB* je lokalizována v exonu 7, který odpovídá aktivnímu centru v ATR.<sup>74</sup>

**Pacienti a léčba:** Přesná incidence MMA není známa, uvádí se kolem 1:150 000 v západních zemích.<sup>75</sup>

K manifestaci onemocnění dochází obvykle brzy po porodu nebo v raném dětství. Pro pacienty s neonatální formou jsou typickým příznakem záchvaty zvracení, apatie, nechutenství, rychlý váhový úbytek, dehydratace a svalová hypotonie, které mohou progradovat do acidotických krizí s dýchacími obtížemi a bezvědomím. Bez správné léčby během několika dnů dochází k úmrtí pacienta nebo k permanentnímu poškození mozku.

Pozdní formy onemocnění se projevují od chronických symptomů, jako jsou neprospívání, anorexie, opakované zvracení a poruchy chování, po život ohrožující ataky metabolických dekompenzací s vážným orgánovým selháním.

Během akutních episod metabolické dekompenzace dochází k masivní sekreci metabolitů (amoniaku, kyselin methylmalonové, 2-methylcitronové a 3-hydroxypropionové a dalších

derivátů propionyl-CoA) a otravě organismu. Hyperamonémie je důsledkem deficitu acetyl-CoA v mitochondriích a současně důsledkem sekundární inhibice enzymů močovinového cyklu, z důvodu akumulace abnormálních esterů acyl-CoA a organických kyselin.<sup>76, 77</sup> Homocystinúria není přítomna. Následkem metabolických krizí dochází k poškození mozku, a tím k mentální retardaci, epilepsii a motorické dysfunkci, a k dalším orgánovým selháním vedoucím k renální tubulární dysfunkci, kardiomyopatii nebo pankreatitidě.

Při léčbě je zapotřebí během atak odstranit energetický schodek podáváním glukózy a detoxikovat a rehydratovat organismus, současně začít alkalickou léčbu, s podáváním karnitinu a vitamínu B<sub>12</sub>. Jestliže nedojde ke zlepšení, je nutné odstranit toxické látky z organismu hemodiafiltrací nebo hemodialýzou.<sup>78</sup>

Dlouhodobá léčba je založena na nízkobílkovinné vysokoenergetické dietě, suplementaci karnitinem a metronidazolem, který potlačuje růst střevních bakterií produkujících kyselinu propionovou. Vitamin B<sub>12</sub> je podáván pacientům, kteří odpovídají na jeho léčbu. Obvykle pouze minimum případů pacientů s *mut*<sup>0</sup> a *mut* fenotypem odpovídá na léčbu vitaminem B<sub>12</sub>, oproti tomu u více než 90 % pacientů s *cblA* formou a kolem 40 % pacientů s *cblB* formou nastává zlepšení při podávání vitamínu B<sub>12</sub>.<sup>79, 80</sup>

Předcházení metabolické dekompenzaci včasnou diagnózou je nejúčinnější formou léčby MMA.

### **Korelace genotypu a klinického fenotypu**

Pro pacienty s formou *mut*<sup>0</sup> je typický časný nástup onemocnění, vysoká mortalita a závažné neurologické komplikace. Projev onemocnění u pacientů s *mut* a *cblB* formou je rozličný od vážných nenonatálních forem, po mírnější formy s pozdějším nástupem. Pacienti *cblB*, kteří neodpovídají na léčbu vitaminem B<sub>12</sub> (kolem 60 %) mají stejný klinický fenotyp jako pacienti s formou *mut*<sup>0</sup>. Naopak klinický stav pacientů s formou *mut*, u kterých byla pozorována odpověď na léčbu vitaminem B<sub>12</sub>, je zpravidla méně závažný.<sup>79, 80</sup> Pozn.: klinický fenotyp *mut* forem plně neodpovídá biochemickému fenotypu (viz. 4.2.1)

Mírnou formu onemocnění nacházíme u pacientů s *cblA* formou MMA. Symptomy onemocnění nastupují později v dětství a prognóza je v těchto případech dobrá. Nicméně pokud u pacientů přesto dojde k metabolické krizi, může dojít k lehké mentální retardaci.<sup>79, 80</sup>

### 3.2.2 Komentář a diskuze k přiložené publikaci #3

Pospíšilová E, Mrázová L, Klement P, Martincová O, Hrubá E, Chrastina P, Příbyl D, Vobruba V, Hálová K, Zeman J. (2006) **Methylmalonová acidémie: klinická, biochemická a molekulárně biologická studie.** *Čes.-slov. Pediat.* **61**, 190-198.

#### 3.2.2.1 Soubor pacientů

V roce 2006 (Pospíšilová a kol.) byl publikován v Česko-Slovenské pediatrii článek popisující 10 pacientů s MMA z oblasti bývalého Československa. Během dalších let jsme soubor rozšířili a zde uvádíme kompletní studii 14 pacientů z 13 nepříbuzných rodin, dva z pacientů byli sourozenci, dvojčata.

Pacienti byli přijati ve věku několika dní až měsíců s typickými příznaky zvracení, letargií, neprospíváním a metabolickou acidózou. Laboratorní biochemické testy odhalily vysoké koncentrace kyseliny methylmalonové, methylcitronové a 3-hydroxypropionové v moči, koncentrace homocysteinu v plazmě byla normální. Nejstaršímu pacientovu je dnes 20 let, čtyři pacienti zemřeli ve věku 16 dní, 9 měsíců, 5 a 7 let.

#### 3.2.2.2 Enzymová metoda

Pro měření enzymové aktivity MCM byla zavedena neradioaktivní HPLC metoda s UV detekcí. Aktivita MCM byla stanovena v lymfocytech nebo kultivovaných fibroblastech v přítomnosti AdoCbl. V případě pacientů s formou *mut<sup>0</sup>*, je měřená enzymová aktivita v přítomnosti AdoCbl pod detekčním limitem. Naopak u *cbl* forem dochází v důsledku přítomnosti AdoCbl ke zvýšení enzymové aktivity na hodnoty srovnatelné se zdravými kontrolami. Možnost zvýšení enzymové aktivity v přítomnosti AdoCbl u *mut<sup>+</sup>* forem, je diskutabilní. Tradiční radioaktivní metoda je založena na měření inkorporace [<sup>14</sup>C]-propionátu do precipitátu trichloracetové kyseliny v kultivovaných fibroblastech.<sup>81</sup> Willard a kol. podle toho rozdělil *mut* formy MMA na: *mut<sup>0</sup>*, u kterých nedochází k žádné inkorporaci [<sup>14</sup>C]-propionátu za žádných podmínek a aktivita MCM je nedetekovatelná *in vitro*, a na *mut<sup>+</sup>*, u kterých dochází k inkorporaci [<sup>14</sup>C]-propionátu v přítomnosti vysoké koncentrace hydroxykobalaminu.<sup>58</sup> Přesto Janata a kol. publikoval případ *mut<sup>+</sup>*, kde byla zachována částečná aktivita MCM (kolem 2 %), ale odpověď na přídavek hydroxykobalaminu byla velice slabá.<sup>59</sup> Detekční limit námi zavedené neradioaktivní metody nedovoluje rozlišit mezi *mut<sup>+</sup>* a *mut<sup>0</sup>* formou měřením zbytkové aktivity enzymu. U žádného z vyšetřovaných *mut* pacientů v našem souboru (u pacienta č.13 nebylo provedeno enzymové stanovení) nebyla



detekována zbytková aktivita v přítomnosti AdoCbl. Přesto stále nemůžeme vyloučit možnost, že dojde k částečnému obnovení aktivity v některých *mut* případech.

### 3.2.2.3 Výsledky enzymologie a molekulární analýzy

Výsledky enzymového stanovení dovolily rozlišit mezi *mut* formami onemocnění a předpokládanými *cbl* formami. Pacienti s neměřitelnou enzymovou aktivitou byly vyšetřeni pro mutace v genu apoenzymu *MUT*, kdežto u pacientů s obnovenou aktivitou MCM byly vyšetřeny geny *MMAA* a/nebo *MMAB*. V případech *cbl* forem bylo přihlédnuto ke klinickému stavu pacienta. U lehčích forem MMA byl u pacienta přednostně vyšetřen gen *MMAA*, naopak u pacientů s těžkou klinickou formou onemocnění byl nejprve vyšetřen gen *MMAB*.

Výsledky jsou shrnuty v Tab. 4.

Molekulární analýza v postižených rodinách umožnila genetické poradenství a prenatální diagnostiku u dvou rodin s *mut*<sup>0</sup> formou a u dvou rodin s *cblB* formou (rodiny: 3, 4, 6, 8)

Pozice trans nalezených mutací byla ověřena u jedenácti vyšetřovaných pacientů, v devíti případech vyšetřením vzorků rodičů; u dvou pacientů č. 7 a 12 byly alely odděleny klonováním PCR produktu obsahujícího exon 6 genu *MUT* a následně analyzovány sekvenováním. Ve dvou případech homozygotních mutací u pacientů č. 1 a 13 není možné vyloučit přítomnost velké delece na jedné z alel, neboť byly k dispozici vzorky vždy jen od jednoho rodiče.

#### **Mutace v genu *MUT***

U osmi pacientů s MMA byly nalezeny mutace v genu *MUT*. U pacienta č.10 nebyla molekulární analýza provedena, ale předpokládáme, že pacient nesl stejné mutace jako jeho bratr - dvojče (pacient č. 11).

Mutace byly nalezeny v obou hlavních doménách MCM apoenzymu, N-koncové doméně vázající substrát a C-koncové doméně vázající kofaktor. (Obr. 9)

Dvě missense mutace p.G203R (c. 607G>A) a p.N219Y (c. 655A>T) a jedna nonsense mutace p.R727X (c. 2179C>T) nalezené u našich pacientů byly již dříve asociovány s biochemickým *mut*<sup>0</sup> fenotypem.<sup>61, 82, 83</sup> Gly 203 se nachází v I $\alpha$ 3-helixu. Glycin bez postranního řetězce umožňuje vysokou flexibilitu C $\alpha$  vazby, jeho záměna pravděpodobně ovlivňuje aktivitu domény.<sup>82</sup> Asn 219 leží ve vysoce konzervované sekundární struktuře, I $\beta$ 4-řetězce. Substituce Asn 219 za Tyr zbytek patrně mění konformaci tohoto úseku a narušuje substrát vázající doménu.<sup>61</sup> Nonsense mutace p.R727X vede k předčasnému stop

kodonu, předpokládaný vznikající polypeptid je dlouhý 726 aminokyselin ve srovnání s 750 aminokyselin u wild typu.

Mutace p.R369H (c. 1106G>A) a p.R369C (c. 1105C>T) ovlivňují stejný aminokyselinový zbytek. Arg 369 leží v I $\alpha$ 7-helixu, který je součástí rozhraní účastnící se dimerizace. Dříve byla mutace p.R369H asociována s fenotypem *mut*<sup>0</sup>, na základě funkční expresní analýzy,<sup>59, 84</sup> později bylo zjištěno, že buněčná kultura, u které byly analýzy provedeny, není homozygotní pro mutaci p.R369H, ale jedná se o složenou heterozygotii p.R369H a p.R108G. Worgan a kol. a Lempp a kol. poté publikovali biochemické studie u homozygotních pacientů p.R369H a asociovali tento typ mutace s *mut*<sup>0</sup> fenotypem.<sup>83, 85</sup>

Další nalezená missense mutace p.R694W (c. 2080C>T) je na základě transfekčních studií a klinických a biochemických nálezů asociována s fenotypem *mut*<sup>0</sup>.<sup>60, 85</sup> Substituce Arg 694 za Trp ovlivňuje hydrofobní skupinu na povrchu domény, čímž narušuje místní chemické interakce, ale k samotnému rozbití domény pravděpodobně nedochází.<sup>54</sup>

Byly nalezeny dvě nové missense mutace p.H386N (c. 1156C>A) a p.H627Q (c. 1881T>A). His 386 se nachází ve vysoce konzervovaném regionu na konci I $\beta$ 8-řetězce.<sup>54</sup> Predikční program SIFT<sup>86</sup> ukázal, že není možná záměna za jiný aminokyselinový zbytek, aniž by došlo k vážnému poškození výsledného proteinu.

V kodonu 627 byly již dříve nalezeny missense mutace p.H627R a p.H627N.<sup>82, 87</sup> His 627 se nachází ve smyčce mezi II $\beta$ 1 a II $\alpha$ 1 a společně s Asp 625 a Lys 621 se podílí na vazbě kobaltového atomu kofaktoru.<sup>54</sup> Mutace p.H627R byla asociována s *mut*<sup>0</sup> biochemickým fenotypem.<sup>82</sup>

Nová sestříhová mutace [c. 546\_911del, c. 754\_911del] vede ke dvěma transkriptům, u jednoho dochází k vynechání exonu 4 a u druhého k vynechání exonu 4 plus části exonu 3. Sekvenováním exonů genu MUT i s přilehlými intronovými oblastmi nebyla nalezena žádná změna na úrovni genomové DNA. K nesprávnému sestřihu vede pravděpodobně změna v intronových oblastech, nejspíše intronů 3 nebo 4. Delece exonu 4 v transkriptu vede k posunu čtecího rámce a předčasnému stop kodonu na pozici 273, zatímco delece exonu 4 plus části exonu 3 v transkriptu vede pravděpodobně ke zkrácenému proteinu, u kterého chybí aminokyselinové zbytky Ser183 až Arg304.

**Tab.4: Výsledky biochemické, enzymologické a molekulárně biologické analýzy u pacientů s MMA**

pacient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	kontroly
komplementační skupina	cbIA	cbIA	cbIB	cbIB	cbIB	mut	mut	mut	mut	mut	mut	mut	mut	mut	mut
<b>Klinická prezentace</b>															
současný věk	7 l	3 l	9 l	6 l	8 m.	15 l	7 l†	5 l†	9 m†	16 d†	6.5 l	15.5 l	20 l	2 l	
nástup onemocnění	6 m	5 m	2 d	5 m	3 d	1 d	3 t	3 d	2 d	2 d	2 d	1 - 2 m	3 m	5 d	
pohlaví	F	F	F	F	M	M	F	F	F	M	M	M	M	F	F
B <sub>12</sub> responsiveness	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
<b>Metabolity v moči *</b>															
kys. methylmalonová [mmol/mol kreat.]	4.401	↑↑↑	1.914	↑↑↑	5800	↑↑↑	9.568	17.414	6.219	6.219	7.463	↑↑↑	↑↑↑*	1832	< 14
kys. 3-hydroxypropionová [mmol/mol kreat.]	148	↑	271	↑↑	327	↑↑	203	251	371	293	212	↑↑*	↑↑*	117	< 19
kys. methylcitronová [mmol/mol kreat.]	84	±	43	↑↑	217	↑↑	210	61	64	147	65	↑↑*	↑↑*	144	< 8
<b>Metabolity v plasmě *</b>															
kys. methylmalonová [μmol/l]	177	not done	356	not done	1328	not done	881	1.788	975	750	898	not done	↑↑*	2149	nd
amoniak [μmol/l]	122	79	224	117	896	216	236	500	2.400	279	218	215*	not done	4600	< 80
celkový homocystein [μmol/l]	7.6	not done	6.3	3.8	11.9	not done	3.3	9.6	4.2	5.6	5.3	not done	not done	3.8	< 12.0
<b>Enzymová metoda **</b>															
celková mutáza v lymfocytech	2.29	not done	2.36	not done	not done	nd	nd	nd	not done	not done	nd	not done	not done	not done	1.32 - 2.62
celková mutáza v k. fibroblastech	3.61	5.55	3.09	5.82	2.53	not done	nd	nd	nd	not done	not done	nd	not done	nd	2.31 - 6.18
<b>Molekulární analýza</b>															
gen	MMAA	MMAA	MMAB	MMAB	MMAB	MUT	MUT	MUT	MUT	MUT	MUT	MUT	MUT	MUT	MUT
alela 1 (předpokládaná změna)	c.551dupG (C184YfsX3)	c.592_595 delACTG (T198SfsX6)	c.556C>T (R186W)	c.556C>T (R186W)	c.556C>T (R186W)	c.655A>T (N219Y)	c.1106G>A (R369H)	c.655A>T (N219Y)	c.607G>A (G203R)	#	c.655A>T (N219Y)	c.1105C>T (R369C)	c.2080 C>T (R694W)	c.655A>T (N219Y)	c.655A>T (N219Y)
exon	3	4	7	7	7	3	6	3	3	#	3	6	12	3	3
alela 2 (předpokládaná změna)	c.551dupG (C184YfsX3)	c.592_595 delACTG (T198SfsX6)	c.556C>T (R186W)	c.556C>T (R186W)	c.556C>T (R186W)	c.2179C>T (R727X)	c.1105C>T (R369C)	c.1881T>A (H627Q)	r.546_911del; del(G)insC	#	r.546_911del; r.754_911del	c.1156C>A (H386N)	c.2080 C>T (R694W)	r.546_911del; r.754_911del	(p.S183_R304del; p.H252VfsX22)
exon	3	4	7	7	7	13	6	11	#	#	11	6	12	#	#

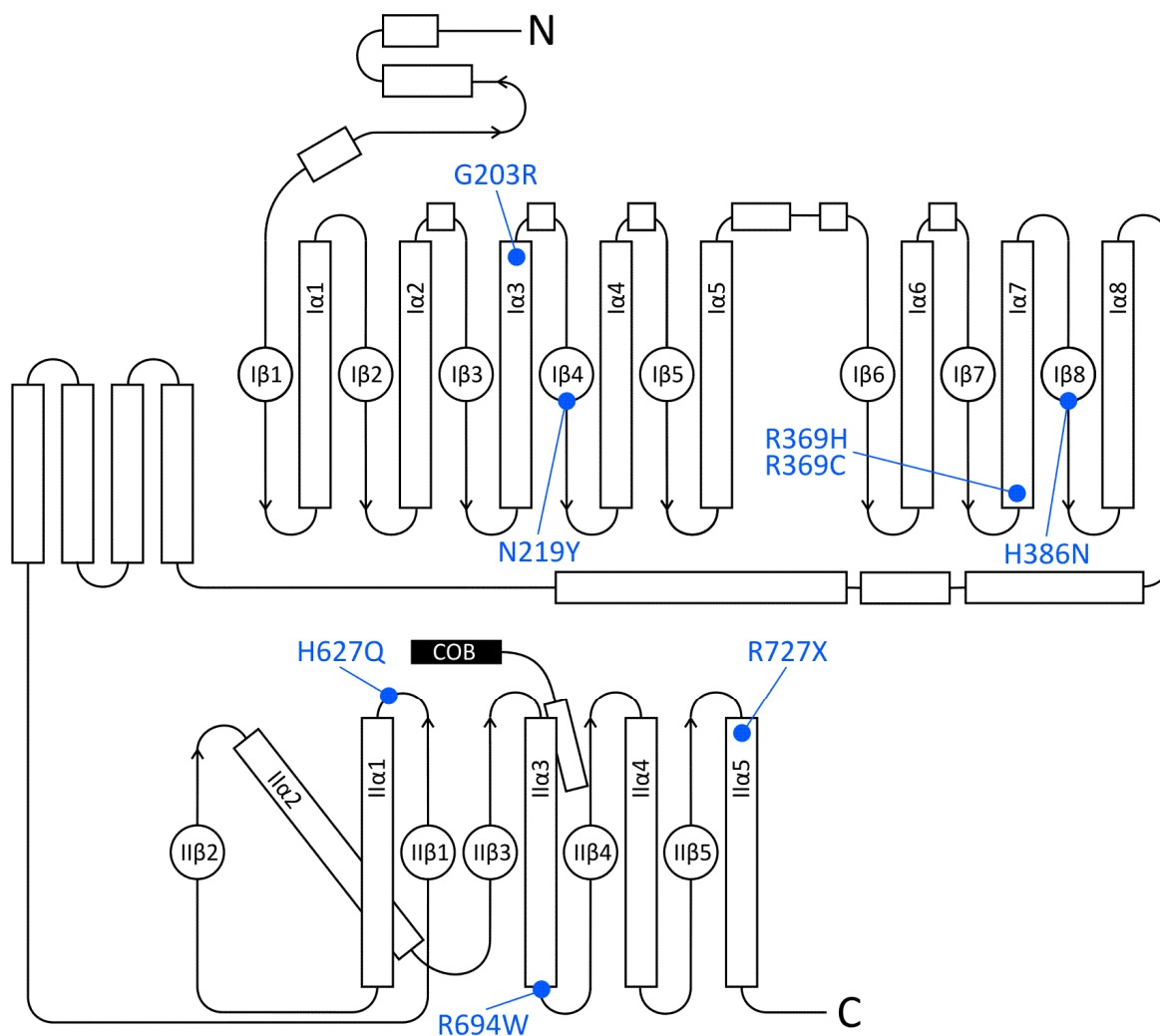
\* laboratorní nálezy v době nástupu onemocnění, kromě pacientů č. 12 a 13, u kterých byla diagnóza stanovena až ve věku 13, respektive 8 měsíců života

\*\* celková aktivita methylmalonyl Co-A mutázy měřená v přítomnosti 5 μmol/l adenosylkobalaminu je vyjádřena v nmol sukcinyl-CoA vytvořeného za minutu na mg bílkoviny

nd - pod hranici detekčního limitu

not done - měření neprovedeno

# bratr pacienta č. 11 (předpokládáme stejný genotyp)



**Obr.9 Topologie lidské MCM.** N-konec (AK zbytky 33-87), N-koncová doména vázající substrát ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub> barel, (TIM-barel, AK zbytky 88-422), spojovací úsek (AK zbytky 423-577), C-koncová ( $\beta\alpha$ )<sub>5</sub> doména vázající kofaktor (AK zbytky 578-750). Missense a nonsense mutace nalezené v genu *MUT* u pacientů s MMA jsou vyznačeny modře. COB = kobalamin.

Obr. podle Thoma & Leadlay, 1996.

### Mutace v genu *MMAA*

U dvou pacientů s *cblA* formou onemocnění byly nalezeny mutace v genu *MMAA*, p.C184YfsX3 (c. 551dupG) a p.T198SfsX6 (c. 592\_595delACTG). Obě mutace jsou homozygotní a vedou k posunu čtecího rámce a předčasnému stop kodonu. Mutace p.T198fs byla již dříve publikovaná,<sup>64</sup> mutace p.C184fs je nová. V obou případech byl pomocí RT-PCR detekován transkript, předpokládáme, že vlivem těchto mutací nedochází k výrazné degradaci mRNA (NMD).

### Mutace v genu *MMAB*

U třech pacientů byla na základě molekulární analýzy diagnostikována *cblB* forma MMA. Všechny mutace nalezené v genu *MMAB* se nacházejí v exonu 7. Dvě nalezené missense mutace p.R186W (c. 556 C>T) a p.E193K (c. 577G>A) byly již publikovány.<sup>70, 88</sup> Arg 186 pravděpodobně interaguje přímo s kobalaminem. Glu 193 se účastní koordinace Mg<sup>2+</sup> iontu, substitucí za Lys patrně dochází k inhibici vazby ATP.<sup>73</sup> Biochemické studie obou mutací potvrdily jejich vliv na onemocnění, expresní analýza ukázala zanedbatelnou aktivitu ATR. *In vivo* patrně dochází k degradaci ATR, neboť Western blot z patientských buněk prokázal absenci proteinu.<sup>88</sup>

Nová indel mutace p.R186PfsX28 (c.557\_559delGGinsC) je první inzerí - delecí nalezenou v genu *MMAB*. Mutace vede k posunu čtecího rámce a k předčasnému stop kodonu v aktivním místě ATR.

#### 3.2.2.4 Diskuze

Mutace p.N219Y v genu *MUT* byla nalezena ve čtyřech z šestnácti sledovaných alel. Všichni pacienti byli heterozygoti. Vysoký výskyt této mutace (25 % alel) u českých a slovenských pacientů koresponduje s vysokou frekvencí mutace v kavkazské populaci (kolem 20 %).<sup>61</sup>

Některé z mutací v genu *MUT* se nacházejí velice blízko u sebe nebo přímo na stejném místě, navíc byly některé z nich nalezeny u pacientů různého původu, to ukazuje na možný výskyt mutačních hot spotů.<sup>83</sup> Jeden ze známých mutačních hot spotů dinukleotid CpG, se nachází v kodonu 369, kde byly u našich pacientů zaznamenány již dříve popsání mutace p.R369H a p.R369C, a v kodonu 727, kde byla lokalizována známá mutace p.R727X. Také kodon 627 je pravděpodobným mutačním hot spotem, neboť zde došlo dokonce ke třem záměnám, k p.H627Q, nové mutaci u českého pacienta a ke dvěma publikovaným mutacím p.H627R a p.H627N. Mutace p.G203R zjištěná heterozygotně u našeho pacienta byla popsána Worganem a kol. u homozygotního pacienta.<sup>83</sup> Analýza SNP polymorfismů odhalila, že tento pacient nesl mutaci na dvou alelách s rozdílným haplotypem. Předpokládáme, že ke vzniku těchto mutací došlo v historii více než jednou.

Dvě homozygotní mutace v exonu 3 a exonu 4 genu *MMAA* způsobují posun čtecího rámce. Povaha obou mutací odpovídá většině mutací nalezených v genu *MMAA* u pacientů s *cblA* formou.<sup>68</sup>

Většina známých mutací v genu *MMAB* se nalézá v exonu 7,<sup>74</sup> stejně jako všechny tři mutace nalezené u našich pacientů. Exon 7 obsahuje vysoký podíl GC a má repetitivní charakter. Také se zde vyskytuje většina aminokyselinových zbytků, které tvoří aktivní

centrum enzymu. Záměna p.R186W je nejčastější mutací v evropské populaci (kolem 30 %), Dobson a kol. původně publikovala tuto mutaci jako potenciální vzácný polymorfismus, protože byl nalezen ve 4 z 240 alel kontrolních vzorků.<sup>70</sup> V české populaci bylo vyšetřeno 300 kontrolních alel, ale žádná nenesla tuto mutaci. Vysoký výskyt této mutace v populaci může být vysvětlen přítomností CpG dinukleotidu, známého mutačního hot spotu.

Kompletní provedená klinická, biochemická a molekulární analýza nám dovolila porovnat **genotyp a fenotyp** u většiny pacientů s MMA.

U sedmi z devíti pacientů s deficitem apoenzymu nastoupily první klinické příznaky v době prvního dne až tří týdnů života. Čtyři z těchto dětí zemřely a u dvou pacientů lze sledovat vážný průběh onemocnění. Všichni tito pacienti jsou heterozygoti alespoň pro jednu dříve popsanou mutaci asociovanou s fenotypem *mut*<sup>0</sup>. Dva, respektive tři pacienti, dívka, která zemřela ve věku pěti let během akutní metabolické dekompenzace a bratři dvojčata, z nichž jeden zemřel ve věku 16 dní na enterogenní sepsi, druhý je v současnosti (6 a půl roku) léčen, byli heterozygoti pro stejné mutace p.N219Y/p.H627Q. Vzhledem k časnému nástupu onemocnění (2, respektive 3 dny života), jeho těžkému průběhu a také povaze nové mutace p.H627Q, se domníváme, že tuto mutaci lze spojovat s *mut*<sup>0</sup> formou onemocnění.

Mutace p.R369H, která byla původně chybně asociována s *mut* fenotypem,<sup>59, 84</sup> byla u jednoho pacienta nalezena heterozygotně s mutací p.R369C a u dalšího pacienta taktéž heterozygotně s novou mutací p.H386N. Pacientka s mutacemi p.R369H/p.R369C zemřela ve věku sedmi let, během akutní metabolické dekompenzace. Těžký průběh onemocnění u našeho pacienta odpovídá pozdějším studiím, které asociují obě mutace s *mut*<sup>0</sup> fenotypem.<sup>83, 85</sup> Heterozygotní pacient s mutací p.R369H a novou mutací p.H386N byl poprvé přijat ve věku 1-2 měsíců v souvislosti se zvracením a těžkými stavy metabolické acidózy (ph 7,15). MMA u něj byla diagnostikována až ve věku 13 měsíců. V současné době, 15 let, je jeho stav relativně uspokojivý v porovnání s ostatními pacienty, i přes opakované porušování léčby. Předpokládáme proto, že nová mutace p.H386N je spjata s *mut*<sup>-</sup> formou onemocnění.

U dvou pacientů byla nalezena nová sestřihová mutace. Konkrétní změna na genomové DNA nebyla detekována. Oba pacienti jsou heterozygoti pro tuto sestřihovou mutaci a mutaci s *mut*<sup>0</sup> fenotypem p.G203R, respektive p.N219Y. Jedna z dívek překonala novorozeneckou ataku metabolického rozvratu s vážnými následky a v 9 měsících zemřela v průběhu respiračního infektu. Předpokládáme, že sestřihová mutace, při které dochází k posunu čtecího rámce popř. ke ztrátě ve funkční oblasti TIM-barelu, je spojena s *mut*<sup>0</sup> formou onemocnění.

U pacienta heterozygotního pro dvě známé mutace p.N219Y/p.R727X asociované s *mut*<sup>0</sup> biochemickým fenotypem došlo k manifestaci onemocnění již první den po porodu. Přesto jeho současný stav, v 15 letech, není ve srovnání s ostatními pacienty tak závažný. Podobný případ byl publikován v Japonsku.<sup>89</sup> Dívka homozygotní pro mutaci p.R727X se klinicky presentovala relativně mírnou formou onemocnění, než by se dalo v takovém případě očekávat. Tento rozpor by se dal u našeho pacienta vysvětlit interalelickou komplementací, každá z mutací se nachází v jiné doméně MCM, ale toto vysvětlení nelze použít v případě japonské dívky homozygotní pro tuto mutaci. Stejně tak biochemická analýza tkáně heterozygotního pacienta s mutacemi p.R727X a p.R108C (každá z mutací se taktéž nachází v jiné doméně) neprokázala zvýšení enzymové aktivity.<sup>83</sup>

Nejstarší pacient našeho souboru, 20letý chlapec, trpí lehkou mozkovou dysfunkcí, přechodnými stavy deprese a rozvinul se u něj Aspergerův syndrom. V porovnání s ostatními pacienty však můžeme považovat jeho klinický stav za méně vážný. Nástup onemocnění byl pozdější, až ve 4 měsíci života, v prvních letech trpěl metabolickými dekompenzacemi během infektů, později se však jeho stav upravil. Tento vývoj odpovídá nalezené homozygotní mutaci p.R694W, která je asociována s *mut* fenotypem.<sup>60, 85</sup> Enzymová aktivita MCM tohoto pacienta nebyla stanovena.

Oba pacienti s *cblA* formou MMA se projevují klinicky mírným fenotypem a prospívají dobře. Naopak u všech tří pacientů s *cblB* formou MMA je stav velmi vážný, čemuž odpovídá povaha nalezených mutací v exonu 7 genu *MMAB*.

Odpověď na léčbu kobalaminem byla pozorována u obou *cblA* pacientů. V případě pacienta č.13 s *mut* fenotypem došlo během léčby k výraznému zlepšení jeho stavu, nicméně nelze jasně prokázat, zdali se tak stalo vlivem léčby vitaminem B<sub>12</sub>, nebo zdali to byl důsledek celkové metabolické kompenzace. V případě druhého pacienta s *mut* fenotypem, pacienta č. 12, nebyl vliv léčby vitaminem B<sub>12</sub> na průběh onemocnění zaznamenán. Žádný z pacientů s fenotypem *mut*<sup>0</sup> ani žádný z *cblB* pacientů neodpovídal na léčbu vitaminem B<sub>12</sub>. Tyto nálezy korespondují s dříve publikovanými výsledky o B<sub>12</sub> responsivitě pacientů s MMA.<sup>79, 80</sup>

### 3.3 Souhrn kapitoly 1

Hlavním zdravotnickým přínosem dvou zmíněných studií bylo vytvoření komplexního systému biochemických, enzymologických a molekulárně biologických metod pro účinnou diferenciální diagnostiku dětí s poruchami metabolismu ketonových látek a methylmalonovou acidémií. Takový systém dosud v ČR neexistoval. Správná a včasná diagnóza umožní rychlé nasazení vhodné léčby. V případě zavedení preventivního screeningu je navíc možné předejít metabolickému rozvratu, který má za následek často těžké poškození mozku, ledvin a dalších orgánů. Vyšetření methylmalonové acidémie bylo proto zahrnuto do pilotního projektu novorozeneckého screeningu některých organických acidémií, aminoacidopatií a poruch  $\beta$ -oxidace mastných kyselin pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS) na našem pracovišti. Tandemová hmotnostní spektrometrie dovoluje ze suché kapky krve stanovit metabolity charakteristické pro zmíněné dědičné poruchy. Zavedení celoplošného screeningu a jeho rozšíření o další stanovované látky, např. charakteristické u pacientů s poruchou metabolismu ketonových látek zatím brání jak nedostatečná kapacita přístroje, tak logistika sběru materiálu. Vzhledem k časnému nástupu onemocnění, především u MMA, by screening měl proběhnout nejpozději druhý den po porodu, což je v současnosti na celostátní úrovni na jednom pracovišti neproveditelné.

Zavedené molekulární metody potvrdily biochemické a enzymologické výsledky a pomohly v individuální prognóze onemocnění a zahájení vhodné léčby. Např. u nemocných s MMA dovoluje enzymologická analýza potvrdit pouze pacienty s *mut<sup>0</sup>* a většinu pacientů s *mut<sup>-</sup>* formou onemocnění. U pacientů s *cbl* formou je vysloveno podezření na tento deficit na základě laboratorních nálezů, vysoké koncentrace kyseliny methylmalonové v tělních tekutinách, a obnovené enzymové aktivity MCM v přítomnosti adenosylkobalamínu. Rozlišení všech forem MMA (*mut<sup>0</sup>*, *mut<sup>-</sup>*, *cblA*, and *cblB*) je možné až na základě molekulárně biologického vyšetření. Znalost formy onemocnění pomáhá v zavedení individuální terapie, např. podáváním vysokých dávek vitamínu B<sub>12</sub> u rezpozivních pacientů.

Molekulárně biologické vyšetření také umožňuje genetické poradenství v postižených rodinách včetně prenatalní diagnostiky. Vyšetření plodu ve vzorku choriových klků je možné již ve 12. týdnu těhotenství, což je o 4 - 5 týdnů dříve, než vyšetření na úrovni metabolitů při amniocentéze, které bylo dříve prováděno ve spolupráci se zahraničními laboratořemi.

Porovnání klinických, biochemických a molekulárně biologických analýz přináší celkový pohled na studovanou problematiku dědičných metabolických onemocnění.



## 4 Kapitola 2: Charakterizace syndromu spojeného s delecí několika genů na chromozómu X

### 4.1.1 X- chromozóm a repetitivní sekvence

Chromozóm X má jedinečné postavení pohlavního chromozómu savců. U žen, které jsou homogameticke (XX), dochází z důvodu vyrovnání kvanta exprese X-vázaných genů k X-inaktivaci. U mužů, kteří jsou heterogametičtí (XY), je fenotyp závislý výlučně na genech nesených jediným zděděným X chromozómem. Původ chromozómu X je pravděpodobně autozomální, vyvinul se během posledních 300 miliónů let.<sup>90</sup> Zatímco chromozóm X zůstal konzervován, u chromozómu Y došlo k postupné ztrátě téměř všech oblastí a tím i genů původního autozómu. Pouze malé oblasti na koncích obou ramének chromozómu X a chromozómu Y jsou homologní a dochází zde k rekombinaci; geny, které se zde nacházejí, jsou tzv. pseudoautozomální. Vzhledem k odlišné dědičnosti X-vázaných onemocnění, výhradnímu přenosu z matky na syna, byla na chromozómu X nalezena řada odpovědných genů monogenních onemocnění, mezi prvními gen chronického granulomatózního onemocnění<sup>91</sup> nebo Duchennovy muskulární dystrofie.<sup>92</sup>

Na chromozómu X bylo nalezeno 1098 genů, to je pouze 1,7 % sekvence chromozómu X (7,1 genu na 1 Mb). To zařazuje X chromozóm mezi chromozómy s nejmenší hustotou genů.<sup>93</sup> Naopak výskyt repetitivních sekvencí je 56 % v sekvenci chromozómu X,<sup>93</sup> oproti 45 % v celém genomu.<sup>94</sup> Největší zastoupení mají LINEs elementy rodiny L1, které zaujímají 29 % sekvence chromozómu X, oproti 17 % v celkovém genomu. Také zde byl zaznamenán vysoký výskyt intrachromozomálních duplikací 2,59 %.<sup>93</sup> Intrachromozomální duplikace na chromozómu X byly popsány jako příčina vzniku několika genetických onemocnění,<sup>95</sup> při kterých vlivem rekombinace mezi vysoce homologními úseky dochází k rozsáhlým delecím, jako je tomu např. u delece *STS* genu u X-vázané ichtyosy.<sup>96</sup>

Repetitivní sekvence roztroušené v genomu, retrotraspozóny, jsou velmi staré, vysoce homologní úseky DNA. K značnému rozšíření retrotraspozónů došlo během vývoje díky jejich schopnosti replikativní transpozice, tj. schopnosti přepisu existující sekvence a začlenění její kopie na jiném místě v genomu. Většina retrotraspozónů tuto schopnost vzhledem k nahromaděným mutacím ztratila. Retrotraspozóny se u savců dělí do tří hlavních tříd: LINEs (Long Interspersed Elements), SINEs (Short Interspersed Elements) a retrovirus like elementy. Retrotraspozóny LINEs jsou autonomní ve svém přepisu a přenosu na jiné

místo genomu, neboť obsahují nezbytnou reverzní transkriptázu. Nejvíce zastoupený je LINE1 element, který je cca 6.1 kb dlouhý a tvoří až 17 % lidského genomu. Naproti tomu SINEs elementy jsou neautonomními retrotranspozóny. K přepisu a přenosu využívají elementy LINEs a nacházejí se často v jejich okolí.<sup>97</sup> Nejčastějšími SINEs elementy jsou Alu repetice, které zaujímají až 10 % lidského genomu. Jsou dlouhé cca 300 bp, CpG bohaté a vyskytují se průměrně každé 3 kb. Obsahují RNA III polymerázový promotor a RNA-like poly(A) konec.<sup>98, 99</sup> Alu rodina je specifická pro primáty, vnitřní homologie jejích členů je asi 70 - 98 %.<sup>100, 101</sup>

Vysoká homologie repetitivních sekvencí může vést v těchto úsecích k nerovnoměrnému crossing-overu, a tím ke vzniku rozsáhlých delecí, duplikací nebo inverzí,<sup>102</sup> které byly popsány jako příčina mnoha onemocnění.<sup>3</sup> Deininger a Batzer popsali tyto rekombinace u některých typů nádorových onemocnění.<sup>103</sup>

#### **4.1.2 Identifikace rozsáhlých delecí**

K identifikaci rozsáhlých delecí v genomu se v současné době nejčastěji používá komparativní genomová hybridizace (CGH),<sup>104</sup> kvantitativní PCR, dříve Southern blot. Rozsáhlé delecce u hemizygotů X-vázaných onemocnění nebo u homozygotů autozomálních onemocnění lze identifikovat levnou a jednoduchou metodou PCR prób. U heterozygotů s autozomálním onemocněním s rozsáhlou delecí na jedné alele, dochází k amplifikaci PCR produktu z druhého vlákna a výsledek daný přítomností PCR produktu není informativní.

#### **4.1.3 Komentář a diskuse k přiložené publikaci #4**

Sediva A, Smith CI, Asplund AC, Hadac J, Janda A, Zeman J, Hansikova H, Dvorakova L, Mrazova L, Velbri S, Koehler C, Roesch K, Sullivan KE, Futatani T, Ochs HD (2007) **Contiguous X-chromosome deletion syndrome encompassing the BTK, TIMM8A, TAF7L, and DRP2 genes.** *J Clin Immunol* 27, 640-6.

U třech českých pacientů ze dvou nepříbuzných rodin s diagnostikovanou X-agamaglobulinémií (XLA) byly pozorovány atypické neurologické komplikace, sensorineurální hluchota a dystonie, odpovídající Mohr-Tranebjaergově syndromu. Kombinace obou onemocnění svědčila pro rozsáhlou delecí na chromozómu X. Do souboru pacientů byli později začleněni dva sourozenci z Estonska a jeden pacient z USA s obdobnými příznaky.

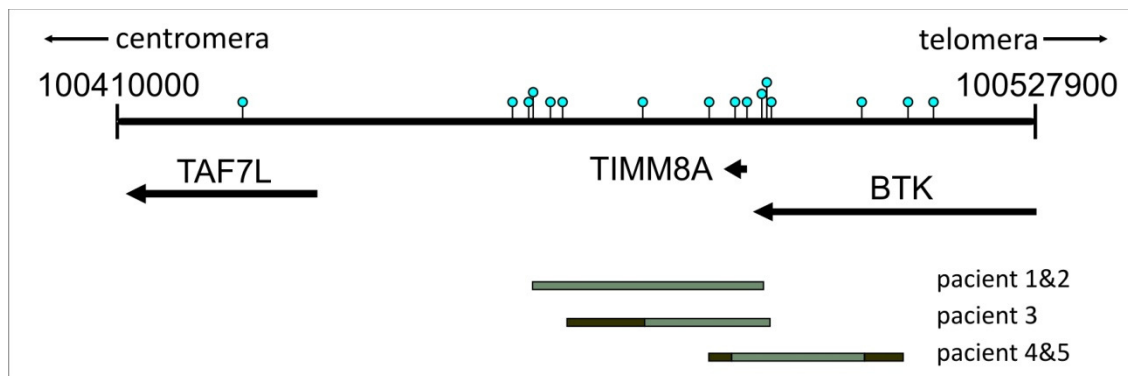
X-vázaná agamaglobulinemie (XLA, Brutonova agamaglobulinemie, OMIM300300) je vrozenou poruchou imunitního systému.<sup>105</sup> U pacientů dochází k defektu zrání B-lymfocytů, a tím k nízké tvorbě imunoglobulinů. Pacienti trpí od raného dětství častými mikrobiálními infekcemi. Onemocnění se léčí substitučně imunoglobuliny.<sup>106, 107</sup> XLA je způsobena mutacemi v genu *BTK*. Gen *BTK* (Bruton tyroxine kinase), leží na chromozómu Xq22.1, je složen z 19 exonů a má délku 37,5 kb.<sup>108, 109</sup> Gen je exprimován ve všech hematopoetických buňkách, kromě T-lymfocytů a plazmatických buněk.<sup>110</sup>

Mohr-Tranebjaergův syndrom (MTS; dystonia-deafness syndrome, DDS, DDP; OMIM 304700) se projevuje postupnou ztrátou sluchu, poruchou řeči, dystonií, slepotou a mentální retardací.<sup>111-113</sup> Syndrom je způsoben mutacemi v genu *TIMM8A* (translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog A; dříve *DDP1*).<sup>114</sup> Tento malý gen, cca 3 kb, je tvořen 2 exony a kóduje 97 aminokyselin dlouhý polypeptid. Protein TIMM8A s proteinem TIMM13 tvoří komplex, který se účastní přenosu proteinů přes vnitřní mitochondriální membránu.<sup>114-116</sup>

První exon genu *TIMM8A* začíná pouhých 770 bp downstream od polyadenylačního signálu genu *BTK*.<sup>117</sup>

Delece, která postihuje oba geny *BTK* a *TIMM8A* byla nalezena u všech 5 pacientů (tři Češi, dva Estonci). U pacienta č. 6, který byl molekulárně geneticky vyšetřen v USA, zahrnovala delece navíc geny *TAF7L* a *DRP2*. Podobně rozsáhlé delece byly v minulosti popsány pouze u 6 pacientů s XLA a DDS.<sup>118-120</sup>

Jelikož se jedná o gonozomálně recesivní onemocnění, rozsah delece byl určen přítomností nebo nepřítomností PCR prób u vzorků genomové DNA pacientů v sérii s kontrolními vzorky zdravých jedinců. Celkem bylo použito 16 informativních PCR prób. PCR produkty měly délku cca 200 až 400 bp, primery byly navrženy podle referenční sekvence v GenBank (accession No. NC\_000023.9). Specifita PCR produktů byla ověřena sekvenováním u kontrolních vzorků. PCR próby byly umístěny mimo oblast repetitivních sekvencí. Oblast genů *BTK*, *TIMM8A*, *TAF7L* a *DRP2* a rozsah delece u všech pacientů je znázorněn na obr viz příložená publikace (Fig.1). Detailní zobrazení delece u pacientů 1 - 5 v okolí genů *BTK* a *TIMM8A* a pozice prób je na Obr. 10.



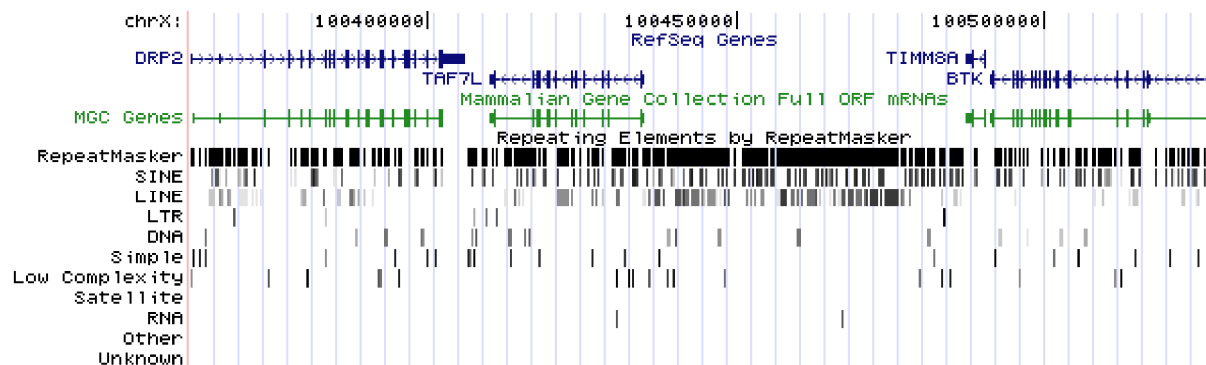
**Obr. 10** Rozsah delece u pacientů 1 - 5 v okolí genů *BTK* a *TIMM8A*.

Pozice práb je vyznačena modře, rozsah delece u pacientů zeleně, oblast hranice delece u pacientů 3 - 5 šedě.

Delece všech pěti pacientů vyšetřených pomocí PCR práb zahrnovala část genu *BTK* a gen *TIMM8A*; gen *TAF7L* byl přítomen. Rozsah delece u pacientů 1&2 (bratři) je 30 kb, začíná cca 25 kb centromericky od genu *TIMM8A* a končí v intronu 18 genu *BTK*. Rozsah delece u pacienta č. 3 je 16 – 25 kb, začíná cca 9 – 20 kb centromericky od genu *TIMM8A* a končí v intronu 18 genu *BTK*. Hranice obou delecí v intronu 18 je rozdílná. Rozsah delece u pacientů 4&5 (bratři) je přibližně 15 - 18 kb, zahrnuje oba exony genu *TIMM8A* a exony 6 – 19 genu *BTK*. Překlenutí deletované oblasti pomocí PCR u všech pěti pacientů nebylo možné, vzhledem k vysokému obsahu repetitivních sekvencí v této oblasti.

Rozsah delece u pacienta č. 6 (196 kb) byl určen v USA (viz příložená publikace), vyšetření pomocí PCR práb tyto výsledky podpořilo.

Okolí genů *BTK* a *TIMM8A* obsahuje repetitivní sekvence až z 80 %, jedná se především o elementy SINEs Alu rodiny (32 %) a LINEs elementy LINE1 (40 %). Okolí genů *TAF7L* a *DRP2* obsahuje repetitivní sekvence již jen z asi 40 %. (Obr 11)



**Obr. 11** Okolí genů *BTK* a *TIMM8A* s vyznačenými repetitivními sekvencemi.  
 Zdroj: databáze UCSC (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks>)

Vysoký výskyt Alu a L1 sekvencí v oblasti genů *BTK* a *TIMM8A* koreluje s poměrně častým výskytem delecí v této oblasti a naznačuje možný vznik delecí nerovnoměrnou homologní rekombinací.

## 5 Kapitola 3: Studium molekulární podstaty mukopolysacharidózy typu IIIC

Mukopolysacharidóza typu IIIC (MPS IIIC) patří do skupiny lysozomálních onemocnění. Lysozomální onemocnění (LSDs) jsou způsobena poruchou degradace makromolekul uvnitř lysozomu, která vede ke stěradání neodbouraných makromolekul (lipidů, glykosaminoglykanů, oligosacharidů aj.). V současné době LSDs zahrnují 48 monogenně dědičných onemocnění, z toho je 30 enzymopatií (29 hydroláz a 1 acetyltransferáza), 8 je spojeno s aktivováním, ochranou nebo posttranslační úpravou těchto enzymů a 10 je způsobeno defektem lysozomálních membránových proteinů.<sup>117</sup>

Většina lysozomálních onemocnění je autozomálně recesivně dědičná. Výjimkou jsou Hunterova nemoc a Fabryho nemoc, které jsou gonozomálně recesivně dědičné. Incidence LSDs je 1:6000 narozených.<sup>121</sup> Lysozomální onemocnění se projevují širokou škálou klinických příznaků. Většina z nich má chronický progresivní průběh. Častými příznaky jsou zvětšení jater a sleziny, často jsou postiženy kosti. Postižení mozku se projevuje opožděním respektive regresí psychomotorického vývoje.

Lysozomální onemocnění byly jedněmi z prvních popsaných metabolických onemocnění (Tay, Sachs, Gaucher v 19. století). V současné době jsou LSDs velmi dobře zmapovanou skupinou onemocnění, v posledních 40. letech byla popsána většina LSDs na molekulární úrovni. Byla zavedena enzymová substituční terapie u Gaucherovy a Fabryho choroby, mukopolysacharidóz I, II a VI a Pompeho choroby. Jiným terapeutickým postupem je snaha zabránit vzniku samotného substrátu nebo genová terapie.<sup>122</sup>

Zatímco u všech 29 enzymopatií, u kterých byl příčinou deficit některé z hydroláz, byl znám odpovědný gen již poměrně dlouho, u mukopolysacharidózy typu IIIC se identifikace odpovědného genu pro N-acetyltransferázu dlouho nedařila. Důvodů bylo několik. Pro účely funkčního klonování se nepodařilo izolovat čistý protein vzhledem k jeho transmembránovému charakteru. Pro komplementační analýzu nebyl nalezen odpovídající klon. A poziční klonování selhalo na nedostatečně velkém souboru pacientů.

V poslední kapitole je uveden postup, kterým se podařilo identifikovat odpovědný gen pro mukopolysacharidózu typu IIIC. Pro zmapování oblasti na chromozómu 8 pomocí pozičního klonování bylo shromážděno 5 pacientů ze 4 nepříbuzných rodin a jejich 49 rodinných příslušníků, tento relativně malý soubor byl dostačující vzhledem k zavedení kodominantního

modelu pro vazebnou analýzu na základě biochemického znaku. Po vymezení kandidátní oblasti byl odpovědný gen identifikován na základě známých biologicko-molekulárních vlastností enzymu (předpokládaná velikost proteinu, přítomnost transmembránových domén, aj.) a na základě průkazu snížené exprese tohoto genu u pacientů.

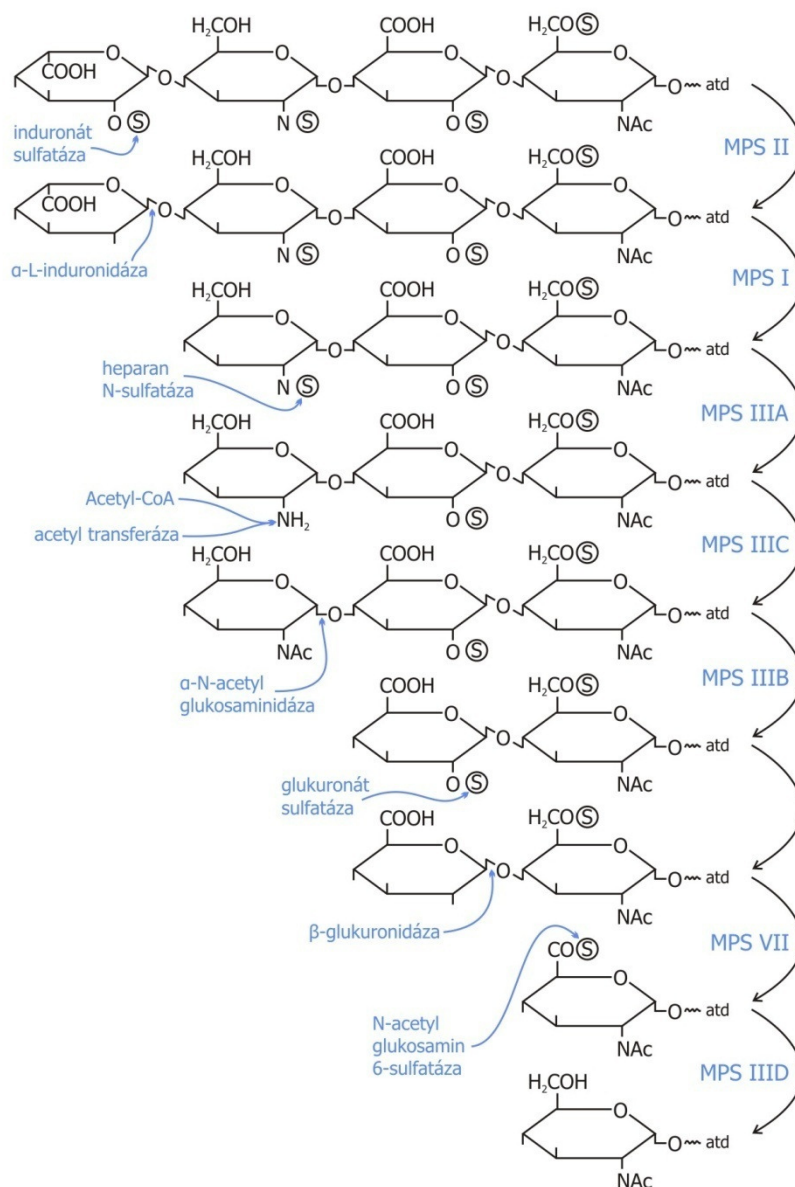
Studie byla vypracována v rámci mezinárodní spolupráce se skupinou Dr. Pshezhetskyho z Montrealu. Práce byla publikována v mezinárodním odborném časopise *American Journal of Human Genetics*.

## 5.1 Mukopolysacharidóza IIIC (Sanfilippo C syndrom)

Mukopolysacharidózy (MPS) patří do skupiny stádavých lysozomálních onemocnění. MPS jsou způsobeny deficitem enzymů katalyzujících degradaci glykosaminoglykanů (dermatan sulfátu, heparan sulfátu, keratan sulfátu, chondroitin sulfátu, hyaluronanu). Celkem jedenáct enzymopatií je rozděleno do sedmi typů MPS. Degradace heparan sulfátu se účastní minimálně osm enzymů: čtyři sulfatázy, tři exo-glykosylázy a jedna N-acetyltransferáza.<sup>123</sup> (Obr. 12) U typu MPSIII dochází k hromadění heparan sulfátu z důvodu deficitu některého ze čtyř enzymů: heparan-N-sulfatázy (MPSIIIA),  $\alpha$ -N-glukozaminidázy (MPSIIIB), acetyl-CoA: $\alpha$ -glukozaminid N-acetyltransferázy (MPSIIIC) a N-acetylglukozamin 6-sulfatázy (MPSIIID). N-acetyltransferáza je jediný lysozomální enzym, který není hydrolázou. Katalyzuje transmembránovou N-acetylaci amino skupiny koncového glukosaminu, která se tak stává přístupnou pro následnou intralysozomální degradaci  $\alpha$ -N-acetylglukozaminidázou.<sup>123</sup> Lidská a myší N-acetyltransferáza byla částečně purifikována, výsledky ukázaly, že se jedná o transmembránový glykoprotein velký cca 100 kDa, který obsahuje aktivní místo.<sup>124</sup>

Čtyři enzymopatie, které spadají pod typ MPSIII se vyznačují stejným klinickým fenotypem, Sanfilippo syndromem s autozomálně recesivní dědičností. Sanfilippo syndrom se projevuje těžkou degenerací centrálního nervového systému. K nástupu onemocnění dochází mezi dvěma až šesti lety pacienta po předchozím normálním vývoji. Děti jsou v první fázi hůře sociálně přizpůsobivé, vývoj je pouze mírně opožděn, fyzický zjev je zpočátku normální. Ve druhé fázi se pacienti projevují extrémní hyperaktivitou, neklidem a agresivitou. Trpí poruchami spánku, sluchu, řeči, jejich vývoj se opožděje, je zde zřetelná ztráta sociálních vazeb, trpí inkontinencí. Ve třetí fázi mezi šestým až desátým rokem dochází k masivní neurologické degeneraci. Oproti druhé fázi dochází ke zklidnění, pacienti ztrácí dříve nabyté schopnosti, přestávají chodit, polykat, potravu přijímají sondou. Demence rychle postupuje.

Na rozdíl od jiných typů MPS, srdce a oči nejsou poškozeny a tělesný vzrůst je normální. Většina pacientů se nedožívá dospělosti.



**Obr. 12 Degradace heparan sulfátu.** Defekty v degradaci heparan sulfátu odpovídají mukopolysacharidózám: MPS II - Huntrův syndrom, MPS I - Hurler, Hurler-Sheie a Sheie syndrom, MPS IIIA Sanfilippo syndrom typ A, MPS IIIC - Sanfilippo syndrom typ C, MPS IIIB - Sanfilippo syndrom typ B, MPS IIID - Sanfilippo syndrom typ D. Obr. podle Neufeld & Muenzer, 2001.



## 5.2 Komentář a diskuse k přiložené publikaci #5

Hrebicek M, Mrazova L, Seyrantepe V, Durand S, Roslin NM, Noskova L, Hartmannova H, Ivanek R, Cizkova A, Poupetova H, Sikora J, Urinovska J, Stranecky V, Zeman J, Lepage P, Roquis D, Verner A, Ausseil J, Beesley CE, Maire I, Poorthuis BJ, van de Kamp J, van Diggelen OP, Wevers RA, Hudson TJ, Fujiwara TM, Majewski J, Morgan K, Kmoch S, Pshezhetsky AV (2006) **Mutations in TMEM76\* cause mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo C syndrome)**. *Am J Hum Genet* **79**, 807-19.

### 5.2.1 Identifikace genu *HGSNAT*

V roce 2006 (Hřebíček a kol.) byl identifikován gen *HGSNAT*, který kóduje enzym heparin acetyl-CoA:  $\alpha$ -glukosaminid N-acetyltransferázu (*HGSNAT*, EC 2.3.1.78). K identifikaci genu *HGSNAT* vedlo nejprve zúžení intervalu v kandidátní oblasti na chromozómu 8 pomocí vazebné analýzy ve čtyřech postižených rodinách. Poté byl na základě předchozích biochemických a molekulárních studií vybrán kandidátní gen. Sekvenováním kandidátního genu u pacientů s MPS IIIC byly nalezeny mutace, které jsou odpovědné za deficit N-acetyltransferázy. Postup je podrobněji rozepsán v následujících kapitolách.

#### 5.2.1.1 Rodiny pacientů

U pěti českých pacientů ze čtyř nepříbuzných rodin bylo diagnostikováno onemocnění MPS IIIC na základě biochemického vyšetření aktivity N-acetyltransferázy. K měření aktivity N-acetyltransferázy v kultivovaných fibroblastech nebo lymfocytech byla použita metoda s fluorogenním substrátem 4-methylumbelliferyl  $\beta$ -D-glukosaminidem.<sup>125</sup> Aktivita N-acetyltransferázy byla dále měřena u sedmi nepochybných heterozygotů a 89 zdravých kontrol. Hodnoty aktivit byly u pacientů nižší než 1.0 nmol/h/mg, u heterozygotů byly v intervalu  $11.6 \pm 1.5$  nmol/h/mg a u kontrol byly v intervalu  $24.4 \pm 5.7$  nmol/h/mg. Na základě hodnot aktivit u 54 rodinných příslušníků ze čtyř postižených rodin byl sestaven autozomálně kodominantní model dědičnosti onemocnění. U čtyř jedinců, u kterých byla hodnota mezi 13.0 – 14.6 nmol/h/mg, nebylo možné určit biochemický fenotyp. Rodokmeny čtyř českých rodin s vyznačenou dědičností onemocnění na základě měření aktivit N-acetyltransferázy jsou na obr viz. přiložená publikace (Fig.1).

### 5.2.1.2 Poziční klonování a vazebná analýza

Ausseil a kol. publikoval kandidátní oblast genu pro MPS IIC o velikosti 8.3 cM na chromozómu 8 v okolí centromery.<sup>126</sup> U čtyř českých postižených rodin byla vyhotovena vazebná analýza na základě biochemických dat s kodominantním modelem dědičnosti s penetrancí 0.99. Osmnáct STR markerů na chromozómu 8 zahrnovalo interval 18.7 cM, včetně publikovaného 8.3 cM intervalu. Označení a pozice markerů jsou v Tab. 5. Genotypování bylo provedeno na sekvenátoru LI-COR IR2 za použití Saga genotyping software.<sup>127</sup> Výsledky vazebné analýzy v rodině A (člen AIV.10) a B (člen BIII.7) zúžily interval na 2.6 cM mezi markery D8S1831 a D8S1051. Maximální LOD skóre bylo 7.8 v blízkosti markeru D8S531.

**Tab. 5 Označení a pozice STR markerů použitých při mapování genu HGSNAT.**

D-number	název próby	Heterozygotie	opakování	velikost	umístění na ch8	
					cM deCode	cM Marshfield
D8S1477	GGAA20C10	86%	(pcr)n	139-179		60.34
D8S532	AFM081yd11	83%	Di (AC)n	239-255	59.76	64.75
D8S268	AFM156xa3	58%	Di (AC)n	255-265	60.01	65.13
D8S1051	UT7847	53%	(pcr)n	206	60.92	66.73
D8S1115	ATA17H02	72%	(pcr)n	142-172		67.27
D8S1460	ATA38C03	74%	(pcr)n	125-140	61.85	66.2
D8S531	AFM081xe9	64%	Di (AC)n	125	62.26	
D8S1745	AFM200xh12	81,50%	Di (AC)n	125-137	62.89	66.2
D8S589	GATA12H01	33%	Tetra (GATA)n	137-149	62.89	66.73
D8S1133	GATA28C05	36%	Tetra (GATA)n	177-197	62.89	67.27
D8S1831	AFMa071yf9	73%	Di (AC)n	263-277	63.65	67.27
D8S538	AFM274ve5	82%	Di (AC)n	169-181	63.89	67.27
D8S524	AFM242zf6	64%	Di (AC)n	248-272	64.48	67.27
D8S1815	AFMa046wg9	81,50%	Di (AC)n	217-249	64.73	67.27
D8S1110	GATA8G10	73%	Tetra (GATA)n	262-286	65.47	67.27
D8S601	AFM276xe9	89%	Di (AC)n	223-236	65.75	67.27
D8S2332	GATA156H01	75%	(pcr)n	148-176	68.19	69.4
D8S1113	GGAA8G07	81%	Tetra (GGAA)n	217-245	70.74	77.89

### 5.2.1.3 Kandidátní gen *TMEM76*

Kandidátní oblast obsahovala 32 známých nebo predikovaných genů a ORFs. Na základě publikovaných molekulárních vlastností N-acetyltransferázy<sup>124</sup> byla vyloučena většina genů z této oblasti. Naopak predikovaný gen označený *TMEM76* (transmembrane protein 76)

odpovídal výše zmíněným kritériím. *TMEM76* je velký cca 73 kDa a obsahuje jedenáct transmembránových domén<sup>128</sup> a čtyři potenciální N-glykosylační místa.<sup>129</sup> Prvních 67 aminokyselin tvoří předpokládaný signální peptid. C-konec, který pravděpodobně směřuje do cytosolu, obsahuje konzervované motivy Tyr-X-X-Θ a Leu-Leu. Motivů se účastní interakce s adaptorovými proteiny zodpovědnými za směřování membránových proteinů do cytosolu. Predikovaná aminokyselinová sekvence *TMEM76* s vyznačenými doménami je na obr. viz příložená publikace (Fig.3).

#### 5.2.1.4 Gen *HGSNAT*

Současné oficiální označení genu *TMEM76* je *HGSNAT* (heparan- $\alpha$ -glucosaminide N-acetyltransferase gene). *HGSNAT* se nachází na chromozómu 8p11.1 a obsahuje 18 exonů. Plnodélková cDNA je dlouhá 4.5 kb, obsahuje 1.992 bp otevřený čtecí rámec a dva polyadenylační signály. Celkem byly amplifikovány pomocí RT-PCR tři transkripty, kromě hlavního transkriptu, kódujícího aktivní protein ještě dva kratší transkripty. Transkript, u kterého dochází k vynechání exonů 9 a 10, patrně vede k tvorbě neaktivního zkráceného proteinu (in-frame delece 64 AK), a tím k absenci transmembránových domén III a IV. U dalšího transkriptu dochází k vynechání exonů 3, 9 a 10, které vede k posunu čtecího rámce a předčasnému stop kodonu na aminokyselinové pozici 126.

RT-PCR 5'-konce vedlo k posunu počátku transkriptu oproti referenční sekvenci NM\_152419.2 o více než 36 nukleotidů upstream (84 nukleotidů nad uvedený počátek ORF), kde se nachází ATG kodon ve čtecím rámci genu. Předpokládaný translatovaný produkt je tak o 28 AK delší než v referenční sekvenci NP\_689632.

#### 5.2.1.5 Sekvenování genu *HGSNAT* a analýza mutací

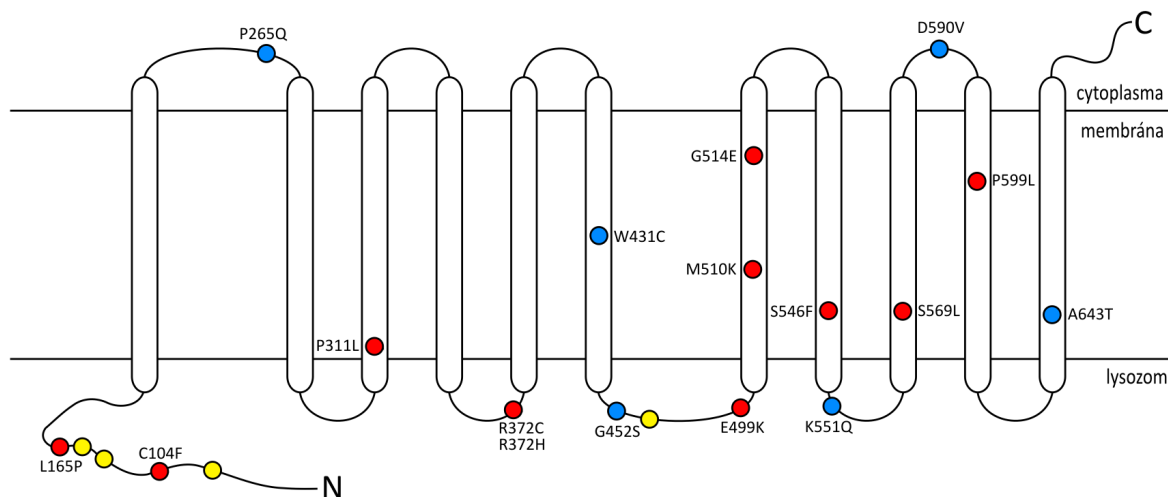
Sekvenování genu *HGSNAT* potvrdilo výsledky vazebné studie. U všech pěti českých pacientů byly nalezeny mutace, které svým charakterem vedou ke ztrátě funkce N-acetyltransferázy. Později bylo vyšetřeno dalších 18 pacientů z 15 nepříbuzných rodin ze zahraničí. Výsledky molekulární analýzy všech pacientů vyšetřených v Praze jsou v Tab. 4. Pozice trans nalezených mutací byla ověřena u pěti českých a dvou řeckých pacientů vyšetřením vzorků rodičů. Dále byla ověřena přítomnost nalezených mutací u rodinných příslušníků ve všech českých rodinách. Přítomnost či nepřítomnost mutací plně segregovala s naměřenou enzymovou aktivitou N-acetyltransferázy. Mutace byly přítomny u všech jedinců, biochemických heterozygotů se sníženou enzymovou aktivitou, včetně čtyř jedinců,

u kterých se hodnoty aktivity pohybovaly mezi 13.0 – 14.6 nmol/h/mg, tj. mimo původně stanovený interval pro heterozygoty.

U ostatních zahraničních pacientů nebyly vzorky rodičů dostupné. U heterozygotů předpokládáme, že vzhledem k patogennímu charakteru nalezených mutací ve spojitosti s onemocněním jsou nalezené mutace v pozici trans. U homozygotů nemůžeme vyloučit přítomnost rozsáhlé delecce na jedné z alel. Většina homozygotů pochází z rodin uzavřených etnických skupin (tureckých, pákistánských), tudíž předpokládáme, že stejnou mutaci nesou obě alely. U jednoho pacienta původem z Běloruska, byla sekvenováním genomové DNA nalezena pouze jedna heterozygotní mutace. cDNA nebyla v tomto případě dostupná.

Celkem byly nalezeny 4 nonsense mutace, 11 missense mutací, 2 mutace, které způsobují posun čtecího rámce, 6 intronových mutací, které ovlivňují sestřihová místa a jedna rozsáhlá delecce, která zahrnuje exon 1.

Všechny nalezené missense mutace se nacházejí v mezidruhově vysoce konzervované oblasti genu *HGSNAT*. (Obr. 13)



**Obr. 13 Topologie lidské HGSNAT v lysozomální membráně s predikovanými 11 transmembránovými doménami a 4 glykosylačními místy - žlutě. Missense mutace nalezené v ÚDMP Praha jsou červeně, mutace nalezené v ústavu v Montrealu modře. Obr. podle Hřebíčka 2006 a Ruijtra 2008.**

**Tab. 6 Mutace v genu *HGSNAT* u pacientů s MPSIIIC**

rodina. pacient	původ	alela 1	předpokládaná změna	exon/ intron	alela 2	předpokládaná změna	exon/ intron
1.1	Czech	c.1118-1133del16	p.I373SfsX5	11	c.1600C>T	p.R534X	15
2.1	Czech	c.1046T>G	p.L349X	10	c.1529T>A	p.M510K	14
3.1	Czech	c.935+5G>A	p.F313XfsX1	9	c.1234C>T	p.R412X	12
3.2	Czech	c.935+5G>A	p.F313XfsX1	9	c.1234C>T	p.R412X	12
4.1	Czech	c.1115G>A	p.R372H	11	c.1796C>T	p.P599L	17
5.1	Belorussia	c.311G>T	p.C104F	2	?	?	
6.1	Turkey	c.1810+1G>A	p.S567NfsX14	17	c.1810+1G>A	p.S567NfsX14	17
6.2	Turkey	c.1810+1G>A	p.S567NfsX14	17	c.1810+1G>A	p.S567NfsX14	17
7.1	Turkey	g.124_2462del <sup>§</sup>	del promotor_exon1		g.124_2462del <sup>§</sup>	del promotor_exon1	
8.1	Turkey	g.124_2462del <sup>§</sup>	del promotor_exon1		g.124_2462del <sup>§</sup>	del promotor_exon1	
9.1	USA	c.1706C>T	p.S569L	17	c.202+1G>A	#	1
9.2	USA	c.1706C>T	p.S569L	17	c.202+1G>A	#	1
9.3	USA	c.1706C>T	p.S569L	17	c.202+1G>A	#	1
10.1	Germany/Turkey	c.1334+1G>A	#	12	c.1334+1G>A	#	12
11.1	Germany/Turkey	c.1234C>T	p.R412X	12	c.1234C>T	p.R412X	12
12.1	Germany	c.1114C>T	p.R372C	11	c.1114C>T	p.R372C	11
13.1	Germany	c.1541G>A	p.G514E	14	c.1541G>A	p.G514E	14
14.1	Germany/Turkey	c.932C>T	p.P311L	9	c.932C>T	p.P311L	9
15.1	Germany	c.494T>C	p.L165P	4	c.1637C>T	p.S546F	16
16.1	Greece	c.1706C>T	p.S569L	17	c.1351_1355dupG	p.I453HfsX45	13
17.1	Greece	c.1495G>A	p.E499K	14	c.1351_1355dupG	p.I453HfsX45	13
18.1	GB	c.1626+4dupA	#	15	c.1758C>G	Y586X	17
19.1	GB/Pakistan	c.828-2A>G	#	7	c.828-2A>G	#	7

§ Hranice delece 2339 bp byly stanoveny podle gDNA sekvence z GenBank Accession

number NC\_000008.9 (CON 03\_MAR\_2008) Region: 43112749\_43177127

# pravděpodobná sestřihová mutace, cDNA nebyla k dispozici

Dvě mutace, jedna delece 16 nukleotidů (c.1118\_1133del16) a jedna duplikace (c.1351\_1355dupG), vedou k posunu čtecího rámce a předčasnému stop kodonu na aminokyselinové pozici 376, respektive 497.

Celkem šest mutací vedlo k abnormálnímu sestřihu transkriptu. Mutace c.1810+1G>A vede ke ztrátě donorového sestřihového místa gt v intronu 17. Dinukleotid gt na začátku intronu je konzervovaným donorovým sestřihovým místem, jakákoliv mutace v tomto místě

vede k abnormálnímu sestřihu. Analýza cDNA potvrdila vynechání exonu 17 v transkriptu, který měl za následek posun čtecího rámce a tvorbu předčasného stop kodonu na aminokyselinové pozici 583. U dalších dvou mutací c.202+1G>A a c.1334+1G>A nebyla k dispozici cDNA, vzhledem ke stejnému charakteru mutací, ztrátě donorového sestřihového místa, předpokládáme, že i zde dochází k abnormálnímu sestřihu mRNA.

Analýza cDNA u dvou českých sourozenců ukázala, že sestřihová mutace c.935+5G>A vede k inzeri prvních 89 bazí intronu 9 a ztrátě exonu 10 v transkriptu.

Intronová mutace c.1626+4dupA ovlivňuje konzervované donorové sestřihové místo exonu 15. Podle dvou predikčních programů<sup>132, 133</sup> dochází vlivem mutace přednostně k využití dinukleotidu gt na pozici + 5\_6 jako donorového sestřihového místa, a tím k tvorbě abnormálního transkriptu a posunu čtecího rámce (wt: TATTCTTgtaagtaa, mut +4dupA: TATTCTTGTAAGtaa).

Mutace c.828-2A>G ruší akceptorové sestřihové místo (agGA) exonu 8, nukleotid A na pozici -2 je plně konzervovaným sestřihovým místem u eukaryot. Předpokládáme, že záměnou za jiný nukleotid dochází k abnormálnímu sestřihu.

Rozsáhlá delece byla nalezena pomocí PCR prób u dvou homozygotních pacientů původem z Turecka. Metoda identifikace rozsáhlých delecí pomocí PCR prób u homozygotů je popsána v kapitole 2. V tomto případě se navíc podařilo překlenout deletovanou část a amplifikovat zkrácený PCR produkt. Sekvenováním tohoto PCR produktu byla přesně vymezena hranice delece a určen její rozsah na 2339 bp. Ačkoliv delece zahrnuje exon 1 a velkou část předpokládané promotorové oblasti, u obou pacientů byly pomocí RT-PCR amplifikovány produkty zahrnující exony 2 – 18.

### 5.2.2 Diskuze

K identifikaci genu *HGSNAT* odpovědného za onemocnění MPS IIIC vedlo několik navzájem se doplňujících přístupů. Poziční klonování a vazebná analýza u čtyř českých rodin byla založená na autozomálně kodominantním modelu, který vycházel z rozdílné aktivity N-acetyltransferázy u homozygotů, heterozygotů a zdravých jedinců. Současně byla provedena montrealskou skupinou vazebná analýza založená na autozomálně recesivním modelu, do které bylo postupně zahrnuto 60 pacientů. Oba modely vedly k zúžení dříve publikované kandidátní oblasti<sup>124</sup> na interval 4.2 cM u montrealské skupiny a na interval 2.6 cM u pražské skupiny. Vymezená kandidátní oblast obsahovala 32 známých a

predikovaných genů. Na základě molekulárních vlastností hledaného genu byl vybrán gen *TMEM76*, v současnosti označovaný jako *HGSNAT*, u kterého byly identifikovány transmembránové domény a glykosylační místa. Navíc byla pomocí DNA čipů sledována exprese všech 32 kandidátních genů u dvou pacientů a čtyř kontrol. Všechny zmíněné přístupy vedly k označení genu *TMEM76 (HGSNAT)* jako kandidátního odpovědného genu pro onemocnění MPS IIIC.

Sekvenováním kandidátního genu *TMEM76 (HGSNAT)* byly nalezeny patogenní mutace u 44 vyšetřovaných pacientů ze 40 rodin s MPS IIIC (z toho u jednoho pacienta vyšetřovaného v ČR a u čtyř pacientů vyšetřovaných na pracovišti v Montrealu byla nalezena pouze jedna heterozygotní mutace). U dvou pacientů žádná mutace zatím nalezena nebyla.

Při Northern blot analýze byl hybridizován 220 bp dlouhý fragment z cDNA, který zahrnoval exony 8-10. Ve všech sledovaných tkáních byly detekovány dva hlavní transkripty dlouhé 4.5 a 2.1 kb, to odpovídá přítomnosti dvou polyadenylačních signálů v cDNA, na obr. viz příložená publikace (Fig.5). Nejvyšší exprese byla zaznamenána v leukocytech, srdečním svaly, plicích, placentě a játrech, naopak nízká exprese byla zaznamenána v thymu, tlustém střevě a mozku, což je ve shodě s expresí ostatních lysozomálních proteinů. Dva, respektive tři transkripty byly amplifikovány pomocí RT-PCR v kultivovaných fibroblastech, lymfocytech a kosterním svaly. Transkript, který zahrnoval celou kódující oblast, byl detekován ve všech uvedených tkáních a dva kratší fragmenty. U prvního z kratších transkriptů (detekovaný ve všech studovaných tkáních) dochází k vynechání exonů 9 a 10, a tím k deleci 64 aminokyselin; u druhého (detekovaném pouze v kosterním svaly) dochází k vynechání exonů 3, 9 a 10, a tím k posunu čtecího rámce a k vytvoření předčasného stop kodonu. Předpokládáme, že tyto krátké transkripty vedou k tvorbě neaktivního enzymu nebo k jejich translaci vůbec nedochází. Předpoklad podporuje analýza u pacienta CIII.1. Pacient je složeným heterozygotem pro nonsense mutaci v exonu 12 a pro sestřihovou mutaci v intronu 9. Ve fibroblastech byl kromě transkriptů, které nesou mutaci v exonu 12, a nebo u nichž dochází k abnormálnímu sestřihu vlivem mutace v intronu 9, nalezen i nemutovaný zkrácený transkript, u kterého je vynechán exon 9 a 10 (stejný jako u kontrolních vzorků). Přesto naměřená enzymová aktivita N-acetyltransferázy pacienta CIII.1 je téměř nulová.

Jako důkaz, že mutace v genu *HGSNAT* vedou k onemocnění MPS IIIC byla provedena funkční expresní studie. Bylo připraveno několik konstruktů obsahujících kódující sekvence lidského *HGSNAT* nebo myššího orthologu *Hgsnat*. K transfekci byly použity kultivované fibroblasty pacienta s nedetekovatelnou enzymovou aktivitou N-acetyltransferázy, pacient byl

homozygotem pro sestřihovou mutaci, která vede k vynechání exonu 17. Komplementační studie prokázala obnovení aktivity N-acetyltransferázy ve fibroblastech. Popis konstruktů a podrobné výsledky funkční analýzy jsou uvedeny v příložené publikaci.

Protein kódovaný genem *HGSNAT*, heparin acetyl-CoA: $\alpha$ -glukozaminid N-acetyltransferáza (HGSNAT), je vysoce konzervovaný a je predikován téměř ve všech známých zvířecích genomech. Přesto HGSNAT protein nevykazuje sekvenční podobnost k žádné jiné známé prokaryotické nebo eukaryotické N-acetyltransferáze nebo k jinému lyzozomálnímu proteinu. Domníváme se, že HGSNAT patří do nové strukturní třídy proteinů, které jsou odpovědné za transport acetyl-CoA přes buněčnou membránu a následnou N-acetylaci. Jediným dalším homologním proteinem je COG4299 z rodiny bakteriálních proteinů, který není blíže specifikován. Nemůžeme vyloučit podobnou funkci těchto proteinů v glykosaminoglykanovém metabolismu, případně v transmembránové acetylaci. Samotný mechanismus transmembránové acetylace je nejasný. Byly publikovány dvě rozdílné teorie. Prvním je ping-pong mechanismus,<sup>134-136</sup> kde vlivem navázání acetylové skupiny na His zbytek v aktivním místě proteinu dojde ke konformační změně, a tím k přenosu do lyzozómu, kde dojde k N-acetylaci heparan sulfátu. Druhou teorií je tvorba přechodného terciálního komplexu enzymu, acetyl-CoA a heparan sulfátu.<sup>137</sup>

Ve stejné době, kdy byla Hřebíčkem a kol. publikována analýza genu *HGSNAT* odpovědného za onemocnění MPS IIIC, dospěl nezávisle ke stejným výsledkům Fan a kol.<sup>138</sup> K identifikaci genu *HGSNAT* použil odlišný postup, založený na proteomické analýze.

Hlavním rozdílem v obou publikacích je velikost genu *HGSNAT*, jeho 5'-konec. Hřebíček a kol. uvádí velikost ORF 1992 bp, tj. o 84 nukleotidů delší směrem k 5'-konci než Fan a kol. a databáze NCBI (GenBank: NM\_152419.2). Delší transkript, který zahrnoval nový ATG kodon ve čtecím rámci byl opakovaně nalezen pomocí RT-PCR u kontrolních i patientských vzorků. Velikost predikovaného polypeptidu HGSNAT je tak o 28 aminokyselin delší na N-konci než velikost uvedená v GenBank: NP\_689632.2. Rozdíl v uvedeném počátku transkripce je pravděpodobně dán vysokým obsahem GC v 5'-koncové oblasti genu, amplifikace PCR produktů je v tomto místě velice obtížná.

Další nejasností genu *HGSNAT* je promotorová oblast. U dvou pacientů byla nalezena rozsáhlá delece, která vedla ke ztrátě více než 2 kb, včetně exonu 1, CpG oblasti a předpokládané promotorové oblasti 300 až 600 bp upstream od genu *HGSNAT*.<sup>139-141</sup> Přesto



u těchto pacientů byl pomocí RT-PCR detekován transkript, který zahrnoval exony 2 – 18. Domníváme se, že zde existuje alternativní promotor v intronu 1.<sup>140, 141</sup>

### 5.3 Souhrn kapitoly 3

Pomocí několika postupů, tj. porovnáním známých molekulárních vlastností enzymu, vazebné analýzy a genové exprese, se podařilo identifikovat gen *HGSNAT*, který kóduje protein heparin acetyl-CoA:  $\alpha$ -glukosaminid N-acetyltransferázu (HGSNAT). Mutace v genu *HGSNAT* vedou k deficitu enzymu HGSNAT a k onemocnění MPSIIIC. Protein HGSNAT byl posledním enzymem v degradaci glykosaminoglykanů, u kterého nebyl znám odpovědný gen.

Ačkoliv je MPSIIIC recesivním onemocněním, byl k mapování genu *HGSNAT* u českých pacientů použit autozomálně kodominantní model. Sledovaným znakem byla snížená aktivita N-acetyltransferázy u přenašečů onemocnění. Tím se počet informativních jedinců zvýšil z 5 na 54.

Identifikace genu *HGSNAT* otevřela řadu otázek, co se týká molekulárních vlastností samotného genu i proteinu. HGSNAT je pravděpodobně členem nové strukturní třídy transmembránových proteinů a je tudíž nemožné odvozovat jeho vlastnosti na základě homologie s jinými proteiny. Hlavními cíli dalšího studia bude proto objasnění a potvrzení buněčné lokalizace proteinu, lokalizace C- a N-konce vně nebo uvnitř lysozómu, identifikace aktivního místa enzymu, vysvětlení mechanismu transmembránové acetylace, stejně jako objasnění funkce prokaryontních proteinů rodiny COG4299. Dalším cílem bude určení počátku transkripce a s tím související velikost proteinu a identifikace promotoru, případně alternativních promotorových oblastí. K potvrzení vlivu nalezených mutací na aktivitu enzymu budou zavedeny expresní studie.

## 6 Závěr

Určení vztahu mezi onemocněním a jeho molekulární podstatou je jedním z hlavních cílů lékařské genetiky. V rámci studie: „**Molekulární analýza vybraných dědičně podmíněných onemocnění**“ byly popsány postupy, které vedou k objasnění molekulární podstaty u onemocnění s již známými odpovědnými geny i u onemocnění, u kterého byl odpovědný gen teprve identifikován.

Souhrnem lze říci, že hlavní cíle studie byly splněny:

### **Klinická, biochemická a molekulárně biologická analýza vybraných dědičných poruch metabolismu organických kyselin**

- Byl zaveden komplexní systém diferenciální diagnostiky u pacientů s poruchou metabolismu ketonových látek a s methylmalonovou acidémií.
- Byla zavedena molekulární analýza u pacientů s poruchou metabolismu ketonových látek, jmenovitě s deficitem 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyázy a  $\beta$ -ketothiolázy, a u pacientů s methylmalonovou acidémií.

### **Charakterizace X-vázaného syndromu spojeného s delecí chromozómu X**

- Byla popsána rozsáhlá delece u pacientů s X-vázanou agammaglobulinémií a vyslovena hypotéza pravděpodobné příčiny vzniku těchto delecí.
- Byla zavedena jednoduchá metoda pro stanovení rozsáhlých delecí u hemizygotů a homozygotů.

### **Studium molekulární podstaty mukopolysacharidózy typu IIIC**

- Byl identifikován gen *HGSNAT* spjatý s onemocněním MPS IIIC.
- Byly nalezeny mutace v genu *HGSNAT* u pacientů s MPSIIIC.
- Byly charakterizovány hlavní molekulární vlastnosti genu *HGSNAT*.

Studie přispěla k rozšíření znalostí zkoumaných dědičných onemocnění. Zavedené postupy molekulárních analýz jsou součástí diagnostiky na Ústavu dědičných metabolických poruch v Praze. Výsledky těchto analýz slouží k prevenci, prognóze i léčbě onemocnění a u postižených rodin byla umožněna prenatální diagnostika. Výsledky byly publikovány v několika domácích i zahraničních odborných časopisech a prezentovány na mezinárodních konferencích. Některé z publikací byly dále citovány.

## 7 Podíl autora na řešené problematice a poděkování

V rámci jednotlivých kapitol se autorka podílela zejména na částech souvisejících s molekulární analýzou onemocnění, konkrétně:

**Kapitola 1:** Klinická, biochemická a molekulárně biologická analýza vybraných dědičných poruch metabolismu organických kyselin:

- zavedení metod pro molekulární analýzu a vyšetření pacientů s poruchou metabolismu ketonových látek (deficit 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyázy a  $\beta$ -ketothiolázy), a u pacientů s methylmalonovou acidémií
- korelace genotypu a fenotypu onemocnění

**Kapitola 2:** Charakterizace X-vázaného syndromu spojeného s delecí několika genů na chromozómu X:

- zavedení metod a zjištění rozsahu delecí u pacientů s X-vázanou agammaglobulinémií pomocí PCR prób

**Kapitola 3:** Studium molekulární podstaty mukopolysacharidózy typu IIIC

- poziční klonování a vazebná analýza genu *HGSNAT*
- molekulární analýza genu *HGSNAT* u pacientů u pacientů s MPSIIIC
- charakteristika molekulárních vlastností genu *HGSNAT* - identifikace transkriptů, identifikace 5'-konce transkriptu

## **Poděkování:**

- Ing. Stanislavu Kmochovi, PhD. - svému školiteli, za celkové odborné a kritické vedení mého postgraduálního studia
- Ing. Evžeenii Pospíšilové - za vedení a odbornou spolupráci v problematice vybraných poruch metabolismu organických kyselin
- RNDr. Lence Dvořákové, CSc. - za vedení a odbornou spolupráci při charakterizaci rozsáhlé X-vázané delece
- MUDr. Martinu Hřebíčkoví - za vedení a odbornou spolupráci při identifikaci genu *HGSNAT*

a dále Prof. MUDr. Milanu Ellederovi za všestrannou podporu studentů na Ústavu dědičných metabolických poruch a celému kolektivu ÚDMP za spolupráci, podporu a vytvoření přátelského pracovního prostředí.

Práce vznikly za podpory grantů: IGA MZ ČR NE 6003-3/2000, IGA MZ ČR NE 7617-3, VZ 111100003, MZ ČR VZ 64165, MZ ČR NR 8069-1, MZ ČR 1A/8239-3 a MSM0021620806.

## 8 Publikace

### Publikace, které jsou podkladem dizertační práce:

1. Pospisilova E, Mrazova L, Hrda J, Martincova O, Zeman J. (2003) Biochemical and molecular analyses in three patients with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. *J Inherit Metab Dis* **26**, 433-41. *IF 1.722*
2. Mrazova L, Fukao T, Halova K, Gregova E, Kohut V, Pribyl D, Chrastina P, Kondo N, Pospisilova E (2005) Two novel mutations in mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase deficiency. *J Inherit Metab Dis* **28**, 235-6. *IF 1.722*
3. Pospíšilová E, Mrázová L, Klement P, Martincová O, Hrubá E, Chrastina P, Přebyl D, Vobruba V, Hálová K, Zeman J. (2006) Methylmalonová acidémie: klinická, biochemická a molekulárně biologická studie. *Čes.-slov. Pediat.* **61**, 190-198.
4. Sediva A, Smith CI, Asplund AC, Hadac J, Janda A, Zeman J, Hansikova H, Dvorakova L, Mrazova L, Velbri S, Koehler C, Roesch K, Sullivan KE, Futatani T, Ochs HD (2007) Contiguous X-chromosome deletion syndrome encompassing the BTK, TIMM8A, TAF7L, and DRP2 genes. *J Clin Immunol* **27**, 640-6. *IF 2.638*
5. Hrebicek M, Mrazova L, Seyrantepe V, Durand S, Roslin NM, Noskova L, Hartmannova H, Ivanek R, Cizkova A, Poupetova H, Sikora J, Urinovska J, Stranecky V, Zeman J, Lepage P, Roquis D, Verner A, Ausseil J, Beesley CE, Maire I, Poorthuis BJ, van de Kamp J, van Diggelen OP, Wevers RA, Hudson TJ, Fujiwara TM, Majewski J, Morgan K, Kmoch S, Pshezhetsky AV (2006) Mutations in TMEM76\* cause mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo C syndrome). *Am J Hum Genet* **79**, 807-19. *IF 12.649*

### Další publikace:

1. Hodanova K, Hrebicek M, Cervenkova M, Mrazova L, Veprekova L, Zeman J (1999) Analysis of the beta-glucocerebrosidase gene in Czech and Slovak Gaucher patients: mutation profile and description of six novel mutant alleles. *Blood Cells Mol Dis* **25**, 287-98. *IF 2.427*
2. Matej R, Dvorakova L, Mrazova L, Houst'kova H, Elleder M (2008) Early onset Alexander disease: a case report with evidence for manifestation of the disorder in neurohypophyseal pituicytes. *Clin Neuropathol* **27**, 64-71. *IF 0.918*

## 9 Seznam použitých zkratk a nomenklatura

3KTD	deficit 3-ketothiolázy
AcAc	acetoacetát
AdoCbl	adenosylkobalamin
AK	aminokyselina
ATR	ATP : kobalamin(I) adenosyltransferáza
CGH	komparativní genomová hybridizace
cDNA	kódující DNA
cM	centiMorgan
DDS, DDP	dystonia-deafness syndrom
HL	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyáza
HGSNAT	heparin acetyl-CoA: $\alpha$ -glucosaminide N-acetyltransferase
LINEs	long interspersed elements
LSDs	lyzozomální onemocnění
LOD	logarithm of the odds
MeCbl	methylkobalamin
MCEE	DL-methylmalonyl-CoA racemáza
MMA	methylmalonová acidémie/acidúria
MCM	methylmalonyl-CoA mutáza
MPS IIIC	mukopolysacharidóza typu IIIC
MTS	Mohr-Tranebjaerg syndrom
NMD	nonsense mediated decay
ORF	otevřený čtecí rámec
PCR	polymerázová řetězová reakce
RT-PCR	reverzní transkripce PCR
SINEs	short interspersed elements
SNP	single nukleotide polymorphism
STR	short tandem repeats
T2	mitochondriální acetoacetyl-CoA thioláza
VNTR	variable number of tandem repeats
XLA	X-vázaná agammaglobulinémie

**Nomenklatura:** Mutace byly pojmenovány ve shodě s Human Genome Variation Society <http://www.hgvs.org/>.

Kvůli přehlednosti je většina mutací v práci popsána na úrovni proteinu, vliv mutace na proteinovou strukturu nebyl experimentálně zjišťován, jedná se o předpokládaný vliv.

## 10 Reference

1. Hatina, J. and Sykes, B., *Lékařská genetika Problémy a přístupy*. 2002, Praha: Academia.
2. Ropers, H. H. New perspectives for the elucidation of genetic disorders. *Am J Hum Genet* **81**, 199-207 (2007).
3. Purandare, S. M. and Patel, P. I. Recombination hot spots and human disease. *Genome Res* **7**, 773-86 (1997).
4. Lopez-Bigas, N., Blencowe, B. J. and Ouzounis, C. A. Highly consistent patterns for inherited human diseases at the molecular level. *Bioinformatics* **22**, 269-77 (2006).
5. Mooney, S. D. and Klein, T. E. The functional importance of disease-associated mutation. *BMC Bioinformatics* **3**, 24 (2002).
6. Vitkup, D., Sander, C. and Church, G. M. The amino-acid mutational spectrum of human genetic disease. *Genome Biol* **4**, R72 (2003).
7. National Library of Medicine. <http://www.nlm.nih.gov/>.
8. Furney, S. J., Alba, M. M. and Lopez-Bigas, N. Differences in the evolutionary history of disease genes affected by dominant or recessive mutations. *BMC Genomics* **7**, 165 (2006).
9. Rossetti, S. and Harris, P. C. Genotype-phenotype correlations in autosomal dominant and autosomal recessive polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* **18**, 1374-80 (2007).
10. Dobrovolny, R., et al. Relationship between X-inactivation and clinical involvement in Fabry heterozygotes. Eleven novel mutations in the alpha-galactosidase A gene in the Czech and Slovak population. *J Mol Med* **83**, 647-54 (2005).
11. Dobrovolny, R., et al. Recurrence of Fabry disease as a result of paternal germline mosaicism for alpha-galactosidase A gene mutation. *Am J Med Genet A* **134A**, 84-7 (2005).
12. Sieberts, S. K. and Schadt, E. E. Moving toward a system genetics view of disease. *Mamm Genome* **18**, 389-401 (2007).
13. The Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* **447**, 661-78 (2007).
14. Maher, E. R. Imprinting and assisted reproductive technology. *Hum Mol Genet* **14 Spec No 1**, R133-8 (2005).
15. Santos-Reboucas, C. B. and Pimentel, M. M. Implication of abnormal epigenetic patterns for human diseases. *Eur J Hum Genet* **15**, 10-7 (2007).
16. Strachan, T. and Read, A., *Human Molecular Genetics* 3. 2004, New York: Garland Science.
17. Lee, C., Iafrate, A. J. and Brothman, A. R. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nat Genet* **39**, S48-54 (2007).
18. The Human Gene Mutation Database. <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>.
19. Ala, U., et al. Prediction of human disease genes by human-mouse conserved coexpression analysis. *PLoS Comput Biol* **4**, e1000043 (2008).



20. Oliver, P. L., Bitoun, E. and Davies, K. E. Comparative genetic analysis: the utility of mouse genetic systems for studying human monogenic disease. *Mamm Genome* **18**, 412-24 (2007).
21. Janosikova, B., et al. Genetic variants of homocysteine metabolizing enzymes and the risk of coronary artery disease. *Mol Genet Metab* **79**, 167-75 (2003).
22. International HapMap Project. <http://www.hapmap.org/>.
23. Segalat, L. Loss-of-function genetic diseases and the concept of pharmaceutical targets. *Orphanet J Rare Dis* **2**, 30 (2007).
24. Middleton, B. The oxoacyl-coenzyme A thiolases of animal tissues. *Biochem J* **132**, 717-30 (1973).
25. Mitchell, G. A. and Fukao, T., *Inborn Errors of Ketone Body Metabolism*. The metabolic and molecular bases of inherited disease, ed. Scriver CR, B. A., Sly WS, Valle D. 2001, New York: McGraw-Hill. 2327-2356.
26. Pardridge, W. M. Blood-brain barrier transport of glucose, free fatty acids, and ketone bodies. *Adv Exp Med Biol* **291**, 43-53 (1991).
27. Mitchell, G. A., et al. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase (HL). Cloning of human and chicken liver HL cDNAs and characterization of a mutation causing human HL deficiency. *J Biol Chem* **268**, 4376-81 (1993).
28. Forouhar, F., et al. Crystal structures of two bacterial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyases suggest a common catalytic mechanism among a family of TIM barrel metalloenzymes cleaving carbon-carbon bonds. *J Biol Chem* **281**, 7533-45 (2006).
29. Fu, Z., et al. Crystal structure of human 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Lyase: insights into catalysis and the molecular basis for hydroxymethylglutaric aciduria. *J Biol Chem* **281**, 7526-32 (2006).
30. Ashmarina, L. I., et al. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase: targeting and processing in peroxisomes and mitochondria. *J Lipid Res* **40**, 70-5 (1999).
31. Ashmarina, L. I., et al. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase is present in mouse and human liver peroxisomes. *J Biol Chem* **269**, 31929-32 (1994).
32. Pie, J., et al. A nonsense mutation in the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase gene produces exon skipping in two patients of different origin with 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency. *Biochem J* **323** ( Pt 2), 329-35 (1997).
33. Faull, K., et al. Letter: Patient with defect in leucine metabolism. *N Engl J Med* **294**, 1013 (1976).
34. Huth, W., et al. On the mechanism of ketogenesis and its control. Purification, kinetic mechanism and regulation of different forms of mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolases from ox liver. *Eur J Biochem* **59**, 475-89 (1975).
35. Schwerdt, G. and Huth, W. Turnover and transformation of mitochondrial acetyl-CoA acetyltransferase into CoA-modified forms. *Biochem J* **292** ( Pt 3), 915-9 (1993).
36. Haapalainen, A. M., et al. Crystallographic and kinetic studies of human mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase: the importance of potassium and chloride ions for its structure and function. *Biochemistry* **46**, 4305-21 (2007).
37. Fukao, T., et al. Molecular cloning and sequence of the complementary DNA encoding human mitochondrial acetoacetyl-coenzyme A thiolase and study of the variant enzymes in

- cultured fibroblasts from patients with 3-ketothiolase deficiency. *J Clin Invest* **86**, 2086-92 (1990).
38. Fukao, T., et al. Enzymes of ketone body utilization in human tissues: protein and messenger RNA levels of succinyl-coenzyme A (CoA):3-ketoacid CoA transferase and mitochondrial and cytosolic acetoacetyl-CoA thiolases. *Pediatr Res* **42**, 498-502 (1997).
39. Masuno, M., et al. Assignment of the human cytosolic acetoacetyl-coenzyme A thiolase (ACAT2) gene to chromosome 6q25.3-q26. *Genomics* **36**, 217-8 (1996).
40. Wanders, R. J., Schutgens, R. B. and Zoeters, P. H. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase in human skin fibroblasts: study of its properties and deficient activity in 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria patients using a simple spectrophotometric method. *Clin Chim Acta* **171**, 95-101 (1988).
41. Kikuchi, M., et al. Enzymatic diagnosis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency with high-performance liquid chromatography. *Clin Chim Acta* **189**, 297-301 (1990).
42. Puisac, B., et al. Skipping of exon 2 and exons 2 plus 3 of HMG-CoA lyase (HL) gene produces the loss of beta sheets 1 and 2 in the recently proposed (beta-alpha)<sup>8</sup> TIM barrel model of HL. *Biophys Chem* **115**, 241-5 (2005).
43. Al-Sayed, M., et al. Mutations underlying 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase deficiency in the Saudi population. *BMC Med Genet* **7**, 86 (2006).
44. Mitchell, G. A., et al. HMG CoA lyase deficiency: identification of five causal point mutations in codons 41 and 42, including a frequent Saudi Arabian mutation, R41Q. *Am J Hum Genet* **62**, 295-300 (1998).
45. Tuinstra, R. L., et al. Evaluation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase arginine-41 as a catalytic residue: use of acetyldithio-coenzyme A to monitor product enolization. *Biochemistry* **43**, 5287-95 (2004).
46. Zapater, N., et al. Two missense point mutations in different alleles in the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase gene produce 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria in a French patient. *Arch Biochem Biophys* **358**, 197-203 (1998).
47. Roberts, J. R., Mitchell, G. A. and Mizioroko, H. M. Modeling of a mutation responsible for human 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency implicates histidine 233 as an active site residue. *J Biol Chem* **271**, 24604-9 (1996).
48. Carrasco, P., et al. C-terminal end and aminoacid Lys48 in HMG-CoA lyase are involved in substrate binding and enzyme activity. *Mol Genet Metab* **91**, 120-7 (2007).
49. Fenton, W., Gravel, R. and Rosenblatt, D., *Disorders of Propionate and Methylmalonate Metabolism*. The metabolic and molecular bases of inherited disease, ed. Scriver CR, et al. 2001, New York: McGraw-Hill. 2165-2193.
50. Cooper, B. A., Rosenblatt, D. S. and Watkins, D. Methylmalonic aciduria due to a new defect in adenosylcobalamin accumulation by cells. *Am J Hematol* **34**, 115-20 (1990).
51. Watkins, D., Matiaszuk, N. and Rosenblatt, D. S. Complementation studies in the cblA class of inborn error of cobalamin metabolism: evidence for interallelic complementation and for a new complementation class (cblH). *J Med Genet* **37**, 510-3 (2000).
52. Bobik, T. A. and Rasche, M. E. Identification of the human methylmalonyl-CoA racemase gene based on the analysis of prokaryotic gene arrangements. Implications for decoding the human genome. *J Biol Chem* **276**, 37194-8 (2001).

53. Mancia, F., et al. How coenzyme B12 radicals are generated: the crystal structure of methylmalonyl-coenzyme A mutase at 2 Å resolution. *Structure* **4**, 339-50 (1996).
54. Thoma, N. H. and Leadlay, P. F. Homology modeling of human methylmalonyl-CoA mutase: a structural basis for point mutations causing methylmalonic aciduria. *Protein Sci* **5**, 1922-7 (1996).
55. Fenton, W. A., et al. Purification and properties of methylmalonyl coenzyme A mutase from human liver. *Arch Biochem Biophys* **214**, 815-23 (1982).
56. Jansen, R., et al. Cloning of full-length methylmalonyl-CoA mutase from a cDNA library using the polymerase chain reaction. *Genomics* **4**, 198-205 (1989).
57. Ledley, F. D., et al. Molecular cloning of L-methylmalonyl-CoA mutase: gene transfer and analysis of mut cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 3518-21 (1988).
58. Willard, H. F. and Rosenberg, L. E. Inherited deficiencies of human methylmalonyl CoA mutase activity: reduced affinity of mutant apoenzyme for adenosylcobalamin. *Biochem Biophys Res Commun* **78**, 927-34 (1977).
59. Janata, J., Kogekar, N. and Fenton, W. A. Expression and kinetic characterization of methylmalonyl-CoA mutase from patients with the mut- phenotype: evidence for naturally occurring interallelic complementation. *Hum Mol Genet* **6**, 1457-64 (1997).
60. Crane, A. M. and Ledley, F. D. Clustering of mutations in methylmalonyl CoA mutase associated with mut- methylmalonic acidemia. *Am J Hum Genet* **55**, 42-50 (1994).
61. Acquaviva, C., et al. N219Y, a new frequent mutation among mut(degree) forms of methylmalonic acidemia in Caucasian patients. *Eur J Hum Genet* **9**, 577-82 (2001).
62. Adjalla, C. E., et al. A common mutation among blacks with mut- methylmalonic aciduria. *Hum Mutat Suppl* **1**, S248-50 (1998).
63. Mikami, H., et al. Molecular analysis of methylmalonyl-CoA mutase deficiency: identification of three missense mutations in mut0 patients. *J Hum Genet* **44**, 35-9 (1999).
64. Dobson, C. M., et al. Identification of the gene responsible for the cblA complementation group of vitamin B12-responsive methylmalonic acidemia based on analysis of prokaryotic gene arrangements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15554-9 (2002).
65. Korotkova, N. and Lidstrom, M. E. MeaB is a component of the methylmalonyl-CoA mutase complex required for protection of the enzyme from inactivation. *J Biol Chem* **279**, 13652-8 (2004).
66. Hubbard, P. A., et al. Crystal structure and mutagenesis of the metallochaperone MeaB: insight into the causes of methylmalonic aciduria. *J Biol Chem* **282**, 31308-16 (2007).
67. Padovani, D., Labunska, T. and Banerjee, R. Energetics of interaction between the G-protein chaperone, MeaB, and B12-dependent methylmalonyl-CoA mutase. *J Biol Chem* **281**, 17838-44 (2006).
68. Martinez, M. A., et al. Genetic analysis of three genes causing isolated methylmalonic acidemia: identification of 21 novel allelic variants. *Mol Genet Metab* **84**, 317-25 (2005).
69. Johnson, C. L., et al. Functional genomic, biochemical, and genetic characterization of the Salmonella pduO gene, an ATP:cob(I)alamin adenosyltransferase gene. *J Bacteriol* **183**, 1577-84 (2001).
70. Dobson, C. M., et al. Identification of the gene responsible for the cblB complementation group of vitamin B12-dependent methylmalonic aciduria. *Hum Mol Genet* **11**, 3361-9 (2002).

71. Leal, N. A., et al. Identification of the human and bovine ATP:Cob(I)alamin adenosyltransferase cDNAs based on complementation of a bacterial mutant. *J Biol Chem* **278**, 9227-34 (2003).
72. Saridakis, V., et al. The structural basis for methylmalonic aciduria. The crystal structure of archaeal ATP:cobalamin adenosyltransferase. *J Biol Chem* **279**, 23646-53 (2004).
73. Schubert, H. L. and Hill, C. P. Structure of ATP-bound human ATP:cobalamin adenosyltransferase. *Biochemistry* **45**, 15188-96 (2006).
74. Lerner-Ellis, J. P., et al. Mutation and biochemical analysis of patients belonging to the cblB complementation class of vitamin B12-dependent methylmalonic aciduria. *Mol Genet Metab* **87**, 219-25 (2006).
75. Dionisi-Vici, C., et al. Inborn errors of metabolism in the Italian pediatric population: a national retrospective survey. *J Pediatr* **140**, 321-7 (2002).
76. Brock, M. and Buckel, W. On the mechanism of action of the antifungal agent propionate. *Eur J Biochem* **271**, 3227-41 (2004).
77. Schwab, M. A., et al. Secondary mitochondrial dysfunction in propionic aciduria: a pathogenic role for endogenous mitochondrial toxins. *Biochem J* **398**, 107-12 (2006).
78. Picca, S., et al. Extracorporeal dialysis in neonatal hyperammonemia: modalities and prognostic indicators. *Pediatr Nephrol* **16**, 862-7 (2001).
79. Horster, F., et al. Long-term outcome in methylmalonic acidurias is influenced by the underlying defect (mut0, mut-, cblA, cblB). *Pediatr Res* **62**, 225-30 (2007).
80. Matsui, S. M., Mahoney, M. J. and Rosenberg, L. E. The natural history of the inherited methylmalonic acidemias. *N Engl J Med* **308**, 857-61 (1983).
81. Willard, H. F., et al. Rapid prenatal and postnatal detection of inborn errors of propionate, methylmalonate, and cobalamin metabolism: a sensitive assay using cultured cells. *Hum Genet* **34**, 277-83 (1976).
82. Fuchshuber, A., et al. mut0 methylmalonic acidemia: eleven novel mutations of the methylmalonyl CoA mutase including a deletion-insertion mutation. *Hum Mutat* **16**, 179 (2000).
83. Worgan, L. C., et al. Spectrum of mutations in mut methylmalonic acidemia and identification of a common Hispanic mutation and haplotype. *Hum Mutat* **27**, 31-43 (2006).
84. Acquaviva, C., et al. Molecular basis of methylmalonyl-CoA mutase apoenzyme defect in 40 European patients affected by mut(o) and mut- forms of methylmalonic acidemia: identification of 29 novel mutations in the MUT gene. *Hum Mutat* **25**, 167-76 (2005).
85. Lempp, T. J., et al. Mutation and biochemical analysis of 19 probands with mut0 and 13 with mut- methylmalonic aciduria: identification of seven novel mutations. *Mol Genet Metab* **90**, 284-90 (2007).
86. Sorting Intolerant From Tolerant. <http://blocks.fhcr.org/sift/SIFT.html>.
87. Benoist, J. F., et al. Molecular and structural analysis of two novel mutations in a patient with mut(-) methylmalonyl-CoA deficiency. *Mol Genet Metab* **72**, 181-4 (2001).
88. Zhang, J., et al. Impact of cblB mutations on the function of ATP:cob(I)alamin adenosyltransferase in disorders of vitamin B12 metabolism. *Mol Genet Metab* **87**, 315-22 (2006).

89. Oyama, C., et al. Novel mutation of methylmalonyl-CoA mutase gene causing the mut0 form of methylmalonic acidemia in a Japanese girl. *Pediatr Int* **49**, 232-4 (2007).
90. Ohno, S., *Sex chromosomes and Sex-linked Genes*. 1967, Berlin: Springer.
91. Royer-Pokora, B., et al. Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location. *Nature* **322**, 32-8 (1986).
92. Monaco, A. P., et al. Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* **323**, 646-50 (1986).
93. Ross, M. T., et al. The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature* **434**, 325-37 (2005).
94. Li, W. H., et al. Evolutionary analyses of the human genome. *Nature* **409**, 847-9 (2001).
95. Stankiewicz, P. and Lupski, J. R. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet* **18**, 74-82 (2002).
96. Yen, P. H., et al. Frequent deletions of the human X chromosome distal short arm result from recombination between low copy repetitive elements. *Cell* **61**, 603-10 (1990).
97. Kajikawa, M. and Okada, N. LINEs mobilize SINEs in the eel through a shared 3' sequence. *Cell* **111**, 433-44 (2002).
98. Hedges, D. J. and Batzer, M. A. From the margins of the genome: mobile elements shape primate evolution. *Bioessays* **27**, 785-94 (2005).
99. Shankar, R., et al. Evolution and distribution of RNA polymerase II regulatory sites from RNA polymerase III dependant mobile Alu elements. *BMC Evol Biol* **4**, 37 (2004).
100. Rowold, D. J. and Herrera, R. J. Alu elements and the human genome. *Genetica* **108**, 57-72 (2000).
101. Schmid, C. W. Alu: structure, origin, evolution, significance and function of one-tenth of human DNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **53**, 283-319 (1996).
102. Mighell, A. J., Markham, A. F. and Robinson, P. A. Alu sequences. *FEBS Lett* **417**, 1-5 (1997).
103. Deininger, P. L. and Batzer, M. A. Alu repeats and human disease. *Mol Genet Metab* **67**, 183-93 (1999).
104. Van Esch, H., et al. Deletion of VCX-A due to NAHR plays a major role in the occurrence of mental retardation in patients with X-linked ichthyosis. *Hum Mol Genet* **14**, 1795-803 (2005).
105. Bruton, O. C. Agammaglobulinemia. *Pediatrics* **9**, 722-8 (1952).
106. Quartier, P., et al. Early and prolonged intravenous immunoglobulin replacement therapy in childhood agammaglobulinemia: a retrospective survey of 31 patients. *J Pediatr* **134**, 589-96 (1999).
107. Rich, K., et al. Familial hypogammaglobulinemia with variable serum immunoglobulins. Concordance with lymphocyte ecto-5'-nucleotidase deficiency. *Am J Dis Child* **135**, 795-8 (1981).
108. Tsukada, S., et al. Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell* **72**, 279-90 (1993).
109. Vetrie, D., et al. The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature* **361**, 226-33 (1993).

110. Smith, C. I., et al. Expression of Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase gene, BTK, is selectively down-regulated in T lymphocytes and plasma cells. *J Immunol* **152**, 557-65 (1994).
111. Mohr, J. and Mageroy, K. Sex-linked deafness of a possibly new type. *Acta Genet Stat Med* **10**, 54-62 (1960).
112. Tranebjaerg, L., Lou, H. and Andresen, J. New X-linked syndrome with apraxia, ataxia, and mental deficiency: clinical, cytogenetic and neuropsychological studies in two Danish families. *Am J Med Genet* **43**, 498-504 (1992).
113. Tranebjaerg, L., et al. A new X linked recessive deafness syndrome with blindness, dystonia, fractures, and mental deficiency is linked to Xq22. *J Med Genet* **32**, 257-63 (1995).
114. Jin, H., et al. The human family of Deafness/Dystonia peptide (DDP) related mitochondrial import proteins. *Genomics* **61**, 259-67 (1999).
115. Koehler, C. M., et al. Human deafness dystonia syndrome is a mitochondrial disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2141-6 (1999).
116. Roesch, K., et al. Human deafness dystonia syndrome is caused by a defect in assembly of the DDP1/TIMM8a-TIMM13 complex. *Hum Mol Genet* **11**, 477-86 (2002).
117. Online Mendelian Inheritance in Man. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>.
118. Jin, H., et al. A novel X-linked gene, DDP, shows mutations in families with deafness (DFN-1), dystonia, mental deficiency and blindness. *Nat Genet* **14**, 177-80 (1996).
119. Jyonouchi, H., et al. Monozygous twins with a microdeletion syndrome involving BTK, DDP1, and two other genes; evidence of intact dendritic cell development and TLR responses. *Eur J Pediatr* **167**, 317-21 (2008).
120. Vorechovsky, I., et al. Isolation of cosmid and cDNA clones in the region surrounding the BTK gene at Xq21.3-q22. *Genomics* **21**, 517-24 (1994).
121. Meikle, P. J., et al. Prevalence of lysosomal storage disorders. *Jama* **281**, 249-54 (1999).
122. Beck, M. New therapeutic options for lysosomal storage disorders: enzyme replacement, small molecules and gene therapy. *Hum Genet* **121**, 1-22 (2007).
123. Neufeld, E. and Muenzer, J., *The Mucopolysaccharidoses*. The metabolic and molecular bases of inherited disease, ed. Scriver CR, B. A., Sly WS, Valle D. 2001, New York: McGraw-Hill. 3421-3445.
124. Ausseil, J., et al. An acetylated 120-kDa lysosomal transmembrane protein is absent from mucopolysaccharidosis IIIC fibroblasts: a candidate molecule for MPS IIIC. *Mol Genet Metab* **87**, 22-31 (2006).
125. Voznyi Ya, V., et al. A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Sanfilippo disease C (MPS III C). *J Inherit Metab Dis* **16**, 465-72 (1993).
126. Ausseil, J., et al. Localisation of a gene for mucopolysaccharidosis IIIC to the pericentromeric region of chromosome 8. *J Med Genet* **41**, 941-5 (2004).
127. Hodanova, K., et al. Mapping of a new candidate locus for uromodulin-associated kidney disease (UAKD) to chromosome 1q41. *Kidney Int* **68**, 1472-82 (2005).

128. Kahsay, R. Y., Gao, G. and Liao, L. An improved hidden Markov model for transmembrane protein detection and topology prediction and its applications to complete genomes. *Bioinformatics* **21**, 1853-8 (2005).
129. Blom, N., et al. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* **4**, 1633-49 (2004).
130. Fedele, A. O., et al. Mutational analysis of the HGSNAT gene in Italian patients with mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo C syndrome). Mutation in brief #959. Online. *Hum Mutat* **28**, 523 (2007).
131. Ruijter, G. J., et al. Clinical and genetic spectrum of Sanfilippo type C (MPS IIIC) disease in The Netherlands. *Mol Genet Metab* **93**, 104-11 (2008).
132. Berkeley Drosophila Genome Project. [http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html).
133. Sahashi, K., et al. In vitro and in silico analysis reveals an efficient algorithm to predict the splicing consequences of mutations at the 5' splice sites. *Nucleic Acids Res* **35**, 5995-6003 (2007).
134. Bame, K. J. and Rome, L. H. Acetyl coenzyme A: alpha-glucosaminide N-acetyltransferase. Evidence for a transmembrane acetylation mechanism. *J Biol Chem* **260**, 11293-9 (1985).
135. Bame, K. J. and Rome, L. H. Genetic evidence for transmembrane acetylation by lysosomes. *Science* **233**, 1087-9 (1986).
136. Bame, K. J. and Rome, L. H. Acetyl-coenzyme A:alpha-glucosaminide N-acetyltransferase. Evidence for an active site histidine residue. *J Biol Chem* **261**, 10127-32 (1986).
137. Meikle, P. J., Whittle, A. M. and Hopwood, J. J. Human acetyl-coenzyme A:alpha-glucosaminide N-acetyltransferase. Kinetic characterization and mechanistic interpretation. *Biochem J* **308** ( Pt 1), 327-33 (1995).
138. Fan, X., et al. Identification of the gene encoding the enzyme deficient in mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo disease type C). *Am J Hum Genet* **79**, 738-44 (2006).
139. Davuluri, R. V. Application of FirstEF to find promoters and first exons in the human genome. *Curr Protoc Bioinformatics* **Chapter 4**, Unit4 7 (2003).
140. Frith, M. C., Hansen, U. and Weng, Z. Detection of cis-element clusters in higher eukaryotic DNA. *Bioinformatics* **17**, 878-89 (2001).
141. Prestridge, D. S. Predicting Pol II promoter sequences using transcription factor binding sites. *J Mol Biol* **249**, 923-32 (1995).

## **11 Kopie publikovaných prací**



## Biochemical and molecular analyses in three patients with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria

E. POSPÍŠILOVÁ<sup>1\*</sup>, L. MRÁZOVÁ<sup>1</sup>, J. HRDÁ<sup>1</sup>, O. MARTINCOVÁ<sup>1</sup> and J. ZEMAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Inherited Metabolic Diseases, General Faculty Hospital and 1st Faculty of Medicine;* <sup>2</sup>*Centre for Integrated Genomics, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic*

*\*Correspondence: Institute of Inherited Metabolic Diseases, General Faculty Hospital, Ke Karlovu 2, CZ 128 08 Prague 2, Czech Republic, E-mail: eposp@lf1.cuni.cz*

*MS received 14.06.02 Accepted 15.04.03*

**Summary:** Two methods, spectrophotometry and HPLC, were compared in the analyses of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase (HL) activity in three unrelated Czech patients with 3-hydroxy-3-methylglutaric (HMG) aciduria and their family members. The HL activities in cultured fibroblasts and/or isolated lymphocytes of probands were below the detection limits of the methods used. Both methods were also suitable for recognition of all heterozygotes in affected families. We searched for pathogenic mutations in the HL gene. Molecular analyses revealed that two patients are homozygous for known mutation H233R and R41Q, respectively, whereas the third patient is a compound heterozygote for the mutation H233R and a novel mutation Pro9fs(–1). This study expands the knowledge of the genotypic variability of the HMG aciduria.

3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase (HL; EC 4.1.3.4) deficiency leading to 3-hydroxy-3-methylglutaric (HMG) aciduria (McKusick 246450) is an autosomal recessive disorder presenting in neonates or infants and characterized by severe hypoketotic hypoglycaemia and metabolic acidosis, hyperammonaemia, vomiting and hypotonia (Wysocki and Hähnel 1986). HL is a key enzyme of leucine catabolism in mitochondria of most tissues. In liver, the HL has an additional function, the synthesis of the ketone bodies. Avoidance of fasting, carnitine supplementation, and low-protein and low-fat diet improve the prognosis in the affected children.

HMG aciduria can be diagnosed on the basis of the characteristic organic acid pattern, with marked elevated 3-hydroxy-3-methylglutaric, 3-methylglutaconic, 3-hydroxyisovaleric and 3-methylglutaric acids. The diagnosis can be confirmed by enzyme assay in leukocytes, cultured skin fibroblasts or liver (Wysocki and

Hähnel 1986). The heterozygotes can be identified by finding intermediate enzyme activities in leukocytes, lymphocytes or fibroblasts (Barash et al 1990; Gibson et al 1982). The gene for HL is on chromosome 1p36.1 and consists of nine exons (Wang et al 1996), which are transcribed into a messenger RNA of 1.7 kb (Mitchell et al 1993).

The incidence of HL deficiency is quite low except in Saudi Arabia, where HMG aciduria is the most common organic acidemia (Ozand et al 1992). So far about 42 cases have been reported (Funghini et al 2001; Muroi et al 2000). The molecular defects have been investigated, revealing considerable genetic heterogeneity. Twenty-one distinct mutations have been identified in the HL gene to date. Previous mutational analyses have shown the presence of the common HL mutations R41Q and F305fs(-2) among Saudi Arabians (Mitchell et al 1998). Another mutation, Glu37X, has repeatedly been found in Southern European and Mediterranean populations (Casale et al 1998; Pie et al 1997). A relatively common mutation, E279K, was found among the Japanese (Muroi et al 2000) besides other mutations unique to each family (Buesa et al 1996; Casals et al 1997; Funghini et al 2001; Mitchell et al 1993, 1995; Wang et al 1996).

We present the results of the spectrophotometric and HPLC measurements of HL activity and molecular analyses of the HL gene in three unrelated Czech families with HMG aciduria.

## CASE REPORTS

*Patient 1:* The 6 year-old boy was born at term from the first uncomplicated pregnancy with birth weight 3630 g and length 53 cm. Early postnatal adaptation was uneventful, but hypotonia developed on the third day of life followed by irritability, opisthotonus, generalized seizures and metabolic acidosis. His clinical symptoms improved during three days of ventilatory support and glucose infusion. GC-MS analysis of urinary organic acids revealed massive excretion of 3-hydroxy-3-methylglutaric acid (6971 mmol/mol creatinine) and 3-methylglutaconic acid (4238 mmol/mol creatinine), elevated 3-hydroxyisovaleric acid (364 mmol/mol creatinine), mild lactic aciduria and moderate dicarboxylic aciduria. From the second week of life, the child has been on a low-protein diet supplemented with carnitine and leucine-free amino acid mixture. No metabolic decompensation has developed since the neonatal period. The anthropometric parameters and psychomotor development correspond to his age, but antiepileptic therapy was started at the age of 3 years because of two attacks of generalized seizures.

*Patient 2:* The 4-year-old girl was born at term from the second pregnancy with birth weight 2700 g and length 47 cm. The early postnatal adaptation was uneventful and psychomotor development in the first year of life was normal. At the age of 18 months during the third day of acute respiratory infection she started to vomit; several hours later rapid deterioration of consciousness and seizures developed. Metabolic acidosis and hypoglycaemia of 1.5 mmol/L (normal 3.3–5.8) were revealed at admission to the intensive-care unit. Her clinical symptoms improved during

parenteral fluid therapy with glucose. GC-MS analysis of urinary organic acids showed highly elevated excretion of 3-hydroxy-3-methylglutaric (3534 mmol/mol creatinine), 3-methylglutaconic (5198 mmol/mol creatinine), 3-hydroxyisovaleric (4944 mmol/mol creatinine) and 3-methylglutaric (191 mmol/mol creatinine) acids. 3-Methylcrotonylglycine (35 mmol/mol creatinine) and marked glutaric aciduria (1280 mmol/mol creatinine) were present. A low-protein diet supplemented with carnitine and an amino acid mixture without leucine was introduced. The girl is in a good clinical condition, her psychomotor development corresponds to her age, but she had two periods of lethargy during febrile infections.

*Patient 3:* Clinical data of this patient have been reported previously (Marklová et al 1987). Briefly, the boy was admitted to hospital at the age of 18 months because of sudden unconsciousness with hypoglycaemia of 0.9 mmol/L (normal 3.3–5.8). His condition improved rapidly after correction of the blood glucose level. At the age of 28 months, two days after a mild respiratory infection, persistent vomiting and diarrhoea appeared followed by a Reye-like episode with hepatomegaly, hypoglycaemia (1.1 mmol/L), metabolic acidosis and hyperammonaemia. GC-MS analysis revealed elevation of 3-hydroxyisovaleric, 3-methylglutaric, 3-methylglutaconic and 3-hydroxy-3-methylglutaric acids. Now, at the age of 18 years, the patient keeps to the low-protein diet and feels well.

## MATERIALS AND METHODS

*Gas chromatography–mass spectrometry:* The urinary organic acids were determined by standard GC-MS method (Sweetman et al 1991) using the gas chromatography–mass spectrometer GCQ MAT (Finnigan).

*Cell culture:* Human skin fibroblasts were cultured in Eagle minimal essential medium supplemented with 10% fetal bovine serum and gentamycin.

*Lymphocyte isolation:* The lymphocytes were isolated from whole venous blood collected into EDTA by gradient centrifugation (Boyum 1968).

*Enzymatic assays:* HL activity determination was performed by two distinct techniques: a spectrophotometric method according to Wanders (1988) and an HPLC method according to Kikuchi (1990). The cellular homogenates were prepared using ultrasound probe Sonopuls HD 2070 (Bandelin Electronic). Protein concentration was determined by the method using bicinchoninic acid (Smith et al 1985). The activity of citrate synthase was measured as control mitochondrial enzyme (Lowenstein 1969). The spectrophotometric measurements were performed with the centrifugal analyser Cobas Fara (Roche). A Waters Model 990 HPLC system equipped with a Supelcosil LC-18 column (Supelco) was used for HPLC analysis. All chemicals were obtained from Sigma and Merck.

*DNA isolation:* Genomic DNA was isolated from cultured skin fibroblasts and/or venous blood using a standard protocol with QIAamp DNA Blood Mini Kit and QIAamp Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA).

**RNA isolation:** Total RNA was prepared from cultured fibroblasts and/or white blood cells using the guanidinium thiocyanate method (Chomzynski and Sacchi 1987).

**Reverse transcription PCR:** The total RNA was reverse-transcribed using SuperScript II reverse transcriptase and oligo-dT<sub>18</sub> primer (Gibco BRL). Full-length HL cDNA (cHL) was amplified using primers cHL-T7 and cHL-RP containing universal overhangs for T7 and RP (shown bold) sequencing primers (5'-AATAC-GACTCACTATAGGATGGCAGCAATGAGGAAG-3', 5'-GAAACAGCTATG-ACCATGTCAGCCCTCAAAGCCTCT-3').

**cDNA sequencing:** The PCR products were purified using 1% TAE agarose gel and QIA gene purification kit. Deletion and frameshift were verified by sequencing of cloned PCR products (pCR 2.1 vector, TOPO TA cloning kit (Invitrogen)). Thermostable polymerase and Cy-5-labelled universal primers M13F or T7 and RP and one Cy-5-labelled specific primer (5'-GGAGAGTTTTTCAGAGGTTTG-3') were used. Sequencing was performed using an automated fluorescent sequencer (ALF Express, Pharmacia).

**Amplification of genomic fragments by PCR:** Exons 2 and 7 of the HL gene were amplified in 20 µl reactions containing 1 µl of template (genomic DNA), 0.2 mmol/L dNTPs, 10 pmol of each primer, 2.5 U KlenTaq polymerase (AB peptides), 50 mmol/L Tris-HCl pH 9.1, 16 mmol/L ammonium sulphate, 150 µg/ml bovine serum albumin (BSA), 3.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 5% dimethyl sulphoxide (exon 2). The sequences of the primers were: ex2, 5'-AATACGACTCACTATAGAGTTCTGTTTCGGGACTG-3'; 5'-GAAACAGCTATGACCATGTCTCTACTCTCCCCTAA-3'; ex7, 5'-ATGATGTGACAGCCGTAA-3'; 5'-CACACTGAAAACCCTGTA-3'.

**ARMS analysis:** The missense mutation R41Q was verified by ARMS analysis. PCR primers were designed to discriminate between the mutant and the wild-type alleles (R41Q+ recognizing mutation 5'-ACCTTTTCATTTTGTAGTCCATTT-3' and R41Q- recognizing wild-type 5'-ACCTTTTCATTTTGTAGTCCATTT-3'. Upper primer ex2: 5'-AATACGACTCACTATAGAGTTCTGTTTCGGGACTG-3'), was used.

**PCR-RFLP analysis:** Exon 7 of the HL gene and cHL were amplified as described above. The amplified products were digested with *MspA1-I* (BioLabs) enzyme recognizing mutated sites c.698A>G and 27delG. Digested fragments were loaded on 7% polyacrylamide gel and visualized using ethidium bromide.

## RESULTS

The results of two distinct assays for 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase in cultured fibroblasts and/or isolated lymphocytes derived from three patients with HMG aciduria and the members of affected families are shown in Table 1. The HL activities in the cells of the patients were less than 1% of healthy controls. The HL activities in the heterozygotes' lymphocytes ranged from 37% to 69% of simultaneous healthy controls, determined by the spectrophotometric

**Table 1** Activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase in cultured fibroblasts and isolated lymphocytes in three Czech families with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria: comparison of two enzyme assays

		3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase						
Family	Subject	Tissue	Spectrophotometric assay		HPLC assay		Mutations in HL cDNA (exon)	
			Activity <sup>a</sup>	% of control	Activity <sup>b</sup>	% of control		Citrate synthase <sup>c</sup>
1	Patient	Fibroblasts	Undetectable	<1.0	Undetectable	<1.0	53.5	698A>G/698A>G (7)
		Lymphocytes	Undetectable	<1.0	Undetectable	<1.0	78.2	
	Mother	Lymphocytes	2.04	37	2.10	36	65.4	698A>G/-
	Father	Lymphocytes	2.62	47	2.34	40	102.5	698A>G/-
2	Patient	Fibroblasts	Undetectable	<1.0	Undetectable	<1.0	64.2	698A>G/27delG (7,1)
		Lymphocytes	Undetectable	<1.0	Undetectable	<1.0	114.2	
	Mother	Lymphocytes	3.87	69	2.88	48	111.8	698A>G/-
	Father	Lymphocytes	3.26	58	2.49	43	104.0	27delG/-
	Brother			ND	-	-	27delG/-	
3	Patient	Fibroblasts <sup>d</sup>	ND	-	ND	-	-	122G>A/122G>A (2)
		Lymphocytes	Undetectable	<1.0	Undetectable	<1.0	67.8	
	Sister	Lymphocytes	4.55	82	5.64	99	45.9	-/-
	Control	Lymphocytes	5.56 ± 0.32 (8)	-	5.43 ± 1.06 (9)	-	102.8 ± 36.6 (8)	
		Fibroblasts	4.61 ± 0.63 (4)	-	7.3; 9.7	-	88.8 ± 23.3 (23)	

The results are the means of duplicate determinations

ND, not done

<sup>a</sup>Enzyme activities are expressed as nmol of acetoacetate produced per minute per mg of protein

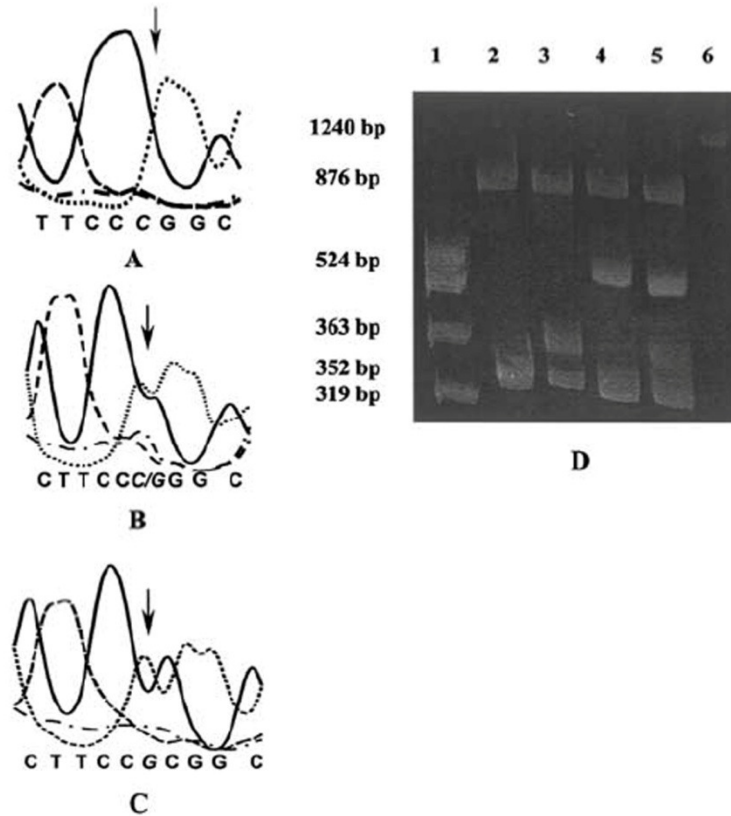
<sup>b</sup>Enzyme activities are expressed as nmol of acetyl-CoA produced per minute per mg of protein

<sup>c</sup>Control mitochondrial enzyme; units nmol per minute per mg of protein

<sup>d</sup>Fibroblasts not available

method, and from 36% to 48% of simultaneous healthy controls, determined by HPLC technique.

Molecular analyses of the gene for HL revealed that two patients are homozygous for the known mutations H233R and R41Q, respectively, whereas the third patient is a compound heterozygote for the known mutation H233R and a novel one-point deletion in exon 1 of the HL gene. The results of mutation studies in probands with HMG aciduria and their family members are summarized in Table 1. The new



**Figure 1** Mutation analysis in patient 2. (A) cDNA sequence of cloned RT-PCR product; mutated allele with one base deletion. (B) cDNA sequence of RT-PCR product, where the both alleles are seen. (C) cDNA sequence of cloned RT-PCR product, wild-type allele. The arrow denotes the G deletion on position 27 causing a frameshift that leads to the premature stop codon after 32 amino acids. (D) PCR-RFLP analysis of cDNA for detection of c.698A>G and 27delG mutations in the HL gene; both mutations were recognized by *MspA1-I* digestion. Lane 1 contains pUC 19 molecular markers; lanes 2–5 represent samples from a normal control, the patient's father and mother, and patient 2, respectively; lane 6 represents an undigested PCR product. The PCR product was 1240 bp long and was cut into three bands of 876 bp, 319 bp and 45 bp (not shown) in a control sample. In patient 2, who is a compound heterozygote for c.698A>G and 27delG mutations, the PCR product was cut into six bands of 524 bp, 352 bp, 319 bp and 45 (not shown) corresponding to the allele with c.698A>G mutation and 876 bp and 363 bp corresponding to the second allele with 27delG mutation. The patient's father and mother are heterozygous for 27delG and c.698A>G, respectively. The sample of her brother who is heterozygous for 27delG is not shown in this figure

mutation 27delG leads to a frameshift Pro9fs(-1) and premature stop codon after 32 amino acids. The analysis of this mutation is shown in Figure 1, giving cDNA sequences of the patient's cloned PCR product (Figure 1A) and its PCR product, where both alleles are seen (Figure 1B). The subsequent PCR-RFLP analysis of cDNA confirmed the compound heterozygosity of the patient (Figure 1D). The *MspA1-I* enzyme used for a digestion recognized the mutated sites c.698A>G and 27delG. The use of this enzyme allowed the detection of both mutations in one PCR product.

## DISCUSSION

The previously reported values of HL activity determined by distinct laboratory methods differ widely. We chose two nonradiochemical methods for enzyme assay, spectrophotometry and HPLC, because of their relative simplicity and safety. Using these methods, it was possible to differentiate homozygotes and heterozygotes from healthy subjects. There were no significant discrepancies between results of spectrophotometric and HPLC assays in probands or heterozygotes or normal controls. Both lymphocytes and fibroblasts are suitable for the confirmation of diagnosis. Lymphocytes seem to be an appropriate material for the detection of heterozygotes, and they could substitute for fibroblasts because they are easier to obtain. Indeed, mutation analysis remains the most reliable way of heterozygote detection, although our results did not show the overlap of heterozygous and normal enzyme activities. The results of the enzyme assays correlate with those of mutation analyses and give evidence of an autosomal recessive mode of inheritance.

In the six HL alleles derived from the three Czech patients with HMG aciduria, three distinct mutations in the HL gene were identified: two known missense mutations and a novel one-base deletion. Both known mutations detected in two patients at the homozygous level are causal for HL deficiency. Patient 1 is homozygote and patient 2 is compound heterozygote for a transition c.698A>G, which replaces histidine in position 233 by arginine. Histidine 233 lies in the catalytic site of the enzyme and the absence of its nucleophilic activity in the mutated enzyme is assumed to be responsible for the decrease in the HL activity (Roberts et al 1996). A recently reported French patient was found to be a compound heterozygote for H233R and L263P mutations (Zapater et al 1998). This patient with relatively high residual enzyme activity (12%) presented in the third year of life. Our patient homozygous for mutation H233R had an absolute lack of enzyme activity and the disease appeared at 3 days of life with a very severe attack. The finding of the identical mutation H233R in patients 1 and 2 and the origin of families from the same geographical region could signify possible consanguinity. It was not confirmed by the construction of a pedigree in affected families. The transition c.122G>A identified in patient 3 at the homozygous level replaces arginine in position 41 by glutamine. This mutation is the most frequent in Saudi Arabians (Mitchell et al 1998). The previous expression study showed that mutation R41Q caused a marked decrease in HL activity. Mutation R41Q has been predicted to generate HL peptides that lack an essential amino acid residue and is considered to be causal

for HL deficiency. In two Saudi homozygotes for mutation R41Q the disease caused a first attack within 3 days of life, and in two other infants the disease appeared later (Ozand et al 1991, Mitchell et al 1998). In our patient homozygous for R41Q the first attack of disease appeared at 18 month of age. Although R41Q is the most frequent mutation in Saudis, it occurs in other populations as well. Six Saudi patients and one Turkish patient homozygous for R41Q, together with an Italian patient heterozygous for this mutation, have been identified (Mitchell et al 1998), suggesting that this mutation may have arisen independently more than once. The detection of this mutation in a Czech patient supports this suggestion. Absolute lack of HL activity in patients 1 and 3 confirmed the seriousness of the mutations found.

We detected a novel one-base deletion, 27delG, in exon 1 of the HL gene in patient 2. This mutation leads to a frameshift Pro9fs(-1) and premature stop codon after 32 amino acids; the mRNA is not degraded. Since the stop codon occurs before the active site of the enzyme, we assume that this mutation is disease-causing. Expression analysis has not yet been carried out. Patient 2 is a compound heterozygote for H233R and Pro9fs(-1) with an undetectable HL activity. The first disease attack appeared relatively late at 18 months of age. The typical symptoms of nausea, vomiting, spasm, unconsciousness, metabolic acidosis and hypoglycaemia were present.

Our observations extend the knowledge of the genotype of HMG aciduria. The complete biochemical and molecular diagnostics allow an earlier start of dietary treatment of patients with HMG aciduria and genetic counselling in the affected families.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Eliška Marklová (Hradec Králové, Czech Republic) for her contribution in providing clinical information and blood samples from her patient for this study. This work was supported by grants IGA MZ CR NE 6003-3/2000 and VZ111100003.

#### REFERENCES

- Barash V, Mandel H, Sella S, Geiger R (1990) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency: biochemical studies and family investigation of four generations. *J Inherit Metab Dis* **13**: 156–164.
- Boyum A (1968) Separation of lymphocytes from blood and bone marrow. *Scand J Clin Lab Invest* **21**: 77–89.
- Buesa C, Pie J, Barcelo A, Casals N, et al (1996) Aberrantly spliced mRNA of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase (HL) deficiency with a donor splice-site point mutation produce hereditary HL deficiency. *J Lipid Res* **37**: 2420–2432.
- Casale CH, Casals N, Pie J, et al (1998) A nonsense mutation in the exon 2 of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase (HL) gene producing three mature mRNAs is the main cause of 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria in European Mediterranean patients. *Arch Biochem Biophys* **349**: 129–137.
- Casals N, Pie J, Casale CH, Zapater N, et al (1997) A two-base deletion in exon 6 of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase (HL) gene producing the skipping of exons 5 and 6 determines 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. *J Lipid Res* **38**: 2303–2313.



- Chomzynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156–159.
- Funghini S, Pasquini E, Cappelini M, et al (2001) 3-Hydroxy-3-methylglutaric aciduria in an Italian patient is caused by a new nonsense mutation in the HMGCL gene. *Mol Genet Metab* **73**: 268–275.
- Gibson KM, Sweetman L, Nyhan WL, Page TM, Greene C, Cann HW (1982) 3-Hydroxy-3-methylglutaric aciduria: a new assay of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase using high performance liquid chromatography. *Clin Chim Acta* **126**: 171–181.
- Kikuchi M, Narisawa K, Tada K, Sweetman L (1990) Enzymatic diagnosis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency with high-performance liquid chromatography. *Clin Chim Acta* **189**: 297–302.
- Lowenstein JM (1969) *Methods in Enzymol* **13**: 3–26.
- Marklová E, Verner P, Pehal F, Brátová M, Polák J (1987) A new case of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency. *J Inherit Metab Dis* **10**: 399.
- Mitchell GA, Robert MF, Hruz PW, et al (1993) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase (HL). Cloning of human and chicken liver HL cDNAs and characterization of a mutation causing human HL deficiency. *J Biol Chem* **268**: 4376–4381.
- Mitchell GA, Jacobs C, Gibson KM, et al (1995) Molecular prenatal diagnosis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency. *Prenat Diagn* **15**: 725–729.
- Mitchell GA, Ozand PT, Robert MF, et al (1998) HMG CoA lyase deficiency: identification of five causal point mutations in codons 41 and 42, including a frequent Saudi Arabian mutation, R41Q. *Am J Hum Genet* **62**: 295–300.
- Muroi J, Yorifuji T, Uematsu A, et al (2000) Molecular and clinical analysis of Japanese patients with 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase (HL) deficiency. *Hum Genet* **107**: 320–326.
- Ozand PT, al Ageel A, Gascon G, Brismar J, Thomas E, Gleispach H (1991) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) lyase deficiency in Saudi Arabia. *J Inherit Metab Dis* **14**: 174–188.
- Ozand PT, Devol EB, Gascon GG (1992) Neurometabolic diseases at a national referral center: five years experience at the King Faisal Specialist Hospital and Research Centre. *J Child Neurol* **7**: 4–10.
- Pie J, Casals N, Casale CH, et al (1997) A nonsense mutation in the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase gene produces exon skipping in two patients of different origin with 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency. *Biochem J* **323**: 329–335.
- Roberts JR, Mitchell GA, Miziorko HM (1996) Modeling of a mutation responsible for human 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency implicates histidine 233 as an active site residue. *J Biol Chem* **271**: 24604–24609.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**: 76–85.
- Sweetman L (1991) Organic acid analysis. In Hommes FA, ed. *Techniques in Diagnostic Biochemical Genetics. A Laboratory Manual*. New York: Wiley-Liss, 1943–2176.
- Wanders R, Schutgens R, Zoeters P (1988) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase in human skin fibroblasts: study of its properties and deficient activity in 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria patients using a simple spectrophotometric method. *Clin Chim Acta* **171**: 95–102.
- Wang SP, Robert MF, Gibson KM, Wanders RJ, Mitchell GA (1996) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase (HL): mouse and human HL gene (HMGCL) cloning and detection of large gene deletion in two unrelated HL-deficient patients. *Genomics* **33**: 99–104.
- Wysocki SJ, Hähnel R (1986) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency: a review. *J Inherit Metab Dis* **9**: 225–233.
- Zapater N, Pie J, Lloberas J, et al (1998) Two missense point mutations in different alleles in the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase gene produce 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria in a French patient. *Arch Biochem Biophys* **358**: 197–203.

## CASE REPORT

### Two novel mutations in mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase deficiency

L. Mrázová<sup>1\*</sup>, T. Fukao<sup>2</sup>, K. Hálková<sup>3</sup>, E. Gregová<sup>4</sup>, V. Kohút<sup>3</sup>, D. Přibyl<sup>1</sup>,  
P. Chrastina<sup>1</sup>, N. Kondo<sup>2</sup> and E. Pospíšilová<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Inherited Metabolic Diseases, General Faculty Hospital & Charles University 1st Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic; <sup>2</sup>Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Gifu University, Gifu, Japan; <sup>3</sup>Pediatric Clinic; <sup>4</sup>Department of Clinical Chemistry, F. D. Roosevelt Hospital, Banská Bystrica, Slovak Republic

\*Correspondence: UDMP, Ke Karlovu 2, 128 02 Praha 2, Czech Republic.

E-mail: LMRAZ@LF1.CUNICZ

**Summary:** We report a new patient with acetoacetyl-CoA thiolase deficiency in whom we found two new missense mutations.

Mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase ( $\beta$ -ketothiolase, T2, EC 2.3.1.9) is an enzyme active in isoleucine catabolism and ketone body metabolism. T2 deficiency (McKusick 203750) is characterized by intermittent episodes of severe ketoacidosis accompanied by vomiting, diarrhoea, and coma, which may lead to death. The gene for T2, *ACAT1*, is localized on chromosome 11q22.3-q23.1 and contains 12 exons. The incidence of T2 deficiency is low; about 40 cases and 37 different mutations have been reported (Fukao et al 2001, 2002). We report a new patient with T2 deficiency in which we found two new missense mutations.

A 21-month-old boy with normal perinatal period and further development was admitted to a hospital unconscious after a short period of lethargy and vomiting following all-day fasting. Routine biochemical testing revealed severe metabolic acidosis (pH 6.79,  $\text{HCO}_3^-$  5.6, BE  $-25.8$ ), hypoglycaemia (below the limit of detection), ketonuria (ketones ++++), hyperuricaemia ( $1939 \mu\text{mol/L}$ ), increased serum urea ( $17.59 \text{ mmol/L}$ ) and abnormal liver function tests (AST  $158 \text{ U/L}$ , normal  $<38$ ; ALT  $112 \text{ U/L}$ , normal  $<36$ ). GC-MS analysis of urinary organic acids revealed markedly elevated 2-methyl-3-hydroxybutyrate ( $>4000 \text{ mmol/mol creatinine}$ ), 2-methylacetoacetate ( $>1000 \text{ mmol/mol creatinine}$ ), tiglylglycine ( $\sim 300 \text{ mmol/mol creatinine}$ ), 3-hydroxybutyrate ( $>15000 \text{ mmol/mol creatinine}$ ) and acetoacetate ( $>10000 \text{ mmol/mol creatinine}$ ). Tandem mass spectrometric analysis of acylcarnitines in a dry blood spot revealed increased  $\text{C}_5\text{OH}$  (2-methyl-3-hydroxybutyryl) and  $\text{C}_{5:1}$  (tiglyl) carnitines. The diagnosis was confirmed by enzyme assay (Middleton 1973) in cultured skin fibroblasts. Thiolase activity with and without  $\text{K}^+$  was  $4.3 \text{ nmol/min per mg protein}$  (control  $11.9 \pm 4.1$ ;  $n=10$ ) and  $4.3 \text{ nmol/min per mg protein}$  (controls  $5.3 \pm 2.0$ ;  $n=10$ ), respectively. No activation of thiolase activity by  $\text{K}^+$  demonstrated the lack of T2 activity ( $+\text{K}^+/-\text{K}^+$  activity ratio in controls  $2.3 \pm 0.6$ ;  $n=10$ ).

Sequence analysis of cDNA from the patient's cultured fibroblasts revealed compound heterozygosity for two novel mutations in *ACAT1*: c.578T>C (M193T) in exon 6 and c1040T>C (I347T) in exon 11. The presence of mutations was confirmed by PCR-ARMS analysis of gDNA. The patient's mother is heterozygous for mutation c.578T>C while his father is a carrier for mutation c.1040T>C. Transient expression analysis of wild-type, mock, M193T and I314T cDNAs was performed in SV40-transformed T2-deficient fibroblasts as previously described (Fukao et al 2002). The wild-type T2 cDNA gave a significant acetoacetyl-CoA thiolase activity (+K<sup>+</sup>/-K<sup>+</sup> activity ratio 9.0). On the other hand, M193T and I347T mutant cDNAs gave a very low acetoacetyl-CoA thiolase activity (ratios of 1.8 and 1.3, respectively). These data confirmed that M193T and I314T mutations are causative mutations.

The patient is 4.5 years old now and his development is normal. He maintains a dietary regime with mildly restricted protein and lipid intake and frequent feeding. Our observations extend the knowledge of the genotype of T2 deficiency.

Supported by grant IGA MZ CR NE 6003-3/2000.

#### REFERENCES

- Fukao T, Scriver CR, Kondo N (2001) The clinical phenotype and outcome of mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase deficiency (beta-ketothiolase or T2 deficiency) in 26 enzymatically proved and mutation-defined patients. *Mol Genet Metab* **72**: 109–114.
- Fukao T, Nakamura H, Nakamura K, et al (2002) Characterization of six mutations in five Spanish patients with mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase deficiency: effects of amino acid substitutions on tertiary structure. *Mol Genet Metab* **75**: 235–243.
- Middleton B (1973) The oxoacyl-coenzymeA thiolases of animal tissues. *Biochem J* **132**: 717–730.

# Methylmalonová acidémie: klinická, biochemická a molekulárně biologická studie

Pospíšilová E.<sup>1</sup>, Mrázová L.<sup>1</sup>, Klement P.<sup>2</sup>, Martincová O.<sup>1</sup>, Hrubá E.<sup>1</sup>,  
Chrastina P.<sup>1</sup>, Příbyl D.<sup>1</sup>, Vobruba V.<sup>2</sup>, Hálová K.<sup>3</sup>, Zeman J.<sup>1,2</sup>

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK, Praha<sup>1</sup>  
přednosta prof. MUDr. M. Elleder, DrSc.  
Klinika dětského a dorostového lékařství VFN a 1. LF UK, Praha<sup>2</sup>  
přednosta doc. MUDr. J. Hoza, CSc.  
Dětská fakultní nemocnice s poliklinikou, Banská Bystrica<sup>3</sup>  
přednosta prof. MUDr. S. Dluholucký, CSc.

## Souhrn

Methylmalonová acidémie (MMA) je dědičně podmíněná porucha metabolismu, která se projevuje v novorozeneckém nebo kojeneckém věku akutní poruchou funkce jater, ledvin a CNS. Cílem práce bylo popsat klinický průběh, metabolické projevy a molekulární podstatu onemocnění u 10 pacientů s MMA, kteří byli diagnostikováni v období 1988–2005 v rámci selektivního screeningu dědičných poruch metabolismu. U 7 dětí se první příznaky onemocnění objevily v novorozeneckém věku rychle progredující poruchou vědomí doprovázenou metabolickou acidózou. U 3 dětí s neprospíváním a opakovanými atakami zvracení se onemocnění projevilo až v kojeneckém věku. Laboratorní vyšetření ukázala u všech pacientů mírnou až výraznou hyperamonémií, ketoacidózu, výrazně zvýšenou koncentraci kyseliny methylmalonové v krvi a zvýšené vylučování methylmalonátu, 3-hydroxypropionátu, methylcitrátu a propionylglycinu v moči. Enzymatické analýzy u pěti dětí s MMA prokázaly poruchu aktivity methylmalonyl-CoA-mutázy (*mut* forma MMA) a molekulární analýzy prokázaly přítomnost mutací v genech *MUT* kódující methylmalonyl-CoA-mutázu, *MMAA* kódující protein s dosud nejasnou funkcí a *MMAB* kódující enzym kob(I)adenosyltransferázu. U 4 pacientů s MMA s normální aktivitou methylmalonyl-CoA-mutázy byla prokázána porucha metabolismu adenosylkobalaminu (*cbl*) – u dvou dětí porucha na úrovni *cblA* a u dvou dětí porucha na úrovni *cblB*. Prognóza dětí s MMA není příznivá. U pacientů s *mut* formou MMA byl průběh onemocnění nejzávažnější, čtyři z pěti dětí zemřely. Naopak nejmírnější průběh onemocnění byl pozorován u dětí s MMA z poruchy na úrovni *cblA*, které jako jediné v tomto souboru jsou vitamín B<sub>12</sub> responzivní, zatímco ostatní pacienti s MMA byli/jsou na podávání vitamínu B<sub>12</sub> rezistentní. Na základě výsledků této studie lze postiženým rodinám nabídnout účinné genetické poradenství a prenatální diagnostiku, která dosud nebyla v ČR dostupná.

**Klíčová slova:** methylmalonová acidémie, methylmalonyl-CoA-mutáza, kobalaminový deficit, kyselina methylmalonová, plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí, tandemová hmotnostní spektrometrie

## Summary

### Methylmalonic Acidemia: Clinical, Biochemical and Molecular Biological Study

Methylmalonic acidemia (MMA) is an inborn error of metabolism presenting in neonates or infants as acute failure of liver, renal and CNS functions. The aim of study was a description of clinical course, metabolic findings and molecular cause of this disease at 10 patients with MMA who were diagnosed within selective screening of inherited metabolic diseases between 1988 and 2005. Seven patients presented in neonatal period with fast progressive coma accompanied by metabolic acidosis. Three patients presented in infancy with failure to thrive and repeated attacks of vomiting. Laboratory investigations revealed at all patients mild to marked hyperamonemia, ketoacidosis, markedly increased concentration of methylmalonic acid in blood and elevated excretion of methylmalonic acid, 3-hydroxypropionic acid, methylcitric acid and propionylglycine in urine. Performed enzyme assays demonstrated deficiency of activity of methylmalonyl-CoA mutase in 5 children (*mut* form) and molecular biological analyses detected mutations present in *MUT* gene coding methylmalonyl-CoA mutase, *MMAA* gene coding protein with still unclear function and *MMAB* gene coding enzyme cob(I)adenosyltransferase. The error of metabolism of adenosylcobalamin (*cbl* form) was demonstrated in 4 patients with normal activity of

methylmalonyl-CoA mutase – 2 children were identified as *cblA* and 2 children as *cblB*. Prognosis of patients with MMA is not favourable. The most serious course of disease was present at patients with *mut* form, 4 of 5 died. The patients with *cblA* form had much milder clinical symptoms, only they were responsive to vitamin B<sub>12</sub>, while other patients with MMA were/are non-responsive to B<sub>12</sub> supplementation. On the basis of this study the efficient genetic counselling and prenatal diagnostics can be offered to the affected families, which were not available before.

**Key words:** methylmalonic acidemia, methylmalonyl-CoA mutase, cobalamin deficiency, methylmalonic acid, gas chromatography/mass spectrometry, tandem mass spectrometry

P.

## Úvod

Methylmalonová acidémie (MMA) je geneticky heterogenní porucha metabolismu kyseliny methylmalonové a kobalaminu (*cbl*, vitamin B<sub>12</sub>). Onemocnění se obvykle manifestuje v novorozeneckém nebo kojeneckém věku zvracením, letargií, progredující poruchou vědomí, edémem mozku, jaterním a ledvinným selháním. V akutním stadiu jsou přítomny ketoacidóza, hyperamonémie a laboratorní známky jaterního poškození a ledvinného selhání [1]. Onemocnění je spojeno s výraznou akumulací kyseliny methylmalonové v moči a krvi. Prognózu postižených dětí může zlepšit pouze včasná diagnostika, rychlá eliminace toxických metabolitů pomocí hemodiafiltrace nebo hemodialýzy a trvalá dietní terapie.

Izolovaná MMA byla nalezena u pacientů s mutacemi v *MUT* genu, které způsobují částečný (*mut<sup>-</sup>*) nebo úplný (*mut<sup>0</sup>*) deficit enzymu methylmalonyl-CoA-mutázy (EC 5.4.99.2), jenž katalyzuje izomeraci L-methylmalonyl-CoA na sukcinyl-CoA a podílí se na katabolismu několika esenciálních aminokyselin – isoleucinu, valinu, methioninu a threoninu, mastných kyselin s lichým nebo větveným počtem uhlíků a cholesterolu. Tyto formy onemocnění nebývají responzivní k podávání vitaminu B<sub>12</sub>. *MUT* gen skládající se ze 13 exonů je lokalizován na chromozomu 6p21 [2, 3].

Izolovaná MMA se dále vyskytuje u podskupiny pacientů s poruchou v syntéze koenzymu methylmalonyl-CoA-mutázy – adenosylkobalaminu (AdoCbl). Tito pacienti jsou klasifikováni do tří komplementačních skupin: *cblA*, *cblB* a *cblH*. V současnosti jsou známy dva geny *MMAA* a *MMAB* odpovídající skupině *cblA*, resp. *cblB*. Gen *MMAA* leží na chromozomu 4q31.21 [4, 5] a skládá se ze sedmi exonů, které kódují protein o 418 aminokyselinách. Přesná funkce tohoto proteinu není dosud známa. Gen *MMAB* leží na chromozomu 12q24 [5], obsahuje 9 exonů a kóduje protein kob(I)adenosyltransferázu. Více než 90 % pacientů s *cblA* formou MMA a přibližně 40 % pacientů s *cblB* formou jsou responzivní na podávání vitaminu B<sub>12</sub> [1].

Další příčinou MMA mohou být jiné poruchy metabolismu kobalaminu (*cblC*, *cblD* a *cblF*), které jsou však spojeny s hyperhomocysteinémií a homocystinurií.

V našem sdělení předkládáme popis klinických projevů a výsledky laboratorních vyšetření dětí, u kterých jsme diagnostikovali MMA.

## Soubor pacientů

V rámci selektivního screeningu dědičných metabolických poruch (DMP) jsme v letech 1988–2005 vyšetřili v laboratoři Ústavu dědičných metabolických poruch (ÚDMP) více než 25 000 dětí z neonatologických a pediatrických pracovišť ze všech regionů České a Slovenské republiky, u kterých ošetřující lékaři vyslovili podezření na DMP. U třinácti dětí byla na základě výrazně zvýšeného vylučování kyseliny methylmalonové v moči a její zvýšené koncentrace v krvi diagnostikována MMA. Dvě děti zemřely ještě před překladem na naše pracoviště. Devět dětí, které byly přeloženy na Kliniku dětského a dorostového lékařství VFN a 1. LF UK v Praze, přežilo první akutní ataku onemocnění. Jeden chlapec zemřel v 16 dnech života na enterogenní sepsi. Dívka, která přežila novorozeneckou ataku metabolického rozvratu s následným těžkým postižením CNS s mikrocefalií a praktickou zástavou psychomotorického vývoje, zemřela v devíti měsících věku v průběhu respiračního infektu. Dvě dívky zemřely během akutní dekompenzace onemocnění ve věku pěti, resp. sedmi let. Čtyři děti s MMA jsou trvale léčeny přísnou nízkobílkovinnou dietou, která je doplněna směsí esenciálních aminokyselin bez isoleucinu, methioninu, threoninu a valinu, L-karnitinem a MCT olejem (medium-chain triacylglyceroly), pacienti jsou suplementováni vitaminem B<sub>12</sub>. Do souboru pacientů prezentovaných v tomto sdělení jsou zahrnuty i dvě slovenské dívky, které byly laboratorně vyšetřeny na našem pracovišti, ale klinicky jsou sledovány ve SR. Tyto pacientky jsou rovněž na sníženém příjmu bílkoviny doplněném směsí esenciálních aminokyselin bez isoleucinu, methioninu, threoninu a valinu a jsou suplementovány vitaminem B<sub>12</sub>.

## Metodika

Aminokyseliny v krvi byly stanoveny metodou iontoměničové kapalinové chromatografie na automatických analyzátoch aminokyselin AAA339 Mikrotechna a AAA400 Ingos [6]. Laktát v krvi a moči byl stanoven enzymatickou spektrofotometrickou metodou při 340 nm [7] na automatických biochemických analyzátoch Hitachi 705 a 902. Organické kyseliny v moči byly stanoveny metodou plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí (GC/MS) s extrakcí ethylacetátem, stabilizací oxokyselin ve formě ethoximů a derivatizací pomocí BSTFA (bis-trimethylsilyl-trifluoroacetamid) [8]. Vyšetření byla prováděna na kapilárních kolonách s chemicky vázanou fází DB-5. Kyselina methylmalonová v plazmě a séru byla stanovena metodou GC/MS s použitím deuterovaného vnitřního standardu [9]. GC/MS analýzy byly provedeny na přístroji Finnigan GCQ MAT. Amoniak v plazmě byl stanoven spektrofotometrickou metodou s glutamátdehydrogenázou [10]. Karnitin v plazmě a séru byl stanoven radiochemicky se značeným  $^{14}\text{C}$ -acetyl-CoA a acetylkarnitinttransferázou [11]. Profil acylkarnitinů byl stanoven ze suché kapky krve metodou tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS) a jednotlivé acylkarnitiny byly kvantifikovány na směs vnitřních deuterovaných standardů [12]. Pro stanovení jsme použili tandemový hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupolem a ionizací elektrosprejem API 2000 (Applied Biosystems). Celkový homocystein v plazmě a séru jsme stanovili metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s fluorometrickou detekcí na přístroji Shimadzu [13].

Pro stanovení aktivity methylmalonyl-CoA-mutázy v lymfocytech a kultivovaných fibroblastech jsme modifikovali metodu HPLC s UV detekcí [14]. Analýzy byly provedeny pomocí systému Waters na koloně Supelco  $\text{C}_{18}$  (25 cm x 4 mm). Kontrolní mitochondriální enzym citrátsyntáza byl stanoven spektrofotometrickou metodou [15].

Pro určení molekulárně biologické charakteristiky onemocnění jsme použili běžně užívané metody molekulární biologie. Genomová DNA byla izolována z venózní krve nebo kultivovaných fibroblastů s použitím kitu QiaAmp® (Qiagen, Hilden, Německo). Totální RNA byla izolována z venózní krve nebo kultivovaných fibroblastů metodou Chomezynskiho a Sacchi [16]. Z totální RNA byla reverzní transkripční přípravena cDNA s použitím kitu Superscript II RT a oligo dT<sub>18</sub> primeru. cDNA a genomová DNA sloužily jako templat pro PCR k amplifikaci kódujících oblastí genů *MUT*, *MMAA* a *MMAB* a nepřekládaných oblastí 5'UTR a 3'UTR a k amplifikaci exonů výše

zmíněných genů včetně přiléhajících částí intronů. PCR produkty byly použity pro analýzu mutací pomocí přímého sekvenování na automatickém sekvenátoru ALF Express a dále k ověření nalezených mutací restriční analýzou.

Sekvence použitých primerů, detailní popis metod a přehled restričních enzymů jsou k dispozici na požádání.

## Výsledky

V tabulkách 1 a 2 jsou uvedeny vybrané klinické a laboratorní údaje 10 dětí s MMA (3 chlapci a 7 dívek), které byly diagnostikovány na našem pracovišti. U 6 dětí se první příznaky onemocnění objevily již v prvním týdnu života, u jednoho dítěte do 1 měsíce věku a u zbývajících 3 pacientů byl nástup onemocnění v několika měsících věku. Mezi první klinické příznaky nejčastěji patřilo zvracení, váhový úbytek a metabolická acidóza. V průběhu dlouhodobého sledování byla u 6 dětí zaznamenána psychomotorická retardace, u 8 hypotonie, v 7 případech anorexie a zvracení, u 4 nejstarších pacientů bylo nutné provést gastrostomii. Porucha růstu byla pozorována u 5 dětí. U 2 dětí byla zjištěna porucha zraku, u dalších 2 pacientů se projevila epilepsie. U 9 dětí byla přítomna anémie a u 8 leukopenie. U 4 nejstarších dětí byla prokázána renální tubulární acidóza.

Laboratorní data uvedená v tabulce 2 jsou převážně z období první ataky onemocnění. GC/MS analýza organických kyselin v moči pacientů prokázala profil organických kyselin charakteristický pro diagnózu MMA (obr. 1). Vysoká koncentrace kyseliny methylmalonové byla přítomna i v plazmě či séru vyšetřovaných dětí. Rovněž byly nalezeny odchylky v profilu aminokyselin v plazmě nebo séru. K významným laboratorním nálezům při první atace onemocnění patřila hyperamonémie, laktátová acidurie a ketonurie. U některých pacientů byla přítomna hyperlaktacidémie. U 6 pacientů bylo provedeno stanovení karnitinu v plazmě nebo séru, přičemž u všech těchto pacientů byla výrazně snížená koncentrace volného karnitinu se zvýšeným poměrem acylovaného karnitinu k volnému karnitinu. Koncentrace celkového homocysteinu v séru/plazmě byla v 8 případech normální, čímž byla vyloučena kombinovaná MMA s homocystinurií, u 2 dětí nebyl homocystein vyšetřen. Dále jsou v tabulce 2 uvedeny laboratorní údaje z období remise, kdy již byli pacienti na léčbě. Metodou MS/MS sledujeme koncentraci propionylkarnitinu v krvi (obr. 2) a koncentraci kyseliny methylmalonové v plazmě, která se zdá být vhodným markerem pro posouzení renálního poškození.

Tab. 1. Vybrané klinické údaje u souboru pacientů s MMA.

Pacient č.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.*	8.	9.	10.
pohlaví	♂	♀	♀	♀	♀	♂	♂	♀	♀	♀
nástup onemocnění / stanovení diagnózy	1/2 dny	3 týdny/1měsíc	3/7 dní	2/3 dny	2/4 dny	2/4 dny	2/4 dny	6/6,5 měs.	5/6 měs.	5/5 měs.
1. příznaky onemocnění	apatie, zvracení	zvracení, váhový úbytek	porucha vědomí	cyanóza, časný ikterus, váhový úbytek	cyanóza, časný ikterus, apatie, hypotonie	metabolická acidóza	metabolická acidóza	nechutenství, zvracení, váhový úbytek	hepatopatie, zvracení, neprospívání	zvracení, spavost, nechutenství, hyperphoe
současný věk	12,5 roku	7 let†	5 let†	6 let	9 měs.†	16 dní†	4 roky	4,5 roku	3 roky	1,5 roku
B <sub>12</sub> senzitivita	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ne	ano
počet hospitalizací / rok	2,7	6,7	5,6	2,3	16	1	3,5	1	3	2
psychomotorická retardace	++	++	+++	+	+++	nehodn.	+	-	-	-
ataxie	+++	++	+++	-	-	-	-	-	-	-
porucha zraku	+++	+/-	-	-	-	nehodn.	-	-	-	-
hypotonie	++	++	++	-	+++	+++	+	-	+	+
epilepsie	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
metabolický „stroke“ (ve věku)	+ (3 roky)	+ (5 let)	+ (1,5 roku)	-	-	-	-	-	+ (10 měs.)	-
porucha růstu	++	-	+	-	++	nehodn.	++	-	+	-
anorexie/zvracení	++	++	++	++	++	nehodn.	++	-	+	-
gastrostomie ve věku (let)	1,5	2,5	2	2	-	-	-	-	-	-
anémie	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
leukopenie	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
renální tubulární acidóza ve věku (roky)	8,5	4	4	1,5	-	-	-	-	?	-
MR CNS – hypodenzity bazálních ganglií	+	+	nevyš.	nevyš.	atrofie CNS	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.

Výsvohlivky: \* dvojitě dítěte č. 6, † věk v době úmrtí, nevyš. – nevyšetřováno, nehodn. – nehodnoceno

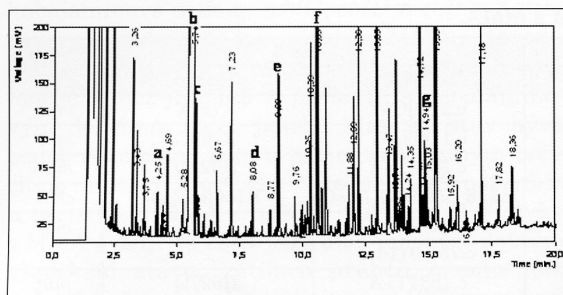
Tab. 2. Laboratorní nálezy u souboru pacientů s MMA.

Pacient č.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.*	8.	9.	10.	normální hodnoty
kys. methylmalonová v moči [mmol/mol kreat.]	↑↑↑	9568	17 414	1914	6219	6219	7463	4401	↑↑↑	↑↑↑	< 14
kys. methylcitronová v moči [mmol/mol kreat.]	↑↑	210	61	43	64	147	65	84	↑↑	±	< 8
kys. 3-hydroxypropionová v moči [mmol/mol kreat.]	↑↑	203	251	271	371	293	212	148	↑↑	↑	< 19
kys. 3-hydroxyvalerová v moči [mmol/mol kreat.]	nevyš.	nevyš.	89	699	stopy	34	34	31	nevyš.	nevyš.	nd
propionylglycin v moči [mmol/mol kreat.]	nevyš.	stopy	nečet.	39	30	stopy	14	stopy	nevyš.	nevyš.	nd
kys. methylmalonová v plazmě/séru [μmol/l]	nevyš.	881	1 788	356	975	750	898	177	nevyš.	nevyš.	nd
amoniak v plazmě [μmol/l]	216	236	500	224	2400	279	218	122	117	79	< 80
aminokyseliny v plazmě/séru**	↑Gly, ↑Met, ↑Ile, ↑Val, ↑Arg, ↑Lys,	↑Gly, ↑Met, známky restrikce bílkoviny	↑Gly, ↑Met, ↑Ile, ↑Val, ↑Orn	↑Pro, ↑Gly, ↑Tyr, ↑Lys	↑↑Gly, ↑Tyr, ↑↑Lys, ↑Thr, ↑Ser, ↑Pro, ↑Val, ↑Ile, ↑Leu, ↑Arg	hr. Gly, hr. Thr, hr. Met, ↑Val, ↑Ile, ↑Leu, ↑Lys	↑Gly, ↑Val, ↑Met, ↑Ile, ↑Leu, ↑Lys	hr. Val, hr. Ile, ↑IMHis	↑Gly, ↑Ala	hr. Gly	-
laktátová acidurie	-	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑	↑↑	↑↑	-
ketonurie	↑↑	-	↑↑	↑↑	-	↑	↑	↑↑	↑↑	↑↑	-
laktát v krvi [mmol/l]	nevyš.	nevyš.	2,99	nevyš.	nevyš.	2,86	4,16	nevyš.	5,03	7,30	< 2,0
ketonémie	nevyš.	+	+	-	+	-	-	+	nevyš.	-	-
acylovaný karnitin v plazmě/séru	nevyš.	na horní hranici	normální	nevyš.	v normě	v normě	v normě	↑	nevyš.	nevyš.	-
volný karnitin v plazmě/séru	nevyš.	↓↓	↓↓	nevyš.	↓	↓↓	↓↓	↓↓	nevyš.	nevyš.	-
celkový karnitin v plazmě/séru	nevyš.	↓	↓	nevyš.	v normě	↓	na dolní hranici	v normě	nevyš.	nevyš.	-
poměr acylovaný/volný karnitin v plazmě/séru	nevyš.	↑↑	↑↑	nevyš.	↑	↑↑	↑↑	↑↑	nevyš.	nevyš.	-
celkový homocystein v plazmě/séru [μmol/l]	nevyš.	3,3	9,6	6,3	4,2	5,6	5,3	7,6	3,8	nevyš.	< 12,0
kys. methylmalonová v plazmě v období remise **** [μmol/l]	904	735	748	542	153	205	351	47	63	nd	nd
- průměr, rozmezí (n)	361-3226 (38)	69-3954 (48)	89-3954 (24)	204-1783 (31)	4-1470 (30)	60-1044 (7)	52-850 (50)	15-850 (10)			
propionylkarnitin v krvi v období remise **** [μmol/l] - průměr, rozmezí (n)	19,4	42,3	10,5	11,0	20,4	21,8; 42,7	14,1	3,2	10,2	1,6	< 2,0
	1,3-56,5 (17)	5,5-265,0 (27)	3,3-48,2 (32)	2,5-28,9 (18)	11,9-88,6 (6)		4,5-36,5 (6)	1,1-4,7 (6)			

Vysvětlivky: nevyš. - nevyšetřováno, nd - nedetekováno, hr. - hranice

\* dvojice dítěte č. 6, \*\* názvy aminokyselin: IMHis - I-methylhistidin, Arg - arginin, Gly - glycin, Ile - isoleucin, Leu - leucin, Lys - lysin, Met - methionin, Orn - ornithin, Pro - prolin, Ser - serin, Thr - threonin, Tyr - tyrosin, Val - valin, \*\*\* uvedené hodnoty z období remise jsou průměrem n počtu stanovení





**Obr. 1. Profil organických kyselin v moči pacienta s methylmalonovou acidémií stanovený metodou plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí.**

Vysvětlivky: a) kyselina 3-hydroxypropionová, b) kyselina methylmalonová pík 1, c) kyselina 3-hydroxyvalerová, d) propionylglycin, e) kyselina methylmalonová pík 2, f) vnitřní standard, g) kyselina methylcitronová (2 píky)

**Fig. 1. Profile of urinary organic acids in a patient with methylmalonic acidemia determined using gas chromatography/mass spectrometry.**

Legends: a) 3-hydroxypropionic acid, b) methylmalonic acid peak 1, c) 3-hydroxyvaleric acid, d) propionylglycine, e) methylmalonic acid peak 2, f) internal standard, g) methylcitric acid (2 peaks)

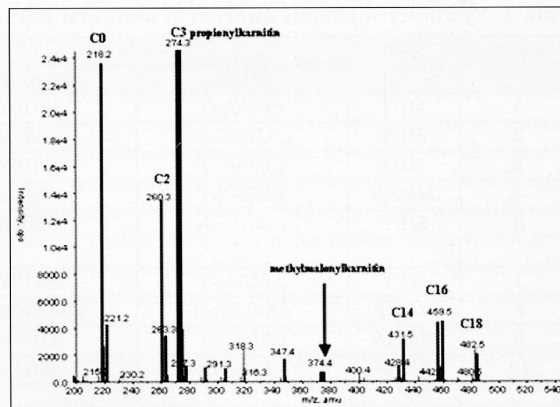
V tabulce 3 uvádíme výsledky stanovení enzymové aktivity methylmalonyl-CoA-mutázy v lymfocytech a/nebo kultivovaných fibroblastech 9 pacientů s MMA. V případě pacienta č. 6 nebyl k dispozici diagnostický materiál. U 5 pacientů jsme prokázali deficit aktivity methylmalonyl-CoA-mutázy. U 4 pacientů byla v přítomnosti adenosylkobalaminu naměřena normální aktivita methylmalonyl-CoA-mutázy. U těchto pacientů jsme proto dále předpokládali, že je jejich onemocnění způsobeno některým z kobalaminových deficitů (*cblA* nebo *cblB*).

**Tab. 3. Aktivita methylmalonyl-CoA mutázy v lymfocytech a/nebo kultivovaných fibroblastech u souboru pacientů s MMA.**

Pacient č.	Lymfocyty		Kultivované fibroblasty		Závěr
	celková mutázová aktivita*	citrátsyntáza**	celková mutázová aktivita*	citrátsyntáza**	
1.	nd	127,0	nevyš.	nevyš.	deficit mutázy
2.	nd	136,5	nd	55,1	deficit mutázy
3.	nd	78,5	nd	122,1	deficit mutázy
4.	2,36	123,3	3,09	63,9	susp. cbl A/B
5.	nevyš.	nevyš.	nd	91,9	deficit mutázy
7.	nd	120,4	nevyš.	nevyš.	deficit mutázy
8.	2,29	97,8	3,61	55,1	susp. cbl A/B
9.	nevyš.	nevyš.	5,82	51,2	susp. cbl A/B
10.	nevyš.	nevyš.	5,55	64,3	susp. cbl A/B
zdravé kontroly (n)	1,97±0,65 (17)	105,8±20,2 (157)	4,22±0,90 (18)	76,4±22,2 (50)	-

Vysvětlivky: nd – nedetekováno, nevyš. – nevyšetřováno

\*celková aktivita methylmalonyl-CoA-mutázy měřená v přítomnosti 5 μmol/l adenosylkobalaminu je vyjádřena v nmol sukcinyl-CoA vytvořeného za minutu na mg bílkoviny, \*\* kontrolní mitochondriální enzym [nmol/min/mg bílk.]



**Obr. 2. Profil acylkarnitinů v krvi pacienta s methylmalonovou acidémií stanovený metodou tandemové hmotnostní spektrometrie.**

Vysvětlivky: C<sub>0</sub> – volný karnitin, C<sub>2</sub> – acetylkarnitin, C<sub>3</sub> – propionylkarnitin, C<sub>14</sub> – myristoylkarnitin, C<sub>16</sub> – palmitoylkarnitin, C<sub>18</sub> – stearoylkarnitin

**Fig. 2. Blood acylcarnitine profile in a patient with methylmalonic acidemia determined using tandem mass spectrometry.**

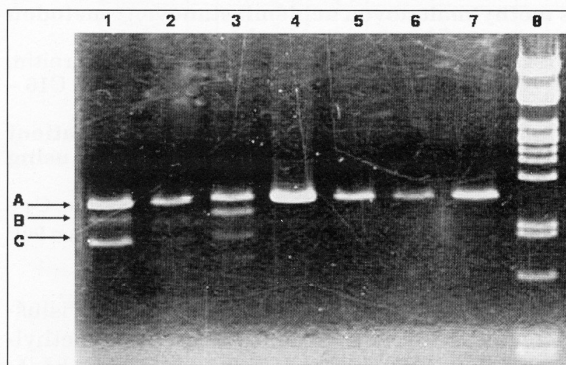
Legends: C<sub>0</sub> – free carnitine, C<sub>2</sub> – acetylcarnitine, C<sub>3</sub> – propionylcarnitine, C<sub>14</sub> – myristoylcarnitine, C<sub>16</sub> – palmitoylcarnitine, C<sub>18</sub> – stearoylcarnitine

U 9 pacientů s MMA jsme analyzovali příslušné geny. Z toho u 5 pacientů s deficitem methylmalonyl-CoA-mutázy byla v genu *MUT* prokázána přítomnost mutací zodpovědných za vznik onemocnění. Nalezli jsme 4 nové mutace, 3 jednobázové substituce (dvě z nich mění aminokyselinový zbytek, R369C a H627Q, a třetí vytváří stop kodon R727X) a jednu sestřihovou mutaci. Nová mutace nalezená u pacienta č. 5 heterozygotně, která nebyla na úrovni genomové DNA identifikována, vede k chybnému sestřihu a vzniku dvou produktů mRNA. U prvního produktu je deleto-

Tab. 4. Výsledky mutační analýzy u souboru pacientů s MMA.

Pacient č.	Gen	Alela 1		Alela 2		Výsledek
		cDNA	protein*	cDNA	protein*	
1.	<i>MUT</i>	c.655A>T	N219Y	c.2179C>T	R727X	<i>mut</i>
2.	<i>MUT</i>	c.1106G>A	R369H	c.1105C>T	R369C	<i>mut</i>
3.	<i>MUT</i>	c.655A>T	N219Y	c.1881T>A	H627Q	<i>mut</i>
4.	<i>MMAB</i>	c.556C>T	R186W	c.558_559delGGinsC	R186fsX213	<i>cblB</i>
5.	<i>MUT</i>	c.607G>A	G203R	c.546-911del c.754-911del	**	<i>mut</i>
7.	<i>MUT</i>	c.655A>T	N219Y	c.1881T>A	H627Q	<i>mut</i>
8.	<i>MMAA</i>	c.551dupG	C184fsX186	c.551dupG	C184fsX186	<i>cblA</i>
9.	<i>MMAB</i>	c.556C>T	R186W	c.556C>T	R186W	<i>cblB</i>
10.	<i>MMAA</i>	c.592_595delACTG	T198fsX203	c.592_595delACTG	T198fsX203	<i>cblA</i>

Vysvětlivky: \* předpokládaná změna v proteinu, \*\* sestřihová mutace vede ke dvěma produktům mRNA, u nichž dochází k delecí exonu 4 v prvním případě a k delecí exonu 4 a části exonu 3 ve druhém případě



Obr. 3. Detekce sestřihové mutace v rodině pacienta č. 5.

cDNA byla amplifikována jedním párem PCR primerů, které leží v exonech 2 a 7 genu *MUT*. PCR produkt byl analyzován pomocí elektroforézy na 1% agarózovém gelu.

Vysvětlivky: šipka A – wild type, šipka B – delecí exonu 4, šipka C – delecí exonu 4 a části exonu 3.

1 a 3 – pacient, resp. otec, kteří jsou heterozygotní pro sestřihovou mutaci, 2 – matka, 4–7 – kontroly, 8 – velikostní marker 1 PstI.

Fig. 3. Detection of the splicing mutation in family of the patient No. 5.

cDNA was PCR-amplified using forward primer localized in exon 2 and reverse primer localized in exon 7 of *MUT* gene. PCR products were analyzed by electrophoresis on 1% agarose gel.

Legends: arrow A – wild type, arrow B – deletion of exon 4, arrow C – deletion of exon 4 and part of exon 3. 1 a 3 – patient, resp. her father who are heterozygous for splicing mutation, 2 – mother, 4–7 – controls, 8 – size marker 1 PstI.

ván exon 4 a u druhého dochází k delecí exonu 4 a části exonu 3 (obr. 3). Již dříve popsaná mutace N219Y byla nalezena ve 3 z 10 alel a potvrzuje tak častý výskyt v kavkazské populaci [17]. U zbývajících 4 pacientů s MMA byla provedena mutační analýza v *MMAA* a *MMAB* genech a ve všech případech jsme identifikovali mutace zodpovědné za vznik onemocnění. Obě nové mutace:

inserce c.551dupG v genu *MMAA* a indelová mutace c.558\_559delGGinsC v genu *MMAB* vedou k posunu čtecího rámce a předčasným stop kodonům. U pacienta č. 6 nemohla být mutační analýza provedena, neboť jsme neměli k dispozici diagnostický materiál. Můžeme pouze předpokládat, že onemocnění tohoto dítěte způsobily stejné mutace, které byly nalezeny u jeho bratra dvojčete. Výsledky molekulárně biologického vyšetření jsou uvedeny v tabulce 4.

## Diskuse

Nejdříve byla diagnóza MMA u pacientů ze souboru prokázána na úrovni metabolitů. V akutním stadiu byla přítomna ketoacidóza a laboratorní známky jaterního poškození a ledvinného selhání. V krvi i v moči byla zvýšená koncentrace glycinu, methioninu, větvených a dalších aminokyselin a některých organických kyselin, především kyseliny methylmalonové, methylcitronové a 3-hydroxypropionové. Častá byla hyperamonémie a mírná pancytopenie.

Pro potřeby genetického poradenství a případnou prenatální diagnostiku v postižené rodině je vhodné doplnit diagnostiku na enzymatické a/nebo molekulární úrovni. Tato vyšetření nebyla donedávna v ČR dostupná. Proto jsme na našem pracovišti zavedli metodiky, jejichž pomocí lze diagnózu MMA dále specifikovat na úrovni proteinu a genu – stanovení aktivity methylmalonyl-CoA-mutázy a mutační analýzu genů *MUT*, *MMAA* a *MMAB*.

U 5 pacientů jsme prokázali deficit methylmalonyl-CoA-mutázy na úrovni enzymu. Normální mutázová aktivita u dalších 4 pacientů nevylučovala MMA z důvodu poruchy syntézy mutázového kofaktoru AdoCbl. U těchto pacientů jsme proto pomýšleli na některý z kobalaminových deficitů (*cblA* nebo *cblB*). Normální koncentrace celkového homocysteinu v plazmě a séru vyloučila jiné

kobalaminové deficity (*cbfC*, *cbfD* a *cbfF*). Z literatury je známo, že u pacientů s MMA z důvodu deficitu *cbfA* bývá mírnější klinický průběh onemocnění, než je tomu u pacientů s kobalaminovým deficitem *cbfB*, jejichž klinický stav bývá podobně závažný jako u pacientů s úplným deficitem mutázy *mut<sup>0</sup>* [1]. Toto se také potvrdilo u pacientů s MMA z našeho souboru. Dvě dívky s MMA z deficitu *cbfA* jsou dlouhodobě v dobrém klinickém stavu, zatímco průběh onemocnění u dalších dvou dívek s deficitem *cbfB* je poměrně vážný.

Nejtěžší klinický průběh onemocnění byl zaznamenán u 6 pacientů s deficitem methylmalonyl-CoA-mutázy, z nichž 4 již zemřeli. Nejstarší pacient (č. 1) ze souboru je heterozygotem pro známou *mut<sup>0</sup>* mutaci a novou mutaci, která pravděpodobně vede ke vzniku proteinu, který je o 23 aminokyselin kratší. Klinický stav tohoto chlapce není ve srovnání se zbývajících pěti pacienty s *mut<sup>0</sup>* formou tak závažný. Proto se domníváme, že aktivita proteinu u tohoto pacienta je částečně zachována, ale vzhledem k nedostatečné citlivosti HPLC metody používané ke stanovení aktivity methylmalonyl-CoA-mutázy jsme tuto nízkou zbytkovou aktivitu nedetekovali. Pro lepší charakterizaci této a dalších nových mutací bude provedena expresní analýza.

Podle našich zkušeností dochází mezi objevením se prvních příznaků onemocnění a stanovením diagnózy na základě cíleného metabolického vyšetření k určité prodlevě, která u některých našich pacientů činila i několik dnů. V poslední době byly vyvinuty nové analytické techniky pro diagnostiku DMP, mezi kterými si získala své nezastupitelné místo tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS). Tato výkonná, rychlá a vysoce senzitivní technologie je ve světě využívána pro selektivní i novorozenecký screening DMP. Pomocí MS/MS lze zachytit pacienty s léčitelnou DMP dříve, než toto onemocnění může způsobit závažné poškození dítěte či dokonce jeho úmrtí. MS/MS vyšetření ze suché kapky krve umožňuje diagnostikovat několik různých DMP včetně MMA a dalších organických acidémií, aminoacidopatií a poruch mitochondriální  $\beta$ -oxidace mastných kyselin. Vzhledem k velmi časnému nástupu onemocnění u MMA má použití MS/MS v novorozeneckém screeningu obrovský preventivní význam. V současnosti se novorozenecký screening v ČR, screening fenylketonurie, hypothyreózy a kongenitální adrenální hyperplazie provádí z krve odebrané 4. až 5. den života dítěte. Odběr krve pro screening DMP metodou MS/MS se doporučuje provést již 3. den po narození.

Naše zkušenosti ukázaly, že se mírná MMA často vyskytuje sekundárně z důvodu nedostatku vitamínu B<sub>12</sub> ve stravě. Poměrně výrazná sekun-

dární MMA byla prokázána u kojenců, jejichž matky byly na přísné vegetariánské výživě.

U kriticky nemocného dítěte s MMA s vysokou hladinou kyseliny metylmalonové v krvi, výraznou hyperamonémií a poruchou vědomí je nutno k rychlému snížení hladin kyseliny metylmalonové a amoniaku použít některou z mimotělních eliminačních metod, nejlépe hemodiafiltraci. Dietní léčba je založena na omezení denního příjmu přirozených bílkovin na 0,8–1,4 g/kg, další potřeba bílkovin je hrazena směsí esenciálních aminokyselin bez isoleucinu, valinu, methioninu a threoninu. Ve výživě je dále nezbytné snížit příjem mastných kyselin s lichým počtem uhlíků, část energetických potřeb dítěte je možné hradit MCT oleji. Některé děti s MMA příznivě reagují na podávání hydroxykobalaminu (1–3krát týdně). U postižených dětí je vždy nutná suplementace L-karnitinem (100 mg/kg) a megadávkami vitamínu C (50–100 mg/kg), dále se doporučuje podávat dětem metronidazol, který potlačuje růst střevních bakterií produkujících kyselinu propionovou, prekursor kyseliny metylmalonové. Při léčbě je monitorován nejen růst a vývoj dítěte, ale i funkce jater a ledvin a hladiny aminokyselin, organických kyselin, karnitinu a amoniaku. Pokud u dítěte s MMA dojde k hyperamonémii, je nutno zvýšit výdej nebílkovinného dusíku podáváním benzoátu sodného v dávce 100–250 mg/kg a den.

Ve shodě s případy popsány v odborné literatuře odpovídala reakce našich pacientů na podávání vitamínu B<sub>12</sub> příčině onemocnění. Naši pacienti s *mut* a *cbfB* formami MMA nebyly B<sub>12</sub> responzivní, zatímco obě pacientky s MMA z deficitu *cbfA* dobře reagovaly na podání vitamínu B<sub>12</sub>. U několika pacientů se vyvinula psychomotorická retardace, která zřejmě není způsobena samotnou chorobou, ale spíše je následkem prodělaných atak hyperamonémie, výrazně zvýšené koncentrace kyseliny metylmalonové v krvi či „metabolic stroke“ epizod.

**CAVE!** U každého dítěte s MMA by měl být v průběhu akutních horečnatých onemocnění snížen příjem bílkovin ve výživě na polovinu povoleného denního příjmu a ve snaze zabránit katabolismu by měl být zajištěn dostatečný kalorický příjem, nejlépe formou intravenózního podávání 10–13 % glukózy. Při intravenózním podávání tuků jsou používány preparáty obohacené o MCT oleje. U kriticky nemocných dětí s poruchami vědomí je nutno k odstranění toxických metabolitů použít mimotělní eliminační metodu. Při včas zahájené léčbě může být prognóza dítěte s MMA dobrá. U některých dětí dochází v průběhu dospívání k progredující poruše tubulárních a jaterních funkcí, které vedou k indikaci transplantace ledvin a jater.

---

## Závěr

---

Prognóza postižených dětí s MMA v ČR není stále příznivá. Diagnóza MMA byla u našich pacientů stanovena až při akutně probíhajících příznacích s těžkým postižením CNS. Dítěti s MMA lze sice pomocí mimotělních eliminačních metod zachránit život, ale pro pacienta i jeho rodinu by bylo lepší, kdyby byla v ČR dostupná včasná diagnostika tohoto závažného metabolického onemocnění při novorozeneckém screeningu DMP pomocí MS/MS. Diagnostika MMA byla v ČR zatím možná jen na úrovni metabolitů, pro komplexní diagnostiku je však žádoucí i potvrzení diagnózy na dalších úrovních. Nové laboratorní metody a techniky zavedené v Ústavu dědičných metabolických poruch v Praze umožnily potvrzení diagnózy na enzymové a molekulárně biologické úrovni. S použitím těchto metod může naše pracoviště poskytnout postiženým rodinám účinné genetické poradenství a nabídnout jim prenatální diagnostiku. Výsledky této studie již umožnily provést prenatální diagnostiku ve třech případech dalšího těhotenství v postižených rodinách.

### Poděkování

Práce vznikla s podporou grantů IGA MZ ČR NE 7617-3 a výzkumného záměru MZ ČR VZ 64165.

---

## Literatura

---

1. **Fenton WA, Gravel RA, Rosenblatt DS.** Disorders of Propionate and Methylmalonate Metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 8th ed. New York: McGraw-Hill, 2001:2165–2193.
2. **Wilkemeyer MF, Crane AM, Ledley FD.** Primary structure and activity of mouse methylmalonyl-CoA mutase. *Biochem. J.* 1990;271:449.
3. **Martínez MA, Rincon A., Desviat LR, et al.** Genetic analysis of three genes causing isolated methylmalonic acidemia: identification of 21 novel allelic variants. *Mol. Genet. Metab.* 2005;84(4):317–325.
4. **Lerner-Ellis JP, Dobson CM, Wai T, et al.** Mutations in the MMAA gene in patients with the cblA disorder of vitamin B12 metabolism. *Hum. Mutat.* 2004;24(6):509–516.
5. **Yang X, Sakamoto O, Matsubara Y, et al.** Mutation analysis of the MMAA and MMAB genes in Japanese patients with vitamin B (12) – responsive methylmalonic acidemia: identification of a prevalent MMAA mutation. *Mol. Genet. Metab.* 2004;82(4):329–333.
6. **Hyánek J, a kol.** Dědičné metabolické poruchy. 1. vyd. Praha: Avicenum, 1991:96–97.
7. **Noll F.** L(+)-Lactate. In: Bergmeyer HU. Method of Enzymatic Analysis. 3rd ed. Verlag Chemie: RFA, 1984:582–588.
8. **Sweetman L.** Organic acid analysis. In: Hommes FA (ed). Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics. A Laboratory Manual. New York: Wiley-Liss, 1991:143–176.
9. **Montgomery JA, Mamer OA.** Determination of methylmalonic acid in biological fluids by mass spectrometry. *Methods of Enzymology.* 1988;166:47–55.
10. **Ratcliff CR, Hall FF.** Selected Methods of Clinical Chemistry. Edited by Willard R, Faulkner and Samuel Meites. American Association for Clinical Chemistry. Vol. 9. Washington DC, 1982:85.
11. **Cederblad G, Linstedt S.** A method for the determination of carnitine in the picomole range. *Clin. Chim. Acta.* 1972;37:235–243.
12. **Rolinski B, Arnecke R, Dame T, et al.** The biochemical metabolite screen in the Munich ENU Mouse Mutagenesis Project: determination of aminoacids and acylcarnitines by tandem mass spectrometry. *Mamm. Genome.* 2000;11:547–551.
13. **Krijt J, Vacková M, Kožich K.** Measurement of homocysteine and other aminothiols in plasma: Advantages of using tris(2carboxyethyl) phosphine as reductant compared with tri-n-butylphosphine. *Clin. Chem.* 2001;47:1821–1828.
14. **Kikuchi M, Hanamizu H, Narisawa K, et al.** Assay of methylmalonyl CoA mutase with high-performance liquid chromatography. *Clin. Chim. Acta.* 1989;184:307–314.
15. **Lowenstein JM.** Methods in Enzymology. 1969;13:3–26.
16. **Chomeczynski P, Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987;162:156–159.
17. **Acquaviva C, Benoist JF, Callebaut I, et al.** N219Y, a new frequent mutation among mut<sup>0</sup> forms of methylmalonic acidemia in Caucasian patients. *Europ. J. Hum. Genet.* 2001;9:577–582.

Došlo: 9. 1. 2006

Přijato: 3. 3. 2006

Ing. Evženie Pospíšilová

Ústav dědičných metabolických poruch VFN

a 1. LF UK

Ke Karlovu 2

128 08 Praha 2

e-mail:eposp@lf1.cuni.cz

## Contiguous X-chromosome Deletion Syndrome Encompassing the *BTK*, *TIMM8A*, *TAF7L*, and *DRP2* Genes

Anna Šedivá · C. I. Edvard Smith ·  
A. Charlotta Asplund · Jan Hadač · Aleš Janda ·  
Jiří Zeman · Hana Hansíková · Lenka Dvořáková ·  
Lenka Mrázová · Sirje Velbri · Carla Koehler ·  
Karin Roesch · Kathleen E. Sullivan · Takeshi Futatani ·  
Hans D. Ochs

Received: 24 June 2007 / Accepted: 30 July 2007 / Published online: 12 September 2007  
© Springer Science + Business Media, LLC 2007

**Abstract** X-linked agammaglobulinemia (XLA) is characterized by low levels of B-lymphocytes with early-onset, recurrent, microbial infections occasionally causing neurological symptoms. We observed an atypical clinical course of XLA, complicated since early childhood with neurological impairment, progressive sensorineural deafness, and dystonia in six boys of four unrelated families. The neurologic symptoms suggested the diagnosis of Mohr–Tranebjaerg syndrome, caused by mutations in the *TIMM8A* gene, previously known as *DDP1*, and located centromerically of *BTK*. Deafness dystonia peptide (DDP1) participates in neurological development and is a part of the mitochondrial protein import pathway. Mutation analysis of the *BTK* gene revealed gross deletions of different lengths in all patients, in one case extending approximately 196 kb, including the genes *TIMM8A*,

*TAF7L*, and *DRP2*. The most prominent clinical findings of this contiguous deletion syndrome are the combination of immunodeficiency and sensorineural deafness, which were present in all affected boys. The severity of symptoms, however, did not correlate with the extent of the deletion.

**Keywords** X-linked agammaglobulinemia (XLA) · Bruton tyrosine kinase (BTK) · Mohr–Tranebjaerg syndrome · immunodeficiency · sensorineural deafness

### Introduction

Bruton agammaglobulinemia, or X-linked agammaglobulinemia, OMIM 300300, is a classical form of primary humoral

A. Šedivá (✉) · A. Janda  
Institute of Immunology,  
University Hospital Motol,  
V Uvalu 84,  
150 06 Prague 5, Czech Republic  
e-mail: anna.sediva@fnmotol.cz

C. I. E. Smith · A. C. Asplund  
Clinical Research Center, Department of Laboratory Medicine,  
Karolinska Institutet,  
Karolinska University Hospital Huddinge,  
Huddinge, Sweden

J. Hadač  
Department of Neurology, Thomayer Hospital,  
Prague, Czech Republic

J. Zeman · H. Hansíková · L. Dvořáková · L. Mrázová  
Centre of Applied Genomics, First Medical Faculty,  
Charles University,  
Prague, Czech Republic

S. Velbri  
Tallinn Children's Hospital,  
Tallinn, Estonia

C. Koehler · K. Roesch  
Department of Chemistry & Biochemistry,  
University of California,  
Los Angeles, USA

K. E. Sullivan  
Department of Pediatrics, University of Pennsylvania,  
Philadelphia, USA

T. Futatani · H. D. Ochs  
Department of Pediatrics School of Medicine,  
University of Washington, Seattle, USA

T. Futatani  
Department of Pediatrics,  
Toyama Medical and Pharmaceutical University,  
Toyama, Japan

immunodeficiency, characterized by a B-cell specific maturation defect and, as a consequence, absence of B cells and low levels of immunoglobulins [1–4] ameliorated by immunoglobulin substitution therapy [5]. The genetic basis of the disease was discovered in 1993 [6, 7]. The affected gene, Bruton tyrosine kinase, *BTK*, encompasses 37.5 kb and contains 19 exons. *BTK* is expressed in all hematopoietic cells, with the exception of T lymphocytes and plasma cells [8]. The mutations causing XLA appear almost uniformly throughout the entire *BTK* gene [9, 10].

In the same chromosomal region, located 770 bp centromerically of the *BTK* gene, is the gene originally named *DDPI* [11–13]. The HUGO Gene Nomenclature Committee has named this gene “Translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog A” (*TIMM8A*). It is a relatively small gene consisting of two exons and producing a 97-amino-acid polypeptide [12]. The original gene name, *DDPI* for deafness dystonia protein, refers to the main clinical symptoms of the disease known as Mohr–Tranebjaerg syndrome, originally described by Mohr [14] and subsequently by Tranebjaerg [15, 16], which is due to mutations in this gene. *TIMM8A* was later found to be associated with the protein import system in the intermembrane space of mitochondria [17].

In the current report, we describe six boys, including two brother pairs from four unrelated families, all of them diagnosed with XLA in early childhood. All presented in the first years of life with progressive neurologic symptoms including sensorineural deafness, which are not typical for boys with XLA. These unusual clinical findings initiated a more detailed investigation for a possible genetic basis for the complex clinical problems. The occurrence of a contiguous deletion syndrome consisting of a large deletion that included both *BTK* and *TIMM8A* genes was suggested

in two clinical reports demonstrating the co-existence of XLA and the Mohr–Tranebjaerg syndrome [11, 12]. While we were analyzing our material, which included a patient with an extended deletion encompassing the *BTK-TIMM8A-TAF7L-DRP2* genes, a similar deletion was described in two identical twins [18]. In this paper, we report on the largest cohort of XLA patients with *TIMM8A* mutations, including a case with a deletion encompassing the *TAF7L* and the *DRP2* genes. We further demonstrate that the *TIMM8A* encoded protein is absent, presumably leading to a defect in protein import in mitochondrial intermembrane space.

**Patients and Methods**

**Patients**

*History and Case Reports*

A total of six boys from four unrelated families were investigated, two brother pairs now aged 25, 33, and 5 and 6 years, respectively, one boy 13 years old and one who died at the age of 6 years (Table 1).

Patient 1 is a 33-year-old man with no family history of immunodeficiency and/or neurological problems. He was well until the second year of life when he developed recurrent respiratory infections, which intensified when he entered preschool. The deafness appeared gradually over the next 3 years. The diagnosis of XLA was made at 9 years of age during a hospital stay for severe bronchopneumonia. Despite immunoglobulin therapy, he continued to have infections. At present, his clinical problems include progressive deafness, abnormal speech, aggressive behavior, and muscle wasting.

**Table 1** Clinical and Laboratory Parameters

	Age at diagnosis	Age when IVIg started	Age when first infection occurred	IgG (g/l)	IgA (g/l)	IgM (g/l)	IgE (IU/ml)	CD3+ (%)	CD4+ (%)	CD8+ (%)	CD19+ (%)	CD16+/56+ (%)
Pt 1	9 years	18 years	3 years (pneumonia)	2.46 <sup>a</sup>	0.14	0.19	<30	NA	NA	NA	NA	NA
Pt 2	18 months	11 years	15 months (complicated sinusitis)	2.42 <sup>a</sup>	0.09	0.49	<30	89	57	25	0	NA
Pt 3	8 months	20 months	6 months (bronchitis)	1.61	<0.07	<0.04	<30	97	58	36	0	1
Pt 4	7 months	8 months	3 months (bronchitis)	<0.1	<0.07	<0.04	<2	92	64	26	0	12
Pt 5	2 months	6 months	7 months (pneumonia)	1.39	<0.07	0.06	<2	85	53	39	1	14
Pt 6	8 months	8 months	6 months (pneumonia)	0.27	<0.07	0.7	<2	90	71	15	1.3	NA

At diagnosis, T-cell function was intact in all tested patients.

<sup>a</sup>On IVIg substitution

Patient 2, the 25-year-old brother of patient 1, has a similar history, including recurrent respiratory infections and progressive deafness since attending preschool; however, the psychological component and general wasting are less pronounced.

Patient 3, born in 1994, died at the age of 6 years from progressive dystonia, neurological impairment, and general wasting. Family history is negative for immunodeficiency; however, the maternal grandmother has had progressive torticollis spastica, dysphonia, and monoparesis of right upper extremity for 35 years, symptoms sometimes reported in carrier females for mutations in the *TIMM8A* gene. The diagnosis of XLA was established at 2 years of age, and he was treated effectively with intravenous immunoglobulins (IVIg), without further major infections. Delayed speech development led to the discovery of sensorineural deafness at the age of 4 years. First signs of dystonia appeared at the age of 5 years and progressed rapidly to a severe form of spasticity until his death due to pneumonitis and cardiorespiratory failure.

Patient 4, now 6 years old, was healthy until 3 months of age when he started to suffer from recurrent respiratory infections. The diagnosis of XLA was confirmed at 7 months of age. Repeated infectious episodes resolved with the introduction of regular IVIg infusions. He subsequently developed slowly progressing psychomotor retardation and severe speech impairment; since the age of 4 years, he has sensorineural hearing loss. No spasticity has been documented.

Patient 5 is the 5 year old brother of patient 4. The diagnosis of XLA was made early due to the positive family history at the age of 2 months. Despite IVIg therapy, he suffered from acute bronchopneumonia at the age of 7 months and chronic bronchitis since 16 months of age. Speech development has been delayed and signs of hearing loss could be demonstrated at the age of 2.5 years. Interestingly, a maternal uncle of patients 4 and 5 died in early childhood of severe infection of unknown etiology, otherwise the history is uneventful.

Patient 6 is now 13 years of age and of African-American origin. He presented at 6 months of age with respiratory distress, pneumonia, and neutropenia that had resolved by the time of discharge. At 8 months, the diagnosis of XLA was made. Despite regular IVIg substitution, he developed a few additional episodes of pneumonia. At 3 years of age, delay in language and motor development was noticed and audiometry revealed behavioral thresholds at 80 dB bilaterally. The hearing loss was progressive and of sensorineural character. Family history is negative. The patient's two healthy sisters are carriers for his mutation.

Patients 1, 2, and 3 are from the Czech Republic; the two brothers, patients 4 and 5, are from Estonia; and patient 6 is from the USA.

#### Audiometry, Evoked Otoacoustic Emissions

The investigation proved postlingual sensorineural deafness in the three Czech patients. All patients had a detailed ear, nose, throat, and audiological investigation. All three boys had evidence of normal middle ear structures and function verified with normal tympanogram and evoked otoacoustic emissions. In patients 1 and 2, progressive sensorineural hearing loss was detected and hearing threshold was determined at about 50–100 dB. Hearing aids were made for these two brothers at 7 and 4 years of age, respectively. The absent auditory brainstem response of patient 4 at the age of 4 years pointed to central hearing loss. Patient 6 has had severe language delay detected since 3 years of age. Audiometric examination of this patient, performed at 3 years of age, revealed absence of V wave response to either ear up to 90 dB but robust otoacoustic emissions. He refused to wear the hearing aids. Audiometry data for patient 5 is not available.

#### Methods

##### Immunological Investigation

The levels of immunoglobulins were assessed by nephelometry with appropriate antisera (Boehring, Germany). B- and T-lymphocyte analysis was performed by flow cytometry using commercially available monoclonal antibodies (Becton Dickinson, USA).

##### Exclusion of Kinship Among the Families

DNA analysis of hypervariable region I in mitochondrial DNA was used to prove that families of the two probands from the Czech Republic were not related. The nucleotides 16019–16390 (372 nucleotides in total) within the hypervariable region I were sequenced and compared between the families.

##### Molecular Analysis of the *BTK* and *TIMM8A* Gene Region

The extent of the deletions in patients 1–6 were analyzed by inspection of presence/absence of PCR products in patient and control genomic DNA. The initial mutation detection of the *BTK* gene was made according to Vořechovský et al. [19]. PCR products covering all exons of *BTK* and *TIMM8A* genes and the first exon of *TAF7L* gene were analyzed. Thirteen additional PCR probes were designed: seven of them were located in introns of the *BTK* gene; another six probes were situated in the intergenic region between the genes *TIMM8A* and *TAF7L*. Positions of PCR probes and primers were designed according to the reference sequence in GenBank (accession no. NC\_000023.9) and are available

together with PCR conditions upon request. Specificity of the probes situated at the deletion breakpoints of the individual patients was verified by direct sequencing. Specificity of all probes was analyzed by sequencing of control PCR products. Determination of the deletion endpoint in patient 6 was performed by ligation-mediated PCR. First, 200 pmol of 44mer oligonucleotide (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCCGCCGGCAGGT) and 200 pmol of 8mer oligonucleotide (5'-ACCTGCCC) were annealed and used as an adapter. Gene specific primer (ACCAGACCCTGACATACAGT) and adapter primer AP1 (5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGG) were used for amplification. Nested PCR was performed with the adapter primer AP2 (ACT CACTATAGGGCTCGAGCGGC) and the nested gene specific primer (CCTCTCTGGAGCCTCAGTTA) under the conditions described elsewhere [20].

### Mitochondria

Platelets were isolated from heparinized blood by differential centrifugation as reported previously [21]. In patient 3, skin, muscle, and liver biopsies were obtained at autopsy. Mitochondria were isolated according to Makinen and Lee [22] without the use of protease. The activities of mitochondrial enzymes, NADH-coenzyme Q10 oxidoreductase (NCQR, complex I), succinate-coenzyme Q10 oxidoreductase (NCQR, complex II), coenzyme Q10 cytochrome c oxidoreductase (CQCR, complex III), cytochrome c oxidase (COX, complex IV), NADH-cytochrome c reductase (NCCR, complex I+III), succinate cytochrome c reductase (SCCR, complex II+III), and citrate synthase (CS) were measured spectrophotometrically [23] in platelets from the three Czech patients and, in addition, in isolated muscle mitochondria obtained from patient 3. The ratio between activities of individual respiratory chain complexes and CS was calculated to eliminate the possible effect of changes in the number of mitochondria in patient cells. Blue native electrophoresis was used for separation of mitochondrial proteins in the first dimension and sodium dodecyl sulfate (SDS) electrophoresis in the second dimension. A fibroblast culture from a skin biopsy was successful in patient 3. The cells were grown at 37°C in Medium 199 with Earle's Salts supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (GibcoBRL, USA), 100 U/ml penicillin (GibcoBRL), and 100 µg/ml streptomycin (GibcoBRL) with 5% CO<sub>2</sub>.

### Mitochondrial Import and Co-immunoprecipitation Studies

To demonstrate the presence or absence of the TIMM8a–TIMM13 complex in mitochondria, we performed co-immunoprecipitation assays for TIMM8a and TIMM13. Detergent solubilized (0.16% *n*-dodecyl maltoside) fibro-

blast mitochondria were incubated with protein A-Sepharose beads containing immobilized rabbit IgG monospecific for human TIMM8a and TIMM13 [24, 25]. After washing, bound proteins were eluted with SDS-containing sample buffer. Samples were analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblotting with rabbit antisera monospecific for TIMM8a. In a control set of experiments, the abundance of mitochondrial proteins was determined by immunoblot analysis for Hsp60 and TIMM23, a substrate of TIMM8a.

### Results

#### Diagnosis of XLA and Mohr–Tranebjaerg Syndrome

The diagnosis of XLA was suggested in all six boys by the very low level of serum immunoglobulins and absence of B cells. These findings were confirmed by demonstrating large deletions involving the *BTK* gene. The clinical diagnosis of Mohr–Tranebjaerg syndrome was based on sensorineural deafness associated with dystonia and confirmed molecularly by the deletion of the *TIMM8A* gene (Fig. 1).

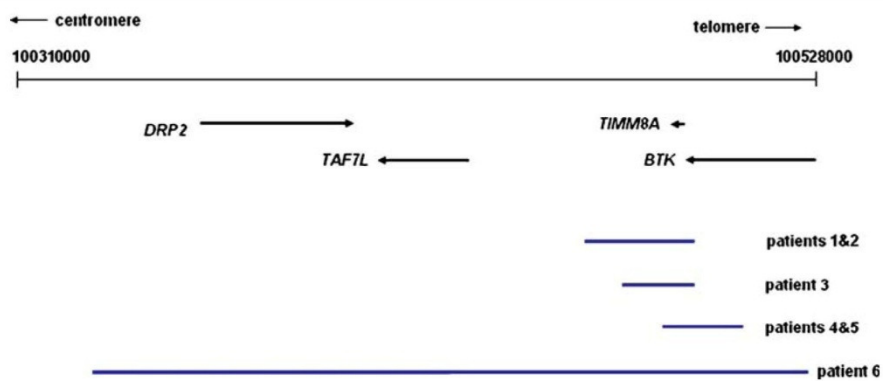
#### Mapping deletions

Sixteen PCR probes were used to delineate the deletion breakpoint regions (Fig. 1) in patients 1–5. Patients 1 and 2 (sibling pair) have a 30-kb deletion with breakpoints in intron 18 of the *BTK* gene and 29 kb centromerically of the first exon of the *TIMM8A* gene, respectively. The deletion includes the last exon of the *BTK* gene and both exons of the *TIMM8A* gene. The deletion detected in patient 3 includes the last exon of the *BTK* gene and the entire *TIMM8A* gene (a situation resembling that found in patients 1 and 2), but the breakpoints are different and the overall extent of the deletion is smaller (approximately 20 kb). The extent of the deletion in patients 4 and 5 (siblings) is approximately 22 kb. It involves exons 6–19 of the *BTK* gene and both exons of the *TIMM8A* gene. None of the deletions of patients 1–5 includes the *TAF7L* gene, which is situated 57 kb centromerically of the *TIMM8A* gene. In patient 6, polymerase chain reaction (PCR) analysis failed to amplify any of the *BTK* exons except exon 1, which is outside the coding region. The extent of the deletion was determined by nested PCR and sequencing (see “Methods”). The deletion of 196 kb includes the entire coding region of the genes *BTK*, *TIMM8A*, *TAF7L*, and *DRP2* (Fig. 1).

#### Functional analysis of mitochondrial function

The activities of respiratory chain complexes in isolated platelets from the three Czech patients were within the





**Fig. 1** Extent of deletions in patients 1–6. The upper part of the scheme shows the reference sequence of 218-kb region of chromosome X (NC\_000023.9) containing four genes (telomere → centromere, *BTK*, *TIMM8A*, *TAF7L*, and *DRP2*). Arrows show direction of the gene transcription. In the lower part, the lines depict the extent of deletions: deletion in patients 1 and 2 (30 kb) and deletion in patient 3

(approximately 20 kb) include the last exon of *BTK* and both exons of *TIMM8A*. Deletion in patients 4 and 5 (approximately 22 kb) include exons 6–19 of *BTK* and both exons of *TIMM8A*. Deletion in patient 6 (196 kb) includes the entire coding region of the genes *BTK*, *TIMM8A*, *TAF7L*, and *DRP2*.

reference range of age related controls, except of respiratory chain complex I+III, where a decrease to 60% of the lower limit of age-related controls was observed. In isolated muscle and liver mitochondria of patient 3, the activities of respiratory chain complexes (I, II, I+III, II+III, and IV) were within the reference range, and electrophoretic analyses did not show any significant differences in the amount or composition of respiratory chain complexes I, III, IV and V.

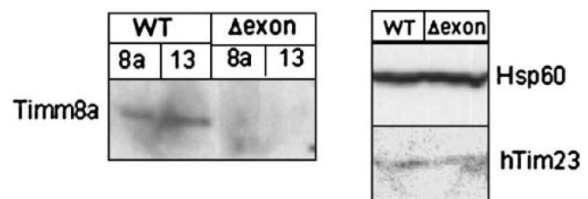
To confirm that the DDP1–TIMM13 complex was absent as predicted, fibroblast mitochondria from patient 3 (designated  $\Delta$ exon) and an age-matched control (designated WT) were analyzed by co-precipitation for the presence of the TIMM8a–TIMM13 complex (Fig. 2). After separation by SDS-PAGE, TIMM8a was detected in the WT cell line but not the patient cell line (Fig. 2, left panel). Steady-state levels of mitochondrial proteins, analyzed by immunoblotting, were similar in patient and control cell lines (Fig. 2, right panel). Thus, the patient cell line lacks the TIMM8a–TIMM13 complex, but the abundance of mitochondrial proteins is not significantly altered. This set of experiments suggests that affected tissues, such as the neural system, will have to be investigated to dissect defects caused by the Mohr–Tranebjaerg syndrome.

## Discussion

A contiguous deletion syndrome as an underlying defect of XLA with sensorineural deafness was originally discovered when the regions surrounding the *BTK* gene were mapped in detail [11]. The association of XLA and Mohr–Tranebjaerg syndrome was subsequently recognized in a single family that took part in a study that identified the

*TIMM8A* gene and the corresponding DDP1 protein [12]. The only surviving male in this family had Mohr–Tranebjaerg syndrome and XLA [12]. Three additional patients with XLA, deafness, and large deletions involving *BTK* and *TIMM8A* were published in 2001 [26], and more recently, two identical twin boys with a deletion affecting two additional genes, *TAF7L* and *DRP2*, have been described [18]. All patients with the contiguous deletion syndrome affecting the X22q region, including ours, had clinical and laboratory findings that fulfilled the criteria for XLA [27]. The immunodeficiency was apparently not affected by the concomitant neurological condition.

The clinical syndrome of X-linked deafness/dystonia was first described by Mohr and Mageroy in 1960 [14] and by Tranebjaerg et al. in 1992 [15]. The causative gene was discovered in 1996 [12] and subsequently shown to affect



**Fig. 2** The TIMM8a–TIMM13 complex is absent in patient cells. *Left panel* Fibroblasts from the age-matched control (WT) and patient ( $\Delta$ exon) were solubilized in 0.16 mg/ml *n*-dodecyl maltoside, and aliquots were immunoprecipitated with antibodies against TIMM8a or TIMM13 followed by immunoblot analysis with antibodies against TIMM8a. The TIMM8a–TIMM13 complex was undetectable in the patient cell line. *Right panel* The steady-state levels of two mitochondrial proteins, Hsp60 and TIMM23 (hTim23, a substrate of TIMM8a) were investigated by immunoblot analysis. Levels of Hsp60 and TIMM23 were similar in the control and patient cell lines. WT Control cells;  $\Delta$ exon patient cells without the exons encoding for DDP1.

the assembly of DDP1 (TIMM8a) and TIMM13 in the mitochondria [28]. The discovery of the molecular defect allowed a more refined description of the clinical phenotype of the Mohr–Tranebjaerg syndrome. In addition to sensorineural deafness, the principal neurologic symptom, many patients develop dystonia, ataxia, spasticity, visual impairment, fractures, and mental deterioration. These clinical symptoms are highly variable and present in different combinations in individual pedigrees [12, 29–32]. This variability in the neurological impairment is exemplified by the six patients reported in this paper. The deafness and associated speech delay was uniformly present in all boys. However, the dystonia and spasticity that developed in patient 3 and that led gradually to general wasting and death were not present in other patients. The reason for the variability in the clinical symptoms is unknown and not related to the extent of deletion. In concordance with our observation, no relation between the extent of deletion and the severity of the symptoms was reported by Richter et al. [26]. Patients 1 and 2, both presenting with severe psychomotor retardation, extensive hearing loss, and muscle wasting, have a deletion of approximately 30 kb, whereas patient 6 with a 196-kb deletion that includes not only most of the *BTK* gene and the *TIMM8A* gene but also the *TAF7L* and *DRP2* genes (Fig. 1) developed a substantially milder phenotype. The *TAF7L* gene encodes a transcription factor that belongs to the TATA-binding-protein (TBP) associated factors (TAFs). Together with TBP, TAF7L forms the testis-specific version of the general transcription factor TFIID and is involved in male germ-cell differentiation [33]. Male mice with an inactivated *Taf7l* gene were recently reported to produce abnormal sperm [34]. The *DRP2* gene encodes dystrophin related protein 2, a member of the dystrophin family that is exclusively expressed in the nervous system, where its function is not fully understood [35]. Interestingly, patient 6, who lacks both TAF7L and DRP2 at the age of 13 years, has not developed signs of dystonia, and his neurological problems are limited to hearing loss. He is prepubertal and no information is available as to the quantity or quality of his sperm count. The mechanism(s) leading to the sensorineural deafness/dystonia remains unclear, but a specific subset of calcium-binding carriers, the aspartate/glutamate carriers, citrin and aralar1, depend on TIMM8a for import [25]. The deficient assembly of membrane transport proteins, discovered by Roesch et al. when studying a cell line derived from a Mohr–Tranebjaerg patient with a known mutation in *TIMM8A* [24], was also observed in a fibroblast line generated from patient 3 with the deletion of part of *BTK* and the entire *TIMM8A* gene; the TIMM8a–TIMM13 complex could not be assembled. The consequences of this defect on mitochondrial transport mechanism leading to the clinical symptoms are not completely understood. In

concordance with previous studies, our analyses showed that loss of TIMM8a–TIMM13 complex does not affect the OXPHOS system significantly [24, 36]: both the quantity and the composition of the respiratory chain complexes in isolated muscle and liver mitochondria from patient 3 were normal. In the three patients evaluated, the activities of the respiratory chain complexes I+III in isolated platelets were decreased, while the activities of other respiratory chain complexes were normal. It has been postulated that the activities of some respiratory chain complexes may be affected by decreased NADH levels in the mitochondria as result of a compromised aspartate–malate NADH shuttle and lower TIMM13 biogenesis [25]. Unlike other mitochondrial diseases that are caused by defects in the energy generation system of mitochondria, the deafness/dystonia syndrome must have a different, not yet elucidated, mechanism, as the OXPHOS system is intact in the Mohr–Tranebjaerg syndrome.

## Conclusions

The detailed genetic analysis of the contiguous deletion syndrome affecting the X22q region provided the explanation for the rare combination of agammaglobulinemia and neurological symptoms. Unexpectedly, the additional loss of the *TAF7L* and the *DRP2* genes observed in one of our patients and recently in two twins [18] did not result in a characteristic phenotype, although we expect to discover not yet recognized deficiencies, for example, abnormal sperm counts in adult males lacking TAF7L.

**Acknowledgements** We wish to thank Dr Zachová and Dr Groh from University Hospital Motol, Prague, Czech Republic and Dr Einberg from Tallinn Children's Hospital, Estonia taking care for the above-mentioned boys, for their willingness to share data on these patients, and Dr. Chudoba from University Hospital Motol, Prague, for skin fibroblasts cultivation.

This work was supported by The Swedish Science Council, the Wallenberg Foundation, The European Union (EURO-POLICY-PIID; SP23-CT-2005-006411), grant MDA 03018774 and grant MSM 0021620812 from the Ministry of Education of the Czech Republic, NIH grant HD17427 and The Jeffrey Modell Foundation.

## References

1. Bruton OC. Agammaglobulinemia. *Pediatrics*. 1952;9 (6):722–8.
2. Rich R, Fleisher TA. *Clinical immunology, principles and practice*. St. Louis, MO: Mosby; 2001.
3. Ochs HD, Smith CI. X-linked agammaglobulinemia. A clinical and molecular analysis. *Medicine (Baltimore)*. 1996;75 (6):287–99.
4. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM), Johns Hopkins University, Baltimore, MD, MIM Number: 300300, date last edited: 4/11/2007. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>. Cited May 3, 2007.

5. Quartier P, Debre M, De Blic J, de Sauverzac R, Sayegh N, Jabado N, et al. Early and prolonged intravenous immunoglobulin replacement therapy in childhood agammaglobulinemia: a retrospective survey of 31 patients. *J Pediatr*. 1999;134 (5):589–96.
6. Vetrie D, Vorechovsky I, Sideras P, Holland J, Davies A, Flinter F, et al. The gene involved in X-linked agammaglobulinemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature*. 1993;361 (6409):226–33.
7. Tsukada S, Saffran DC, Rawlings DJ, Parolini O, Allen RC, Klisak I, et al. Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell*. 1993;72 (2):279–90.
8. Smith CI, Baskin B, Humire-Greiff P, Zhou JN, Olsson PG, Maniar HS, et al. Expression of Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase gene, BTK, is selectively down-regulated in T lymphocytes and plasma cells. *J Immunol*. 1994;152 (2):557–65.
9. Valiaho J, Smith CI, Vihinen M. BTKbase: the mutation database for X-linked agammaglobulinemia. *Hum Mutat*. 2006;27 (12):1209–17.
10. Lindvall JM, Blomberg KE, Valiaho J, Vargas L, Heinonen JE, Berglof A, et al. Bruton's tyrosine kinase: cell biology, sequence conservation, mutation spectrum, siRNA modifications, and expression profiling. *Immunol Rev*. 2005;203:200–15.
11. Vorechovsky I, Vetrie D, Holland J, Bentley DR, Thomas K, Zhou JN, et al. Isolation of cosmid and cDNA clones in the region surrounding the BTK gene at Xq21.3-q22. *Genomics*. 1994;21 (3):517–24.
12. Jin H, May M, Tranebjaerg L, Kendall E, Fontan G, Jackson J, et al. A novel X-linked gene, DDP, shows mutations in families with deafness (DFN-1), dystonia, mental deficiency and blindness. *Nat Genet*. 1996;14 (2):177–80.
13. Tranebjaerg L, Hamel BC, Gabreels FJ, Renier WO, Van Ghelue M. A de novo missense mutation in a critical domain of the X-linked DDP gene causes the typical deafness-dystonia-optic atrophy syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2000;8 (6):464–7.
14. Mohr J, Mageroy K. Sex-linked deafness of a possibly new type. *Acta Genet Stat Med*. 1960;10:54–62.
15. Tranebjaerg L, Lou H, Andresen J. New X-linked syndrome with apraxia, ataxia, and mental deficiency: clinical, cytogenetic and neuropsychological studies in two Danish families. *Am J Med Genet*. 1992;43 (1–2):498–504.
16. Tranebjaerg L, Schwartz C, Eriksen H, Andreasson S, Ponjavic V, Dahl A, et al. A new X linked recessive deafness syndrome with blindness, dystonia, fractures, and mental deficiency is linked to Xq22. *J Med Genet*. 1995;32 (4):257–63.
17. Jin H, Kendall E, Freeman TC, Roberts RG, Vetrie DL. The human family of Deafness/Dystonia peptide (DDP) related mitochondrial import proteins. *Genomics*. 1999;61 (3):259–67.
18. Jyonouchi H, Geng L, Toruner GA, Vinekar K, Feng D, Fitzgerald-Bocarsly P. Monozygous twins with a microdeletion syndrome involving BTK, DDP1, and two other genes; evidence of intact dendritic cell development and TLR responses. *Eur J Pediatr* 2007 (in press).
19. Vorechovsky I, Vihinen M, de Saint Basile G, Honsova S, Hammarstrom L, Muller S, et al. DNA-based mutation analysis of Bruton's tyrosine kinase gene in patients with X-linked agammaglobulinemia. *Hum Mol Genet*. 1995;4 (1):51–8.
20. Siebert PD, Chenchik A, Kellogg DE, Lukyanov KA, Lukyanov SA. An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res*. 1995;23 (6):1087–8.
21. Fox JE, Reynolds CC, Boyles JK. Studying the platelet cytoskeleton in Triton X-100 lysates. *Methods Enzymol*. 1992;215:42–58.
22. Makinen MW, Lee CP. Biochemical studies of skeletal muscle mitochondria. I. Microanalysis of cytochrome content, oxidative and phosphorylative activities of mammalian skeletal muscle mitochondria. *Arch Biochem Biophys*. 1968;126 (1):75–82.
23. Rustin P, Lebidois J, Chretien D, Bourgeron T, Piechaut JF, Rotig A, et al. Endomyocardial biopsies for early detection of mitochondrial disorders in hypertrophic cardiomyopathies. *J Pediatr*. 1994;124 (2):224–8.
24. Roesch K, Curran SP, Tranebjaerg L, Koehler CM. Human deafness dystonia syndrome is caused by a defect in assembly of the DDP1/TIMM8a-TIMM13 complex. *Hum Mol Genet*. 2002;11 (5):477–86.
25. Roesch K, Hynds PJ, Varga R, Tranebjaerg L, Koehler CM. The calcium-binding aspartate/glutamate carriers, citrin and aralar1, are new substrates for the DDP1/TIMM8a-TIMM13 complex. *Hum Mol Genet*. 2004;13 (18):2101–11.
26. Richter D, Conley ME, Rohrer J, Myers LA, Zahradka K, Kelecic J, et al. A contiguous deletion syndrome of X-linked agammaglobulinemia and sensorineural deafness. *Pediatr Allergy Immunol*. 2001;12 (2):107–11.
27. Conley ME, Notarangelo LD, Etzioni A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies). *Clin Immunol*. 1999;93 (3):190–7.
28. Koehler CM, Leuenberger D, Merchant S, Renold A, Junne T, Schatz G. Human deafness dystonia syndrome is a mitochondrial disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96 (5):2141–6.
29. Orstavik KH, Orstavik RE, Eiklid K, Tranebjaerg L. Inheritance of skewed X chromosome inactivation in a large family with an X-linked recessive deafness syndrome. *Am J Med Genet*. 1996;64 (1):31–4.
30. Wallace DC, Murdock DG. Mitochondria and dystonia: the movement disorder connection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96 (5):1817–9.
31. Tranebjaerg L, Jensen PK, van Ghelue M. X-linked recessive deafness-dystonia syndrome (Mohr-Tranebjaerg syndrome). *Adv Otorhinolaryngol*. 2000;56:176–80.
32. Ujike H, Tanabe Y, Takehisa Y, Hayabara T, Kuroda S. A family with X-linked dystonia-deafness syndrome with a novel mutation of the DDP gene. *Arch Neurol*. 2001;58 (6):1004–7.
33. Pointud JC, Mengus G, Brancorsini S, Monaco L, Parvinen M, Sassone-Corsi P, et al. The intracellular localisation of TAF7L, a paralogue of transcription factor TFIID subunit TAF7, is developmentally regulated during male germ-cell differentiation. *J Cell Sci*. 2003;116 (Pt 9):1847–58.
34. Cheng Y, Buffone MG, Kouadio M, Goodheart M, Page DC, Gerton GL, et al. Abnormal sperm in mice lacking the Taf7l gene. *Mol Cell Biol*. 2007;27 (7):2582–9.
35. Jin H, Tan S, Hermanowski J, Bohm S, Pacheco S, McCauley JM, et al. The dystrotelin, dystrophin and dystrobrevin superfamily: new paralogues and old isoforms. *BMC Genomics*. 2007;8:19.
36. Binder J, Hofmann S, Kreisel S, Wohrle JC, Bazner H, Krauss JK, et al. Clinical and molecular findings in a patient with a novel mutation in the deafness-dystonia peptide (DDP1) gene. *Brain*. 2003;126 (Pt 8):1814–20.

## Mutations in *TMEM76*\* Cause Mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo C Syndrome)

Martin Hřebíček, Lenka Mrázová, Volkan Seyrantepe, Stéphanie Durand, Nicole M. Roslin, Lenka Nosková, Hana Hartmannová, Robert Ivánek, Alena Čížková, Helena Poupětová, Jakub Sikora, Jana Uřinová, Viktor Stránecký, Jiří Zeman, Pierre Lepage, David Roquis, Andrei Verner, Jérôme Ausseil, Clare E. Beesley, Irène Maire, Ben J. H. M. Poorthuis, Jiddeke van de Kamp, Otto P. van Diggelen, Ron A. Wevers, Thomas J. Hudson, T. Mary Fujiwara, Jacek Majewski, Kenneth Morgan, Stanislav Kmoch,<sup>†</sup> and Alexey V. Pshezhetsky

Mucopolysaccharidosis IIIC (MPS IIIC, or Sanfilippo C syndrome) is a lysosomal storage disorder caused by the inherited deficiency of the lysosomal membrane enzyme acetyl-coenzyme A:α-glucosaminide *N*-acetyltransferase (*N*-acetyltransferase), which leads to impaired degradation of heparan sulfate. We report the narrowing of the candidate region to a 2.6-cM interval between *D8S1051* and *D8S1831* and the identification of the transmembrane protein 76 gene (*TMEM76*), which encodes a 73-kDa protein with predicted multiple transmembrane domains and glycosylation sites, as the gene that causes MPS IIIC when it is mutated. Four nonsense mutations, 3 frameshift mutations due to deletions or a duplication, 6 splice-site mutations, and 14 missense mutations were identified among 30 probands with MPS IIIC. Functional expression of human *TMEM76* and the mouse ortholog demonstrates that it is the gene that encodes the lysosomal *N*-acetyltransferase and suggests that this enzyme belongs to a new structural class of proteins that transport the activated acetyl residues across the cell membrane.

Heparan sulfate is a polysaccharide found in proteoglycans associated with the cell membrane in nearly all cells. The lysosomal membrane enzyme, acetyl-coenzyme A (CoA):α-glucosaminide *N*-acetyltransferase (*N*-acetyltransferase) is required to *N*-acetylate the terminal glucosamine residues of heparan sulfate before hydrolysis by the α-*N*-acetyl glucosaminidase. Since the acetyl-CoA substrate would be rapidly degraded in the lysosome,<sup>1</sup> *N*-acetyltransferase employs a unique mechanism, acting both as an enzyme and a membrane channel, and catalyzes the transmembrane acetylation of heparan sulfate.<sup>2</sup> The mechanism by which this is achieved has been the topic of considerable investigation, but, for many years, the isolation and cloning of *N*-acetyltransferase has been hampered by its low tissue content, instability, and hydrophobic nature.<sup>3–5</sup>

Genetic deficiency of *N*-acetyltransferase causes mucopolysaccharidosis IIIC (MPS IIIC [MIM 252930], or Sanfilippo syndrome C), a rare autosomal recessive lysosomal disorder of mucopolysaccharide catabolism.<sup>6–8</sup> MPS IIIC is clinically similar to other subtypes of Sanfilippo syn-

drome.<sup>9</sup> Patients manifest symptoms during childhood with progressive and severe neurological deterioration causing hyperactivity, sleep disorders, and loss of speech accompanied by behavioral abnormalities, neuropsychiatric problems, mental retardation, hearing loss, and relatively minor visceral manifestations, such as mild hepatomegaly, mild dwarfism with joint stiffness and biconvex dorsolumbar vertebral bodies, mild coarse faces, and hypertrichosis.<sup>7</sup> Most patients die before adulthood, but some survive to the 4th decade and show progressive dementia and retinitis pigmentosa. Soon after the first 3 patients with MPS IIIC were described by Kresse et al.,<sup>6</sup> Klein et al.<sup>8,10</sup> reported a similar deficiency in 11 patients who had received the diagnosis of Sanfilippo syndrome, therefore suggesting that the disease is a relatively frequent subtype. The birth prevalence of MPS IIIC in Australia,<sup>11</sup> Portugal,<sup>12</sup> and the Netherlands<sup>13</sup> has been estimated to be 0.07, 0.12, and 0.21 per 100,000, respectively.

The putative chromosomal locus of the MPS IIIC gene was first reported in 1992. By studying two siblings who received the diagnosis of MPS IIIC and had an apparently

From the Institute for Inherited Metabolic Disorders (M.H.; L.M.; L.N.; H.H.; R.I.; A.Č.; H.P.; J.S.; J.U.; V. Stránecký; J.Z.; S.K.) and Center for Applied Genomics (R.I.; A.Č.; V. Stránecký; J.Z.; S.K.), Charles University 1st School of Medicine, and Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic (R.I.), Prague; Hôpital Sainte-Justine and Département de Pédiatrie (V. Seyrantepe; S.D.; J.A.; A.V.P.) and Biochimie (A.V.P.), Université de Montréal, and Research Institute of the McGill University Health Centre (N.M.R.; T.J.H.; T.M.F.; K.M.), McGill University and Genome Quebec Innovation Centre (P.L.; D.R.; A.V.; T.J.H.; J.M.), and Departments of Human Genetics (T.J.H.; T.M.F.; J.M.; K.M.), Medicine (T.J.H.; T.M.F.; K.M.), and Anatomy and Cell Biology (A.V.P.), McGill University, Montreal; Biochemistry, Endocrinology & Metabolism Unit, UCL Institute of Child Health, London (C.E.B.); Hôpital Debrousse, Lyon, France (I.M.); Department of Medical Biochemistry, Academic Medical Center UVA (B.J.H.M.P.), and Department of Clinical Genetics, VU University Medical Center (J.v.d.K.), Amsterdam; Department of Clinical Genetics, Erasmus University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands (O.P.v.D.); and Laboratory of Pediatrics and Neurology, University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands (R.A.W.)

Received June 8, 2006; accepted for publication August 8, 2006; electronically published September 8, 2006.

Address for correspondence and reprints: Dr. Alexey V. Pshezhetsky, Service de Génétique Médicale, Hôpital Sainte-Justine, 3175 Côte Sainte-Catherine, Montreal, Quebec H3T 1C5, Canada. E-mail: alexei.pshezhetski@umontreal.ca

\* Footnote added in proof: the gene name has been changed to *HGSNAT*.

<sup>†</sup> S.K. has led the Prague team.

*Am. J. Hum. Genet.* 2006;79:807–819. © 2006 by The American Society of Human Genetics. All rights reserved. 0002-9297/2006/7905-0004\$15.00

balanced Robertsonian translocation, Zaremba et al.<sup>14</sup> suggested that the mutant gene may be located in the pericentric region of either chromosome 14 or chromosome 21, but no further confirmation of this finding was provided. Previously, we performed a genomewide scan on 27 patients with MPS IIIC and 17 unaffected family members, using 392 highly informative microsatellite markers with an average interspacing of 10 cM. For chromosome 8, the scan showed an apparent excess of homozygosity in patients compared with their unaffected relatives.<sup>15</sup> Additional genotyping of 38 patients with MPS IIIC for 22 markers on chromosome 8 identified 15 consecutive markers (from *D8S1051* to *D8S2332*) in an 8.3-cM interval for which the genotypes of affected siblings were identical in state. A maximum multipoint LOD score of 10.6 was found at marker *D8S519*, suggesting that this region includes the locus for MPS IIIC.<sup>15</sup> Recently, localization of the MPS IIIC causative gene on chromosome 8 was confirmed by microcell-mediated chromosome transfer in cultured skin fibroblasts of patients with MPS IIIC.<sup>16</sup>

Here, we report the results of linkage analyses that narrowed the candidate region for MPC IIIC to a 2.6-cM interval between *D8S1051* and *D8S1831* and the identification of the *TMEM76* gene, located within the candidate region, as the gene that codes for the lysosomal *N*-acetyltransferase and, when mutated, is responsible for MPS IIIC.

## Material and Methods

### Families

In Montreal, 33 affected individuals and 35 unaffected relatives comprising 15 families informative for linkage were genotyped. The families came from Europe, North Africa, and North America. An additional 27 affected individuals and 9 unaffected relatives in uninformative pedigrees, as well as 40 controls, were also genotyped. Eleven of these families and the controls have been reported elsewhere.<sup>15</sup> In addition, 54 individuals from four MPS IIIC-affected families from the Czech Republic were studied in Prague (fig. 1). One family had two affected brothers, whereas the remaining three families each had one affected individual. The families came from various regions of the Czech Republic and were not related within the four most-recent generations. The diagnosis for affected individuals was confirmed by the measurement of *N*-acetyltransferase activity in cultured skin fibroblasts or white blood cells.

### Genotyping

The samples in Montreal were genotyped for 22 microsatellite markers in the pericentromeric region of chromosome 8 spanning 8.9 cM on the Rutgers map, version 2.0.<sup>17</sup> The genotyping was performed as described by Mira et al.<sup>18</sup> at the McGill University and Genome Quebec Innovation Centre on an ABI 3730xl DNA Analyzer platform (Applied Biosystems). Alleles were assigned using Genotyper, version 3.6 (Applied Biosystems). The random-error model of SimWalk2, version 2.91,<sup>19,20</sup> was used to detect potential genotyping errors, with an overall error rate of 0.025. Nine genotypes for which the posterior probability of being incorrect was >0.5 were removed before subsequent analyses. In

addition, nine genotypes for one marker in one family were removed because of a suspected microsatellite mutation. The samples from the Czech Republic were genotyped in Prague for 18 microsatellite markers in an 18.7-cM region that includes the 8.9-cM region mentioned above. The genotyping was performed on an LI-COR IR2 sequencer by use of Saga genotyping software (Li-Cor) as described elsewhere.<sup>21</sup> Genotypes were screened for errors by use of the PedCheck program.<sup>22</sup>

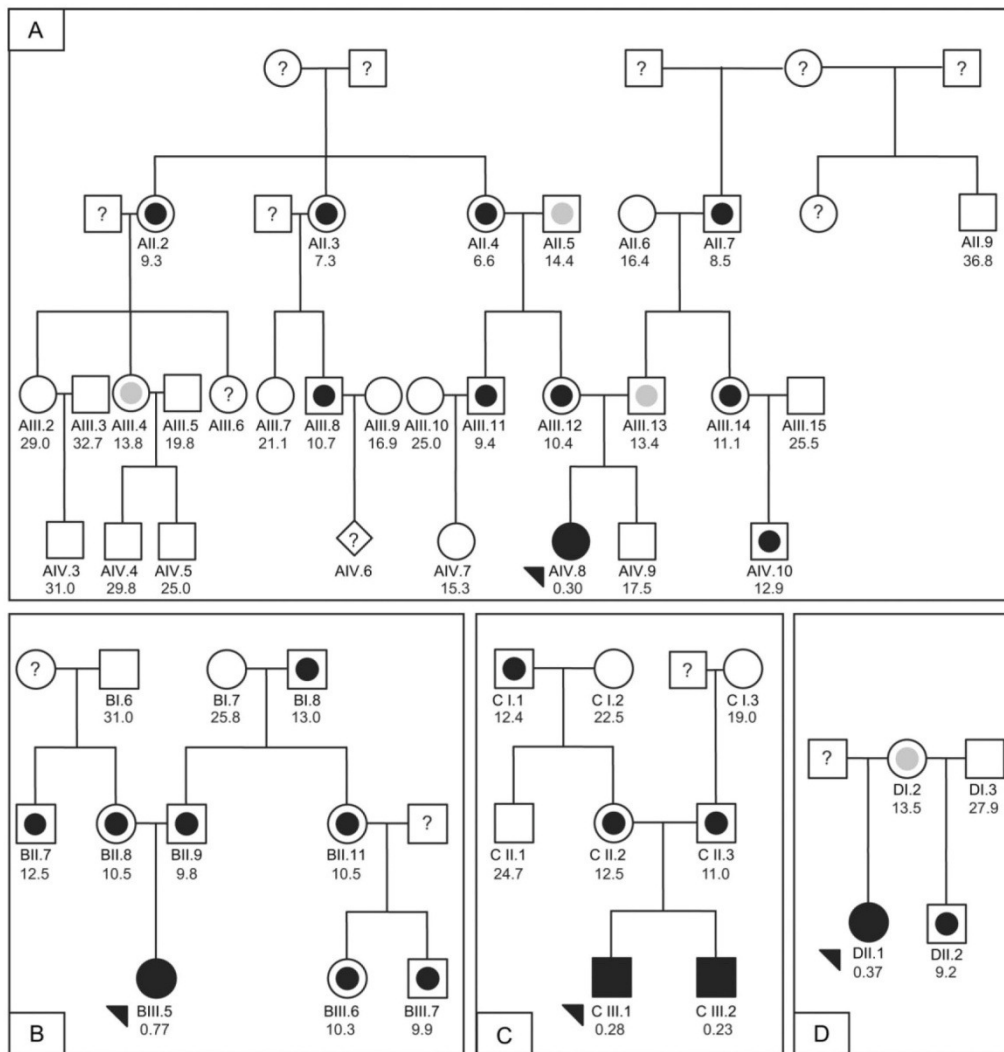
### Linkage Analysis

For the families genotyped in Montreal, multipoint linkage analysis was performed using the Markov chain–Monte Carlo (MCMC) method implemented in SimWalk2, version 2.91,<sup>19</sup> since one pedigree was too large to be analyzed by exact computation. A fully penetrant autosomal recessive parametric model was used with a disease-allele frequency of 0.0045. Marker-allele frequencies were estimated by counting alleles in the available parents of patients with MPS IIIC and in control individuals. To check the consistency of the results, the MCMC analysis was repeated four times.

*N*-acetyltransferase activity was measured in all participants of the four families from the Czech Republic.<sup>23</sup> Individuals were classified as affected, carriers, or unaffected on the basis of the results of this assay. Mean affected and carrier activities were determined from the five affected individuals and their seven obligate heterozygote parents, respectively, whereas the mean control activity was determined from a sample of 89 unrelated individuals. Four individuals were unable to be classified because their values were within 2 SDs of the means of both the control and carrier groups. Multipoint linkage analysis was performed using a codominant model with a penetrance of 0.99 and a phenocopy rate of 0.01, to account for the possibility of misclassification or genotyping errors. The same disease-allele frequency of 0.0045 was used. Marker-allele frequencies were estimated by counting all genotyped individuals. Exact multipoint linkage analysis was run on 18 microsatellite markers by use of Allegro 1.2c,<sup>24</sup> which was also used to infer haplotypes.

### Gene-Expression Analysis

For each of 32 genes located in the candidate interval, a single 5'-amino-modified 40-mer oligonucleotide probe (Illumina) was spotted in quadruplicate on aminosilane-modified microscopic slides and was immobilized using a combination of baking and UV cross-linking. Total RNA (250–1,000 ng) from white blood cells of two patients with MPS IIIC (patients AIV.8 and BIII.5) and four healthy individuals were amplified using the SenseAmp plus RNA Amplification Kit (Genisphere) and were reverse transcribed using 300 ng of poly(A)-tailed mRNA. Reverse transcription and microarray detection were done using the Array 900 Expression Detection Kit (Genisphere) according to the manufacturer's protocol. The two patient samples and four control samples were analyzed in dye-swap mode, in two replicates of each mode. The hybridized slides were scanned with a GenePix 4200A scanner (Molecular Devices), with photomultiplier gains adjusted to obtain the highest-intensity unsaturated images. Data analysis was performed in the R statistical environment (The R Project for Statistical Computing, version 2.2.1) by use of the Linear Models for Microarray Data package (Limma, version 2.2.0).<sup>25</sup> Raw data were processed using loess normalization and a moving minimum background correction on individual arrays and quantile



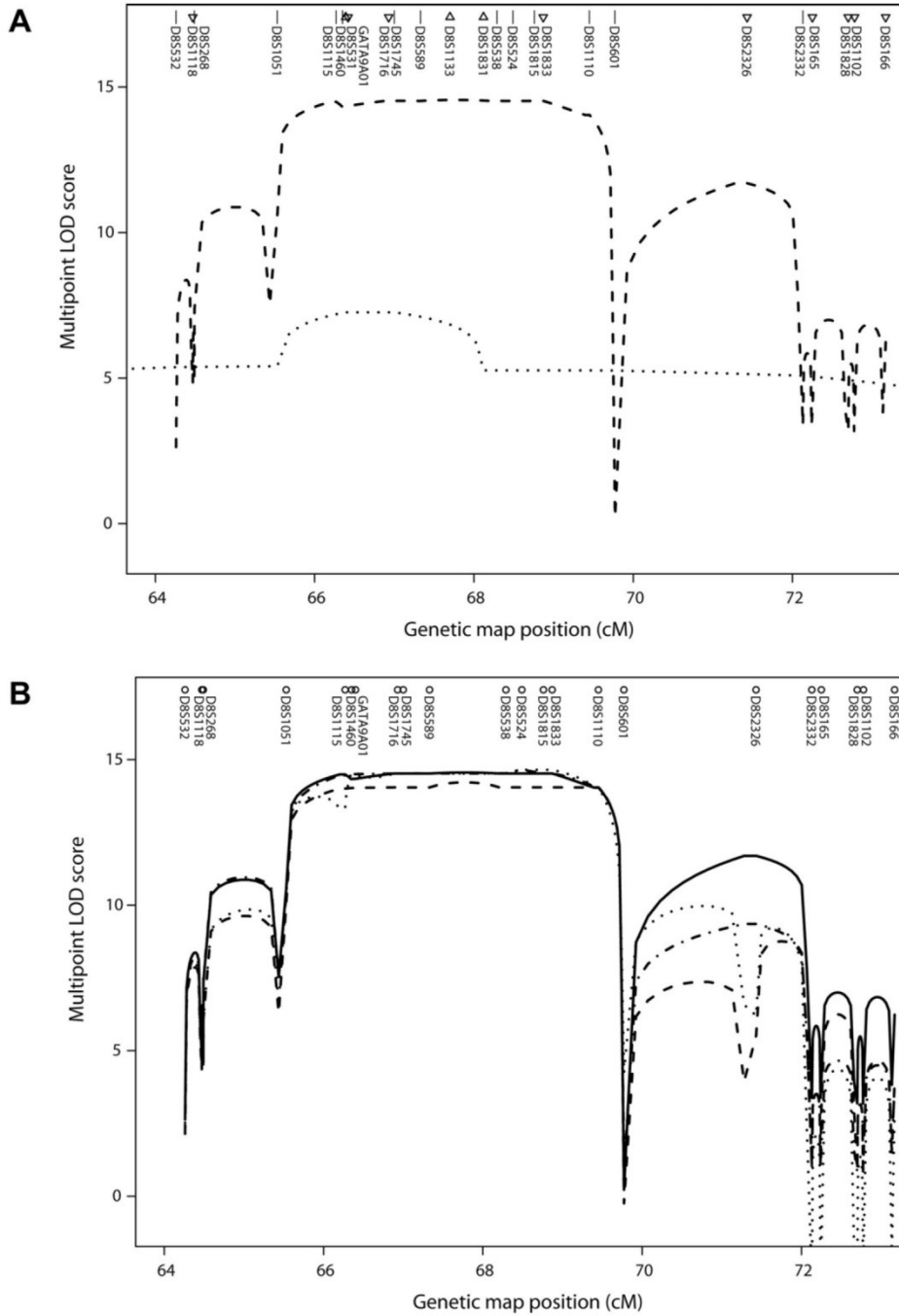
**Figure 1.** Four families from the Czech Republic used in the linkage and mutation analyses. Fully blackened symbols indicate individuals with MPS IIIC; arrowheads indicate probands. Measurements in seven obligate heterozygotes from these pedigrees (mean  $\pm$  SD 11.6  $\pm$  1.5 nmol/h/mg) and 89 controls not known to be related to members of the pedigree (mean  $\pm$  SD 24.4  $\pm$  5.7 nmol/h/mg) were used to establish *N*-acetyltransferase activity ranges for heterozygotes (symbols with blackened inner circle) and normal homozygotes (open symbols). An individual was assigned to a class if his or her enzyme activity was within 2 SDs of the class, unless the value was within the overlap of the upper end of the obligate heterozygotes and the lower end of the controls. Individuals with values within the open interval 13.0–14.6 nmol/h/mg were classified as unknown (symbols with gray inner circle). A symbol with a question mark (?) indicates that no material was available for the enzyme assay. DNA was available for individuals with ID numbers, and *N*-acetyltransferase activity measurements in white blood cells are shown below the ID numbers.

normalization between arrays. The correlation between four duplicate spots per gene on each array was used to increase the robustness. A linear model was fitted for each gene given a series of arrays by use of the *lmFit* function. The empirical Bayes method<sup>26</sup> was used to rank the differential expression of genes by use of the *eBayes* function. Correction for multiple testing was performed using the Benjamini and Hochberg false-discovery-

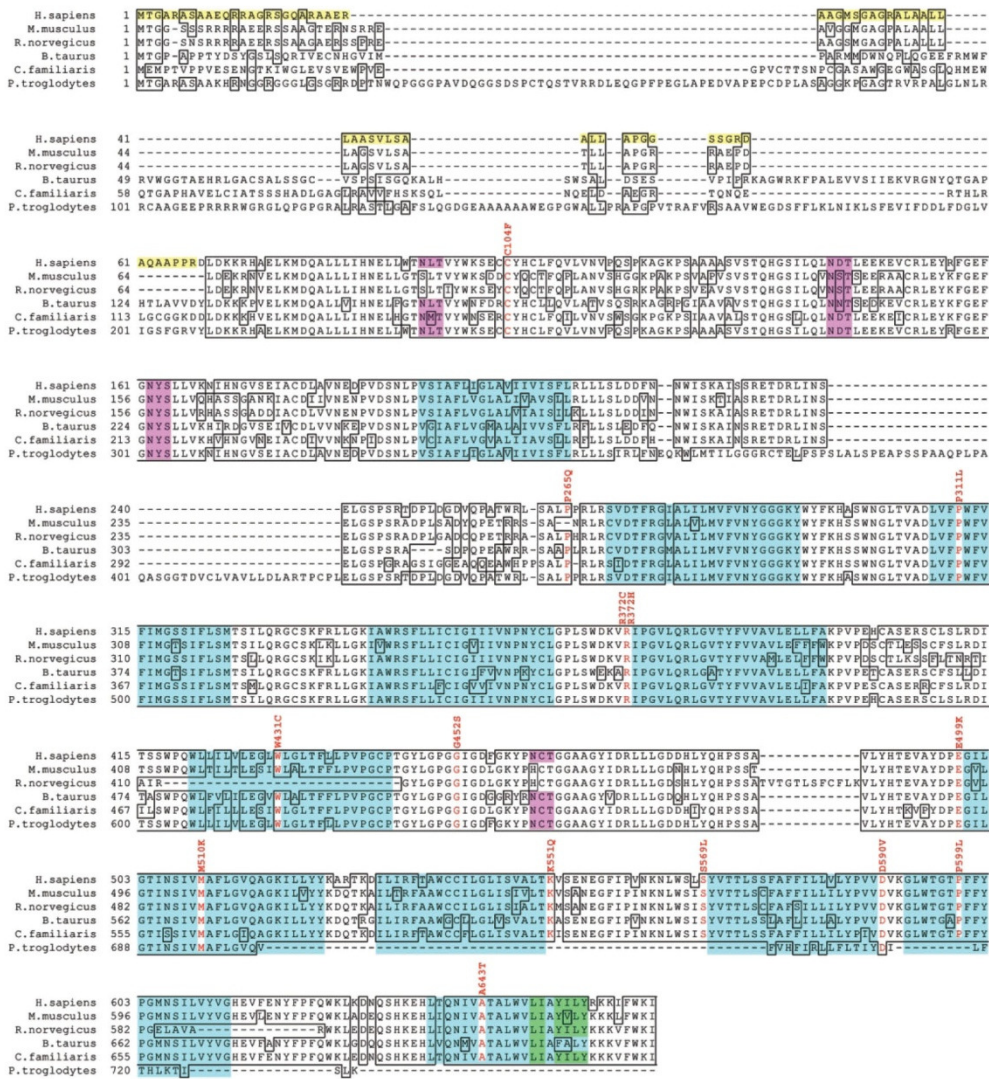
rate method.<sup>27</sup> We considered genes to be differentially expressed if the adjusted *P* value was  $<.01$ .

#### *DNA and RNA Isolation and Sequencing*

Cultured skin fibroblasts from patients with MPS IIIC and normal controls were obtained from cell depositories (Hôpital Debrousse,



**Figure 2.** Multipoint linkage analysis of MPS IIIC on chromosome 8. *A*, Multipoint LOD scores in an 8.9-cM interval from two sets of families. Symbols above the marker names indicate the map position. Marker names are listed in the correct order but may be displaced from the symbols for visibility. The dashed line is based on families genotyped in Montreal, and the dotted line on families genotyped in Prague. Straight lines next to marker names indicate that the markers were typed in both data sets. Triangles pointing down indicate markers typed only in the Montreal data set, and triangles pointing up indicate markers typed only in the Prague data set. For the Montreal data, the SimWalk2 run with the highest likelihood is shown. *TMEM76* lies between *D8S1115* and *D8S1460*, and, according to the March 2006 freeze of the human genome sequence from the University of California–Santa Cruz Genome Browser,<sup>30</sup> the order is *D8S1115*–(500 kb)–*TMEM76*–(800 kb)–centromere–(200 kb)–*D8S1460*. *B*, Multipoint LOD scores from the Montreal data from four runs of SimWalk2, version 2.91,<sup>19</sup> showing the variation between runs.

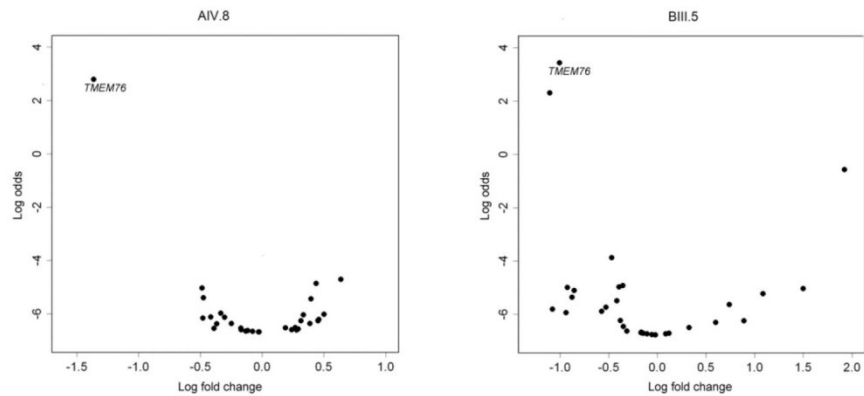


**Figure 3.** Predicted amino acid sequence of the TMEM76 protein. Amino acid sequence alignment of *Homo sapiens* TMEM76 with orthologs from *Mus musculus* (cloned sequence), *Canis familiaris* (GenBank accession number XP\_539948.2), *Bos taurus* (XP\_588978.2), *Rattus norvegicus* (XP\_341451.2), and *Pan troglodytes* (XP\_519741.1) by use of BLAST. All cDNA sequences are predicted except the sequence for *M. musculus*. The identical residues are boxed, the residues with missense mutations in patients with MPS III C are shown in red, and the amino acid changes are indicated above the sequence. The first 67 aa of the human sequence shown as black on yellow comprise the predicted signal peptide. The predicted transmembrane domains in the human sequence are shown as black on turquoise. The topology model<sup>5-7</sup> strongly predicts that the N-terminus is inside the lysosome and the C-terminus is outside. Four predicted N-glycosylation sites are shown as black on pink, and the predicted motifs for the lysosomal targeting, as black on green.

France; NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository; Montreal Children's Hospital, Canada; and Department of Clinical Genetics, Erasmus Medical Center, The Netherlands). Blood samples from patients with MPS III C, their relatives, and controls were collected with ethics approval from the appropriate institutional review boards. DNA from blood or cultured skin fibroblasts was extracted using the PureGene kit (Gentra Systems). Total RNA

from cultured skin fibroblasts and pooled tissues (spleen, liver, kidney, heart, lung, and brain) of a C57BL/6J mouse was isolated using Trizol (Invitrogen), and first-strand cDNA synthesis was prepared with SuperScript II (Invitrogen). DNA fragments containing *TMEM76* exons and adjacent regions (~40 bp from each side; primer sequences are shown in appendix A) were amplified by PCR from genomic DNA and were purified with Montage PCR96



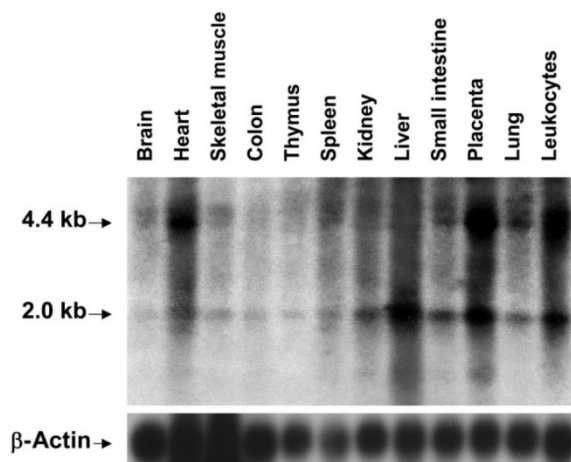


**Figure 4.** Volcano plot of genes located within the MPS IIIC candidate region, showing significantly reduced expression of the *TMEM76* gene in white blood cells of two patients with MPS IIIC: AIV.8 and BIII.5. The natural logarithm of the probability that the gene is differentially expressed (Log odds) is plotted as a function of the logarithm of the gene-expression  $\log_2$  fold change (Log fold change) between the patient and control samples.

filter plates (Millipore). Each sequencing reaction contained 2  $\mu$ l of purified PCR product, 5.25  $\mu$ l of H<sub>2</sub>O, 1.75  $\mu$ l of 5  $\times$  sequencing buffer, 0.5  $\mu$ l of 20  $\mu$ M primer, and 0.5  $\mu$ l of Big Dye Terminator v3.1 (all from Applied Biosystems). In Montreal, PCR products were analyzed using an ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems). In Prague, PCR products were analyzed on an ALFexpress DNA sequencer (Pharmacia), as described elsewhere.<sup>28</sup> Included in the sequencing analysis were 30 probands with MPS IIIC who were considered unrelated and 105 controls. The controls were unrelated CEPH individuals, and amplified DNAs were combined in pools of two before sequencing.

#### Northern Blotting

A 12-lane multiple-tissue northern blot containing 1  $\mu$ g of poly A+ RNA per lane from various human tissues (BD Biosciences Clontech) was hybridized with the 220-bp cDNA fragment corresponding to exons 8–10 of the human *TMEM76* gene or the entire cDNA of human  $\beta$ -actin labeled with [<sup>32</sup>P]-dCTP by random priming with the MegaPrime labeling kit (Amersham). Prehybridization of the blot was performed at 68°C for 30 min in ExpressHyb (Clontech). The denatured probes were added directly to the prehybridization solution and were incubated at 68°C for 1 h. The blots were washed twice for 30 min at room temperature with 2  $\times$  sodium chloride–sodium citrate (SSC) solution and 0.05% SDS and once for 40 min at 50°C with 0.1  $\times$  SSC and 0.1% SDS and were exposed to a BioMax film for 48 h.



**Figure 5.** Northern-blot analysis of *TMEM76* mRNA in human tissues. A 12-lane blot containing 1  $\mu$ g of poly A+ RNA per lane from various adult human tissues was hybridized with a [<sup>32</sup>P]-labeled 220-bp cDNA fragment corresponding to exons 8–10 of the *TMEM76* gene or  $\beta$ -actin, as described in the Material and Methods section.

#### Mouse and Human *TMEM76* cDNA Cloning

Mouse coding sequence was amplified by PCR (forward primer 5'-GAATTCATGACGGGCGGGTTCGAGC-3'; reverse primer 5'-ATATGTCGACGATTTTCCAAAACAGCTTC-3') and was cloned into pCMV-Script, pCMV-Tag4A (Stratagene), and pEGFP-N3 (BD Biosciences Clontech) vectors by use of the *Eco*RI and *Sal*I restriction sites of the primers. The cloned sequence was identical to GenBank accession number AK152926.1, except that an "AT" was needed to complete an alternate ATG initiation codon. GenBank accession number AK149883.1 provides what we consider to be the complete clone and encodes a 656-aa protein. The GenBank sequences differ by 1 aa and three silent substitutions.

A 1,907-bp fragment of the human *TMEM76* cDNA (nt +75 to +1992) was amplified using Platinum High Fidelity *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), a sense primer with an *Hind*III site (5'-AAGCTTGGCGGCGGCATGAG-3'), and an antisense primer with a *Sal*I site (5'-GTCGACCTCAGTGGGAGCCATCAGATTTT-3') and was cloned into pCMV-Script expression vector (Stratagene). Since high GC content (85%) of the 5' region of human *TMEM76* cDNA prevented its amplification by PCR, a synthetic 186-bp codon-optimized double-stranded oligonucleotide fragment (5'-AAGCTTATGACCGGAGCGAGGGCAAGCGCCGCGC-

AACAAAGAAGAGCCGGACGGTCCGGCCAGGCTAGGGCCGC-AGAGCGAGCTGCTGGCATGTCAGGTGCAGGGCGCGCACTTGCCGCCTTGCTGCTCGCCGCGAGTGTGCTGAGCGCTGCCCTCCTGGCTCCCGGAGGCTCTCCGGGCGGGAC-3') corresponding to nt +1 to +186 of human *TMEM76* cDNA was purchased from BioS&T. A 177-bp 5' fragment was combined with rest of the cDNA by use of *HindIII* and *SapI* sites. The cloned sequence is identical to GenBank accession number XM\_372038.4 from nt 131 to nt 1946, except for the presence of SNP *rs1126058*.

#### Cell Culture and Transfection

Skin fibroblasts and COS-7 cells were cultured in Eagle's minimal essential medium (Invitrogen) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (Invitrogen) and were transfected with the full-size mouse *Tmem76* (*Hgsnat*) coding sequence subcloned into pCMV-Script, pCMV-Tag4A, and pEGFP-N3 vectors or with the full-size human *TMEM76* coding sequence subcloned into pCMV-Script vector by use of Lipofectamine Plus (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. The cells were harvested 48 h after transfection, and *N*-acetyltransferase activity was measured in the homogenates of *TMEM76*-transfected and mock-transfected cells (i.e., transfected with only the cloning vector).

#### Enzyme Assay

*N*-acetyltransferase enzymatic activity was measured using the fluorogenic substrate 4-methylumbelliferyl  $\beta$ -D-glucosaminide (Moscercdam) as described elsewhere.<sup>23</sup> Protein concentration was measured according to the method of Bradford.<sup>29</sup> This assay was used for the activity measurements in cultured skin fibroblasts or white blood cells from patients and all participating members of the Czech families and for the functional expression experiments.

#### Confocal Microscopy

To establish colocalization of the tagged protein with the lysosomal compartment, the skin fibroblasts expressing mouse *TMEM76*-EGFP were treated with 50 nM LysoTracker Red DND-99 dye (Molecular Probes), were washed twice with ice-cold PBS, and were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 30 min. Slides were studied on an LMS 510 Meta inverted confocal microscope (Zeiss).

## Results

### Linkage Analysis

Previously, we performed a genomewide linkage study that indicated that the locus for MPS IIIC is mapped to an 8.3-cM interval in the pericentromeric region of chromosome 8.<sup>15</sup> To reduce this interval, we genotyped the families from that study as well as newly obtained MPS IIIC-affected families for 22 microsatellite markers (Montreal data). Linkage analysis under an autosomal recessive model resulted in LOD scores >14 in the 4.2-cM region spanning *D8S1051* to *D8S601*, which included the centromere (fig. 2). The results of multiple MCMC runs showed consistent trends. Linkage was also performed in four families from the Czech Republic by use of an autosomal codominant model (Prague data). For these data, linkage analysis produced a maximum LOD score of 7.8 at 66.4 cM at *D8S531* and reduced the linked region for

the Montreal data to a 2.6-cM interval between *D8S1051* and *D8S1831*. This region was defined by inferred recombinants at *D8S1051* in one family in each of the Montreal and Prague data sets, and a recombinant at *D8S1831* in an additional family in the Prague data set. This interval contains 32 known or predicted genes and ORFs.

### Identification of a Candidate Gene

On the basis of our previous studies that defined the molecular properties of the lysosomal *N*-acetyltransferase,<sup>31</sup> we searched the candidate region for a gene encoding a protein with multiple transmembrane domains and a molecular weight of ~100 kDa, which allowed us to exclude the majority of the genes in the region. In contrast, the predicted protein product of the *TMEM76* gene has multiple putative transmembrane domains. The predicted coding region in GenBank accession number XM\_372038.4 was extended by 28 residues at the 5' end on the basis of the transcript in GenBank accession number DR000652.1 (which includes 14 of the 28 residues), examination of the genomic sequence in NT\_007995.14, and comparison with mouse sequence AK149883.1. We predict that the modified *TMEM76* contains 18 exons, corresponding to an ORF of 1,992 bp, and codes for a 73-kDa protein. A comparison of human *TMEM76* with five vertebrate orthologs is shown in figure 3. Furthermore, of all the genes present in the candidate interval, only *TMEM76* showed a statistically significant reduction of the transcript level in the cells of two patients with MPS IIIC (AIV.8 and BIII.5; adjusted *P* values < .001) in the custom oligonucleotide-based microarray assay (fig. 4). Further, we showed that both patients carried nonsense mutations presumably causing mRNA decay (R534X and L349X; see table 2).

### Analysis of the *TMEM76* Transcript by Northern Blot and RT-PCR

Northern-blot analysis identified two major *TMEM76* transcripts of 4.5 and 2.1 kb ubiquitously expressed in various human tissues (fig. 5). The highest expression was detected in leukocytes, heart, lung, placenta, and liver, whereas the gene was expressed at a much lower level in the thymus, colon, and brain, which is consistent with the expression patterns of lysosomal proteins. Consistent with the northern-blot results, a full-length 4.5-kb cDNA containing 1,992 bp of coding sequence and two polyadenylation signals as well as two shorter transcripts were amplified by RT-PCR from the total RNA of normal human skin fibroblasts, white blood cells, and skeletal muscle. In one transcript, exons 9 and 10 were spliced out, leading to an in-frame deletion of 64 aa, which contains the predicted transmembrane domains III and IV. Most likely, this transcript does not encode an active enzyme, since it was also detected in the RNA of two patients with MPS IIIC (patients CIII.1 and CIII.2) who had almost complete loss of

*N*-acetyltransferase activity. Another transcript lacked exons 3, 9, and 10.

The deduced amino acid sequence predicts 11 transmembrane domains and four potential *N*-glycosylation sites (fig. 3), consistent with the molecular properties of lysosomal *N*-acetyltransferase.<sup>31</sup> The first 67 aa may comprise the signal peptide, with length and composition resembling those of lysosomal proteins. According to the predictions made by empirical computer algorithms,<sup>32–34</sup> the C-terminus of the *TMEM76* protein is exposed to the cytoplasm and contains conserved Tyr-X-X-Ø and Leu-Leu sequence motifs involved in the interaction with the adaptor proteins responsible for the lysosomal targeting of membrane proteins.<sup>35</sup>

#### Mutation Analysis

We identified 27 *TMEM76* mutations in the DNA of 30 MPS IIIC-affected families (table 1) that were not found in DNA from 105 controls. Among the identified mutations, there were 4 nonsense mutations, 14 missense mu-

tations, 3 predicted frameshift mutations due to deletions or duplications, and 6 splice-site mutations. All the missense mutations occur at residues conserved among five species with the most homologous *TMEM76* sequences (fig. 3), except for P265Q, which is not conserved in the mouse, and W431C, which is not conserved in the rat. There were three instances of two mutations on the same allele that were found in patients who were homozygous, and these are designated as complex mutations in table 1. cDNA sequencing of one of the patients homozygous for the splice-site mutation in intron 2 and a missense mutation (P265Q) demonstrated that the splice-site mutation disrupts the consensus splice-site sequence between exon 2 and intron 2 and causes exon 2 skipping and a frameshift (not shown).

Consanguinity was reported in 4 of the 13 families in which the patients were homozygous for *TMEM76* mutations: the two Moroccan families, the French family with two missense mutations (W431C and A643T), and the Turkish family with the splice-site mutation in intron

**Table 1. Mutations in *TMEM76* Identified in Patients from 30 Families with MPS IIIC**

Mutation Group and Mutation <sup>a</sup>	Predicted Effect on Protein	No. of Alleles	Location in <i>TMEM76</i>
<b>Nonsense mutations:</b>			
c.1031G→A	p.W344X	2	Exon 10
c.1046T→G	p.L349X	1	Exon 10
c.1234C→T	p.R412X	8	Exon 12
c.1600C→T	p.R534X	1	Exon 15
<b>Missense mutations:</b>			
c.311G→T	p.C104F	1	Exon 2
c.932C→T	p.P311L	3	Exon 9
c.1114C→T	p.R372C	3	Exon 11
c.1115G→A	p.R372H	1	Exon 11
c.1354G→A	p.G452S	2	Exon 13
c.1495G→A	p.E499K	3	Exon 14
c.1529T→A	p.M510K	1	Exon 14
c.1706C→T	p.S569L	4	Exon 17
c.1769A→T	p.D590V	1	Exon 17
c.1796C→T	p.P599L	1	Exon 17
<b>Frameshift mutations:</b>			
c.1118_1133del	p.I373SfsX3	1	Exon 11
c.1420_1456dup	p.V488GfsX22	1	Exon 13
c.1834delG	p.V612SfsX16	1	Exon 18
<b>Splice-site mutations:</b>			
c.202+1G→A	p.L69EfsX32 <sup>b</sup>	1	Intron 1
c.577+1G→A	p.P193HfsX20 <sup>b</sup>	1	Intron 4
c.935+5G→A	p.F313X	1	Intron 9
c.1334+1G→A	p.G446X <sup>b</sup>	1	Intron 12
c.1810+1G→A	p.S567NfsX14	2	Intron 17
<b>Complex mutations:</b>			
c.[318+1G→A; 794C→A]	p.[D68VfsX19; P265Q]	6	Intron 2; exon 7
c.[577+1G→A; 1650A→C]	p.[P193HfsX20; K551Q]	2	Intron 4; exon 16
c.[1293G→T; 1927G→A]	p.[W431C; A643T]	2	Exon 12; exon 18

<sup>a</sup> Mutation names were assigned according to the guidelines of the Human Genome Variation Society and on the basis of the cDNA sequence from GenBank accession number NT\_007995.14, except that the first exon includes 84 nt 5' of the stated ATG initiation codon. Thus, +1 corresponds to the A of the ATG at nt 13315945 (instead of nt 13316029).

<sup>b</sup> The mutations were named under the assumption that no exon skipping takes place; cDNA sequencing was not done.

17. The two Moroccan families were not known to be related to each other or to the Spanish patient homozygous for the same mutations (table 2). The parents of the French patient are second cousins in two ways (see family F1 in the work of Ausseil et al.<sup>15</sup>).

The splice-site mutation in the above-mentioned Turkish family disrupts the consensus splice-site sequence between exon 17 and intron 17 and causes exon 17 skipping and a frameshift in all transcripts, as detected by sequencing of multiple RT-PCR clones (not shown). The two affected siblings in this family (family F8 in the work of Ausseil et al.<sup>15</sup>) had a severe form of MPS IIIC and showed almost complete loss of *N*-acetyltransferase activity in cultured skin fibroblasts. Among other severely affected patients with MPS IIIC, a patient of French origin was homozygous for a nonsense mutation (W344X) in exon 10, which may result in the synthesis of a truncated protein or RNA decay. A patient of Polish origin was a compound heterozygote for a 37-bp duplication in exon 13 and a missense mutation (S569L) in exon 17 (table 2). The duplication results in a frameshift, whereas the substitution of a strictly conserved small polar Ser for a bulky hydrophobic Leu may have a significant structural impact (fig. 3).

The five patients from four Czech families are all compound heterozygotes for eight different mutations (table 2). Five of the eight mutations are predicted to result in truncated products (three nonsense mutations, one 16-bp

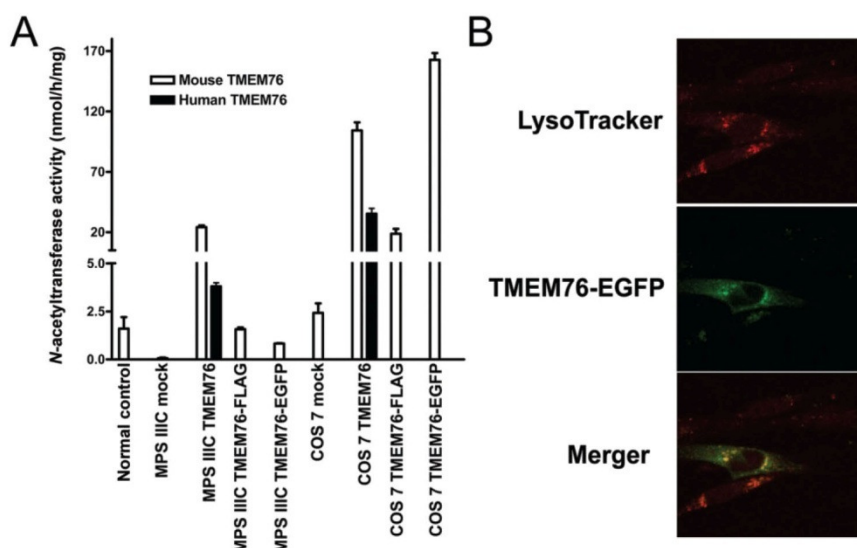
deletion, and one splice-site mutation leading to the inclusion of 89 bases from the 5' end of intron 9 and the splicing out of exon 10 in the transcript, and the remaining three are missense mutations affecting residues conserved among multiple species and located either in the predicted transmembrane regions (fig. 3) or in their close vicinity, suggesting that they may have a serious structural impact. In the Czech families, the mutations completely segregated with reduced enzyme activity. That is, all individuals assigned to be heterozygotes on the basis of the enzyme assay as well as the four individuals who were within 2 SD of the lower end of the controls (symbols with gray inner circle in fig. 1) were found to carry *TMEM76* mutations.

#### Functional Expression Studies

The fibroblast cell line from a patient homozygous for a splice-site mutation in intron 17 with negligible *N*-acetyltransferase activity was transfected with plasmids containing human *TMEM76* cDNA or cDNA of the mouse ortholog of *TMEM76* carrying a FLAG tag on the C-terminus or of a fusion protein of mouse *TMEM76* with enhanced green fluorescent protein (EGFP). All constructs increased the *N*-acetyltransferase activity in the mutant fibroblast cells to approximately normal level (fig. 6A). Significant increase in activity was also observed in transfected COS-7 cells, confirming that the *TMEM76* protein

**Table 2. *TMEM76* Predicted Mutations in Probands from 30 Families with MPS IIIC**

Patient Group and Mutation 1	Mutation 2	No. of Patients	Geographic Origin of Patient(s)
Patients from Czech families:			
p.I373SfsX3	p.R534X	1	Czech Republic
p.L349X	p.M510K	1	Czech Republic
p.F313X	p.R412X	1	Czech Republic
p.R372H	p.P599L	1	Czech Republic
Patients homozygous for <i>TMEM76</i> mutations:			
p.[D68VfsX19; P265Q]	p.[D68VfsX19; P265Q]	3	Morocco, Morocco, and Spain
p.[P193HfsX20; K551Q]	p.[P193HfsX20; K551Q]	1	France
p.P311L	p.P311L	1	United Kingdom
p.W344X	p.W344X	1	France
p.R372C	p.R372C	1	United Kingdom
p.R412X	p.R412X	2	Turkey and Poland
p.[W431C; A643T]	p.[W431C; A643T]	1	France
p.G452S	p.G452S	1	Canada
p.E499K	p.E499K	1	Canada
p.S567NfsX14	p.S567NfsX14	1	Turkey
Patients compound heterozygous for <i>TMEM76</i> mutations:			
p.C104F	...	1	Belarus
p.E499K	p.D590V	1	France
p.P193HfsX20	p.R412X	1	Canada
p.P311L	p.R372C	1	France
p.R412X	...	1	Poland
p.R412X	p.G446X	1	Poland
p.S569L	...	2	France and Portugal
p.S569L	p.L69EfsX32	1	United States
p.V488GfsX22	p.S569L	1	Poland
p.V612SfsX16	...	1	Finland
Families with no mutations identified to date	...	2	North Africa and Portugal



**Figure 6.** Functional expression of human and mouse *TMEM76* protein. *A*, The full-size human and mouse *TMEM76* coding sequences subcloned into pCMV-Script, pCMV-Tag4A, and pEGFP-N3 vectors were expressed in COS-7 cells and in cultured skin fibroblasts from a patient with MPS IIIC. The cells were harvested 48 h after transfection, and *N*-acetyltransferase activity was measured in the homogenates of *TMEM76*-transfected and mock-transfected fibroblast or COS-7 cells by use of the artificial fluorometric substrate 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucosaminide.<sup>23</sup> Values represent means  $\pm$  SD of four independent experiments. *B*, The intracellular localization of *TMEM76* was studied by expressing the fusion protein of the mouse *TMEM76* with EGFP. Before fixation, the cells were treated for 45 min with 50 nM lysosomal marker, LysoTracker Red DND-99 dye. Slides were analyzed on an LMS 510 Meta confocal microscope (Zeiss). Magnification  $\times$  1000. The image was randomly selected from 30 studied panels, all of which showed a similar localization of *TMEM76*-EGFP. The fluorescence of EGFP was not quenched as it would have been if the fluorophore had been exposed to the acidic lysosomal microenvironment, confirming that the C-terminus of *TMEM76* faces the cytoplasmic side of the lysosomal membrane.

by itself has *N*-acetyltransferase activity. Confocal fluorescent microscopy shows that *TMEM76*-EGFP (fig. 6B) or *TMEM76*-FLAG (not shown) peptides are targeted in human fibroblasts to cytoplasmic organelles, colocalizing with the lysosomal-endosomal marker LysoTracker Red.

## Discussion

Degradation of heparan sulfate occurs within the lysosomes by the concerted action of a group of at least eight enzymes: four sulfatases, three exo-glycosydases, and one *N*-acetyltransferase, which work sequentially at the terminus of heparan sulfate chains, producing free sulfate and monosaccharides. The inherited deficiencies of four enzymes involved in the degradation of heparan sulfate cause four subtypes of MPS III: MPS IIIA (heparan *N*-sulfatase deficiency [MIM 252900]), MPS IIIB ( $\alpha$ -*N*-acetylglucosaminidase deficiency [MIM 252920]), MPS IIIC (acetyl-CoA: $\alpha$ -glucosaminide acetyltransferase deficiency), and MPS IIID (*N*-acetylglucosamine 6-sulfatase deficiency [MIM 252940]). Since the clinical phenotypes of all these disorders are similar, precise diagnosis relies on the determination of enzymatic activities in patients' cultured skin fibroblasts or leukocytes. The biochemical defect in MPS IIIC was identified 30 years ago as a deficiency of an en-

zyme that transfers an acetyl group from cytoplasmically derived acetyl-CoA to terminal  $\alpha$ -glucosamine residues of heparan sulfate within the lysosomes, resulting in the accumulation of heparan sulfate. Therefore, for identification of the molecular basis of this disorder, we used two complementary approaches. First, we performed a partial purification of human and mouse lysosomal *N*-acetyltransferase, which suggested that the enzyme has properties of an oligomeric transmembrane glycoprotein, with an  $\sim$ 100-kDa polypeptide containing the enzyme active site.<sup>31</sup> Second, by linkage analysis, we narrowed the locus for MPC IIIC to a 2.6 cM-interval (*D8S1051*–*D8S1831*) and, third, compared the level of transcripts of the genes present in the candidate region between normal control cells and those from patients with MPS IIIC. Thus, an integrated bioinformatic search and gene-expression analysis both pinpointed a single gene, *TMEM76*, which encodes a 73-kDa protein with predicted multiple transmembrane domains and glycosylation sites. DNA mutation analysis showed that patients with MPS IIIC harbor *TMEM76* mutations incompatible with the normal function of the predicted protein, whereas expression of human *TMEM76* and the mouse ortholog proved that the protein has *N*-acetyltransferase activity and lysosomal lo-

calization, providing evidence that *TMEM76* is the gene that codes for the lysosomal *N*-acetyltransferase.

The *TMEM76* protein does not show a structural similarity to any known prokaryotic or eukaryotic *N*-acetyltransferases or to other lysosomal proteins, on the basis of sequence homology searches. Thus, we think that it belongs to a new structural class of proteins capable of transporting the activated acetyl residues across the cell membrane. Moreover, *TMEM76* shares homology with a conserved family of bacterial proteins COG4299 (uncharacterized protein conserved in bacteria) (Entrez Gene GeneID 138050). All 146 members of this family are predicted proteins from diverse bacterial species, including Proteobacteria, Cyanobacteria, and Deinococci. Since many of these bacteria are capable of synthesizing heparan sulfate and other structurally related glycosaminoglycans and perform reactions of transmembrane acetylation, it is tempting to speculate that this activity may also be performed by the proteins of the COG4299 family. Previous studies suggested two contradictory mechanisms of transmembrane acetylation. Bame and Rome<sup>2,36,37</sup> proposed that it is performed via a ping-pong mechanism. First, the acetyl group of acetyl-CoA is transferred to an His residue in the active site of the enzyme. This induces a conformational change that results in the translocation of the protein domain containing the acetylated residue to the lysosome, where the acetyl residue is transferred to the glucosamine residue of heparan sulfate. In contrast, Meikle et al.<sup>38</sup> were unable to demonstrate any specific acetylation of the lysosomal membranes and proposed an alternative mechanism that involved the formation of a tertiary complex of the enzyme, acetyl-CoA, and heparan sulfate. Identification of *N*-acetyltransferase as a 73-kDa protein with multiple transmembrane domains, together with our previous data that showed that *N*-acetyltransferase is acetylated by [<sup>14</sup>C]acetyl-CoA in the absence of glucosamine,<sup>31</sup> strongly supports the ping-pong mechanism of transmembrane acetylation.

For 23 of the 30 probands included in this study for mutation analysis, *TMEM76* mutations were identified in both alleles. Five probands were heterozygous for a missense mutation, with a second mutation yet to be identified. In two probands from North Africa and Portugal,

we did not identify any mutations in the coding regions or immediate flanking regions. These patients are homozygous for the microsatellite markers throughout the entire MPS IIIC locus and may be homozygous for a yet-to-be-identified *TMEM76* mutation; however, we cannot formally exclude defects in other genes. Additional studies have been initiated to search for mutations in the introns and promoter regions. The patients with MPS IIIC with the identified frameshift and nonsense mutations all have a clinically severe early-onset form. The almost complete deficiency of *N*-acetyltransferase activity in cultured skin fibroblasts from these patients is consistent with the predicted protein truncations and/or nonsense-mediated mRNA decay. Further expression studies are necessary to confirm the impact of the identified substitutions of the conserved amino acids on enzyme activity. Nevertheless, the identification of the lysosomal *N*-acetyltransferase gene which, when mutated, accounts for the molecular defect in patients with MPS IIIC sets the stage for DNA-based diagnosis and genotype-phenotype correlation studies and marks the end of the gene-discovery phase for lysosomal genetic enzymopathies.

#### Acknowledgments

We thank the patients, their families, and the Czech Society for Mucopolysaccharidosis, for participating in our study, and members of the sequencing and genotyping facilities at the McGill University and Genome Quebec Innovation Centre, for their technical support. We also acknowledge Nina Gusina, Joe Clarke, and Tony Rupa, for providing cell lines from patients with MPS IIIC; Mila Ashmarina, Milan Elleder, J. Loreda-Osti, and Johanna Rommens, for helpful discussions; Karine Landry, for technical support; and Maryssa Canuel, for help with confocal microscopy. The Montreal study was supported by operating grants from the Sanfilippo Children's Research Foundation (to A.V.P.) and by the Canadian Networks of Centres of Excellence Program—the Mathematics of Information Technology and Complex System network (to K.M.). The Prague study was supported by grants NR8069-1 and 1A/8239-3 from the Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic. Institutional support was provided by Ministry of Education of the Czech Republic grant MSM0021620806. A.V.P. is a National Investigator of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

**Table A1. Exon-Flanking Primers Used for PCR Amplification and Sequencing of the Exons in the Human *TMEM76* Gene**

Primer	Sequence (5'→3')
TMEM76_Exon1_F	CTCCCGAAGACAAACTCC
TMEM76_Exon1_R	GCGAAGTCGAGCAACAGC
TMEM76_Exon2_F	AAGCTTTTGAGAAGCACTACTGG
TMEM76_Exon2_R	GAAGGGCTTTAGACATGAGAGC
TMEM76_Exon3_F	GGAAAAGTCATGTCAGGATCTCC
TMEM76_Exon3_R	GAATAATACATGTTCTGGGTACG
TMEM76_Exon4_F	TTATTCTGCCTCCATGATATTAGC
TMEM76_Exon4_R	CTACAGAAAGCGTCATGGACTGC
TMEM76_Exon5_F	GGAAATTCAGCATGAGAATATAGG
TMEM76_Exon5_R	GCCACTTGAGGGTGACAGC
TMEM76_Exon6_F	GAATATGAGCTTAAATTTATTTC
TMEM76_Exon6_R	TTAGGAATACGGGAGCTACAACC
TMEM76_Exon7_F	CAAAATGAAATTTACCCCTTAGC
TMEM76_Exon7_R	ACATCCAAGAAATCCTTCTAGC
TMEM76_Exon8_F	CCTTCTTTTACATAGCAAACC
TMEM76_Exon8_R	GCTCTGTGAAGGACGTATATAAGC
TMEM76_Exon9_F	CCCCGGGTTACTTCTATACC
TMEM76_Exon9_R	CCAGCATCATCTGAAAAACAGG
TMEM76_Exon10_F	GGGGCTATATTCTGAACCTTCC
TMEM76_Exon10_R	ACCTGAGATGGAGGAATTGC
TMEM76_Exon11_F	CTGGGATGAGAGGAGAAGTCC
TMEM76_Exon11_R	ACTTGAAGCCAGGAGTGAGG
TMEM76_Exon12_F	CCTTCTATTGCATTTAGTTACC
TMEM76_Exon12_R	GAGAATTCCTTGACTCGAGACC
TMEM76_Exon13_F	TTTTATTCTTGCCCTCTGTTCC
TMEM76_Exon13_R	CACCTTCTGAAAGCCTGAGTTCC
TMEM76_Exon14_F	TTGGTCTAGGAGCTGTTGTAGC
TMEM76_Exon14_R	CCATAGCACAAAGAGAGAATATGC
TMEM76_Exon15_F	TCTTTGTGAGGTAGTTAAGACAGTGG
TMEM76_Exon15_R	GTGAAGGAAAGGAATTTAGC
TMEM76_Exon16_F	ACAAGTTTCAGCCCTCTCAGC
TMEM76_Exon16_R	GTGGAGGAGAGCTTTCAGTGC
TMEM76_Exon17_F	ATGCTGAAATGGATTGTTCC
TMEM76_Exon17_R	ACCAAGGATGCTCCAGAGG
TMEM76_Exon18_F	AGTAGCCAAATGGAAGTGC
TMEM76_Exon18_R	GAGCCGTGCACAGTTAAC

NOTE.—For bidirectional sequencing on the ALFexpress DNA sequencer, all primers have the universal overhang synthesized on the 5' end (AATACGACTCACTATAG for forward [F] primers and CAGGAAACGCTATGAC for reverse [R] primers).

### Web Resources

Accession numbers and URLs for data presented herein are as follows:

BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> (used to identify ortholog protein sequences)

Entrez Gene, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene> (for GeneID 138050)

GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/> (for accession numbers AK152926.1, AK149883.1, DR000652.1, XM\_372038.4, NT\_007995.14, XP\_539948.2, XP\_588978.2, XP\_341451.2, and XP\_519741.1)

Human Genome Variation Society, <http://www.hgvs.org/>  
Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/> (for MPS IIIA, IIIB, IIIC, and IIID)

### References

- Rome LH, Hill DF, Bame KJ, Crain LR (1983) Utilization of exogenously added acetyl coenzyme A by intact isolated lysosomes. *J Biol Chem* 258:3006–3011
- Bame KJ, Rome LH (1985) Acetyl-coenzyme A:α-glucosaminide N-acetyltransferase: evidence for a transmembrane acetylation mechanism. *J Biol Chem* 260:11293–11299
- Pohlmann R, Klein U, Fromme HG, von Figura K (1981) Localisation of acetyl-CoA: α-glucosaminide N-acetyltransferase in microsomes and lysosomes of rat liver. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 362:1199–1207
- Hopwood JJ, Freeman C, Clements PR, Stein R, Miller AL (1983) Cellular location of N-acetyltransferase activities toward glucosamine and glucosamine-6-phosphate in cultured human skin fibroblasts. *Biochem Int* 6:823–830
- Meikle PJ, Whittle AM, Hopwood JJ (1995) Human acetyl-coenzyme A:α-glucosaminide N-acetyltransferase: kinetic characterization and mechanistic interpretation. *Biochem J* 308:327–333
- Kresse H, von Figura K, Bartsocas C (1976) Clinical and biochemical findings in a family with Sanfilippo disease, type C. *Clin Genet* 10:364
- Bartsocas C, Grobe H, van de Kamp JJ, von Figura K, Kresse H, Klein U, Giesberts MA (1979) Sanfilippo type C disease: clinical findings in four patients with a new variant of mucopolysaccharidosis III. *Eur J Pediatr* 130:251–258
- Klein U, Kresse H, von Figura K (1978) Sanfilippo syndrome type C: deficiency of acetyl-CoA:α-glucosaminide N-acetyltransferase in skin fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:5185–5189
- Sanfilippo SJ, Podosin R, Langer LO Jr, Good RA (1963) Mental retardation associated with acid mucopolysacchariduria (heparitin sulfate type). *J Pediatr* 63:837–838
- Klein U, van de Kamp JJP, von Figura K, Pohlmann R (1981) Sanfilippo syndrome type C: assay for acetyl-CoA:α-glucosaminide N-acetyltransferase in leukocytes for detection of homozygous and heterozygous individuals. *Clin Genet* 20:55–59
- Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF (1999) Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* 281:249–254
- Pinto R, Caseiro C, Lemos M, Lopes L, Fontes A, Ribeiro H, Pinto E, Silva E, Rocha S, Marcao A, Ribeiro I, Lacerda L, Ribeiro G, Amaral O, Sa Miranda MC (2004) Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur J Hum Genet* 12:87–92
- Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JE, de Jong JG, van Weely S, Niezen-Koning KE, van Diggelen OP (1999) The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum Genet* 105:151–156
- Zaremba J, Kleijer WJ, Juijmans JG, Poorthuis B, Fidzianska E, Glogowska I (1992) Chromosomes 14 and 21 as possible candidates for mapping the gene for Sanfilippo disease type IIIC. *J Med Genet* 29:514
- Ausseil J, Loredo-Osti JC, Verner A, Darmond-Zwaig C, Maire I, Poorthuis B, van Diggelen OP, Hudson TJ, Fujiwara TM, Morgan K, Pshezhetsky AV (2004) Localization of a gene for mucopolysaccharidosis IIIC to chromosome region 8p11-8q11. *J Med Genet* 41:941–945

16. Seyrantepe V, Tihy F, Pshezhetsky AV (2006) The microcell-mediated transfer of human chromosome 8 restores the deficient *N*-acetyltransferase activity in skin fibroblasts of mucopolysaccharidosis type IIIC patients. *Hum Genet* 120:293–296
17. Kong X, Murphy K, Raj T, He C, White PS, Matisse TC (2004) A combined linkage-physical map of the human genome. *Am J Hum Genet* 75:1143–1148
18. Mira MT, Alcais A, Nguyen VT, Moraes MO, Di Flumeri C, Vu HT, Mai CP, Nguyen TH, Nguyen NB, Pham XK, Sarno EN, Alter A, Montpetit A, Moraes ME, Moraes JR, Dore C, Gallant CJ, Lepage P, Verner A, Van De Vosse E, Hudson TJ, Abel L, Schurr E (2004) Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature* 427:636–640
19. Sobel E, Lange K (1996) Descent graphs in pedigree analysis: applications to haplotyping, location scores, and marker sharing statistics. *Am J Hum Genet* 58:1323–1337
20. Sobel E, Papp JC, Lange K (2002) Detection and integration of genotyping errors in statistical genetics. *Am J Hum Genet* 70:496–508
21. Hodanova K, Majewski J, Kublova M, Vyletal P, Kalbacova M, Stiburkova B, Hulkova H, Chagnon YC, Lanouette CM, Marinaki A, Fryns JP, Venkat-Raman G, Knoch S (2005) Mapping of a new candidate locus for uromodulin-associated kidney disease (UAKD) to chromosome 1q41. *Kidney Int* 68:1472–1482
22. O'Connell JR, Weeks DE (1998) PedCheck: a program for identifying genotype incompatibilities in linkage analysis. *Am J Hum Genet* 63:259–266
23. Voznyi YV, Karpova EA, Dudukina TV, Tsvetkova IV, Boer AM, Janse HC, van Diggelen OP (1993). A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Sanfilippo disease C (MPS III C). *J Inher Metab Dis* 16:465–472
24. Gudbjartsson DF, Jonasson K, Frigge M, Kong A (2000) Allegro, a new computer program for multipoint linkage analysis. *Nat Genet* 25:12–13
25. Smyth GK (2005) Limma: linear models for microarray data. In: Gentleman R, Carey V, Dudoit S, Irizarry R, Huber W (eds) *Bioinformatics and computational biology solutions using R and Bioconductor*. Springer, New York, pp 397–420
26. Smyth GK (2004) Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 3:article 3
27. Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc B* 57:289–300
28. Knoch S, Hartmannova H, Stiburkova B, Krijt J, Zikanova M, Sebesta I (2000) Human adenylosuccinate lyase (ADSL), cloning and characterization of full-length cDNA and its isoform, gene structure and molecular basis for ADSL deficiency in six patients. *Hum Mol Genet* 9:1501–1513
29. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
30. Hinrichs AS, Karolchik D, Baertsch R, Barber GP, Bejerano G, Clawson H, Diekhans M, et al (2006) The UCSC Genome Browser Database: update 2006. *Nucleic Acids Res* 34:D590–D598
31. Ausseil J, Landry K, Seyrantepe V, Trudel S, Mazur A, Lapointe F, Pshezhetsky AV (2006) An acetylated 120-kDa lysosomal transmembrane protein is absent from mucopolysaccharidosis IIIC fibroblasts: a candidate molecule for MPS IIIC. *Mol Genet Metab* 87:22–31
32. Kahsay RY, Gao G, Liao L (2005) An improved hidden Markov model for transmembrane protein detection and topology prediction and its applications to complete genomes. *Bioinformatics* 21:1853–1858
33. Jensen LJ, Gupta R, Blom N, Devos D, Tamames J, Kesmir C, Nielsen H, Staerfeldt HH, Rapacki K, Workman C, Andersen CA, Knudsen S, Krogh A, Valencia A, Brunak S (2002) Prediction of human protein function from post-translational modifications and localization features. *J Mol Biol* 319:1257–1265
34. Blom N, Sicheritz-Ponten T, Gupta R, Gammeltoft S, Brunak S (2004) Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* 4:1633–1649
35. Bonifacino JS, Traub LM (2003) Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* 72:395–447
36. Bame KJ, Rome LH (1986a) Acetyl-coenzyme A: $\alpha$ -glucosaminide *N*-acetyltransferase: evidence for an active site histidine residue. *J Biol Chem* 261:10127–10132
37. Bame KJ, Rome LH (1986b) Genetic evidence for transmembrane acetylation by lysosomes. *Science* 233:1087–1089
38. Meikle PJ, Whittle AM, Hopwood JJ (1995) Human acetyl-coenzyme A: $\alpha$ -glucosaminide *N*-acetyltransferase: kinetic characterization and mechanistic interpretation. *Biochem J* 308:327–333