

L'ACIDÚRIA 3-HIDROXI 3-METILGLUTÀRICA: UNA MALALTIA MOLECULAR PER DEFICIÈNCIA DE 3-HIDROXI 3-METILGLUTARIL COENZIM A LIASA

FAUSTO G. HEGARDT

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Divisió IV. Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona.

Adreça per a la correspondència: Fausto García Hegardt. Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Divisió IV. Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona. Diagonal, 643. 08028 Barcelona. Telèfon +34 93 402 4523. Fax +34 93 402 1896. Adreça electrònica: hegardt@farmacia.far.ub.es.

RESUM

L'acidúria 3-hidroxi-3-metilglutàrica és una malaltia genètica autosòmica recessiva que es manifesta per una sèrie de símptomes que, en conjunt, s'assemblen a la síndrome de Reye. En aquesta revisió realitzada des de la presentació del primer cas, el 1976, s'ha tractat de recollir la informació sobre els aspectes clínics, els metabòlits anormals que apareixen a l'orina, la deficiència enzimàtica de la HMG-CoA liasa, el diagnòstic, el tractament i la genètica de la malaltia. Si bé són més de cinquanta els casos reportats d'acidúria 3-hidroxi-3-metilglutàrica, solament quinze pacients s'han estudiat des del punt de vista molecular des que el 1993 es va reportar el clonatge del cDNA de la HMG-CoA liasa humana. Es coneixen nou mutacions al·lèliques diferents fins ara. La major incidència de totes les reportades és la mutació puntual en el nucleòtid 109, que condueix a la producció de tres transcrits diferents, un amb un codó d'aturada, un altre en el qual s'ha produït un *splicing* alternatiu amb eliminació de l'exó 2 i un tercer amb un *splicing* diferent i eliminació dels exons 2 i 3. Aquesta mutació és prevalent al sud d'Europa i representa el 37 % de tots els casos reportats.

SUMMARY

3-Hydroxy-3-methylglutaric aciduria is an autosomal recessive hereditary disease, which presents with symptoms very similar to those of Reye syndrome. The aim of this article is to review the information published since 1976 in which one case of 3-hydroxy-3-

methylglutaric aciduria was reported for the first time. The review covers clinical aspects, abnormal metabolites appearing in urine, enzyme deficiency of HMG-CoA lyase, diagnosis, treatment and genetics. Although more than 50 patients have been diagnosed having 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria, no more than 15 have been studied at the molecular level since 1993, when the cDNA sequence of the human HMG-CoA lyase was reported. Nine mutations have been reported. The most prevalent is the G-T point mutation in nucleotide 109, which determines the occurrence of three different transcripts, one with a stop codon, another in which an alternative *splicing* produced the skipping of exon 2 and a third in which the transcript is skipped in exons 2 and 3. This mutation is prevalent in the south of Europe and represents 37 % of all mutations reported.

Paraules clau: Deficiència en HMG-CoA liasa; Acidúria 3-hidroxi-3-metilglutàrica; metabolisme de la leucina; cossos cetònics; malaltia autosòmica recessiva; Exonic splicing Enhancer; splicing alternatiu; àcid 3-hidroxi-3-metilglutàric; àcid 3-metilglutacònic; àcid 3-hidroxiisovalèric. (HMG-CoA, 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzim A); SSCP, polimorfisme conformacional de cadena única; RT-PCR, transcriptasa reversa-reacció en cadena de la polimerasa.

INTRODUCCIÓ

El compost 3-hidroxi 3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) es produeix a la cèl·lula a través de tres situacions diferents: en el citosol, l'enzim HMG-CoA sintasa catalitza la condensació d'acetoacetyl-CoA i acetyl-CoA i produeix HMG-CoA, que és el punt de partida de la ruta dels isoprenoides, de la qual el compost més representatiu és el colesterol. La primera etapa després d'aquest punt, que és el limitador del procés, és la conversió de HMG-CoA en mevalonat catalitzada per l'enzim HMG-CoA reductasa. A la mitocòndria, es produeixen dos processos que determinen la síntesi de l'HMG-CoA. Per una banda, la HMG-CoA sintasa mitocondrial catalitza una reacció que és idèntica a la descrita en el citosol. Per l'altra, l'enzim 3-metilglutaconil-CoA hidratasa catalitza la hidratació de 3-metilglutaconil-CoA a HMG-CoA. La HMG-CoA sintasa mitocondrial és el punt de regulació metabòlica més important en la ruta de cetogènesi. La reacció catalitzada per la 3-metilglutaconil-CoA hidratasa és el punt final de la ruta catabòlica de la leucina. En conseqüència, dins de la mitocòndria, la HMG-

CoA es troba en un encreuament de dues rutes metabòliques: la de β -oxidació d'àcids grassos i cetogènesi, i la del catabolisme de la leucina. El destí final de l'HMG-CoA mitocondrial és la producció d'acetoacetat, catalitzat per la HMG-CoA liasa (figura 1). L'acetoacetat és convertit per l'acció de la β -hidroxibutíric deshidrogenasa en β -hidroxibutirat, i ambdós, acetoacetat i β -hidroxibutirat, constitueixen els anomenats cossos cetònics.

Existeixen malalties hereditàries associades a mutacions dels enzims de cadascun dels passos del metabolisme de la leucina. En totes aquestes situacions es produeix la conversió dels compostos intermediaris que no es poden metabolitzar en àcids orgànics, i que normalment són excretats per l'orina. A través de l'anàlisi d'aquests àcids es pot conèixer la deficiència hereditària en cada cas. S'han descrit les deficiències d'isovaleril-CoA deshidrogenasa, 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa, 3-metilglutaconil-CoA hidratasa, a més del cas que ens ocupa, el dèficit de HMG-CoA liasa (Scriver *et al.*, 1995).

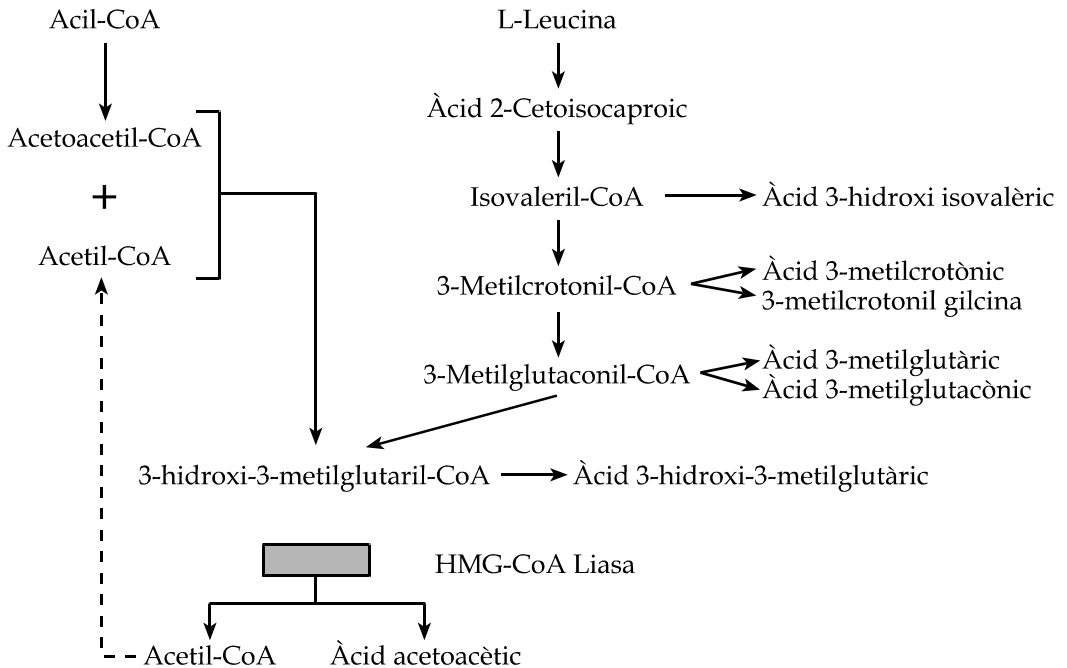


FIGURA 1. Interrelacions metabòliques del 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). El lloc del defecte en pacients amb deficiència en HMG-CoA liasa està barrat. En el fetge, la HMG-CoA liasa, juntament amb la HMG-CoA sintasa mitocondrial, té un paper crític en la producció de cossos cetònics. En altres teixits en els quals no s'expressa la HMG-CoA sintasa mitocondrial, la HMG-CoA liasa participa molt activament en el metabolisme de la leucina.

L'ENZIM HMG-CoA LIASA

Tal com s'ha esmentat, l'enzim HMG-CoA liasa catalitza la ruptura de l'HMG-CoA en acetoacetat i acetil-CoA. Aquest enzim ha estat purificat d'una varietat d'organismes eucariòtics com ara cor de porc (Bachawat *et al.*, 1955), fetge boví (Stegink i Coon, 1968) i pollastre (Kramer i Mizioroko, 1980). També s'ha purificat d'un procariota *Pseudomonas mevalonii* (Scher i Rodwell, 1989). Recentment s'ha publicat la seqüència de la proteïna HMG-CoA liasa a partir dels cDNA del *P. mevalonii* (Anderson i Rodwell, 1989), de pollastre (Mitchell *et al.*, 1993), i humana (Mitchell *et al.*, 1991; Mitchell *et al.*, 1993). El clonatge dels gens de pollastre i humana ha permès conèixer l'organització d'introns i exons, i

això ha facilitat l'estudi de les malalties hereditàries (Wang *et al.*, 1996). El gen humà, que té una mida de 18 kb, està organitzat en nou exons i vuit introns i s'ha localitzat en el cromosoma 1, regió distal p (Wang *et al.*, 1993). L'mRNA per a la HMG-CoA liasa humana és d'1,6 kb determinat per transferència Northern en fetge i fibroblasts. La proteïna humana té un pèptid líder d'entrada a mitocondries de vint-i-set aminoàcids en el seu extrem amino terminal. Una vegada processada la proteïna per pèrdua del pèptid líder, s'associa amb si mateixa i constitueix l'homodímer de dues unitats iguals compostes de 298 aminoàcids i un Pm de 31,6 kDa cadascuna, que constitueixen la forma catalíticament activa. La proteïna també està localitzada al peroxisoma, on és transportada

pel tripèptid senyal CKL de l'extrem carboxi terminal. La forma peroxisomal és monomèrica i no perd el pèptid líder amino terminal (Ashmarina *et al.*, 1996). L'homologia entre les HMG-CoA liasas de pollastre i les humanes és del 80 %, mentre que entre les humanes i les de *P. mevalonii* és del 52,3 % inclouent-hi conjunts de total identitat de fins a dotze aminoàcids.

La determinació del centre catalític de l'enzim fou realitzada mitjançant la utilització d'un marcador d'afinitat, el butinoil-CoA, per Hruz i Miziorko (1992), i va demostrar que la cisteïna 266 és el lloc d'unió del substrat HMG-CoA en humans; en *P. mevalonii* és la Cys-237 (Hruz *et al.*, 1992). La confirmació d'aquesta cisteïna catalítica es va produir per mutagènesi dirigida de diverses cisteïnes. La mutació C266S i C266A va produir una disminució de la Vmax respectivament de 706 i 11.360 vegades, sense variar la Km (Roberts *et al.*, 1995). Una segona cisteïna localitzada en el carboxi terminus intervé en la conformació dimèrica de l'enzim d'eucariotes (Roberts *et al.*, 1994). Aquesta segona cisteïna no és present en la forma fisiològica del *P. mevalonii*, que és monomèrica (Narasimhan i Miziorko, 1992). La mutació C323S no produeix canvis en les constants cinètiques de l'enzim. Roberts *et al.*, el 1966, van provar igualment que la His-233 és un lloc actiu de l'enzim i s'atribueix l'atac nucleofílic a l'HMG-CoA lligat a la Cys-266 en el procés de catàlisi.

L'ACIDÚRIA 3-HIDROXI 3-METILGLUTÀRICA: UNA DEFICIÈNCIA EN HMG-CoA LIASA

Aspectes clínics

El primer pacient amb acidúria 3-hidroxí-3-metilglutàrica es va diagnosticar el 1976 (Faull *et al.*, 1976). Des de llavors se

n'han detectat uns cinquanta casos, el major nombre dels quals pertany a l'àrea mediterrània i països àrabs (Barash *et al.*, 1990; Ozand *et al.*, 1991). S'han portat a terme diverses revisions sobre aquesta acidúria (Gibson *et al.*, 1988a; Gibson *et al.*, 1988b; Wysocki i Hahnel, 1986). L'edat en què es manifesta té una distribució bimodal, en un 30 % dels casos apareix entre els dos i els cinc dies de vida i un 60 % entre els tres i els onze mesos. Se n'han detectat dos casos en la pubertat (catorze i quinze anys). Les manifestacions clíniques solen ésser vòmits, letàrgia i hipotonia, que avança fins al coma en un 10 % dels casos. Els pacients tenen acidosi metabòlica i la gran majoria hipoglucèmia; ambdós símptomes generalment es manifesten d'una manera greu. És general la situació d'hipocetosi fins i tot després del dejuni o la ingesta d'una dieta rica en greixos. En molts casos apareix hiperamonèmia, transaminases elevades i hepatomegàlia. La mort s'esdevé en un 20 % dels casos (Divry *et al.*, 1981; Zoghbi *et al.*, 1986; Ribes *et al.*, 1990; Ozand *et al.*, 1991) i la hipoglucèmia n'és el determinant més característic (Schutgens *et al.*, 1979). Alguns pacients han tingut macrocefàlia (Lisson *et al.*, 1981; Stacey *et al.*, 1985), encara que es va reportar un cas amb microcefàlia (Walter *et al.*, 1986). La tomografia computada de quatre pacients amb retard mental va mostrar atròfia cerebral (Walter *et al.*, 1986; Mitchell *et al.*, 1995) en dos casos i hipodensitat de la substància blanca en els altres dos (Leupold *et al.*, 1982; Lisson *et al.*, 1981), probablement causades per episodis hipoglucèmics. Aquestes manifestacions anatòmiques posen de manifest el paper decisiu dels cossos cetònics en el desenvolupament normal del cervell en l'etapa postnatal. La majoria dels pacients tenen un desenvolupament normal (Gibson *et al.*, 1988a; Casale *et al.*, 1998). Un pacient amb l'acidúria va morir de mort sobtada infantil (Vilaseca *et al.*, 1986). Molts dels simp-

tomes esmentats han estat diagnosticats anteriorment com a síndrome de Reye-like (Leonard *et al.*, 1979; Robinson *et al.*, 1980; Shilkin *et al.*, 1981; Greene *et al.*, 1986). Com que altres deficiències hereditàries mostren símptomes anàlegs englobables al *Reye-like*, és necessària la determinació dels àcids orgànics a l'orina per tal d'obtenir-ne una classificació correcta. Els pacients amb la síndrome de Reye no mostren augments significatius en els àcids orgànics, observats a l'orina dels pacients amb l'acidúria 3-hidroxi-3-metilglutàrica.

Metabòlits en orina

La impossibilitat de metabolització de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA duu a la seva deacilació amb elevació dels nivells de l'àcid 3-hidroxi-3-metilglutàric (HMG) (figura 1). Aquest és el metabòlit característic d'aquesta malaltia, el qual en la majoria dels casos condueix al seu diagnòstic. Alguna altra malaltia mostra també excreció d'aquest àcid, com ara la deficiència de carbamil fosfat sintetasa o la malaltia de *Leigh-like*, encara que solen ser casos aïllats. L'àcid 3-hidroxi-3-metilglutàric augmenta d'una manera molt significativa en la deficiència de HMG-CoA liasa des dels 50-90 mmol HMG/mol de creatinina en el nen normal

de pocs mesos de vida (Lippe *et al.*, 1982) fins a nivells amb mitjanes d'11.000 mmol HMG/mol de creatinina (amb un rang de valors extrems de 1.500 a 19.000 mmol HMG/mol de creatinina) en els nens amb acidúria 3-hidroxi-3-metilglutàrica. A causa de la reversibilitat de la reacció catalitzada per la 3-metilglutaconil-CoA hidratasa, es forma també àcid 3-metilglutacònic en proporcions semblants a les de l'àcid 3-hidroxi-3-metilglutàric. També la reversibilitat de la reacció catalitzada per la 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa condueix a la producció d'àcid 3-hidroxiisovalèric en una proporció del voltant del 30 % de la quantitat de 3-hidroxi-3-metilglutàric. Aquest compost pot convertir-se en 3-metilcrotonilglicina (Faull *et al.*, 1976; Wysocki i Hahnel, 1978; Wilson *et al.*, 1984), com també en petites quantitats d'àcid 3-metilcrotònic (Wysocki *et al.*, 1976; Duran *et al.*, 1978; Jacobs *et al.*, 1980). Shinka *et al.* han mostrat que, tot i amb una dieta baixa en leucina, el 3-metilglutacònic i el 3-hidroxi-3-metilglutàric es troben a nivells anormalment alts (Shinka *et al.*, 1992). Els nivells d'aquests àcids orgànics en quatre pacients estudiats pel nostre grup es donen a la taula 1 (Casale *et al.*, 1998). Quantitats menors d'altres àcids orgànics també en són característics: entre ells l'àcid 3-metilcrotònic, l'àcid glutàric i l'àcid adípic (Duran *et al.*, 1978; Divry *et al.*, 1981; Wilson *et al.*, 1984;

TAULA 1. Els àcids orgànics i l'activitat HMG-CoA liasa en uns quants pacients amb acidúria 3-hidroxi-3-metilglutàrica.

Metabòlits	D. G.	J. I.	J. G.	S. T.	Controls
Àcid 3-hidroxi isovalèric	6.407	449	4.351	n.d.c.	< 46
Àcid glutàric	336	57	64	n.d.c.	< 17
Àcid 3-metilglutàric	1.114	289	570	n.d.c.	N.D.
Àcid 3-hidroxi-3-metilglutàric	4.909	1.654	1.150	n.d.c.	< 32
Àcid 3-metilglutacònic	Alta	Alta	alta	alta	N.D.
Activitat HMG-CoA liasa	0,27	0,41	0,1	0,2	5,5

Nota: n.d.c., no determinat quantitativament. Els àcids orgànics s'expressen en mg / g de creatinina. L'activitat HMG-CoA liasa s'expressa en nmol de l'HMG-CoA transformat/min/mg proteïna.

Greene *et al.*, 1984; Zoghbi *et al.*, 1986). És característic que no aparegui cap dels dos cossos cetònics, l'àcid acetoacètic i l'àcid β -hidroxibutíric, tot i que altres àcids no relacionats amb les rutes metabòliques apareguin en major o menor grau; així, l'àcid làctic sol observar-se en episodis greus, generalment associat a una disfunció cardiovascular (Gibson *et al.*, 1994). S'ha aplicat també l'espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear de protó per a la determinació dels àcids orgànics en orina per al diagnòstic de l'acidèmia (Iles *et al.*, 1986). Com passa en altres acidúries, la proporció d'acilcarnitina a carnitina lliure augmenta en orina (Chalmers *et al.*, 1989), i s'ha detectat en un pacient la presència de 3-metilglutaril carnitina (Scher i Rodwell, 1989).

Deficiència enzimàtica

El fet que aquests àcids orgànics apareguin també en altres malalties associades amb el metabolisme de la leucina fa necessària la determinació de l'activitat enzimàtica HMG-CoA liasa com un sistema de confirmar la malaltia d'una manera inequívoca. La determinació es pot dur a terme en fibroblasts (Wysocki i Hahnel, 1976a), leucòcits (Wysocki i Hahnel, 1976b), o fetge (Schutgens *et al.*, 1979; Robinson *et al.*, 1980), ja que el gen de la HMG-CoA liasa s'expressa pràcticament en tots els teixits. Existeixen diversos assajos radioactius (Gibson *et al.*, 1990; Kikuchi *et al.*, 1990), així com un assaig espectrofotomètric (Wanders *et al.*, 1988a). La quantitat residual d'activitat enzimàtica en els individus afectats oscil·la entre el 0,7 % i el 8 % segons la localització de la mutació. La mitjana d'activitat HMG-CoA liasa en individus sans és de 5,2 nmol HMG-CoA transformats/min/mg proteïna (interval 3,5-6,4) (Casale *et al.*, 1998; Sovik *et al.*, 1984). Els pacients heterozigots per a la deficiència

en HMG-CoA liasa, són difícils de diagnosticar sobre la base de l'activitat enzimàtica HMG-CoA liasa, ja que per una part l'activitat enzimàtica, que sol tenir valors intermedis entre els descrits de la normalitat i els homozigots, coincideix amb l'interval de normalitat (Duran *et al.*, 1979; Gibson *et al.*, 1982; Wilson *et al.*, 1984; Stacey *et al.*, 1985; Zoghbi *et al.*, 1986; Barash *et al.*, 1990); i per una altra part, generalment els heterozigots no mostren dades clíniques que en facin sospitar la condició d'heterozigots per a la deficiència de HMG-CoA liasa.

El diagnòstic prenatal de la deficiència es realitza amb la presència de nivells augmentats dels àcids 3-hidroxi-3-metilglutàric, 3-metilglutacònic i 3-hidroxiàcètic en l'orina materna entre la setmana vint-i-tres de gestació i el part (Duran *et al.*, 1979). La determinació es pot fer també abans en líquid amniòtic (Chalmers *et al.*, 1989). Es pot tenir confirmació de la deficiència de la HMG-CoA liasa en amniòcits cultivats o en *villi* coriònics (Wanders *et al.*, 1988b; Chalmers *et al.*, 1989; Mitchell *et al.*, 1995).

Tractament

El tractament d'episodis aguts consisteix en l'administració intravenosa de glucosa per controlar la hipoglucèmia. Aquest sistema habitualment corregeix *per se* l'acidosi metabòlica (Shilkin *et al.*, 1981). El tractament preventiu, a més llarg termini, usualment s'aconsegueix amb dietes baixes en proteïna i greix, per tal d'evitar la ingesta de leucina i la síntesi de cossos cetònics (Faull *et al.*, 1976; Wysocki i Hahnel, 1986). És sabut que el mitocondri estimula la síntesi de HMG-CoA a través de l'acció dels àcids grassos en el promotor de la HMG-CoA sintasa mitocondrial (Ayté *et al.*, 1990; Gil-Gómez *et al.*, 1993) per l'acció mediada del *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR)

TAULA II. Mutacions al·lèliques de HMG-CoA liasa

Sexe	Posició	Mutació	Codó	Exó	Casos	Origen ètnic	Comentaris	Referències
H	202.207	-CT	<i>Ser 59 Cys</i>	3	2	Acadià-francès-canadenc	Canvi de marc, codó <i>stop 79</i>	Mitchel <i>et al.</i> , 1993
H	134-137	+A	<i>Asn 46 Lys</i>	2	2**	Italià	Canvi de marc, codó <i>stop 47</i>	Mitchel <i>et al.</i> , 1995
H	145-137	417 nt del	49-187	3,4,5,6	1	Turc	Delecció <i>Asn 49/Glu 187</i> , en marc	Wang <i>et al.</i> , 1995
H	61-561	501 nt del	21-187	2,3,4,5,6	1	Anglès	Delecció <i>Val 21/Glu 187</i> , en marc	Wang <i>et al.</i> , 1993
D	233	-	<i>His233Arg</i>	7	-	-	Modificació <i>His catalítica</i>	Roberts <i>et al.</i> , 1993
D	Ivs 8 (+1)	AGgt-Agtt	-	Ivs 8	1	Turc	Destruïx 5' SS	Buesa <i>et al.</i> , 1993
H, D	109	GAA-TAA	<i>Glu 37 Ter</i>	2	2	Portuguès, marroquí	Eliminació parcial exó 2	Pié <i>et al.</i> , 1993
D	504-505	-CT	<i>Val 168</i>	6	1	Espanyol	Canvi de marc, codó <i>stop 176</i>	Casals <i>et al.</i> , 1993
H, D	109	GAA-TAA	<i>Glu 37 Ter</i>	2	4	Tres espanyols, un turc	Eliminació parcial exó 2	Casals <i>et al.</i> , 1993
D	698	-	<i>His233Arg</i>	7	1	Francès	Modificació <i>His catalítica</i>	Zapater <i>et al.</i> , 1998
D	788	-	<i>Leu263Pro</i>	8	1	Francès	Modificació <i>Leu catalítica</i>	Zapater <i>et al.</i> , 1998

* Les posicions es refereixen a la numeració de la seqüència del cDNA de Mitchell *et al.* (1993)

** Un cas d'un fetus avortat

SS, lloc de *splicing*.

(Rodríguez *et al.*, 1994). De fet, s'ha observat que la restricció d'àcids grassos és més eficaç que la restricció de proteïnes per evitar episodis aguts d'hipoglucèmia hipocetòsica en aquests pacients (Berry *et al.*, 1981; Walter *et al.*, 1986). Una dieta ha de tenir, en conseqüència, una proporció d'1,5 a 2,0 g proteïna/kg pes (50-150 mg de leucina/kg) per dia (Berry *et al.*, 1981; François *et al.*, 1981; Norman *et al.*, 1982) i una restricció de greix a tan sols un 25 % del total de calories diàries, i un augment del percentatge de carbohidrats fins al total de calories diàries. S'han d'evitar les infeccions, perquè el catabolisme proteic és major i hi ha major producció de metabòlits de leucina, en particular d'àcid 3-hidroxiiisovalèric (Thomson *et al.*, 1990). Fa un temps es va pensar que la ingesta de carnitina podia tenir algun avantatge en el tractament d'aquesta malaltia (Roe *et al.*, 1986; Dasouki *et al.*, 1987), però avui dia s'ha descartat aquesta pràctica.

Genètica

Fins al 1998 només s'han descrit en l'àmbit molecular les mutacions responsables de quinze pacients, amb un total de nou mutacions al·lèliques diferents. De les mutacions descrites, només tres pacients presenten grans deleccions en el genoma, que conduï-

xen a proteïnes molt truncades. Altres pacients tenen mutacions puntuals d'un o de dos nucleòtids que determinen el truncament prematur de les proteïnes per canvi del marc de lectura. Dos pacients tenen el dinucleòtid CT delecionat tot i que en llocs diferents. Només una mutació puntual al·lèlica condueix a un codó d'aturada, mentre que la resta són mutacions *missense* sense canvi de marc de lectura, però que afecten aminoàcids que intervenen en el procés catalític. Una de les mutacions és en el nucleòtid +1 de l'intró 8, la qual cosa determina la producció de dos transcrits, un amb delecció de l'exó 7 i un altre amb una inserció de setanta-vuit nucleòtids en l'exó 8. Ambdós determinen la codificació de dues proteïnes catalíticament no actives. Un quadre global de les mutacions conegudes es presenta a la taula II.

DESCRIPCIÓ DE LES MUTACIONS RESPONSABLES DELS CASOS CONEGUTS

Casos núm. 1 i 2

El 1993, Mitchell i col·l. (Mitchell *et al.*, 1993) reportaren dos casos d'un pedigrí familiar acadià-francès-canadenc, que tenien tota la simptomatologia de l'acidúria 3-hi-

droxi-3-metilglutàrica, amb una activitat enzimàtica només del 0,5 % del límit mínim de l'interval de referència i amb el patró urinari d'àcids orgànics típic ja descrit. Els nivells de mRNA eren molt baixos comparats amb individus control. L'anàlisi *single strand conformational polymorphism* (SSCP) mostrà que el fragment amplificat per PCR comprès entre els nucleòtids 557 i 756 migrava de manera diferent al control. La seqüenciació d'aquest fragment conduí a l'observació que de la seqüència CTCTCT del control (nucleòtids 202 al 207), el pacient tenia una deleció d'un dinucleòtid CT que determinava un marc de lectura alterat. La proteïna codificada resultant es modificava a partir de la serina 69 i es truncava prematurament deu aminoàcids després, i els vuit darrers aminoàcids eren diferents dels normals. Atès que la cisteïna catalítica es troba en la posició 266, la proteïna codificada resultant de la mutació en ambdós al·lels havia perdut el lloc catalític i, per tant, estava totalment mancada d'activitat enzimàtica.

Casos núm. 3 i 4

L'equip de Mitchell reportà el 1995 dos casos més de deficiència en HMG-CoA liasa (Mitchell *et al.*, 1995). El primer cas és el del primer fill d'uns cosins germans italians. Als dos dies de vida es manifestà l'acidosi metabòlica, que es normalitzà amb tractament adequat. Als nou mesos, durant una infecció respiratòria, el nen va tenir convulsions després del dejuni nocturn, suor freda i no mostrava reacció a estímuls externs. Tenia hipoglucèmia no cetòtica, acidosi metabòlica i gastritis hemorràgica. L'anàlisi d'orina mostrà el patró d'àcids orgànics típic de l'acidúria amb nivells de 3-hidroxi-3-metilglutàric de 1.425 mmol HMG/mol creatinina, 6.572 d'àcid metilglutacònic, 1.702 de hidroxiisovalèric. Encara que no ha tin-

gut altres episodis d'hipoglucèmia, el pacient és retardat mental greu i epilèptic greu. Una tomodensitometria cerebral realitzada als quinze mesos ha mostrat atròfia generalitzada del còrtex cerebral, matèria blanca supratentorial dels nuclis caudat i lenticular, sense afectació del tàlem i cerebel.

L'amplificació de DNA genòmic pel PCR amb oligonucleòtids (primers) situats als introns mostrà, després de l'anàlisi de SSCP i la seqüència, una mutació per inserció d'una adenina en una seqüència de quatre adenines en posicions 134-137 del cDNA de la HMG-CoA liasa. Això determina un canvi del marc de lectura amb modificació a partir de l'asparagina 46 (mutació N46fs (+1)). La proteïna resultant té un truncament prematur nou aminoàcids després i és inviable des d'un punt de vista catalític. Els pares tenien la mateixa mutació en un dels seus al·lels. L'anàlisi d'una mostra de *villus* coriònic del fetus en una gestació posterior de la mateixa mare mostrà que era normal i els nivells d'àcids orgànics estaven dins de l'interval de la normalitat. Lamentablement, la mare va tenir una pèrdua de fluid amniòtic i va patir un avortament natural en un altre hospital, i no es van poder determinar més dades d'aquest fetus. En un embaràs posterior, l'amniocentesi practicada al fetus en la setmana 16,4 mostrà que els nivells de 3-hidroxi-3-metilglutàric eren elevats. L'amplificació del DNA genòmic obtingut d'amniòcits mostrà la mateixa inserció N46fs (+1) del fetus. Se li practicà un avortament terapèutic i l'anàlisi del DNA del fetge fetal confirmà aquestes dades.

Casos núm. 5 i 6

El mateix equip el 1996 reportà el cas de dos nous pacients (descrits com a HL27 i HL29), que per tècnica de Southern *blot*

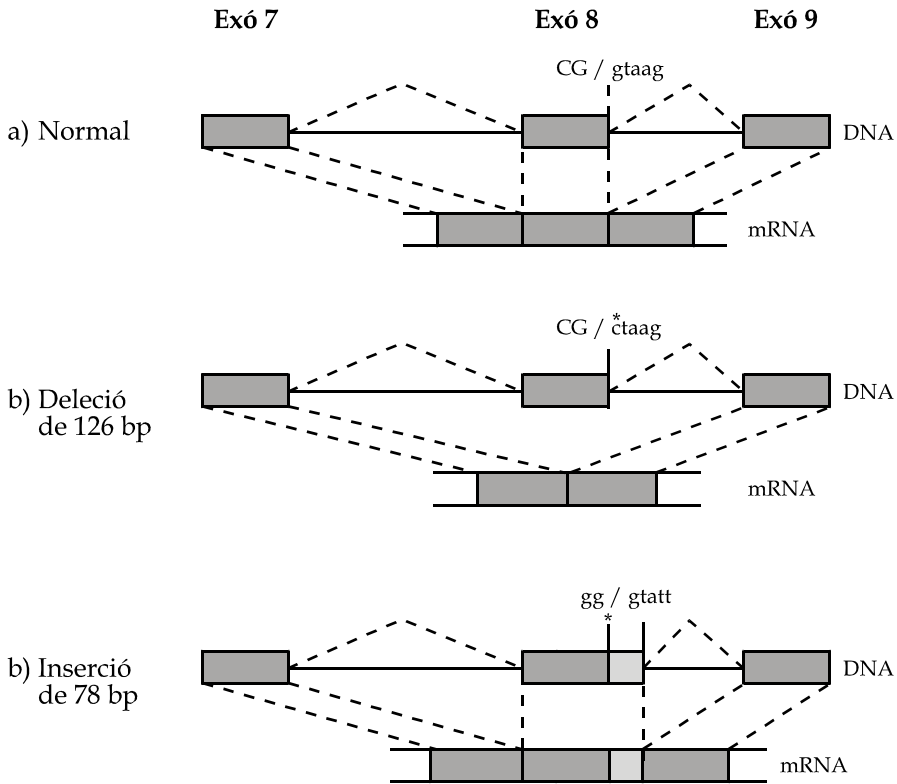


FIGURA 2. Representació esquemàtica de la maduració per tall i unió anormal dels mRNA de la HMG-CoA liasa en el pacient E. C. (Buesa *et al.*, 1996). La transversió G-C (marcada amb un asterisc (*)) elimina el lloc 5' donador de tall i unió en l'intró i permet la formació d'una altra espècie de mRNA com a resultat de l'eliminació de l'exó 8; a més, l'activació d'un lloc donador críptic en el mateix intró determina la formació d'un altre mRNA anormal.

mostraven una deleció important en el gen de la HMG-CoA liasa (Wang *et al.*, 1996). El pacient HL29 tenia una deleció genòmica

d'unes 8 kb, que representava la pèrdua dels exons 3 al 6, mentre que el pacient HL27 tenia una deleció d'unes 12 kb amb pèrdua dels exons 2 al 6. Ambdós al·lels estaven mutats en els dos casos i eren les dues úniques deleccions de diverses kb que s'han reportat. Amb una pèrdua tan important de material genètic les proteïnes HMG-CoA liasa codificades havien perdut 145 i 166 aminoàcids respectivament. L'activitat enzimàtica en ambdós casos resultà ser menor de 0,1 nmol/min/mg proteïna, és a dir, menor del 2 %.

TAULA III. Determinacions analítiques del pacient E. C. (Buesa *et al.*, 1996).

- Glucosa	1mM	(N 2,8-6,0)
- ALT	291 U/l	(N 7-43)
- AST	495 U/l	(N 3-47)
- Àcid úric	1,14 mM	(N 0,05-0,4)
- pH de la sang	7,07	(N 7,4)
- pCO ₂	28,5 mm Hg	(N 7-40)
- CO ₃ H ⁻	7,9 mmol / l	(N 21-28)

Tots els àcids orgànics de l'acidúria són presents a l'orina.
Activitat enzimàtica < 0,1 nmol/mg prot. Min (N 27,5±4)

Cas núm. 7

El nostre grup reportà el 1996 un cas interessant (Buesa *et al.*, 1996) perquè representava la primera mutació observada en zona no codificant, ja que tenia lloc en el nucleòtid +1 de l'intró núm. 8 (Ivs 8 (+1)). En el moment del diagnòstic el pacient (nen) tenia quatre dies de vida i presentava els trets típics de la malaltia (taquipnea, hepatomegàlia, letàrgia i hipotonia). Les dades analítiques i l'activitat enzimàtica HMG-CoA liasa, es donen a la taula III. Fou tractat en el Wilhelmina Kinderziekenhuis, a Utrecht (Holanda), amb solució intravenosa de glucosa i bicarbonat, i es recuperà al cap de pocs dies. Els seus pares i germans eren asintomàtics, les seves concentracions sèriques de glucosa eren normals i la seva activitat enzimàtica era a la meitat del límit superior de l'interval de referència de normalitat. Una anàlisi Southern no va mostrar que el gen HMG-CoA liasa del pacient tingués grans delecions. L'amplificació del cDNA (obtingut per RT-PCR dels mRNA) utilitzant sis parells d'encebadors parcialment coincidents, mostrà que el pacient tenia dos tipus de mRNA diferents, un amb una deleció i un altre amb una inserció. La seqüenciació dels fragments amplificats per PCR mostrà que la deleció afectava completament l'exó 8, mentre que la inserció era de 78 bp addicionats a la zona 3' de l'exó 8. Quan es va fer una amplificació genòmica des de l'exó 8 a l'exó 9 s'observà que l'intró 8 (d'unes 2,1 kb) tenia una transversió (G-C) en el nucleòtid +1 que determinava una seqüència de *splicing no consensus ctaag*. També s'observà que la seqüència de la inserció corresponia als primers 78 bp de l'intró 8.

La figura 2 mostra les diferents opcions de maduració per tall i unió que s'havien produït per la mutació observada. 1) En no ésser reconeguda la seqüència *ctaag* com a seqüència correcta de tall i unió hi ha una deleció

sencera de l'exó anterior com a primera opció. 2) Una altra possibilitat que la maquinària de tall i unió ha permès, ha estat la recerca d'una seqüència *consensus* de l'esmentat tall i unió al llarg de l'intró, cosa que aconseguix en el nucleòtid 78 de l'intró (seqüència *gtatt*), en estar el transcrit en fase de lectura. Les proteïnes codificades per aquests dos transcrits són incapaces d'ésser enzims eficients: la primera, pel fet de perdre 126 pb dels que contenen el lloc catalític, no pot ser un enzim actiu. Pel que fa a la segona proteïna, en el curs dels setanta-vuit nucleòtids insertats existeix un codó d'aturada en l'aminoàcid codificat en la posició 18, per la qual cosa la proteïna no sols queda truncada prematurament, sinó que els últims disset aminoàcids són aberrants; per això és probable que no sigui un catalitzador correcte. A més, ha perdut el senyal d'entrada al peroxisoma i el senyal de formació de l'homodímer. D'altra banda, mitjançant PCR quantitatiu s'observà que la proporció del transcrit insertat era tan sols de l'1,2 %, mentre que el transcrit delecionat (sense centre catalític) era del 98,8 %. L'anàlisi dels pares i germans confirmà que ambdós pares eren heterozigots per a la mutació, com també ho eren dos germans mascles. Un tercer germà estava absent de mutació (figura 3). Aquests resultats van ser transmesos a la família com a consell genètic.

Casos núm. 8 i 9

Dos casos amb la mateixa mutació foren objecte d'estudi del nostre grup (Pié *et al.*, 1997). Un dels pacients (R. R.) era portuguès nascut de pares consanguinis. Dos germans anteriors havien mort prematurament. El tercer dia de vida presentà símptomes de vòmits, hipotonia, hepatomegàlia i acidosi metabòlica sense cetosi. Alimentat amb una llet artificial sense leucina, es va recuperar ben aviat. L'activitat enzimàtica HMG-CoA

liasa fou pròxima a zero. L'anàlisi d'orina per cromatografia gasosa mostrà concentracions elevades dels àcids 3-hidroxiisovalèric, 3-glutàric, 3-metilglutàric i un gran pic de 3-hidroxi-3-metilglutàric. L'estudi metabòlic es va dur a terme a l'hospital Debrousse de Lyon (França). L'altra pacient era marroquina nascuda de pares consanguinis. El segon dia de vida va tenir vòmits, convulsions, hipotonia, lleugera hepatomegàlia i hipoglucèmia (< 20 mg/dl), que es va corregir amb l'administració intravenosa de glucosa. L'amoni sèric fou de 375 μ g/dl (normal 0-100). L'orina mostrà el conjunt

d'àcids orgànics típics de l'alteració. L'activitat enzimàtica fou 3 % del control. Tot i que ha tingut algunes crisis, en les quals el patró d'àcids orgànics torna a aparèixer, la nena a l'edat de tres anys continua viva amb un desenvolupament normal i ha estat tractada en el Provinciaal Centrum voor Opsporing van Metabole Aandoeningen a Antwerpen (Bèlgica).

L'anàlisi genètica es va portar a terme, com en el cas anterior, per RT-PCR a partir de RNA obtinguts de fibroblasts en cultiu dels pacients. L'amplificació dels cinc fragments coincidents en què es va dividir el

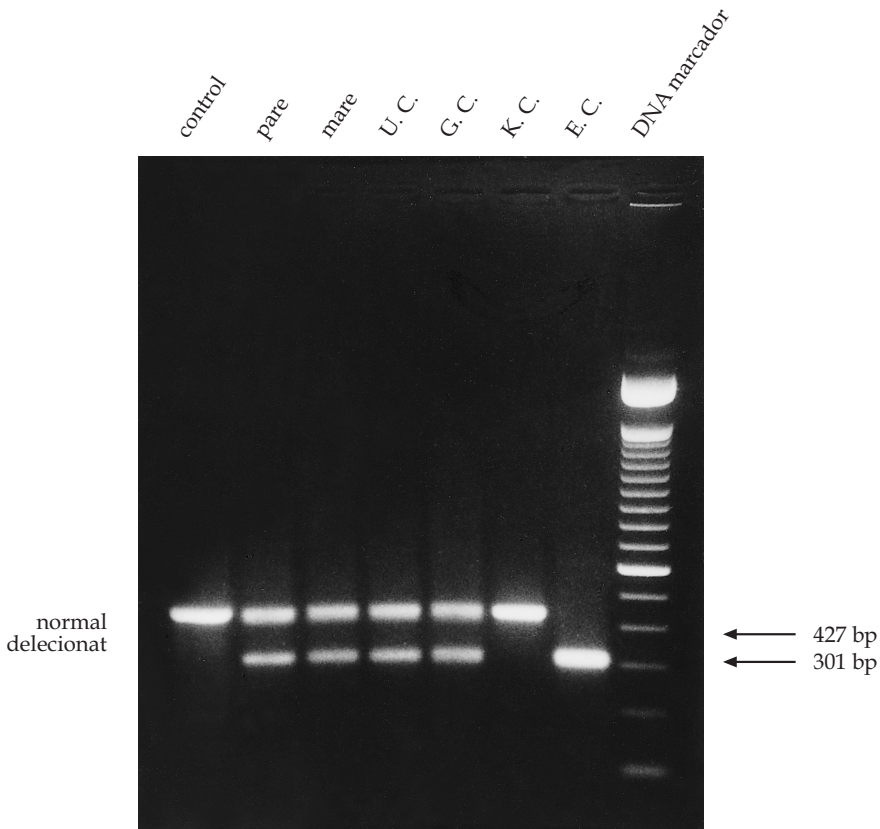


FIGURA 3. Amplificacions per PCR del cDNA del provant E. C., dels seus pares, dels seus germans i d'un control humà (Buesa *et al.*, 1996). L'aparició de dues bandes corresponents als dos mRNA (un, el tipus salvatge i l'altre, l'mRNA delecionat) es veu clarament en els pares i dos germans (U. C. i G. C.). El pacient (E. C.) té solament la banda delecionada. El tercer germà (K. C.) mostra només la banda del control en els dos al·lels, i no transporta la malaltia.

cDNA mostrà que el fragment +5' del pacient amplificava dues bandes, una de la mida esperada i l'altra més petita. L'anàlisi SSCP mostrà que el fragment +5' del cDNA del pacient tenia alterada la mobilitat electroforètica respecte del control. La seqüenciació dels dos fragments amplificats en la zona +5' mostrà que un dels fragments (el de la mateixa mida) tenia una mutació puntual G-T en el nucleòtid 109 que canviava el triplet 37 (GAA) (glutàmic) a (UAA), és a dir, un codó de terminació. La seqüenciació del fragment menor mostrava una deleció de 84 bp corresponent en mida i posició a l'exó 2 complet. Les proteïnes codificades per aquests dos transcrits eren diferents. La que es deduïa del codó de terminació produïa una proteïna que contenia el pèptid líder d'entrada dins de la mitocondria i solament nou aminoàcids més, cosa que impedia qualsevol tipus d'acció catalítica. L'altra proteïna, la que es deduïa de la deleció de l'exó 2, determinava que el pèptid líder d'entrada a la mitocondria estigués truncat en els últims set aminoàcids i que a la proteïna madura li faltessin vint-i-un aminoàcids de l'extrem amino terminal. No se sap *a priori* quin efecte pot produir la pèrdua dels últims set aminoàcids del pèptid líder quant a l'entrada en el mitocondri de la proteïna HMG-CoA liasa. Encara que la proteïna hi entrés, és probable que no fos processada a causa de la manca del senyal de processament. Sigui com sigui, les dades clíniques i analítiques mostren que la proteïna resultant ha de tenir com a molt un 3 % de l'activitat total. La quantificació dels mRNA per PCR quantitativament mostrà que la proporció dels dos transcrits (mRNA delecionat *vs.* mRNA amb codó de *stop*) és de 1:2,73, és a dir, un percentatge de 26,8 % *vs.* 73,2 %.

La raó de la deleció de l'exó 2 s'ha de buscar en la mutació puntual. En efecte, l'exó 2 té una seqüència *exonic splicing enhancer* (ESE) que la mutació ha modificat.

Les seqüències ESE afecten la selecció dels llocs de tall i unió, ja sigui regulant la inclusió de l'exó en el lloc de tall i unió, ja sigui fent una retenció d'intró (Ramchatesingh *et al.*, 1995). Aquí la modificació de la seqüència ESE GGAAG a GTAAG ha estat la causa determinant que s'hagi produït la falta de reconeixement del lloc correcte de *splicing* i que s'hagi produït la pèrdua de l'exó. Vist des d'un punt de vista evolutiu, aquest tipus de mutació hauria pogut tenir algun avantatge, perquè almenys es produeix un transcrit en el qual sols s'han perdut vint-i-un aminoàcids de la part amino terminal. D'una altra manera la generació del codó de *stop* i la producció d'una proteïna madura de tan sols nou aminoàcids hauria estat absolutament letal. Com a mínim el 3 % d'activitat de l'enzim HMG-CoA liasa pot determinar una petita sortida a la malaltia.

Cas núm. 10

Un nou cas, diferent dels anteriors, fou reportat pel nostre grup el 1997 (Casals *et al.*, 1997). La pacient és una nena espanyola de disset anys (C. G. L.) nascuda de pares no consanguinis. Als nou mesos fou ingressada en un hospital amb símptomes de la síndrome de Reye. Als cinc anys en va tenir un nou episodi amb vòmits, seguit de convulsions i coma. Se li va administrar un tractament de carnitina fins als nou anys. Als quinze se la va ingressar a l'Hospital Xeral de Santiago de Compostela per conèixer l'origen dels episodis tipus *Reye-like*. L'exploració va ser normal, solament se li van detectar senyals elevades en l'electroencefalograma en T2 de la matèria blanca cerebral (leucariosi). El patró d'àcids orgànics mostrà el fenotipus de deficiència en HMG-CoA liasa que es va confirmar per una activitat HMG-CoA liasa de 0,8 nmol/min mg proteïna (6,8 % del control).

L'anàlisi mutacional mostrà una transferència Southern igual que el control, fet que feia suposar mutacions puntuals. L'amplificació dels cinc fragments d'unes 230 bp parcialment coincidents a partir de l'amplificació per RT-PCR dels mRNA, mostrà l'aparició de dues bandes de mida menor que el control en la zona dels exons 5 i 6. La seqüenciació de les bandes amplificades mostrà que hi havia tres transcrits diferents del control: 1) el de mida molecular anàloga al control mostrava una deleció del dinucleòtid CT en les posicions 504 i 505 (exó 6); 2) dels altres dos, el de mida molecular major presentava una deleció de seixanta-quatre nucleòtids idèntics als constitutius de l'exó 6; 3) el tercer transcrit mostrava una deleció de 213 nucleòtids, corresponents en estructura i posició als exons 5 i 6. L'anàlisi genòmica mostrà que l'única mutació observada era la deleció del dinucleòtid CT (504 i 505), fet que originava l'aparició dels altres transcrits (figura 4).

La raó molecular d'eliminació de l'exó 6 o dels exons 5 i 6 respectivament en els trans-

crits analitzats pot suposar-se d'acord amb la posició del dinucleòtid deletzionat. El dinucleòtid CT ocupa les posicions 7 i 8 de l'exó 6. Igual que passa en altres gens amb mutacions anàlogues, en aquesta posició es produeix probablement una manca d'interacció entre l'exó i la partícula snRNP U5, la qual determina el posicionament de l'exó 5 en el llaç complex intró 3'-exó, que en aquest cas es perdria. La pèrdua de l'exó 5 arrossegaria també en un cert percentatge la pèrdua de l'exó 6.

Les proteïnes codificades per aquests tres transcrits no són capaces de catalitzar la reacció HMG-CoA liasa. La que s'origina per la deleció del dinucleòtid CT determina un canvi del marc de lectura que representa la inserció de set aminoàcids aberrants LCSWLPL que precedeixen un codó de terminació, cosa que fa que la proteïna es trunqui en l'aminoàcid 175 (la proteïna *wild type* té 325 aminoàcids). El segon transcrit amb deleció de l'exó 5 (seixanta-quatre nucleòtids) duu a un canvi del marc de lectura que determina la inserció de vint-i-sis aminoàcids aberrants que precedeixen un codó de

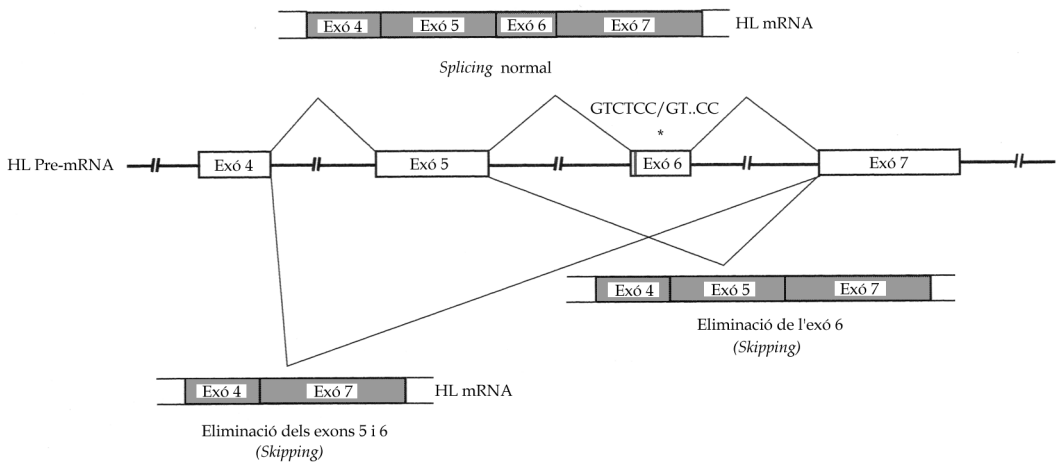


FIGURA 4. Representació esquemàtica de la maduració per tall i unió (*splicing*) normal i dels dos llocs de tall i unió aberrants en el gen de la HMG-CoA liasa del pacient C. G. L. (Casals *et al.*, 1997). Un dels *splicings* produeix l'eliminació de l'exó 6 i l'altre l'eliminació dels exons 5 i 6. L'asterisc (*) indica la localització de la deleció de dos parells de bases en les posicions 7 i 8 de l'exó 6.

terminació. També la proteïna es trunca prematurament en l'aminoàcid 192. El tercer transcrit (amb deleció dels exons 5 i 6) no modifica el marc de lectura, però representa una deleció de setanta-un aminoàcids. Aquesta pèrdua representa un 24 % dels aminoàcids en el centre de la proteïna madura. Sembla probable que la deleció de setanta-un aminoàcids produeixi una proteïna catalíticament inactiva, incapaç de sostenir la síntesi de HMG-CoA mitocondrial. La quantificació dels transcrits per PCR quantitatiu ha mostrat que hi són en una proporció de 4:8:88 %, i el de major proporció és el de la deleció dels exons 5 i 6.

Casos núm. 11-14

Quatre casos foren estudiats conjuntament pel nostre grup, tres dels quals eren pacients espanyols i un altre turc (Casale *et al.*, 1998). Els pacients, tres nens i una nena, van manifestar símptomes anàlegs als ja descrits, amb hipotonia, letàrgia, hipoglucèmia, pujada de transaminases, àcids orgànics característics i molt baixa activitat HMG-CoA liasa (taula 1). Els tres pacients espanyols continuen vius amb unes edats actuals de catorze, deu i deu anys, però el pacient turc, tractat a l'Hospital Universitari d'Utrecht (Holanda), va morir a l'edat de tres anys. El curs clínic d'aquest pacient va ser més complicat que el dels altres tres descrits, perquè ja el primer dia de vida presentà cianosi i hipoglucèmia i va requerir assistència respiratòria durant uns quants dies. Una altra crisi va tenir lloc als cinc mesos, fet que obligà a posar-lo en una dieta restringida en proteïna i abundància de carbohidrats. Als disset mesos va ser hospitalitzat amb pneumònia. Mostrà tetraplègia espàstica, hipotonia axial, visió pobra i poca audició, absència de contacte social, hepatomegàlia i epilèpsia multifocal.

L'anàlisi mutacional es realitzà seguint les pautes descrites pel nostre grup, a través de la tècnica de RT-PCR. Després de l'amplificació i seqüència s'observà que aquests quatre pacients tenien la mutació descrita en els casos núm. 8 i 9, és a dir, una transversió G-T en el nucleòtid 109, fet que origina dos transcrits, un amb un codó de terminació i l'altre amb la deleció de l'exó 2. Se subclonaren els fragments amplificats d'un pacient espanyol i es va observar en un dels clons l'aparició d'una deleció de 192 nucleòtids del nucleòtid 61 al 252, la qual correspon en seqüència i localització als exons 2 i 3. Això significa que la causa apuntada en els casos 8 i 9 d'eliminació de l'exó 2 per mutació en una seqüència ESE produeix en una petita proporció, a més, l'eliminació dels exons 2 i 3. Aquesta deleció manté el marc de lectura, si bé la proteïna codificada per aquest transcrit té una pèrdua de seixanta-quatre aminoàcids (set de la porció carboxi terminal del pèptid líder i cinquanta-set de la porció amino terminal de la proteïna madura). No és fàcil establir relacions fenotipus-genotipus en aquesta malaltia. Els quatre pacients, més els dos descrits anteriorment, tenen la mateixa mutació; no obstant això, el curs clínic evolutiu ha estat molt diferent. La dieta, els períodes de dejuni i les infeccions semblen els determinants d'aquesta afecció, així com les característiques genètiques generals dels pacients. Aquesta mutació és la més abundant de totes les reportades (set pacients, un de no publicat encara, Hegardt *et al.*, d'un total de setze). Els pacients d'aquesta malaltia (quatre espanyols, un portuguès, un marroquí i un turc) mostren una localització geogràfica definida, la qual cosa ha determinat que aquesta mutació hagi estat anomenada pel nostre grup com la mutació mediterrània (Casale *et al.*, 1998)

Cas núm. 15

Un cas més (Zapater *et al.*, 1998) representa dues noves mutacions al·lèliques, diferents de les revisades. Són mutacions puntuals que afecten el centre catalític. Aquesta pacient francesa, que tenia manifestacions fenotípiques de la síndrome de *Reye-like* (Karcher *et al.*, 1993), té també una activitat HMG-CoA liasa molt baixa. És el primer cas descrit dins d'aquesta malaltia que és un doble heterozigot.

AGRAÏMENTS

Aquest treball s'ha fet amb Ajudes a la Recerca de la Fundació Ramón Areces i de la Generalitat de Catalunya (1997SGR 00137). Agraeixo a Montserrat Fullola la seva col·laboració i suggeriments en la redacció del català.

BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON, D. H.; V. W. RODWELL (1989). «Nucleòtide sequence and expression in *Escherichia coli* of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase gene of *Pseudomonas mevalonii*». *J. Bacteriol.*, núm. 171, pàg. 6468-6472.
- ASHMARINA, L.; N. RUSNAK; H. M. MIZIORKO; G. A. MITCHELL (1994). «3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase is present in mouse and human liver peroxisomes». *J. Biol. Chem.*, núm. 269, pàg. 31929-31932.
- AYTÉ, J.; G. GIL-GÓMEZ; D. HARO; P. F. MARRERO; F. G. HEGARDT (1990). «Rat mitochondrial and cytosolic HMG-CoA synthases are encoded by two different genes». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 87, pàg. 3874-3878.
- BACHAWAT, B. K.; W. G. ROBINSON; M. J. COON (1955). «The enzymatic cleavage of hydroxy methylglutaryl coenzyme A to acetoacetic acid and acetyl-CoA». *J. Biol. Chem.*, núm. 216, pàg. 727-736.
- BARASH, V.; H. MANDEL; S. SELLA; R. GEISER (1990). «3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency: Biochemical studies and family investigation of four generations». *J. Inherit. Metab. Dis.*, núm. 13, pàg. 156-164.
- BERRY, H. K.; F. SUCHY; M. HUNT; E. NORMAN (1981). «Treatment of 3-Hydroxy-3-methylglutaric aciduria in first cousins». A: Walser, M.; J. R. Williamson (ed.). *Metabolism and Clinical Implications of Branched Chain Amino and Keto Acids*. New York: Elsevier/North Holland, pàg. 405.
- BUESA, C.; J. PIÉ; A. BARCELÓ; N. CASALS; C. MASCARÓ; C. H. CASALE; D. HARO; M. DURAN; J. A. M. SMEITINK; F. G. HEGARDT (1996). «Aberrantly spliced mRNAs of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase (HL) gene with a donor splice site point mutation produce hereditary HL deficiency». *J. Lipid Res.*, núm. 37, pàg. 2420-2432.
- CASALE, C. H.; N. CASALS; J. PIÉ; N. ZAPATER; C. PÉREZ-CERDÁ; B. MERINERO; M. MARTÍNEZ-PARDO; J. J. GARCÍA-PEÑAS; J. M. GARCÍA-GONZALEZ; R. LAMA; B. T. POLLTHE; J. A. M. SMEITINK; R. J. A. WANDERS; M. UGARTE; F. G. HEGARDT (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.*, núm. 349, pàg. 129-137.
- CASALS, N.; J. PIÉ; C. H. CASALE; N. ZAPATER; A. RIBES; M. CASTRO-GAGO; S. RODRIGUEZ-SEGADÉ; R. J. A. WANDERS; F. G. HEGARDT (1997). «A two-base deletion in exon 6 of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase (HL) gene producing the skipping of exons 5 and 6 determines 3-hydroxy 3-methylglutaric aciduria». *J. Lipid Res.*, núm. 38, pàg. 2303-2313.
- CHALMERS, R. A.; C. R. ROW; B. M. TRACEY; T. E. STACEY; L. HOPPEL; D. S. MILLINGTON (1983). «Secondary carnitine insufficiency in disorders of organic acid metabolism: Modulation of acyl-CoA/CoA ratios by L-carnitine in vivo». *Biochem. Soc. Trans.*, núm. 11, pàg. 724-725.
- CHALMERS, R. A.; B. M. TRACEY; J. MISTRY; T. E. STACEY; I. R. MCFADYEN (1989). «Prenatal diagnosis of 3-Hydroxy-3-methylglutaric aciduria by GC-MS and enzymology on cultured amniocytes and chorionic villi». *J. Inherit. Metab. Dis.*, núm. 12, pàg. 286-292.
- DASOUKI, M.; D. BUCHANAN; N. MERCER; K. M. GIBSON; J. THOENE (1987). «3-Hydroxy-3-methylglutaric aciduria: Response to carnitine therapy and fat and leucine restriction». *J. Inherit. Metab. Dis.*, núm. 10, pàg. 142-146.
- DIVRY, P.; M. O. ROLLAND; J. TEYSSIER; J. COTTE; M. C. FORMOSINHO FERNANDES; I. TAVARES DE ALMEIDA; C. DA SILVEIRA (1981). «3-Hydroxy-3-methylglutaric aciduria combined with 3-methylglutaconic aciduria: A new case». *J. Inherit. Metab. Dis.*, núm. 4, pàg. 173-174.
- DURAN, M.; D. KETTING; S. K. WADMAN; C. JAKOBS; R. B. H. SCHUTGENS; H. A. VEDER (1978). «Organic acid excretion in a patient with 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency». *Clin. Chim. Acta*, núm. 90, pàg. 187-193.
- DURAN, M.; R. B. H. SCHUTGENS; A. KETEL; H. HEYMANS;

- M. W. J. BERTSSEN; D. KETTING; S. K. WADMAN (1979). «3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency: Postnatal management following prenatal diagnosis by analysis of maternal urine». *J. Pediatr.*, núm. 95, pàg. 1004-1007.
- FAULL, K.; P. BOLTON; B. HALPERN; J. HAMMOND; D. M. DANKS (1976a). «The urinary organic acid profile associated with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria». *Clin. Chim. Acta*, núm. 73, pàg. 553-559.
- FAULL, K.; P. BOLTON; B. HALPERN; J. HAMMOND; D. M. DANKS; R. HAHNEL; S. P. WILKINSON; S. J. WYSOCKI; P. L. MASTERS (1976b). «Patient with defect in leucine metabolism». *N. Engl. J. Med.*, núm. 294, pàg. 1013-1013.
- FRANÇOIS, B.; C. BACHMANN; R. B. H. SCHUTGENS (1981). «Glucose metabolism in a child with 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency». *J. Inherit. Metab. Dis.*, núm. 4, pàg. 163-169.
- GIBSON, K. M.; L. SWEETMAN; W. L. NYHAN; T. M. PAGE; C. GREENE; H. M. CANN (1982). «3-Hydroxy-3-methylglutaric aciduria: A new assay of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase using high performance liquid chromatography». *Clin. Chim. Acta*, núm. 126, pàg. 171-181.
- GIBSON, K. M.; J. BREUER; W. L. NYHAN (1988a). «3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency: Review of 18 reported patients». *Eur. J. Pediatr.*, núm. 148, pàg. 180-186.
- GIBSON, K. M.; J. BREUER; K. KAISER; W. L. NYHAN; E. E. MCCOY; P. FERREIRA; C. L. GREENE; M. G. BLITZER; E. SHAPIRA; F. REVERTE; C. CONDE; P. BAGNELL; D. E. C. COLE (1988b). «3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency: Report of five new patients». *J. Inherit. Dis.*, núm. 11, pàg. 76-87.
- GIBSON, K. M.; C. F. LEE; V. KAMALI; K. JOHNSTON; A. L. BEAUDET; W. J. CRAIGEN; B. R. POWELL; R. SCHWARTS; M. Y. TSAI; M. TUCHMAN (1990). «3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency as detected by radiochemical assay in cell extracts by thin layer chromatography and identification of three new cases». *Clin. Chem.*, núm. 36, pàg. 297-303.
- GIBSON, K. M.; S. B. CASSIDY; L. H. SEAVER; R. J. A. WANDERS; N. G. KENNAWAY; G. A. MITCHELL; R. P. SPARK (1994). «Fatal cardiomyopathy associated with hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency». *J. Inherit. Dis.*, núm. 17, pàg. 291-294.
- GIL-GÓMEZ, G.; J. AYTÉ; F. G. HEGARDT (1993). «The rat mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase gene contains elements that mediate its multihorizontal regulation and tissue-specificity». *Eur. J. Biochem.*, núm. 213, pàg. 773-779.
- GREENE, C. L.; H. M. CANN; B. H. ROBINSON; K. M. GIBSON; L. SWEETMAN; J. HOLM; W. L. NYHAN (1984). «3-Hydroxy-3-methylglutaric aciduria». *J. Neurogenet.*, núm. 1, pàg. 165-173.
- GREENE, C.; M. BLITZER; D. BRONFIN; E. SHAPIRA (1986). «3-Hydroxy-3-methylglutaric aciduria presenting as Reye syndrome in an infant». *Clin. Res.*, núm. 34, pàg. 241A.
- HRUZ, P. W.; H. M. MIZIORKO (1992). «Avian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase: Sensitivity of enzyme activity to thiol/disulfide exchange and identification of proximal reactive cysteines». *Protein Sci.*, núm. 1, pàg. 1144-1153.
- HRUZ, P. W.; C. NARASIMHAM; H. M. MIZIORKO (1992). «3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase: affinity labeling of the *Pseudomonas mevalonii* enzyme and assignment of cysteine-237 to the active site». *Biochemistry*, núm. 31, pàg. 6842-6847.
- ILES, R. A.; J. R. JAGO; S. R. WILLIAMS; R. A. CHALMERS (1986). «3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency studied using 2-dimensional proton nuclear magnetic resonance spectroscopy». *FEBS Lett.*, núm. 203, pàg. 49-53.
- JAKOBS, C.; M. BOJASCH; M. DURAN; D. KETTING; S. K. WADMAN; D. LEUPOLD (1980). «3-Methyl-3-buteneoic acid: An artifact in the urinary metabolic pattern of patients with 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency». *Clin. Chim. Acta*, núm. 106, pàg. 85-89.
- KARCHER, C.; J. M. ROUSSELOT; E. LEFREBvre; M. VIDAILHET (1993). «Deficit en hydroxy-methylglutarylcoenzyme A lyase révélé par un syndrome de Reye chez une fille de 3 ans». *Pédiatrie*, núm. 48, pàg. 385-387.
- KIKUCHI, M.; K. NARISAWA; K. TADA; L. SWEETMAN (1990). «Enzymatic diagnosis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency with high-performance liquid chromatography». *Clin. Chim. Acta*, núm. 189, pàg. 297-301.
- KRAMER, P. R.; H. M. MIZIORKO (1980). «Purification and characterization of avian liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A liase». *J. Biol. Chem.*, núm. 255, pàg. 11023-11028.
- LEONARD, J. V.; J. W. T. SEAKINS; N. K. GRIFFIN (1979). «β-Hydroxy-β-methylglutaric aciduria presenting as Reye's syndrome». *Lancet*, núm. 1, pàg. 680-680.
- LEUPOLD, D.; M. BOJASCH; C. JAKOBS (1982). «3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency in an infant with macrocephaly and mild metabolic acidosis». *Eur. J. Pediatr.*, núm. 138, pàg. 73-76.
- LIPPE, G.; L. GALZIGNA; M. RANCESCONI; C. ZORZI; R. DEANA (1982). «Age dependent excretion of 3-hydroxy-3-methylglutaric acid (HMG) and ketone bodies in the urine of full-term and pre-term newborns». *Clin. Chim. Acta*, núm. 126, pàg. 291-295.
- LISSON, G.; D. LEUPOLD; D. BECHINGER; C. WALLECH (1981). «CT findings in a case of deficiency of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase». *Neuroradiology*, núm. 22, pàg. 99-101.
- MILLS, G. A.; M. A. W. HILL; R. BUCHANAN; D. L. CORINA; V. WALKER (1991). «3-Hydroxy-3-methylglutaric

- aciduria: A possible pitfall in diagnosis». *Clin. Chim. Acta*, núm. 204, pàg. 131-136.
- MITCHELL, G. A.; M. F. ROBERT; P. HRUZ; G. FONTAINE; C. BEHNKE; L. MENDE-MUELLER; K. M. GIBSON; H. MIZIORKO (1991). *Am. J. Hum. Genet.*, núm. 49, pàg. 101 (Extracte).
- MITCHELL, G. A.; M. F. ROBERT; P. W. HRUZ; S. WANG; G. FONTAINE; C. E. BEHNKE; L. M. MENDE-MUELLER; K. SCHAPPER; C. LEE; K. M. GIBSON; H. M. MIZIORKO (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.*, núm. 268, pàg. 4376-4381.
- MITCHELL, G. A.; C. JAKOBS; K. M. GIBSON; M. F. ROBERT; A. BURLINA; C. DIONISI-VICI; L. DALLAIRE (1995). «Molecular prenatal diagnosis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase deficiency». *Prenat. Diagnosis*, núm. 15, pàg. 725-729.
- NARASIMHAN, C.; H. M. MIZIORKO (1992). «*Pseudomonas mevalonii* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase: characterization of the isolated recombinant protein and investigation of the enzyme's cation requirements». *Biochemistry*, núm. 31, pàg. 11224-11230.
- NORMAN, E. J.; M. D. DENTON; H. K. BERRY (1982). «Gas chromatography spectrometric detection of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency in double first cousins». *Clin. Chem.*, núm. 28, pàg. 137-140.
- OZAND, P. T.; A. AL AQEEL; G. GASCON; J. BRISMAR; E. THOMAS; H. GLEISPACH (1991). «3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) lyase deficiency in Saudi Arabia». *J. Inherit. Dis.*, núm. 14, pàg. 174-188.
- PIÉ, P.; N. CASALS; C. H. CASALE; C. BUESA; C. MASCARÓ; A. BARCELÓ; M. O. ROLLAND; M. T. ZABOT; D. HARO; F. EYSKENS; P. DIVRY; F. G. HEGARDT (1997). «A nonsense mutation in the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase gene produces exon skipping in two patients of different origin with HL deficiency». *Biochem. J.*, núm. 323, pàg. 329-335.
- RAMCHATESINGH, J.; A. M. ZAHLER; K. M. NEUGEBAUER M. B. ROTH; T. A. COOPER (1995). «A subset of SR proteins activates *splicing* of the cardiac troponin T alternative exon by direct interactions with an exonic enhancer». *Mol. Cell. Biol.*, núm. 15, pàg. 4898-4907.
- RIBES, A.; P. BRIONES; M. A. VILASECA; R. BARAIBAR; J. M. GAIRI (1990). «Sudden death in an infant with 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency». *J. Inherit. Metab. Dis.*, núm. 13, pàg. 752-753.
- ROBERTS, J. R.; C. NARASIMHAN; P. W. HRUZ; G. A. MITCHELL; H. M. MIZIORKO (1994). «3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase: Expression and isolation of the recombinant human enzyme and investigation of a mechanism for regulation of enzyme activity». *J. Biol. Chem.*, núm. 269, pàg. 17841-17846.
- ROBERTS, J. R.; C. NARASIMHAN; H. M. MIZIORKO (1995). «Evaluation of cysteine 266 of human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase as a catalytic residue». *J. Biol. Chem.*, núm. 270, pàg. 17311-17316.
- ROBERTS, J. R.; G. A. MITCHELL; H. M. MIZIORKO (1996). «Modeling of a mutation responsible for human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase deficiency implicates histidine 233 as an active site residue». *J. Biol. Chem.*, núm. 271, pàg. 24604-24609.
- ROBINSON, B. H.; J. OEI; W. G. SHERWOOD; A. H. SLYPER; J. HEINIGER; O. A. MAMER (1980). «Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase deficiency: Features resembling Reye's syndrome». *Neurology*, núm. 30, pàg. 714-718.
- RODRIGUEZ, J. C.; G. GIL-GÓMEZ; F. G. HEGARDT; D. HARO (1994). «Peroxisome proliferator-activated receptor mediates induction of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase gene by fatty acids». *J. Biol. Chem.*, núm. 269, pàg. 18767-18772.
- ROE, C. R.; D. S. MILLINGTON; D. A. MALTBY (1986). «Identification of 3-methylglutaryl carnitine: A new diagnostic metabolite of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase deficiency». *J. Clin. Invest.*, núm. 77, pàg. 1391-1394.
- SCHER, D. S.; V. W. RODWELL (1989). «3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase from *Pseudomonas mevalonii*». *Biochim. Biophys. Acta*, núm. 1003, pàg. 321-326.
- SCHUTGENS, R. B. H.; H. HEYMANS; A. KETEL; H. A. VEDER; M. DURAN; D. KETTING; S. K. WADMAN (1979). «Lethal hypoglycemia in a child with a deficiency of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase». *J. Pediatr.*, núm. 94, pàg. 89-91.
- SCRIVER, C. R.; A. L. BEAUDET; W. S. SLY; D. VALLE (1995). *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. 7th ed. vol. 1, pàg. 1400-1402.
- SHILKIN, R.; G. WILSON; E. OWLES (1981). «3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency: Follow-up of first described case». *Acta Paediatr. Scand.*, núm. 70, pàg. 265-268.
- SHINKA, T.; T. KUHARA; Y. INOUE; M. MATSUMOTO; I. MATSUMOTO; H. NAKAMURA; H. IRIMICHI; K. HASUMI; A. ENDO (1992). «GC/MS analysis of urine in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency». *Acta Paediatr Jpn*, núm. 34, pàg. 157-165.
- SOVIK, O.; L. SWEETMAN; K. M. GIBSON; W. L. NYHAN (1984). «Genetic complementation analysis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency in cultured fibroblasts». *Am. J. Hum. Gen.*, núm. 36, pàg. 791-801.
- STACEY, T. E.; C. DE SOUSA; B. M. TRACEY; A. WHITELAW; J. MISTRY; P. TIMBRELL; R. A. CHALMERS (1985). «Dizygotic twins with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria; unusual presentation, family studies and

- dietary management». *Eur. J. Pediatr.*, núm. 144, pàg 177-181.
- STEGINK, L. D.; M. J. COON (1968). «Stereospecificity and other properties of highly purified beta-hydroxy-beta-methylglutaryl coenzyme A cleavage enzyme from bovine liver». *J. Biol. Chem.*, núm. 243, pàg. 5272-5279.
- THOMPSON, G. N.; R. A. CHALMERS; D. HALLIDAY (1990). «The contribution of protein catabolism to metabolic decompensation in 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria». *Eur. J. Pediatr.*, núm. 149, pàg. 346-350.
- VILASECA, M. A.; A. RIBES RUBIO; P. BRIONES GODINO; V. CUSÍ SÁNCHEZ; B. BARAIBAR CASTELLÓ; J. M. GAIRI TAULL (1990). «Muerte súbita en un paciente con deficiencia de 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A liasa». *An. Esp. Pediatr.*, núm. 32, pàg. 149-153.
- WALTER, J. H.; P. T. CLAYTON; J. V. LEONARD (1986). «3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) lyase deficiency». *J. Inherit. Metab. Dis.*, núm. 9, pàg. 287-288.
- WANDERS, R. J. A.; R. B. H. SCHUTGENS; B. H. M. ZOETERS (1988a). «3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-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*, núm. 171, pàg. 95-101.
- WANDERS, R. J. A.; R. B. H. SCHUTGENS; B. H. M. ZOETERS (1988b). «Prenatal diagnosis of 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria via enzyme activity measurements in chorionic villi, chorionic villous fibroblasts or amniocytes using a simple spectrophotometric method». *J. Inherit. Metab. Dis.*, núm. 11, pàg. 430-430.
- WANG, S.; J. H. NADEAU; A. DUNCA; M. F. ROBERT; G. FONTAINE; K. SCHAPPERT; K. R. JOHNSON; E. ZIETKIEWICZ; P. HRUZ; H. MIZIORKÓ; G. A. MITCHELL (1993). «3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) lyase: cloning and characterization of a mouse liver HL cDNA and subchromosomal mapping of the human and mouse genes». *Mamm. Genome*, núm. 4, pàg. 382-387.
- WANG, S.; M. F. ROBERT; K. M. GIBSON; R. J. A. WANDERS; G. A. MITCHELL (1996). «3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase (HL): Mouse and human HL gene (HMGCL) cloning and detection of large gene deletions in two unrelated HL-deficient patients». *Genomics*, núm. 33, pàg. 99-104.
- WILSON, W. G.; M. B. CASS; O. SOVIK; M. K. GIBSON; L. SWEETMAN (1984). «A child with acute pancreatitis and recurrent hypoglycemia due to 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency». *Eur. J. Pediatr.*, núm. 142, pàg. 289-291.
- WYSOCKI, S. J.; R. HAHNEL (1976a). «3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria: Deficiency of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase». *Clin. Chim. Acta*, núm. 71, pàg. 349-351.
- WYSOCKI, S. J.; R. HAHNEL (1976b). «3-Hydroxy-3-methylglutaric aciduria: 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase levels in leukocytes». *Clin. Chim. Acta*, núm. 73, pàg. 373-375.
- WYSOCKI, S. J.; S. P. WILKINSON; R. HAHNEL; C. Y. B. WONG; P. K. PANEGYRES (1976). «3-Hydroxy-3-methylglutaric aciduria, combined with 3-methylglutacetic aciduria». *Clin. Chim. Acta*, núm. 70, pàg. 399-406.
- WYSOCKI, S. J.; R. HAHNEL (1978). «Methylcrotonylglycine excretion in 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria». *Clin. Chim. Acta*, núm. 86, pàg. 101-108.
- WYSOCKI, S. J.; R. HAHNEL (1986). «3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency: A review». *J. Inherit. Metab. Dis.*, núm. 9, pàg. 225-233.
- ZAPATER, N.; J. PIÉ; J. LLOVERAS; M. O. ROLLAND; B. LEROUX; M. VIDALET; P. DIVRY; F. G. HEGARDT; N. CASALS (1998). «Two missense point mutations in different alleles in the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase gene produce the 3-hydroxy-3-methylglutaryl aciduria». *Arch. Biochem. Biophys.*, núm. 358, pàg. 197-203.
- ZOGHBI, H. Y.; J. E. SPENCE; A. L. BEAUDET; W. E. O'BRIEN; C. J. GOODMAN; K. M. GIBSON (1986). «Atypical presentation and neuropathological studies in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency». *Ann. Neurol.*, núm. 20, pàg. 367-369.