

Taula 1: Malalties d'acumulació lisosòmica.

| MALALTIA O SÍNDROME | DEFICIÈNCIA ENZIMÀTICA | PRODUCTES D'ACUMULACIÓ |
|---|---|--|
| Glicogenosi II/Pompe | α -glucosidase lysosomal | Glicogen |
| Mucopolisacaridosis | | |
| MPS I/ Hurler/ Scheie | α -L-iduronidasa | Heparà-, dermatà sulfat |
| MPS II/ Hunter | α -Iduronat-2-sulfatasa | Heparà-, dermatà sulfat |
| MPS IIIA/ Sanfilippo A | Heparan N-sulfatasa | Heparà sulfat |
| MPS IIIB/ Sanfilippo B | α -N-acetilglucosaminidasa | Heparà sulfat |
| MPS IIIC/ Sanfilippo C | Acetil-CoA: α -N-acetiltransferasa | Heparà sulfat |
| MPS IIID/ Sanfilippo D | N-acetilglucosamina 6-sulfatasa | Heparà sulfat |
| MPS IVA/ Morquio A | Galactosa 6-sulfatasa | Querata-, condroití sulfat |
| MPS IVB/ Morquio B | β -Galactosidasa | Querata sulfat |
| MPS VI/ Marotaux-Lamy | N-acetilgalactosamina 4-sulfatasa | Dermatà sulfat |
| MPS VII/ Sly | β -Glucuronidasa | Dermatà-, heparà-, condroití sulfat |
| MPS IX | Hialuronoglucoaminidasa-1 | Hialoronan |
| (Oligo)sacaridosis | | |
| Aspartilglucosaminuria | Aspartilglucosaminidasa | Glico-asparagina |
| Mucopolipidosi I/ Sialidosi I/ II | Neuraminidasa | Sialiloligosacàrids/ gangliòsids |
| Schindler I/ II | α -N-acetilgalactosaminidasa | Oligosacàrids/ glicoesfingolípids/ glicosaminoglicans |
| α -fucosidosi | α -L-fucosidasa | Fucosil-oligosacàrids/ fucosil-licolípids |
| α -manosidosi I/II | α -D-manosidasa | α -manosil-oligosacàrids |
| β -manosidosi | β -D-manosidasa | β -manosil-oligosacàrids |
| Lipidosis | | |
| Fabry | α -galactosidasa A | Globotriaosil-digalactosilceramida/ trisacàrids sanguinis del grup B |
| Farber Lipogranulomatosis | Ceramidasa | Ceramida |
| Gaucher I/ II/ III | Glucocerebrosidasa | Glucosilceramida |
| G _{M1} gangliosidosi I/ II/ III | β -galactosidasa | G _{M1} gangliòsid/ galactosiloligosacàrids/ queratà sulfat |
| G _{M2} gangliosidosi I/ Tay Sachs | β -hexosaminidasa A | G _{M2} gangliòsid/ asialo- G _{M2} |
| G _{M2} gangliosidosi II/ Sandhoff | β -hexosaminidasa A i B | G _{M2} gangliòsid/ asialo- G _{M2} / globòsid |
| Krabbe | Galactocerebrosidasa | Galactosilceramida/ galactosilesfingosina |
| Leucodistròfia metacromàtica | Ariilsulfatasa A | Sulfàtid |
| Malaltia d'acumulació d'èster colesterol / Malaltia de Wolman | Lipasa àcida | Colesterilèsters/ triglicèrids |
| Niemann-Pick A/ B | Esfingomielinasa | Esfingomielina |
| Deficiències en activadors | | |
| G _{M2} gangliosidosi (variant) | Activador de G _{M2} | G _{M2} gangliòsid |
| Gaucher (variant) | Saposina C | (glucosil)ceramida |
| Leucodistròfia metacromàtica (variant) | Saposina B | Sulfàtids/ digalactosilceramida/ globotriaosilceramida |
| Lipidosi complexa | Prosaposina | Glucosilceramida/ sulfàtids/ ceramida |
| Deficiències enzimàtiques múltiples | | |
| Deficiència múltiple en sulfatases | Formilglicina Generating Enzim | Mucopolisacàrids/ Sulfàtids/ Gangliòsids |
| Galactosialidosi I/ II | Proteïna de protecció | Sialiloligosacàrids/ gangliòsids |
| Mucopolipidosi II/ III (I-cell disease & pseudo-Hurler polydystrophy) | N-acetilglucosamina-1-fosfoferasa | Oligosacàrids/ lípids/ glicosaminoglicans |
| Mucopolipidosi IV | Mucolipin-1 | Gangliòsids/ fosfolípids/mucopolisacàrids |
| Defectes de transport | | |
| Cistinosis | Transportador de cistina | cistina |
| Defecte en el transport de la vitamina B12 | Sistema de transport de la vitamina B12 | cobalamina |
| Malaltia d'acumulació d'àcid siàlic/ malaltia de Salla | Transportador d'àcid siàlic | Àcid siàlic |
| Niemann-Pick C1/ C2 | Transport del colesterol | Colesterol, fosfolípids, glicolípids |
| Neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN) | | |
| CLN1 | Palmitoil tioesterasa | SAPs A i D, àcids grassos tioèsters |
| CLN2 | Tripeptidil peptidasa I | mitochondrial ATP synthase subunit c |
| CLN3 | ? proteïna de lisosòmica de membrana | mitochondrial ATP synthase subunit c |
| CLN4 | ? | mitochondrial ATP synthase subunit c |
| CLN5 | ? proteïna de membrana | mitochondrial ATP synthase subunit c |
| CLN6 | ? | mitochondrial ATP synthase subunit c |
| CLN7 | ? | mitochondrial ATP synthase subunit c |
| CLN8 | ? | SAPs A i D, mitochondrial ATP synthase subunit c |

Afegida a aquesta variabilitat que existeix entre les malalties d'acumulació lisosòmica, caldria també tenir en compte la variabilitat clínica que presenten els pacients dintre de cada malaltia i inclús dintre de cada tipus, ja sigui en l'edat d'aparició com en la progressió dels símptomes, així com en els òrgans afectats. Aquesta diversitat clínica és deguda, en gran part, a la diversitat al·lèlica, la qual implica que un gen pot ser alterat en diferents punts provocant que es generi una gran diversitat d'al·lels mutats. Cada mutació pot tenir el seu propi efecte sobre l'activitat de la proteïna codificada. Així, un enzim lisosòmic pot perdre la seva capacitat funcional total o parcialment, depenent del tipus de mutació. La pèrdua completa de l'activitat d'un enzim o de la seva síntesi es correlacionarà amb la forma severa de la malaltia; mentre que un curs lleu de la malaltia pot anticipar l'existència de nivells residuals d'activitat.

La incidència d'aquestes malalties és baixa, fet que fa que les malalties d'acumulació lisosòmica siguin classificades dintre del grup de les malalties rares o poc freqüents (freqüència inferior a 5 de cada 10.000 naixements). Malgrat això, determinades malalties apareixen amb una major freqüència en algunes poblacions específiques, com és el cas de les malalties de Tay Sachs i Gaucher que són especialment prevalents entre els jueus Azkenazis.

L'estudi de les malalties d'acumulació lisosòmica, malgrat ser considerades poc freqüents, té una gran importància que es fa més palesa quan s'analitza la incidència

combinada de totes elles. Per exemple, en el cas de la població australiana, una de les més estudiades, aquesta incidència s'eleva fins a 1 de cada 7700 naixements (Meikle i col., 1999), representant un important problema de salut a Austràlia.

Generalment, el diagnòstic dels pacients amb malalties d'acumulació lisosòmica es dona després de l'aparició dels primers símptomes, excepte en aquells casos en que existeix algun antecedent familiar. La possibilitat del desenvolupament d'un ràpid diagnòstic dels nous casos suposaria un considerable benefici per pacients i familiars, que podrien beneficiar-se d'una teràpia efectiva abans del desenvolupament de la malaltia.

En els darrers anys s'han desenvolupat diferents tractaments per algunes malalties d'acumulació lisosòmica. Aquests tractaments són molt variats i van des de teràpies pal·liatives i trasplantament del moll de l'os fins a teràpies de reemplaçament enzimàtic (com en el cas de la malaltia de Gaucher, la de Fabry o la MPS I). Una important ajuda per a l'estudi de les malalties d'acumulació lisosòmica és l'existència de models animals, entre els quals es troben els models per a la síndrome de Sanfilippo tipus A (Fisher i col., 1998; Aronovich i col., 2000; Costanzi i col., 2000), la MPS IIID (Crawley i col., 1996), la leucodistròfia metacromàtica (Hess i col., 1996) i la malaltia de Fabry (Ohshima i col., 1997), entre altres. Aquests models estan sent útils per aprofundir en l'estudi de les malalties lisosòmiques així com per avaluar l'eficàcia de les diferents teràpies disponibles.

Dues malalties d'acumulació lisosòmica, la mucopolisacaridosi IIIA (MPS IIIA, anomenada també síndrome de Sanfilippo tipus A) i la malaltia de Gaucher (una lipidosi), han estat estudiades a nivell molecular en el present treball per tal d'establir quines mutacions afecten al gen en els pacients, la seva freqüència, i l'efecte de les mateixes sobre l'activitat de l'enzim.

MUCOPOLISACARIDOSI
IIIA

1- INTRODUCCIÓ

A l'any 1963, Sanfilippo i col·laboradors van descriure un grup de vuit pacients amb retard intel·lectual sever i progressiu, amb algunes característiques somàtiques semblants però menys severes que les d'altres pacients que presentaven MPS I H (Hurler). Anys després, Rampini (1969) va descriure un altre grup de vuit pacients amb manifestacions clíniques similars als anteriors. Aquests grups de pacients patien una síndrome que rep el nom de mucopolisacaridosi III (MPS III) o síndrome de Sanfilippo, la qual és la més comuna de totes les mucopolisacaridosi (Spranger 1975, Van de Kamp 1979).

Les mucopolisacaridosi són un conjunt de malalties genèticament heterogènies, cadascuna d'elles resultant de la deficiència en un enzim (veure taula 1) responsable d'un pas de la degradació dels glicosaminoglicans (GAG). Els GAG parcialment degradats s'acumulen en elevades quantitats a tots els teixits.

Investigacions posteriors van revelar que la MPS III inclou quatre malalties genèticament diverses causades per la deficiència en quatre enzims diferents (taula 2), implicats en la degradació de l'heparà sulfat (HS). En aquesta degradació intervenen un total de vuit enzims (Hopwood, 1989). Per al cas de la síndrome de Sanfilippo tipus A o mucopolisacaridosi IIIA (MPS IIIA) la deficiència es troba en l'activitat

de l'enzim heparà N-sulfatasa (o sulfamidasa; EC 3.10.1.1).

Els pacients que pateixen alguna d'aquestes síndromes acumulen subproductes de la via de degradació de l'HS en els lisosomes de molts tipus cel·lulars, productes que són excretats a través de l'orina, fet que permet la seva detecció. L'anàlisi dels diferents enzims permet el diagnòstic definitiu dels diferents tipus de MPS III. Malgrat això, el diagnòstic dels portadors basat en l'anàlisi de l'activitat enzimàtica pot donar resultats ambigus, fet que fa necessari l'ús de tècniques moleculars que ens permetran també realitzar els possibles diagnòstics prenatals.

Taula 2: Enzims responsables de la síndrome de Sanfilippo A,B,C i D.

| MPS III | ENZIM | MIM# |
|---------|---|--------|
| A | N-sulfoglucosamina sulfhidrolasa (SGSH) o Heparà N-sulfatasa (NS) o sulfamidasa | 605270 |
| B | α -N-acetilglucosaminidasa (NAGLU) | 252920 |
| C | AcetilCoA: α -glucosaminido-N-acetiltransferasa | 252930 |
| D | N-acetilglucosamino 6-sulfatasa | 252940 |

Malgrat que els quatre subtipus tenen una causa genètica diferent, presenten una clínica predominantment caracteritzada per una degeneració severa del sistema nerviós central (CNS) que dona com a resultat un retard mental progressiu (Neufeld i Muenzer, 1995).

Tot i l'existència d'aquests trets comuns, existeix una elevada variabilitat en l'expressió clínica dintre de la MPS III, tant entre els diferents tipus com dintre de cada tipus.

La incidència estimada de la MPS III és bastant variable en funció del país: 1:20.000 a Alemanya (Beck i col., 1996), 1:24.000 a Holanda (Van de Kamp i col., 1981) i 1:70.000 a Austràlia (Meikle i col., 1999). La incidència del tipus A per separat s'ha determinat en molt pocs països, per exemple s'ha descrit que a British Columbia és de 1:324.000 (Lowry i col., 1990). En població espanyola, fins el moment, no es disposa de dades concretes sobre la incidència ni de la MPS IIIA ni de la MPS III en conjunt.

hiperactivitat, les pertorbacions de la son, l'agressivitat i una ràpida disminució de la capacitat de mantenir l'atenció. Durant la tercera i darrera etapa, pateixen un deteriorament físic general. Són freqüents les caigudes ocasionades per la pèrdua de l'equilibri. També són comuns els problemes en l'alimentació degut al deteriorament en els mecanismes de masticació i deglució, així com problemes en la mobilitat.

La mort de molts dels nens té lloc durant la primera dècada de vida generalment com a conseqüència de problemes respiratoris (Yogalingam i Hopwood, 2001).

Alguns pacients presenten un fenotip menys sever, permetent una mobilitat independent fins la segona o tercera dècada de vida (figura 1) (Miyazaki i col., 2002; Di Natale i col., 2003).

2- CLÍNICA

La síndrome de Sanfilippo tipus A presenta una clínica comuna a la resta de MPS III que pot ser dividida en tres fases (Cleary i Wraith, 1993; Bax i Colville, 1995). Des del primer any de vida fins els 4 o 6 anys els nens presenten un retard en el seu desenvolupament. En la segona fase, que comença en els casos més greus dels 3 als 4 anys de vida i més enllà, són freqüents els problemes de comportament. Són nens sense problemes importants de mobilitat fins els 10 anys i físicament bastant forts, fet que provoca que aquesta etapa sigui la més difícil. En ella són freqüents la

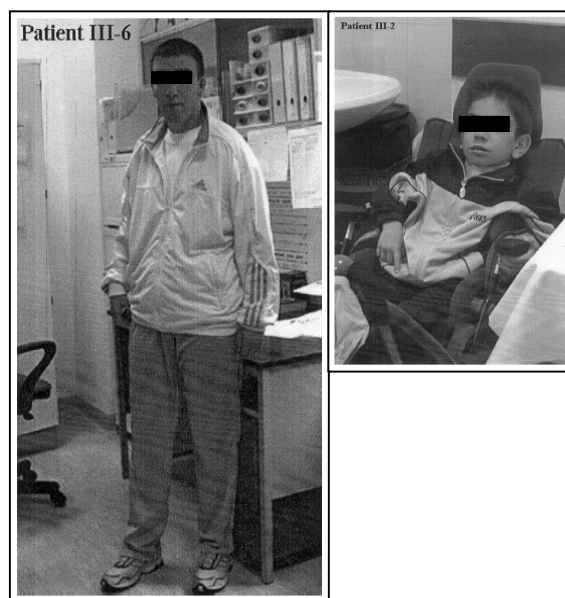


Figura 1: Pacients amb la mucopolisacaridosi IIIA. Esquerra: pacient amb per la forma atenuada de la síndrome de Sanfilippo A als 18 anys. Dreta: pacient afectat per la forma severa de la malaltia als 12 anys. Aquest pacients pertanyen a una amplia família analitzada per DiNatale i col., 2003.

Freqüentment, en els pacients de major edat, són evidents algunes característiques somàtiques, com són algunes patologies esquelètiques, hepatosplenomegàlia i rigidesa articular. Sovint la manca d'aquestes característiques somàtiques combinada amb l'elevada incidència de falsos negatius en els tests urinaris de detecció de l'heparà sulfat dificulta el diagnòstic dels pacients amb una MPS III més atenuada. Aquest fet, entre d'altres, ha provocat la necessitat de desenvolupar diferents estratègies de diagnòstic.

3- DIAGNÒSTIC

3.1- DIAGNÒSTIC DIFERENCIAL

El primer mètode desenvolupat per al diagnòstic de les mucopolisacaridosis, i entre elles la MPS IIIA, es basa en la detecció de glicosaminoglicans a l'orina, mètode que segueix vigent com a test preliminar i que permet discriminar entre diferents classes de mucopolisacaridosis, identificant els glicosaminoglicans de l'orina, però que no permet discriminar entre els diferents subtipus. Posteriorment han estat desenvolupats altres mètodes, un dels quals és el test de "spots", test que es realitza a partir d'una gota de sang seca

situada sobre una targeta de Guthrie. Aquest test és ràpid, econòmic i semiquantitatiu, però pel diagnòstic de les mucopolisacaridosis sembla estar subjecte tant a falsos negatius com a falsos positius (Berry, 1987; de Jong i col., 1991).

Davant la necessitat de diagnosticar els pacients abans de que l'acumulació de glicosaminoglicans provoqui efectes irreversibles i, buscant substàncies que mostrin una clara acumulació en els pacients tant amb MPS com amb altres malalties d'acumulació lisosòmica, s'estan desenvolupant noves estratègies de diagnòstic basades en la detecció de molècules que serien importants en l'estabilitat dels lisosomes davant de l'acumulació dels glicosaminoglicans. Una d'aquestes molècules és la LAMP-1, una proteïna de membrana que sembla jugar un paper important en l'estabilitat de la membrana lisosòmica (Fukuda, 1991) i, que per tant, semblaria important per la integritat estructural dels vacúols d'acumulació (Meikle i col., 1997). S'ha demostrat, a partir de mostres de plasma, que en 17 de 25 malalties d'acumulació lisosòmica aquesta proteïna es troba incrementada. Entre elles es troben les mucopolisacaridosis, on 112 dels 115 individus analitzats presenten un increment significatiu de la LAMP-1 (Meikle i col., 1997).

Amb un intent de millorar els resultats obtinguts amb la LAMP-1 s'han fet nous estudis amb altres proteïnes. Entre elles es troba la LAMP-2 (Hua i col., 1998), amb resultats similars als obtinguts per la LAMP-1, i la quitotriosidasa, amb valors incrementats en

11 de 24 malalties d'acumulació lisosòmica (Guo i col., 1995).

Els diferents estudis realitzats fins el moment fan pensar que els nivells d'acumulació d'aquestes proteïnes en les diferents malalties es trobarien relacionats amb diferents factors, entre els quals es troben el tipus de substrat que s'acumula, la quantitat de producte i el lloc o llocs on aquest s'acumula.

L'objectiu final és el de determinar si un nou-nat pateix alguna malaltia d'acumulació lisosòmica a partir d'una gota de sang seca situada en una targeta de Guthrie. I un cop fet aquest primer test, i només en aquelles mostres en que l'anàlisi hagi estat positiu, es passaria a identificar el producte d'acumulació emprant altres tècniques, com l'espectrometria de masses, per tal d'establir quina malaltia d'acumulació lisosòmica s'ha heretat en cada cas particular.

3.2- DIAGNÒSTIC ENZIMÀTIC

L'activitat sulfamidasa s'analitza generalment amb l'ús d'un substrat comercial marcat radioactivament, el [³⁵S]-heparin, però l'ús de disacàrids marcats radioactivament també ha estat descrit (Hopwood i Elliott, 1981) així com l'ús d'un substrat derivat de la 4-metilumbeliferona (MU) que ha permès el desenvolupament d'un assaig fluoromètric per la detecció dels pacients amb MPS IIIA (Karpova i col., 1996; Kleijer i col., 1996).

El substrat radioactiu presenta nombroses inconvenients (Kleijer i col., 1996) entre els que troben els següents:

- L'activitat específica del producte comercial no és prou elevada per a la detecció de l'enzim en teixits i fluids corporals amb baixa activitat. El nombre de grups N-sulfat disponibles en posició terminal és petit. En el cas més òptim, on tindriem un residu glucosamina N-sulfat ocupant totes les posicions terminals, només un 5% de la radioactivitat seria alliberada.
- El diagnòstic és llarg. Cal separar els [³⁵S]-sulfats alliberats del substrat.
- El substrat radioactiu presenta una curta vida mitja (87 dies) i certa inestabilitat, el que provoca problemes de repetitivitat.

El mètode fluoromètric resol algun d'aquests inconvenients (Kleijer i col., 1996):

- El substrat és estable i més sensible.
- No cal separar els sulfats alliberats i la fluorescència és fàcilment detectable per autoradiografia.

El diagnòstic enzimàtic pot ésser realitzat a partir de diferents tipus cel·lulars i fluids corporals, gràcies a que els enzims lisosòmics són presents a tots els tipus cel·lulars amb excepció dels eritròcits (Neufeld i Muenzer, 2001). Els més emprats són els fibroblasts, els leucòcits i el sèrum, però l'elecció final

depdrà de la disponibilitat de mostra i de les preferències del laboratori.

3.3- DIAGNÒSTIC MOLECULAR

Per a la realització d'un diagnòstic molecular rutinari és essencial conèixer les mutacions presents en cada família a diagnosticar o que existeixi alguna o algunes mutacions amb una freqüència elevada.

La síndrome de Sanfilippo A presenta una heterogeneïtat al·lèlica molt elevada, on cada població presenta una mutació majoritària diferent i en el cas més òptim aquesta s'eleva fins al 58 % per a la mutació R245H en població holandesa (Weber i col., 1998). Així, realitzant un diagnòstic genètic per aquesta mutació i només en població holandesa, tindriem que la probabilitat de que un dels dos al·lèls quedés sense identificar seria del 49 % ($2 \times 0,58 \times 0,42$) i, la probabilitat de no detectar-ne cap seria del 18 % ($0,42 \times 0,42$).

És per tot això, que només en els casos en que coneguem les mutacions responsables de la síndrome de Sanfilippo A en la família a diagnosticar podem realitzar un ràpid diagnòstic molecular, essencial en certs moments. En la resta dels casos caldria procedir a la seqüenciació de tot el cDNA.

Una possible alternativa seria el desenvolupament d'estratègies de diagnòstic indirecte emprant marcadors propers al gen.

4- BIOQUÍMICA

La MPS IIIA està causada per la deficiència en l'enzim heparà N-sulfatasa (NS) també anomenat N-sulfoglucosamina sulfo-hidrolasa (SGSH) o sulfamidasa. És el tercer enzim de la cascada de degradació de l'heparà sulfat (figura 2). La seva deficiència implica l'acumulació de mucopolisacàrids dintre dels lisosomes.

4.1- L'ENZIM: SGHS

La seqüència nucleotídica necessària per l'activitat sulfamidasa presenta una pauta de lectura oberta de 1.506 nucleòtids, que codifiquen per una proteïna de 502 aminoàcids. El lloc de tall del pèptid senyal es troba després del vintè aminoàcid (Von Heijne, 1986).

La proteïna madura té un pes molecular predit de 54.679 Da, que es correspon amb els 56 kDa estimats per la sulfamidasa purificada a partir de fetge humà (Freeman i col., 1986). De forma natural aquesta proteïna es troba en forma de dímer amb un pes molecular de 115 kDa (Bielicki i col., 1998)

Existeixen cinc llocs potencials de N-glicosilació (Asn41, Asn 142, Asn151, Asn264 i Asn413; veure figura 3), dels quals pel Asn41 s'ha comprovat la seva funcionalitat (Scott i col, 1995).

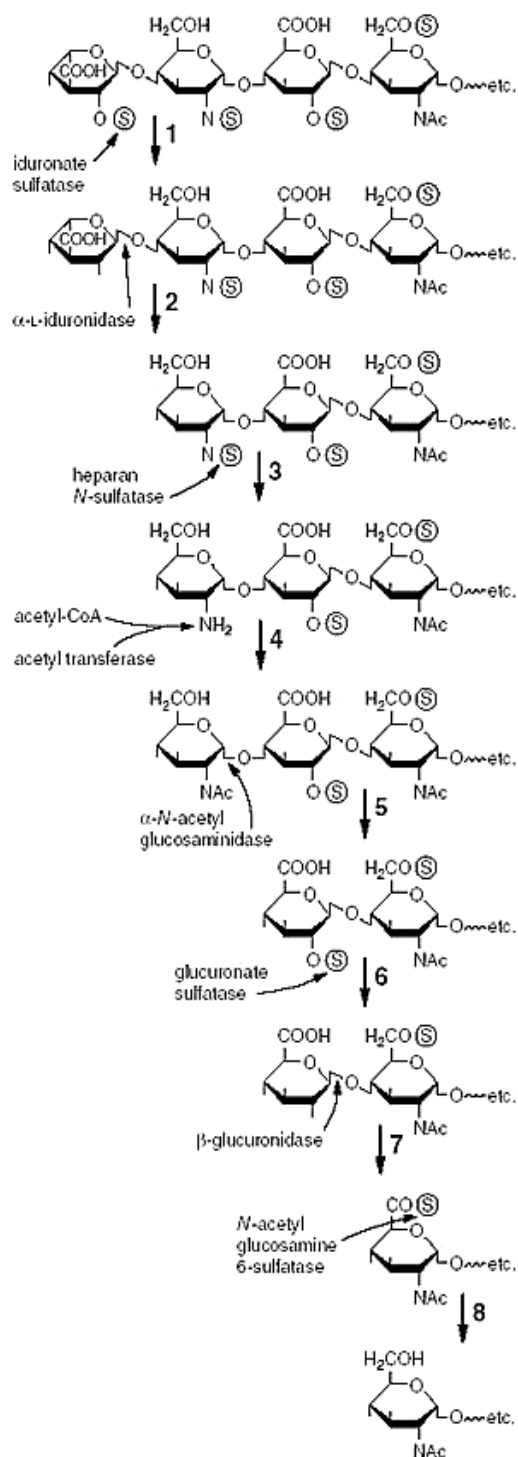


Figura 2: Cascada de degradació de l'heparà sulfat (Neufeld i Muenzer, 2001). Cada número indica una deficiència enzimàtica diferent i en conseqüència una malaltia diferent. **1:** MPS II, síndrome de Hunter. **2:** MPS I, síndrome de Hurler, Hurler-Scheie i Scheie. **3:** MPS IIIA, síndrome de Sanfilippo tipus A. **4:** MPS IIIC, síndrome de Sanfilippo tipus C. **5:** MPS IIIB, síndrome de Sanfilippo tipus B. **6:** no existeix cap deficiència enzimàtica descrita fins al moment per aquest enzim. **7:** MPS VII, síndrome de Sly. **8:** MPS IIID, síndrome de Sanfilippo tipus D.

A l'any 1999, un treball de Perkins i col·laboradors va suggerir, per estudis amb EndoH i PNGasa F, que tots ells eren funcionals (Perkins i col., 1999). Més tard, aquest fet va ser demostrat per un estudi de mutagènesi dirigida sobre aquestes posicions, on quedava també constància de que l'Asn41 i l'Asn151 són crítics per a l'estabilitat i/o activitat de la sulfamidasa (Di Natale i col., 2001).

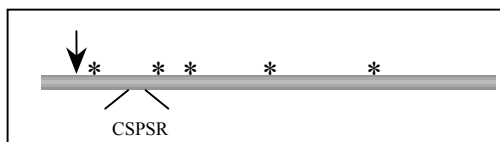


Figura 3: Estructura de la sulfamidasa. La fletxa vertical indica el lloc de tall del pèptid senyal i CSPSR indica la primera seqüència consens. Els cinc llocs de N-glicosilació estan indicats amb asteriscs.

4.1.1- CENTRE ACTIU

A l'igual que moltes O-sulfatases, la sulfamidasa tot i ser una N-sulfatasa presenta entre un 14 i un 24% d'identitat respecte la seqüència de les O-sulfatases descrites fins el moment (Scott i col., 1995). Conté també dues regions consens conservades entre les sulfatases, ambdues a la regió N-terminal. Els residus Cys70 i Arg74 es troben dins de la primera regió consens (SSCSPSRASLLTG) i estan implicats en el mecanisme catalític de les sulfatases (Scott i col., 1995) (figura 3). La segona regió consens es troba entre les posicions 115 i 124 (GVRTGIIGKK).

L'aminoàcid Asp31 es troba també conservat entre les sulfatases i es creu que en combinació amb l'Asp32 coordina la unió d'un ió metàl·lic divalent necessari per l'activitat catalítica (Bhattacharyya i col. 2001).

4.1.2- COMPARACIONS DE SEQÜÈNCIA INTERESPECÍFIQUES

Fins al moment, a part de la humana, han estat descrites la sulfamidasa canina (Fischer i col.,

1998; Aronovich i col., 2000) i la murina (Costanzi i col., 2000). A la figura 4 es mostra l'alineament de les tres seqüències.

Entre la seqüència nucleotídica humana i la de ratolí existeix un 85% d'identitat. Entre les seves seqüències aminoacídiques existeix un 88% d'identitat i un 93% de similaritat.

En comparar la seqüència nucleotídica humana i canina també s'observa una elevada identitat tant nucleotídica, d'un 87%, com aminoacídica, d'un 89%.

| | | | |
|--------|-----|---|-----|
| humana | 1 | MSCPVPACCALLV--LGLCR---ARPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAATPHLDALAR | 55 |
| canina | 1 | MRRRGRACGLLLLLLALGLCRPLGARPRNVLLIVADDGGFESGAYNNTAISTPHLDALAR | 60 |
| murina | 1 | MHCPGLACCTILLV--LGVCG---AHSRNVLLIVADDGGFESGVYNNNTAIAATPHLDALS | 55 |
| humana | 56 | RSLLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHFNNSFDKVRSLPLLLSQAG | 115 |
| canina | 61 | RSLVFRNAFTTVSSCSPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHFNNSFDGVRSLPLLLGRAG | 120 |
| murina | 56 | HSLIFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHFNNSFDKQVSLPLLLNQAG | 115 |
| humana | 116 | VRTGIIGKKHVGPEPVYFFDFAYTEENGSVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTDQDRPFFLYV | 175 |
| canina | 121 | VRTGIIGKKHVGPEPVYFFFAHTEENSSVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTDQDRPFFLYV | 180 |
| murina | 116 | VRTGIIGKKHVGPEPVYFFDFAFREENSSVMQVGRNITRIKLVQKFLQTDQDRPFFLYV | 175 |
| humana | 176 | AFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKFNGESGMGRIPDWTQAYDPLDVLVPYFVNPVTPAARAD | 235 |
| canina | 181 | AFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKFNGESGMGRIPDWTQYDPLDVLVPYFVNPVTPAARAD | 240 |
| murina | 176 | AFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKFNGESGMGYIPDWTQIYDQDVMVPYFVNPVTPAARAD | 235 |
| humana | 236 | LAAQYTTVGRMDQGVGLVQLQELRDAGVLDNLTIVIFTSDNIGIPFPSGRTNLYWPGTAEPLL | 295 |
| canina | 241 | LAAQYTTIGRMDQGVGLVQLQELRDAGVLDNLTIVIFTSDNIGIPFPSGRTNLYWPGTAEPLL | 300 |
| murina | 236 | LAAQYTTIGRMDQGVGLVQLQELRDAGVLDNLTIIIFTSDNIGIPFPSGRTNLYWPGTAEPLL | 295 |
| humana | 296 | VSSPEHFKRWGVSEAYVSLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPALEAE | 355 |
| canina | 301 | ISSPEHFKRWGVSEAYVSLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTVQLTGRSLLPALEAE | 360 |
| murina | 296 | VYSPEHFKRWGVSDAYVSLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIQLTGRSLLPALEAE | 355 |
| humana | 356 | PLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMPPFIDQDFYVSPVTFQDLLNRT | 415 |
| canina | 361 | PLWSTVFGSQSHHEVTMAYPMRSVHHQGFCLVHNLNFKMPPFIDQDFYVSPVTFQDLLNRT | 420 |
| murina | 356 | PLWATVFGSSQSHHEVTMSYPMRSVYHQNFRLIHNLSFKMPPFIDQDFYVSPVTFQDLLNRT | 415 |
| humana | 416 | TAGQPTGWYKDLRHYYRERWELYDRSRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDLAKWQWET | 475 |
| canina | 421 | VAGHPTGWYKDLRHYYRERWELYDRSQDPHETRNLADPPYAPVLELLQTLAKWQWET | 480 |
| murina | 416 | TTGRPTGWYKDLRHYYRERWELYDISRDPRETRNLADPDLAQVLEMLKALVKWQWET | 475 |
| humana | 476 | HDPWVCAPDGVLEEKLSQCCPLHNEL | 502 |
| canina | 481 | HDPWVCAPDGVLEEKLSQCCRPLHNEL | 507 |
| murina | 476 | HDPWVCAPDGVLEEKLTQCCRPLHNEL | 502 |

Figura 4: Alineament de la seqüència aminoacídica de la sulfamidasa humana, canina i murina (Clustal W). Les barres blaves senyalen la posició de les dues regions consens de les sulfatases. Les fletxes verdes indiquen els llocs de N-glicosilació. Els rectangles vermells corresponen als aminoàcids que per comparació amb l'ARSB formarien el centre actiu.

Els cinc llocs potencials de N-glicosilació descrits per la seqüència humana també són presents tant en la seqüència de ratolí com en la canina, amb la diferència que en la murina se n'ha predit un més, a l'aminoàcid Asn389 (Costanzi i col., 2000).

Les dues regions conservades entre les sulfatases humanes són presents també en les sulfamidases canina i de ratolí (Costanzi i col., 2000) (figura 4).

Per comparació amb una altra sulfatasa, l'arilsulfatasa B (ARSB o 4-S, N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa), la qual ha estat caracteritzada per cristallografia (Bond i col., 1997), s'ha comprovat que la sulfamidasa humana així com la canina i la murina comparteixen la majoria dels residus presents en el centre actiu de l'ARSB (taula 3).

Així mateix, gràcies a aquestes comparacions estructurals s'ha predit quina podria ser

l'estructura tridimensional de la proteïna a partir de la seqüència canina (figura 5).

Taula 3: Aminoàcids presents en el centre actiu de la sulfamidasa per comparació amb els predits per l'ARSB. El residu 303 de la seqüència murina és l'únic que no es trobaria conservat (basat en Bhattacharyya i col., 2001).

| PROTEÏNA | AMINOÀCIDS |
|-------------|---|
| ARSB o 4-S | D53, D54, C91, P93, S94, R95, K145, H147, D300, N301, K318 |
| SGSH HUMANA | D31, D32, C70, P72, S73, R74, K123, H125, D273, N274, K303 |
| HSS CANINA | D36, D37, C75, P77, S78, R79, K128, H130, D278, N279, K308 |
| HSS MURINA | D31, D32, C70, P72, S73, R74, K123, H125, D273, N274, <u>Q303</u> |

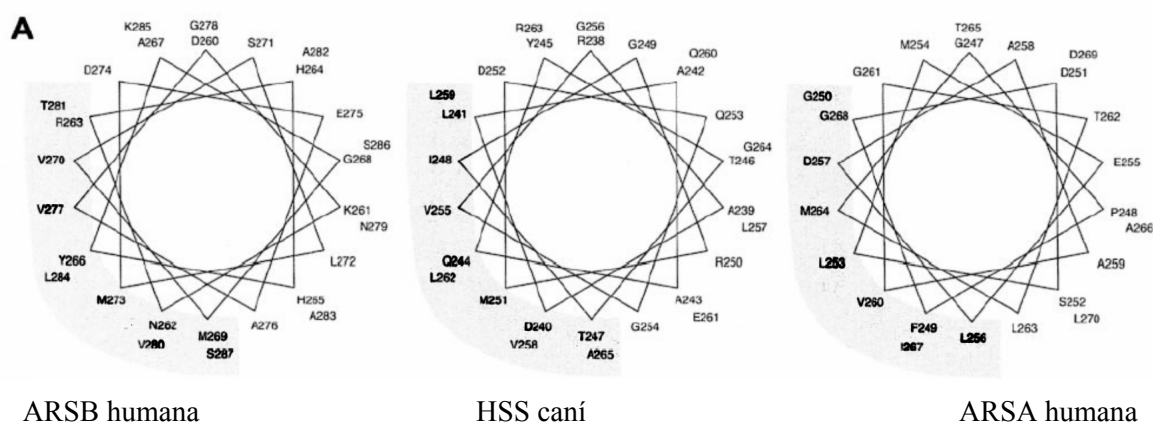


Figura 5: Estructura tridimensional de la sulfamidasa canina predita a partir de l'estructura de l'ARSA i l'ARSB (Imatges de Aronovich i col., 2000). (A) Aminoàcids d'una hèlix α , amb els residus hidrofòbics ombrejats.



Figura 5: (continuació) Estructura tridimensional de la HSS canina predita a partir de l'estructura de l'ARSA i l'ARSB (Imatges de Aronovich i col., 2000). **(B)** Seqüència amoniocídica de l'hèlix α i *loop* precedent. En la seqüència humana els aminoàcids de l'hèlix- α serien els compresos entre l'aminoàcid 233 i el 260. **(C)** Estructura tridimensional predita per comparació de seqüència. Els residus hidrofòbics es troben en groc i els polars en vermell. Els residus del centre actiu, predits també per comparació amb l'ARSB, es troben en vermell.

4.1.3- SÍNTESE I DEGRADACIÓ

La sulfamidasa, així com tots els enzims lisosòmics, és sintetitzada als ribosomes associats al reticle endoplasmàtic i alliberada al lumen. Per analogia amb altres sulfatases s'ha deduït que, una cisteïna del lloc actiu (CSPSR) és modificada a formilglicina post-traduccionament abans del plegament de l'estructura terciària (Dierks i col., 1997).

La sulfamidasa és glicosilada al reticle endoplasmàtic/aparell de Golgi, punt on també es produeix la incorporació d'un o més residus manosa-6-fosfat (M6P). Els receptors de M6P (Kasper i col., 1996) del *trans* Golgi reconeixen així l'enzim permetent la seva

entrada i transport cap als endosomes via transport vesicular. A l'endosoma el pH va disminuint progressivament, el que fa que el receptor es separi de l'enzim i pugui ser reciclat.

L'enzim un cop lliure és finalment transferit al compartiment lisosòmic via transport vesicular i defosforilat (Bresciani i col., 1996) (figura 6). Part de la sulfamidasa sintetitzada pot ser secretada a l'exterior de les cèl·lules, segurament després de l'entrada al *cis* Golgi però abans de la unió al receptor de M6P del *trans* Golgi. Aquest enzim lliure manté intacte la M6P, de manera que pot ser endocitat per altres cèl·lules que expressin el receptor de M6P a la seva superfície (Kasper i col., 1996).

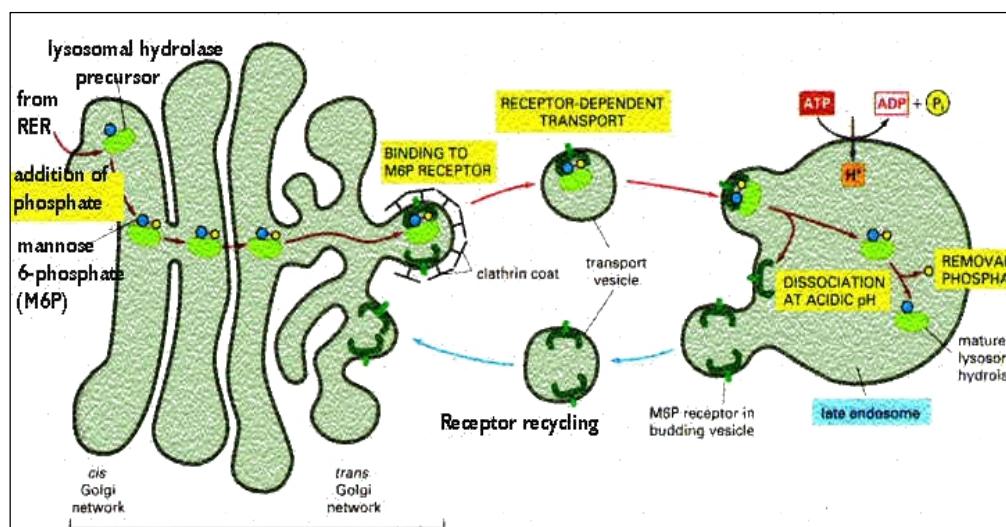


Figura 6: Mecanisme de transport dels enzims lisosòmics des del reticle endoplasmàtic fins als lisosomes.

4.2- EL SUBSTRAT

El substrat natural de la sulfamidasa és un dels subproductes de la via de degradació de l'heparà sulfat (HS).

L'HS està format de manera alternativa per molècules de D-glucosamina (GlcN) amb àcid urònic, ja sigui àcid D-glucurònic (GlcA) o L-idurònic (IdoA) (figura 7). La sulfamidasa actua catalitzant l'eliminació del sulfat de la glucosamina que es troba a l'extrem no reductor de la molècula. Tots els enzims que intervenen en la degradació de l'heparà sulfat ho fan actuant sobre aquest extrem de manera seqüencial (veure figura 2).

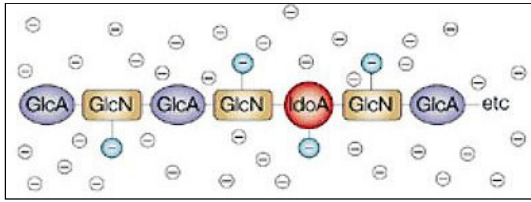
L'HS és un membre de la família dels glicosaminoglicans (GAG), entre els quals també s'hi inclouen el condroití sulfat, el dermatà sulfat i el queratà sulfat.

L'heparà sulfat és un polisacàrid lineal que es troba distribuït de manera ubiqüa a la matriu

extracel·lular i a la superfície de les cèl·lules. Interactua de manera específica amb moltes proteïnes reguladores extracel·lulars, moltes de les quals juguen un paper important en el desenvolupament i en la regulació de la funció. Funciona com un receptor, amb la capacitat de regular la biodisponibilitat, localització i activitat d'aquestes proteïnes reguladores (Bateman i col., 2000).

Algunes d'aquestes proteïnes són: l'antitrombina IIIA, la qual necessita la unió a l'HS per canviar la seva conformació i passar així a la forma activa; factors de creixement com els factors de creixement de fibroblast (FGF), amb els que participa en la formació d'un complex ternari; i la lipoproteïna lipasa, la qual per concentrar-se a la superfície cel·lular necessita la presència de cadenes d'HS (Turnull i col., 2001).

A.



B.

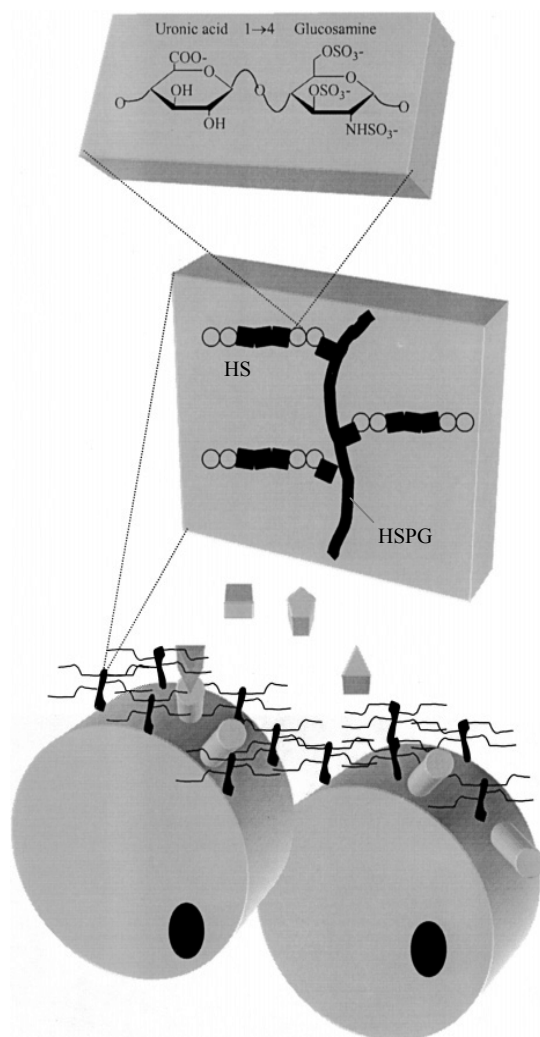


Figura 7: A. Estructura de l'heparà sulfat. B. Les cadenes d'heparà sulfat es troben normalment unides a un nucli proteic formant el que s'anomenen proteoglicans HS (HSPGs), els quals es troben a la superfície cel·lular i a la matriu extracel·lular (Shriver i col., 2002).

4.3- MECANISME CATALÍTIC

El residu cisteïna de la primera regió consens (SSCSPSRASLLTG) descrita anteriorment juga un paper molt important en el mecanisme catalític de la sulfamidasa. Aquest residu, Cys70, és modificat post-traduccionalment al reticle endoplasmàtic convertint-se en un residu formilglicina (Dierks i col., 1997), que serà necessari per la catàlisi del grup sulfat de l'heparà sulfat. Sense aquesta modificació de cisteïna a formilglicina l'enzim no presenta activitat sulfatasa.

Aquest és justament el defecte que causa un síndrome anomenat MSD (deficiència múltiple en sulfatases). Una malaltia d'acumulació lisosòmica que presenta una herència autosòmica recessiva i on l'activitat de totes les sulfatases es troba altament reduïda (Kolodny i col., 1995). Aquesta reducció tan dràstica de l'activitat de totes les sulfatases està causada per la manca total o parcial d'un enzim, FGE (Dierks i col., 2003), que afecta la conversió de cisteïna a formilglicina necessària per a que les sulfatases siguin catalíticament actives (Dierks i col., 1997).

Per comprovar la importància d'aquesta modificació en la sulfamidasa, s'han realitzat estudis de mutagènesi dirigida canviant la Cys70 per una serina o una metionina. Aquests canvis donen com a resultat una disminució dràstica en l'activitat enzimàtica degut a la pèrdua de la funció catalítica (Daniele i Di Natale, 2001). Resultats similars han estat descrits per altres cisteïnes, com la Cys91 de

ARSB (Brooks i col., 1995), la Cys84 de la iduronat sulfatasa (Millat i col., 1997), la Cys69 de l'ARSA (Knaust i col., 1998) i la Cys79 de la N-acetilgalactosamina 6-sulfatasa (Sukegawa i col., 2000), les quals pateixen modificacions posttraduccionals similars a la Cys70 de la sulfamidasa.

Anys més tard va ser localitzat l'ortòleg murí al cromosoma 11 (Costanzi i col., 2000), en una regió homòloga a un segment del cromosoma 17 humà, segment en el qual es troba el gen *SGSH* humà.

Com ja hem vist amb anterioritat, s'han descrit diversos models canins (Fischer i col., 1998; Aronovich i col., 2000), i s'ha identificat i seqüenciat el gen caní (GenBank AF217203), però fins el moment no es disposa de la seva posició al genoma.

5- GENÈTICA

La síndrome de Sanfilippo tipus A presenta un patró d'herència autosòmic recessiu i, tal com s'ha comentat amb anterioritat, està causada per la deficiència en un enzim lisosòmic, l'heparà N-sulfatasa (NS) també anomenat, heparà sulfat sulfatasa (HSS), N-sulfoglucosamina sulfhidrolasa (SGSH) o sulfamidasa.

5.1- EL GEN: SGSH

5.1.1- MAPATGE

El gen de la N-sulfoglucosamina sulfhidrolasa humana (*SGSH*) va ser mapat al 1995 al cromosoma 17 a la regió q25.3 (Scott i col., 1995) (GenBank AF217204).

5.1.2- ESTRUCTURA, ORGANITZACIÓ I EXPRESSIÓ

El gen s'estén per una longitud d'unes 11 Kb i, com s'ha comentat anteriorment, té una pauta de lectura oberta de 1506 nucleòtids. Es troba estructurat en 8 exons amb longituds de 82 a 1.696 pb (Karageorgos i col., 1996) (figura 8). Les seqüències murina i canina comparteixen la mateixa estructura i organització que la seqüència humana.

L'anàlisi per *northern blot* sobre diferents teixits revela l'existència de 3 transcrits diferents de 3,1 Kb, 4,3 Kb i 7,1 Kb (Scott i col., 1995), sent el transcrit de 3,1 el predominant en la majoria de teixits. Aquestes diferències en la mida es creu que poden ser degudes a l'existència de diferents llocs de poliadenilació, tot i que fins el moment, no s'ha demostrat que sigui així ni s'han trobat seqüències consens de poliadenilació.

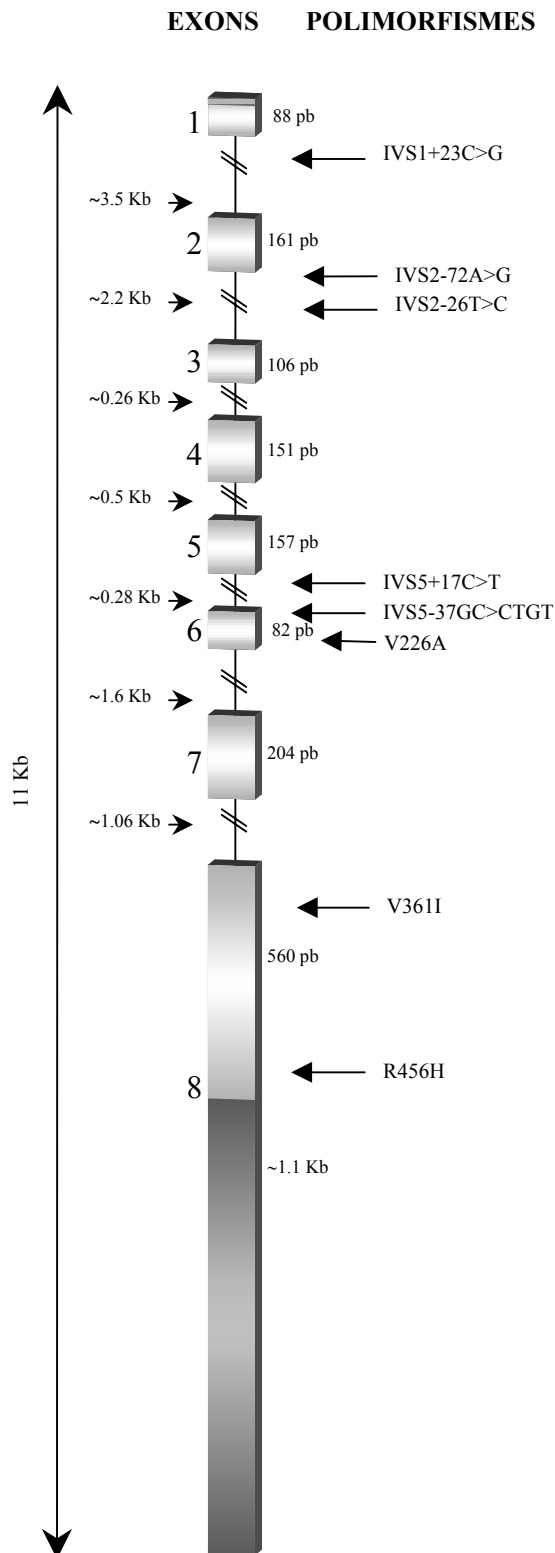


Figura 8: Polimorfismes presents en el gen de la sulfamidasa i i estructura genètica (on s'indica la mida dels exons i introns).

Malgrat no trobar cap seqüència consens de poliadenilació, a la regió 3' no traduïda de 1138 pb se n'ha proposat una d'alternativa, TGTA AAA (Scott i col., 1995). És una regió que es troba també present en la seqüència de ratolí, fet que fa pensar que podria tenir alguna importància (Costanzi i col., 2000). Es coneix que aquesta regió 3' no traduïda conté una seqüència de 57 pb repetida en *tàndem* quatre vegades. Però després d'analitzar 10 mostres independents no s'ha vist que aquestes repeticions siguin polimòrfiques (Karageorgos i col., 1996).

El *CAP site* de la seqüència del gen *SGSH* humana no ha estat identificat, així com la zona promotora, la qual no ha estat caracteritzada fins el moment.

En canvi, la regió promotora de la seqüència de ratolí ha estat identificada i aïllada (Costanzi i col., 2003). S'ha comprovat que conté regions riques en CGs (característic dels gens *housekeeping*) però no s'ha identificat cap caixa TATA o CAAT. S'han determinat, per TRANSFAC, els possibles elements reguladors (MZF 1, Sp1, Nkx-2, lloc d'unió a SRY, entre d'altres) i la seva posició (Costanzi i col., 2003). S'ha identificat l'inici de transcripció, localitzat en la posició -355pb *upstream* del codó d'inici de la traducció.

L'anàlisi de la regió promotora de ratolí ha permès determinar quines són les regions reguladores de l'expressió de la sulfamidasa *in vitro*. Els resultats suggereixen que entre les posicions -702 i -1217 pb existiria un element de control negatiu encara no determinat (Costanzi i col., 2003).

Un estudi per *Northern blot* realitzat per Scott i col·laboradors (Scott i col., 1995) revela que la sulfamidasa humana s'expressa en la majoria de teixits, tot i que es troben nivells més elevats en teixit ovàric, leucòcits de sang perifèrica, pròstata, cor i testicle. Per contra, els nivells són molt baixos en altres teixits com el cervell (no detectables), el ronyó i el timus. En ratolí, els resultats mostren els nivells més elevats a fetge, pulmons i ronyons; intermitjos a melsa, timus, testicle, pell, cervell, cor, intestí i estómac; i, molt baixos al múscle esquelètic (Costanzi i col., 2003).

5.1.3- POLIMORFISMES

Al gen *SGSH* s'han descrit diversos polimorfismes. La seva localització es troba indicada a la figura 8.

L'anàlisi d'aquests polimorfismes permet establir haplotips per estudiar el possible origen únic d'algunes mutacions (Blanch i col., 1997; Weber i col., 1997; Di Natale i col., 1998; *Chabás i col., 2001; Lee-Chen i col., 2002).

5.2- MUTACIONS

La primera mutació identificada com a responsable de la síndrome de Sanfilippo tipus A fou descrita al 1995 amb el clonatge del cDNA (Scott i col., 1995). Fou una deleció d'11 pb, des de la posició 1272 a la 1282, que provoca un trencament de la pauta de lectura i l'aparició d'un codó d'aturada en posició 424 (Scott i col., 1995).

Des d'aleshores se n'han descrit prop de 70, entre mutacions de canvi de sentit, sense sentit, delecions, insercions i una mutació que afecta un lloc d'*splicing* (taula 4). L'espectre de mutacions és molt ampli i no existeix una mutació que pugui ser considerada com la més prevalent en la població general. Malgrat això, sí que és possible trobar-ne algunes que serien les més freqüents en determinades regions o països. És el cas de les següents mutacions: la R74C, descrita com la mutació més freqüent en pacients polonesos (Bunge i col., 1997); la R245H majoritària als Països Baixos (Weber i col., 1997); la S66W, majoritària en pacients italians (Di Natale i col., 1998); i la c.1079delC, descrita com la mutació majoritària en població espanyola (*Montfort i col., 1998).

* Present treball.

Taula 4: Mutacions en el gen *SGSH* causants de la MPS IIIA. Numeració dels aminoàcids i nucleòtids d'acord amb Yogalingam i Hopwood. (2001). En dates anteriors la numeració es correspon amb Scott i col. (1995). Ambdues mantenen una diferència de 12 pb.

| CANVI | cDNA | EXÓ | EFFECTE | DETECCIÓ | REFERÈNCIA |
|-------------------------------------|---------|-----|-------------------------------------|-------------------|--|
| Mutacions de canvi de sentit | | | | | |
| D32G | 95A>G | 2 | Canvi no conservatiu d'aa | | Beesley i col., 2000 |
| Y40N | 118T>A | 2 | Substitució d'aa altament conservat | - <i>RsaI</i> | Di Natale i col., 1998 |
| N42K | 126C>A | 2 | Canvi conservatiu d'aa | | Lee-Chen i col., 2002 |
| A44T | 130G>A | 2 | Canvi no conservatiu d'aa | | Di Natale i col., 1998 |
| S66W | 197C>G | 2 | Canvi no conservatiu d'aa | + <i>EcoRII</i> | Blanch i col., 1997 |
| R74C | 222C>T | 2 | Substitució d'aa altament conservat | - <i>MvnI</i> | Weber i col., 1997; Bunge i col., 1997 |
| R74H | 223G>A | 2 | Substitució d'aa altament conservat | - <i>BstUI</i> | Bunge i col., 1997 |
| T79P | 237A>C | 2 | Substitució d'aa altament conservat | + <i>BstNI</i> | Weber i col., 1997 |
| H84Y | 250C>T | 3 | Canvi no conservatiu d'aa | - <i>Fnu4HI</i> | Beesley i col., 2000 |
| Q85R | 254A>G | 3 | Canvi no conservatiu d'aa | | *Montfort i col., 1998 |
| G90R | 268G>A | 3 | Canvi no conservatiu d'aa | | Bunge i col., 1997 |
| G122R | 364G>A | 4 | Substitució d'aa altament conservat | | Bunge i col., 1997 |
| P128L | 383C>T | 4 | Canvi conservatiu d'aa | | Di Natale i col., 1998 |
| V131M | 391G>A | 4 | Canvi conservatiu d'aa | + <i>NlaIII</i> | Weber i col., 1997 |
| T139M | 416C>T | 4 | Canvi no conservatiu d'aa | + <i>NlaIII</i> | Weber i col., 1997 |
| L146P | 437T>C | 4 | Canvi conservatiu d'aa | - <i>Bpml</i> | Di Natale i col., 1998 |
| R150W | 448C>T | 4 | Canvi no conservatiu d'aa | - <i>Acil</i> | Beesley i col., 2000 |
| R150Q | 449G>A | 4 | Canvi no conservatiu d'aa | | Bunge i col., 1997 |
| D179N | 535G>A | 5 | Canvi no conservatiu d'aa | | Di Natale i col., 1998 |
| R182C | 544C>T | 5 | Canvi no conservatiu d'aa | - <i>MspAII</i> | Di Natale i col., 1998 |
| F193L | 579C>G | 5 | Canvi conservatiu d'aa | | Bunge i col., 1997 |
| R206P | 617G>C | 5 | Canvi no conservatiu d'aa | | *Montfort i col., 1998 |
| P227R | 680C>G | 6 | Canvi no conservatiu d'aa | | Di Natale i col., 1998 |
| A234G | 701C>G | 6 | Canvi no conservatiu d'aa | - <i>BglI</i> | Weber i col., 1997 |
| D235N | 703G>A | 6 | Canvi no conservatiu d'aa | | Beesley i col., 2000 |
| D235V | 704A>T | 6 | Canvi no conservatiu d'aa | | Bunge i col., 1997 |
| R245H | 734G>A | 6 | Canvi no conservatiu d'aa | - <i>EagI</i> | Blanch i col., 1997 |
| D273N | 817G>A | 7 | Canvi no conservatiu d'aa | | Beesley i col., 2000 |
| Y286S | 857A>C | 7 | Canvi no conservatiu d'aa | | Wood i Thompson, 2000 |
| P288S | 862C>T | 7 | Canvi no conservatiu d'aa | - <i>CfrI</i> | Emre i col., 2002 |
| P293S | 877C>T | 7 | Canvi no conservatiu d'aa | | Lee-Chen i col., 2002 |
| S298P | 892T>C | 7 | Canvi no conservatiu d'aa | + <i>MaeIII</i> | Bunge i col., 1997 |
| T321A | 961A>G | 8 | Canvi no conservatiu d'aa | | Bunge i col., 1997 |
| I322S | 965T>G | 8 | Canvi no conservatiu d'aa | + <i>AluI</i> | Beesley i col., 2000 |
| S347F | 1040C>T | 8 | Canvi no conservatiu d'aa | | Miyazaki i col., 2002 |
| A354P | 1060G>C | 8 | Canvi no conservatiu d'aa | - <i>HaeIII</i> | *Montfort i col., 1998 |
| E355K | 1063G>A | 8 | Canvi no conservatiu d'aa | - <i>Bsp1286I</i> | Beesley i col., 2000 |
| S364R | 1092C>G | 8 | Canvi no conservatiu d'aa | | Bunge i col., 1997 |
| E369K | 1105G>A | 8 | Canvi no conservatiu d'aa | | Di Natale i col., 1998 |
| Y374H | 1120T>C | 8 | Canvi no conservatiu d'aa | | Beesley i col., 2000 |
| R377C | 1129C>T | 8 | Canvi no conservatiu d'aa | - <i>HhaI</i> | Di Natale i col., 1998 |
| R377H | 1130G>A | 8 | Canvi conservatiu d'aa | + <i>DraIII</i> | Weber i col., 1997; Bunge i col., 1997 |
| Q380R | 1139A>G | 8 | Canvi no conservatiu d'aa | + <i>NlaIV</i> | Weber i col., 1997 |
| L386R | 1157T>G | 8 | Canvi no conservatiu d'aa | + <i>MvnI</i> | *Montfort i col., 1998 |
| N389K | 1167C>A | 8 | Canvi no conservatiu d'aa | | Bunge i col., 1997 |
| R433W | 1297C>T | 8 | Canvi no conservatiu d'aa | - <i>MspI</i> | Beesley i col., 2000 |
| R433Q | 1298G>A | 8 | Canvi no conservatiu d'aa | - <i>MspI</i> | *Chabás i col., 2001 |
| D444G | 1331A>G | 8 | Canvi conservatiu d'aa | | Miyazaki i col., 2002 |
| E447K | 1339G>A | 8 | Canvi no conservatiu d'aa | | Blanch i col., 1997 |
| V486F | 1456G>T | 8 | Canvi conservatiu d'aa | - <i>BsaHI</i> | Beesley i col., 2000 |

n.d.: no determinat

* Present treball.