

## PATOLOGIA MOLECULAR DE LA MALALTIA DE GAUCHER

DANIEL GRINBERG<sup>1</sup>, BRU CORMAND<sup>1</sup>, LAURA GORT<sup>2</sup>, MAGDA MONTFORT<sup>1</sup>, AMPARO CHABÁS<sup>2</sup> I LLUÏSA VILAGELIU<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Departament de Genètica. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona.*

<sup>2</sup>*Institut de Bioquímica Clínica. Corporació Sanitària. Barcelona.*

Adreça per a la correspondència: D. Grinberg. Departament de Genètica. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona. 08071 Barcelona.

### INTRODUCCIÓ

La malaltia de Gaucher és un trastorn degut a la disfunció del sistema lisosòmic. Les malalties lisosòmiques es classifiquen segons la via metabòlica afectada i la naturalesa química del substrat acumulat. En el cas de la malaltia de Gaucher la deficiència afecta el catabolisme dels esfingolípid i és, per tant, una esfingolipidosi. És l'esfingolipidosi prevalent.

La simptomatologia associada a la malaltia de Gaucher presenta els següents trets distintius: increment de la mida del fetge i de la melsa (hepatoesplenomegàlia); substitució progressiva de la medulla òssia per macròfags carregats de lípids (cèl·lules de Gaucher) que comprometen la producció d'eritròcits i de plaquetes (anèmia, trombocitopènia); degeneració osteolítica de l'esquelet que pot ocasionar crisis òssies, i en una minoria de pacients una degeneració progressiva del sistema nerviós central.

Les manifestacions clíniques de la malal-

tia de Gaucher són molt heterogènies. S'ha classificat en tres subtipus clínics d'acord amb l'absència (tipus I) o presència i gravetat (tipus II i III) de les alteracions neurològiques (Beutler i Grabowski, 1995).

El tipus I, forma no neuropàtica (MIM 230800), és el més freqüent, amb una incidència d'entre 1/40.000 i 1/60.000 en la població general. La incidència s'eleva a d'entre 1/400 i 1/600 en la població jueva asquenàsita. Es caracteritza per l'absència d'afectació del sistema nerviós central i la seva presentació és molt variable tant pel que fa a l'edat d'aparició dels primers símptomes com a la gravetat i progressió de la malaltia.

El tipus II, forma neuropàtica aguda (MIM 230900), té una incidència de 1/100.000 naixements, sense predomini ètnic. És la forma més greu a causa de l'acumulació neurovisceral ràpida de lípids que provoca la mort durant els dos primers anys de vida. Les manifestacions neurològiques

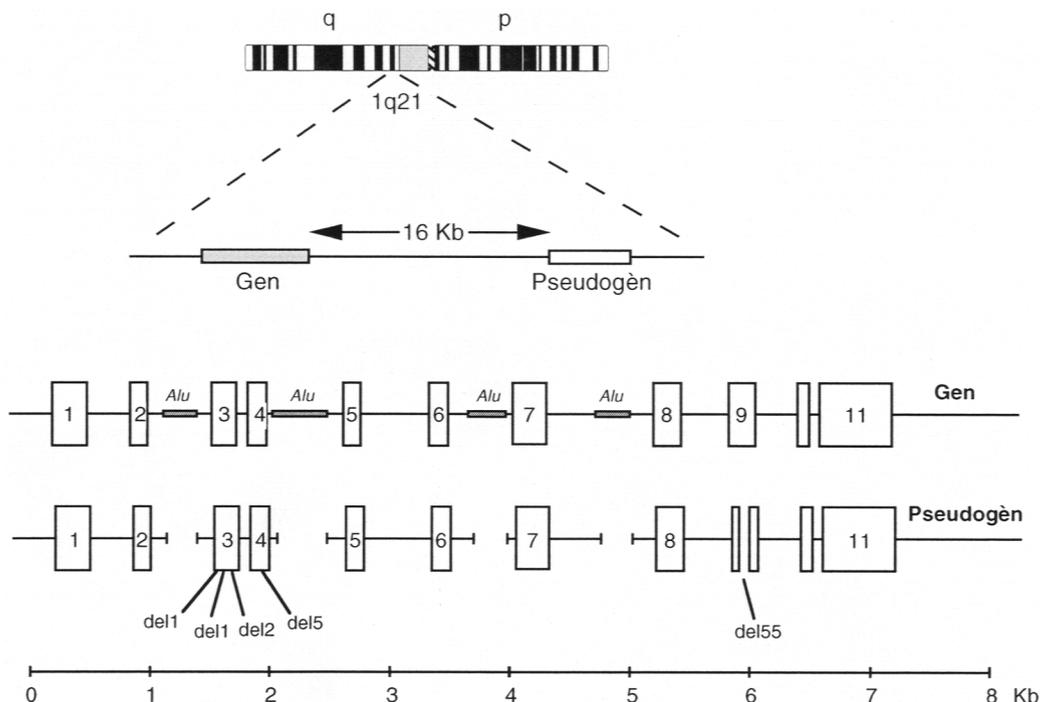


FIGURA 1. Localització cromosòmica i estructura del gen de la  $\beta$ -glucocerebrosidasa (GBA) i del seu pseudogèn.

inicials són generalment anomalies oculomotores.

El tipus III, forma neuropàtica subaguda (MIM 231000), es manifesta amb una gravetat intermèdia entre els tipus I i II. De progressió menys ràpida i amb afectació neurològica més tardana, permet la supervivència fins a l'edat adulta. La seva incidència varia entre 1/50.000 i 1/100.000 naixements i, tot i que no presenta predomini ètnic, és particularment prevalent a la regió de Norrbotten, al nord de Suècia.

La malaltia de Gaucher presenta una herència autosòmica recessiva i és deguda en la major part dels casos a una deficiència en l'enzim  $\beta$ -glucocerebrosidasa (Brady *et al.*, 1965). La  $\beta$ -glucocerebrosidasa és una hidrolasa àcida lisosòmica que catalitza la hidròlisi de glucosilceramida a ceramida i

glucosa en presència d'una proteïna activadora anomenada saposina C o SAP-C. El mal funcionament de la  $\beta$ -glucocerebrosidasa provoca l'acumulació de glucosilceramida (o glucocerebròsid) a l'interior dels lisosomes dels macròfags en el sistema reticuloendotelial, sobretot a la melsa, el fetge i la medul·la òssia.

El gen que codifica la  $\beta$ -glucocerebrosidasa (GBA), una glicoproteïna de membrana de 497 aminoàcids i uns 65 kDa, ha estat clonat i localitzat en el braç llarg del cromosoma 1, a 1q21 (Ginns *et al.*, 1985). Té onze exons i deu introns i cobreix una regió genòmica d'unes 7 kb. Els introns 2, 4, 6 i 7 contenen seqüències Alu (figura 1). S'ha identificat un pseudogèn a unes setze kilobases en direcció 3' respecte al gen funcional, que es transcriu però no es tradueix a proteïna. La

seva identitat amb el gen pel que fa a seqüència és del 96 % (Horowitz *et al.*, 1989). El pseudogèn té una estructura d'exons i introns semblant al gen però no conté les seqüències *Alu* i presenta diverses mutacions que impossibiliten la síntesi d'una proteïna funcional (figura 1).

S'han descrit tretze polimorfismes en el gen *GBA*, dotze en zona no codificant que estan en desequilibri de lligament entre ells i donen lloc a dos haplotips majoritaris (Beutler *et al.*, 1992).

En la majoria dels casos la malaltia de Gaucher és deguda a mutacions en el gen *GBA*. Només en dos malalts s'ha trobat el defecte en el gen que codifica la proteïna activadora SAP-C (Christomanou *et al.*, 1986; 1989), situat a 10q21-22.

S'han descrit fins ara més de cent mutacions en el gen de la glucocerebrosidasa que donen lloc a la malaltia de Gaucher. Aquestes alteracions inclouen mutacions puntuals de canvi d'aminoàcid i sense sentit, insercions, delecions, mutacions de la maduració per tall i unió i reordenaments entre el gen i el pseudogèn (Balicki i Beutler, 1995; Beutler i Gelbart, 1997). Aquests reordenaments originen al·lels complexos que contenen diverses mutacions com a resultat d'entrecreuaments desiguals o de fenòmens de conversió gènica.

De les moltes mutacions que s'han identificat en el gen *GBA*, poques tenen una prevalença elevada, però la seva freqüència relativa varia segons el grup ètnic. En els jueus asquenaites, la mutació N370S, un canvi d'asparagina a serina en la posició 370 de la proteïna, és la més freqüent i està present en un 68-77 % dels al·lels mutats. La segona mutació més freqüent és una inserció d'una guanina en la posició 84 del cDNA (84GG), que representa un 10-13 %. Només quatre mutacions (N370S, 84GG, L444P i IVS2+1) expliquen el 89-96 % dels defectes moleculars responsables de la malaltia en aquesta

població (Beutler *et al.*, 1992; Horowitz *et al.*, 1993; Sibille *et al.*, 1993).

En les poblacions no jueves d'origen europeu les mutacions més freqüents són les substitucions N370S (23-54 %) i L444P (13-57 %) (Beutler *et al.*, 1992; Horowitz *et al.*, 1993; Dahl *et al.*, 1990; Tuteja *et al.*, 1993; Wally *et al.*, 1993; Cormand *et al.*, 1995; Michelakakis *et al.*, 1995; Amaral *et al.*, 1996; Tytki-Szymanska *et al.*, 1996).

S'han observat correlacions clares entre algunes mutacions i l'expressió fenotípica de la malaltia. Això té importància pràctica de cara al consell genètic i a la teràpia. La presència de la mutació N370S, tant en homozigosi com en heterozigosi, va invariablement associada a un diagnòstic no neuronopàtic i, per tant, al tipus I de la malaltia. En canvi, l'al·lel L444P (en absència de N370S) es correlaciona amb les formes neuronopàtiques de la malaltia (Tsuji *et al.*, 1988; Theophilus *et al.*, 1989). Recentment s'ha observat una associació entre el genotip D409H/D409H i un fenotip caracteritzat per calcificacions cardiovasculars i apraxia oculomotora (Chabás *et al.*, 1995; Abrahamov *et al.*, 1995).

S'han desenvolupat diverses estratègies terapèutiques per a la malaltia de Gaucher, a causa de l'existència d'una forma no neuropàtica de gran prevalença. El trasplantament de moll de l'os s'ha substituït per la terapèutica enzimàtica de substitució, que consisteix en la infusió de glucocerebrosidasa modificada (ceredasa) dirigida als macròfags (Barton *et al.*, 1991). Aquesta terapèutica fou introduïda l'any 1991 i actualment són ja més de mil les persones sotmeses a terapèutica de substitució enzimàtica al món. Si bé la majoria d'aquests pacients ha experimentat una clara millora en molts dels símptomes, el tractament és extremadament car i comporta una dependència de les infusions de per vida. La terapèutica gènica constitueix una nova estratègia per al tracta-

ment de la malaltia de Gaucher ja que les cèl·lules principalment involucrades són els macròfags, que deriven de les cèl·lules mare hematopoètiques. Actualment s'estan duent a terme proves clíniques inicials seguint els primers protocols aprovats (Dunbar *et al.*, 1996).

En aquest capítol descrivim alguns aspectes del treball realitzat pel nostre grup de recerca sobre la malaltia de Gaucher: la identificació de les mutacions en pacients espanyols (i també en un grup de pacients argentins i italians), l'estudi de correlacions genotip-fenotip, el mapatge genètic dels gens *GBA* i *PSAP*, el disseny d'una estratègia de diagnòstic molecular de la malaltia i la determinació del possible haplotip ancestral de la mutació N370S. Els malalts han estat diagnosticats de malaltia de Gaucher mitjançant l'anàlisi prèvia de l'activitat glucocerebrosidasa en cèl·lules com leucòcits o fibroblasts cultivats. El diagnòstic dels malalts espanyols es realitza a l'Institut de Bioquímica Clínica, que rep les mostres procedents de diferents hospitals d'arreu d'Espanya.

## DETECCIÓ DE LES MUTACIONS RESPONSABLES DE LA MALALTIA DE GAUCHER

Quan vam iniciar el nostre treball no hi havia dades de mutacions responsables de la malaltia de Gaucher en la població espanyola, i la informació sobre altres poblacions no jueves era pràcticament inexistent. S'havien descrit mutacions en pacients no jueus, però no s'havien realitzat anàlisis exhaustives en poblacions específiques. El coneixement de les mutacions particulars d'una població és una eina molt important per dissenyar estratègies de diagnòstic molecular de la malaltia.

El nostre primer treball va consistir en

l'anàlisi de la presència en pacients espanyols de mutacions prevalents descrites amb anterioritat en altres poblacions (Cormand *et al.*, 1995), mitjançant amplificació per PCR i digestió amb un enzim de restricció o bé utilitzant la tècnica d'hibridació amb oligonucleòtids específics d'al·lel (ASOH). Posteriorment hem analitzat exhaustivament la regió codificant del gen, tots els llocs de *splicing*, part dels introns i regions a 5' i a 3' del gen. Per això hem amplificat aquestes regions mitjançant PCR i a continuació hem utilitzat la tècnica de SSCP que permet detectar canvis puntuals en fragments curts de DNA. Aquest estudi ens ha permès identificar la mutació en cent-un de cent-sis al·lells mutats, que representen més del 95 % del cromosomes estudiats (figura 2). En total hem trobat vint-i-quatre mutacions diferents, catorze de les quals no havien estat mai descrites (Cormand *et al.*, 1996; 1998a; Chabás *et al.*, 1996).

Aquests darrers anys s'han realitzat estudis sobre altres poblacions, com ara l'anglesa (Walley *et al.*, 1993), la portuguesa (Amaral *et al.*, 1996), l'australiana (Lewis *et al.*, 1994; Nelson *et al.*, 1995), la grega (Michalakakis *et al.*, 1995), la polonesa (Tylki-

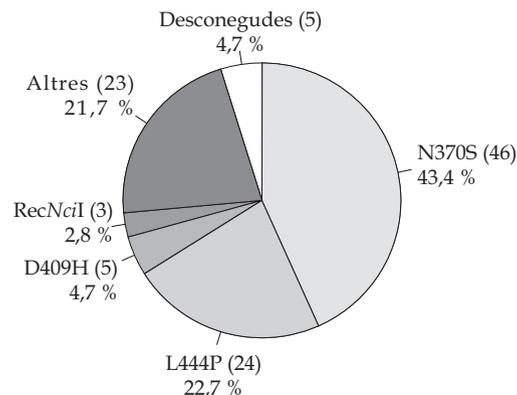


FIGURA 2. Freqüència relativa de les mutacions de la  $\beta$ -glucocerebrosidasa en cinquanta-tres pacients de Gaucher espanyols. Entre parèntesi s'indica el nombre d'al·lells.

Szymanska *et al.*, 1996) i l'alemanya (Lecoutre *et al.*, 1997). Aquests estudis, però, s'han limitat a l'anàlisi d'algunes mutacions prevalents prèviament descrites. Dos fets destaquen en la comparació de les freqüències de les mutacions entre la població espanyola i altres poblacions: per una banda, la mutació prevalent a l'Estat espanyol és la N370S (43,4 %), la mateixa que entre els jueus asquenasites (i també a Portugal), mentre que en altres poblacions aquest canvi és menys freqüent, per exemple un 27 % a Anglaterra o un 25 % a Austràlia. És per això que vam decidir estudiar el possible origen comú d'aquesta mutació en la població espanyola i en la jueva (veure més avall). L'altre fet a destacar és que la tercera mutació més freqüent a Espanya és la D409H, que és molt menys habitual en altres poblacions.

Recentment hem realitzat l'estudi d'una població de malalts de Gaucher d'Argentina (Cormand *et al.*, 1998b). Hem analitzat trenta-un pacients no emparentats i hem identificat la mutació responsable de la malaltia en cinquanta-vuit dels seixanta-dos al·lels mutats (94 %) mitjançant una metodologia similar a la utilitzada amb els pacients espanyols. La mutació N370S és

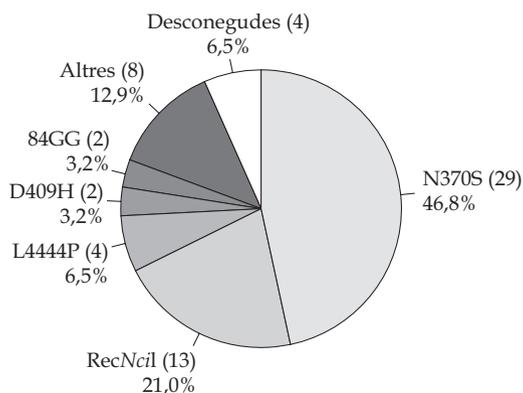


FIGURA 3. Freqüència relativa de les mutacions de la  $\beta$ -glucocerebrosidasa en trenta-un pacients de Gaucher procedents d'Argentina. Entre parèntesi s'indica el nombre d'al·lels.

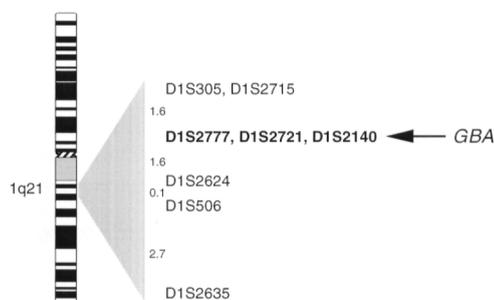


FIGURA 4. Localització genètica i citogenètica del gen de la  $\beta$ -glucocerebrosidasa (*GBA*) en el cromosoma 1. En negra s'indiquen els marcadors tipus microsatèl·lit que es troben a 0 cM del gen. S'inclouen també altres marcadors propers i les distàncies relatives en cM.

també la més freqüent en aquesta població, però en aquest cas va seguida de l'al·lel recombinant anomenat RecNcil (figura 3). Aquesta mutació, originada a partir del pseudogèn, s'ha analitzat en detall tal com es descriu més avall. En els pacients argentins hem identificat tretze mutacions diferents, incloent-hi tres canvis descrits per primera vegada.

### CORRELACIÓ GENOTIP-FENOTIP

El coneixement de les mutacions presents en cada pacient pot aportar una informació molt important per al diagnòstic prenatal, per al consell genètic i per al tractament. No obstant això, en molts casos no hi ha una correlació clara entre el genotip i el fenotip. En la malaltia de Gaucher l'única correlació ben establerta és l'associació entre la presència de la mutació N370S, en un o en els dos al·lels, i el tipus I de la malaltia, és a dir, les formes no neuronopàtiques. Beutler *et al.* (1994) han classificat les mutacions en «lleus», quan no hi ha afectació neurològica (el principal exemple és el canvi N370S); «greus», quan produeixen neuropatia, i «letals», quan no s'han trobat mai en homozigosi i no produeixen proteïna fun-

cional. Gairebé tots els pacients del tipus I tenen la mutació N370S. Per això es molt difícil identificar noves mutacions lleus.

Nosaltres hem identificat una mutació lleu en la població espanyola, la substitució aminoacídica E326K, present en un pacient de catorze anys sense neuropatia i amb el genotip E326K/D409H (Chabás *et al.*, 1996). La mutació D409H és greu i per tant el canvi E326K ha de ser el responsable de l'absència d'afectació neurològica. També hem identificat dues noves mutacions lleus en analitzar dos pacients italians (Cormand *et al.*, 1997a). Els dos pacients són del tipus I i homozigots per mutacions no descrites prèviament, I402T i V375L.

La novetat més interessant referent a la correlació genotip-fenotip que vam trobar fou el cas de tres germanes amb el genotip D409H/D409H que presentaven un fenotip particular amb calcificacions vasculars i moderada visceromegàlia (Chabás *et al.*, 1995). Poc després, altres autors varen publicar la presència de símptomes similars en pacients homozigots per a la mutació D409H, la qual cosa va reforçar aquesta nova correlació genotip-fenotip (Abrahamov *et al.*, 1995; Beu-

tlar *et al.*, 1995; Uyama *et al.*, 1997). Recentment hem identificat un nou pacient homozigot per la mutació D409H que té només dos mesos i que està ja rebent tractament de substitució enzimàtica (Chabás *et al.*, 1998). En aquest cas es podrà avaluar la prevenció de les calcificacions cardíques pel tractament primerenc si assumim que el pacient hauria desenvolupat aquest símptoma com tots els altres malalts amb el genotip D409H/D409H descrits fins ara.

### MAPATGE DELS GENS GBA I PSAP

S'havia localitzat el gen *GBA* al cromosoma 1q21 mitjançant hibridació *in situ* (Ginns *et al.*, 1985), però no s'en coneixia la localització en relació a marcadors de tipus microsatèl·lit altament polimòrfics. Amb l'objectiu de fer el mapatge fi del gen, hem realitzat l'anàlisi de lligament de dos punts i multipuntual entre un polimorfisme intragènic i diversos microsatèl·lits del braç llarg del cromosoma 1 (Cormand *et al.*, 1997b). Hem mapat també el gen *PSAP* que codifica la prosaposina, precursora de la saposina C, i que és el responsable de la malaltia de Gaucher en un nombre reduït de casos. Els resultats del mapatge d'aquests dos gens es mostren en les figures 4 i 5. El mapatge del gen *GBA* ens ha permès dissenyar una estratègia de diagnòstic molecular indirecte, i també identificar l'haplotip ancestral en el qual probablement va tenir lloc la mutació N370S i estudiar el possible origen comú d'aquesta mutació en les poblacions espanyola i jueva.

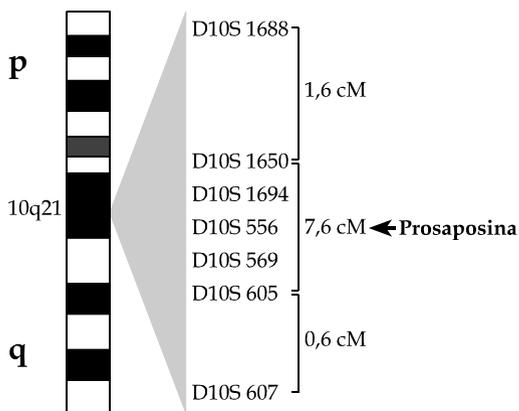


FIGURA 5. Localització genètica i citogenètica del gen de la prosaposina (*PSAP*) en el cromosoma 10. S'indica la posició del gen en relació a marcadors tipus microsatèl·lit i les distàncies relatives en cM.

### DIAGNÒSTIC MOLECULAR INDIRECTE

A partir de l'estudi de l'espectre de les mutacions responsables de la malaltia de

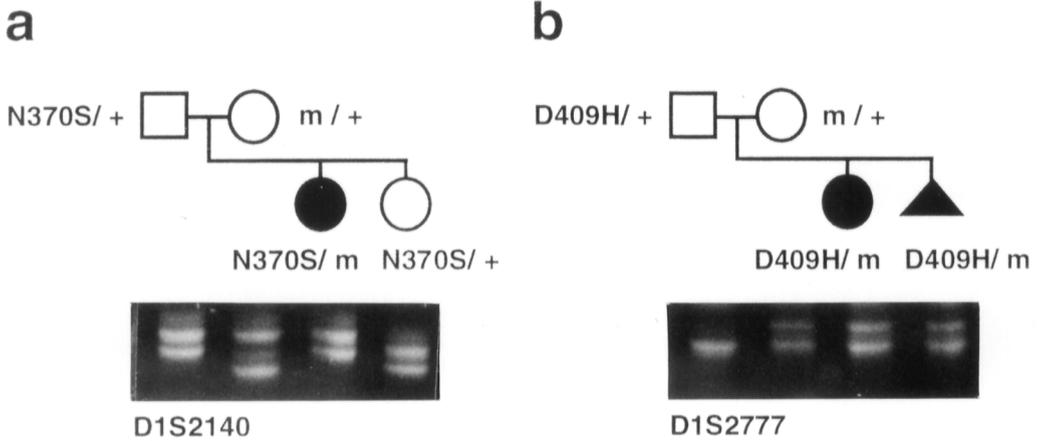


FIGURA 6. Anàlisi de cosegregació de la malaltia de Gaucher amb marcadors tipus microsatèl·lit del cromosoma 1q21 en dues famílies (a i b). Els productes de l'amplificació per PCR s'han separat en un gel de poliacrilamida al 6 % no desnaturant i s'han tenyit amb bromur d'etidi. + = al·lel normal; m = al·lel amb una mutació desconeguda.

Gaucher en la població espanyola, l'Institut de Bioquímica Clínica, com a centre d'abast nacional per al diagnòstic d'aquesta malaltia lisosòmica, ha incorporat de manera rutinària la detecció molecular de les tres mutacions més freqüents (N370S, L444P i D409H). Si algun dels al·lells és portador d'una mutació diferent d'aquestes, s'ha de fer una anàlisi exhaustiva de tota la regió codificant per identificar la mutació mitjançant les tècniques que s'han descrit més amunt. Aquesta anàlisi no té cabuda dins de la rutina d'un laboratori de diagnòstic a causa del seu elevat cost, tant econòmic com de temps. Per això hem dissenyat una estratègia de diagnòstic molecular indirecte que consisteix a analitzar les tres mutacions més freqüents i, si cal, estudiar posteriorment alguns dels marcadors tipus microsatèl·lit propers al gen per fer el diagnòstic d'afectat, portador o sa (Cormand *et al.*, 1998c). Un exemple d'aquest tipus d'anàlisi es mostra a la figura 6.

### MUTACIONS ÚNIQUES O RECURRENTS? HAPLOTIP ANCESTRAL

Un element molt important per conèixer la història natural d'una mutació és saber si es tracta d'un esdeveniment que ha tingut lloc una única vegada (o poques vegades) o si, contràriament, es tracta d'un fet que es produeix amb una relativa freqüència. En el primer cas, una regió genòmica més o menys extensa al voltant de la mutació ha de ser idèntica en tots els cromosomes portadors, perquè l'alteració és heretada d'un ancestre comú. Aquesta identitat es detecta per l'existència de desequilibri de lligament entre la mutació i marcadors polimòrfics propers al gen, que portarien majoritàriament al·lells presents en el cromosoma original en què es produí el canvi.

Mitjançant l'anàlisi dels cromosomes que porten la mutació N370S hem pogut confirmar que aquesta mutació té un origen únic a la població espanyola i hem pogut reconstruir el probable haplotip ancestral

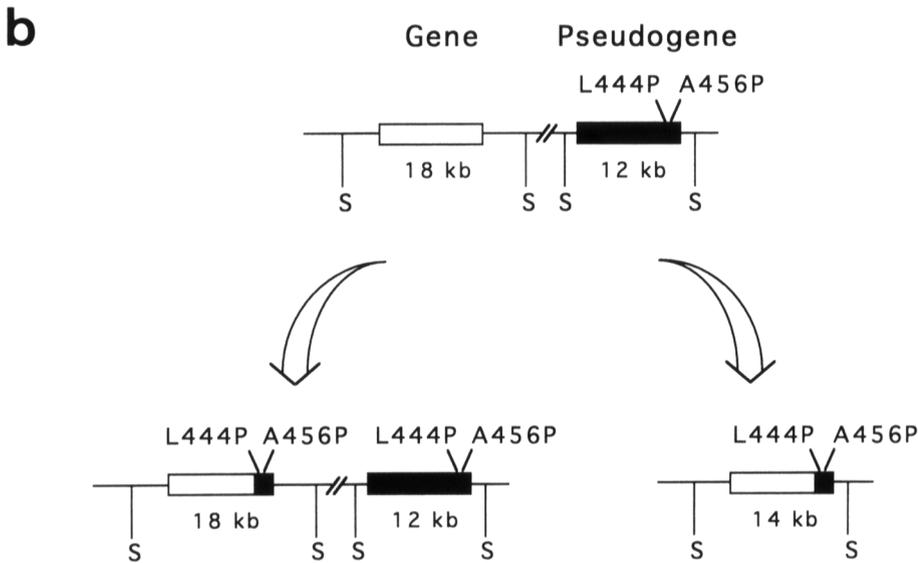
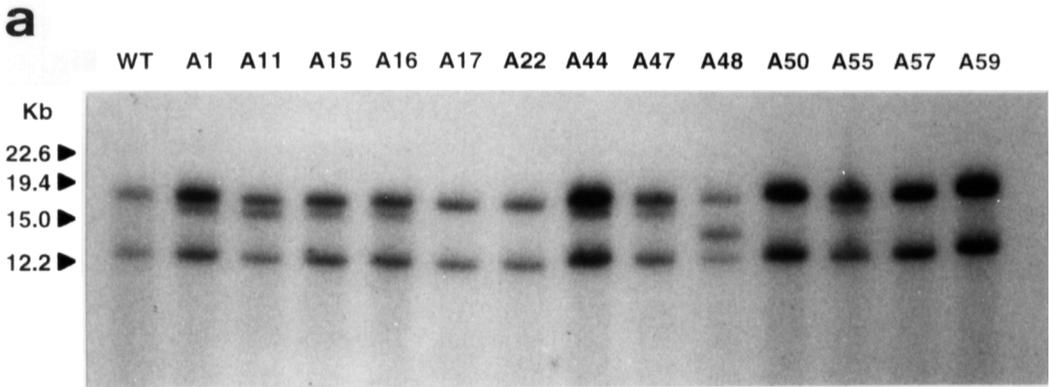


FIGURA 7. *a*) Anàlisi mitjançant transferència de Southern de mostres de DNA genòmic digerides amb *SspI*. El carril de l'esquerra (WT) correspon a un control normal amb dues bandes d'aproximadament 18 i 12 kb respectivament. Els pacients A17, A22, A50, A57 i A59 presenten el patró normal de dues bandes. Els pacients A1, A11, A15, A16, A44 (i el seu germà, A47) i A55 presenten una banda extra de 16 kb. En la mostra del pacient A48 es veuen les bandes de 18 i 12 kb més una banda addicional de 14 kb. *b*) Possibles models per als diferents al·lels RecNciI. Els que presenten el patró amb les bandes de 18 i 12 kb (esquerra) es podrien haver format per conversió gènica mentre que l'al·lel que presenta la banda de 14 kb (dreta) podria ser un gen de fusió resultant d'un entrecruament desigual.

(Cormand *et al.*, 1998a). Així mateix, hem comprovat que l'haplotip conservat a l'entorn de la mutació N370S en els pacients espanyols és semblant al dels pacients jueus

asquenasites (treball en preparació). No hi ha dades sobre els jueus sefardites, originaris de la península Ibèrica, però les nostres dades suggereixen que la mutació a Espa-

nya podria tenir l'origen en un cromosoma jueu. Si això és cert, els jueus sefardites portadors de la mutació N370S haurien de tenir el mateix haplotip, i per tant la mutació s'hauria originat abans de la separació entre les dues branques dels jueus.

L'anàlisi dels haplotips al voltant de les mutacions L444P (Cormand *et al.*, 1998a) i D409H (Chabás *et al.*, 1998) demostra que aquests canvis van tenir lloc repetidament, és a dir, que es tracta de mutacions recurrents. El fet que aquestes mutacions estiguin presents en el pseudogèn fa pensar en un procés reiterat de transferència de material genètic del pseudogèn cap al gen, potser per un mecanisme de conversió gènica.

### AL·LELS REC, RECOMBINACIÓ O CONVERSIÓ GÈNICA?

S'han descrit alguns al·lells complexos que contenen diverses mutacions que estan normalment presents en el pseudogèn. Els més freqüents són l'al·lel RecNciI (amb les mutacions L444P i A456P i el canvi silenciós V460V, 1497G->C en l'àmbit nucleotídic) i l'al·lel RecTL (amb els mateixos canvis que RecNciI més la mutació D409H). Aquests al·lells podrien haver-se originat mitjançant un procés d'entrecruament desigual entre gen i pseudogèn o per conversió gènica. En aquest darrer cas l'estructura genòmica al voltant del gen, que es pot analitzar utilitzant enzims de restricció i Southern, no variaria, mentre que un procés de recombinació alteraria el patró de bandes que s'obtenen mitjançant aquestes tècniques.

En general s'anomena «Rec» als mutants que contenen els canvis nucleotídics esmentats sense tenir en compte el mecanisme mitjançant el qual s'ha produït la mutació. En l'estudi dels pacients argentins (Cormand *et*

*al.*, 1998b) hem identificat un elevat nombre d'al·lells RecNciI. En l'anàlisi per Southern d'aquests al·lells s'observen tres patrons diferents (figura 7a). Alguns dels pacients portadors de l'al·lel RecNciI presenten un patró similar al dels individus sans, compatible amb una hipòtesi de conversió gènica com a mecanisme generador de la mutació (figura 7b). D'altra banda, un dels pacients presenta una banda extra en el Southern que suggereix la presència d'un producte de fusió generat per un procés de recombinació entre gen i pseudogèn. Sorprenentment, alguns pacients presenten un tercer patró de bandes diferent dels anteriors no descrit fins ara. Actualment estem estudiant l'estructura molecular d'aquest al·lel mutant i el possible mecanisme que l'ha generat.

### PERSPECTIVES FUTURES

Actualment estem posant a punt les tècniques d'expressió dels al·lells mutats. L'objectiu és caracteritzar la  $\beta$ -glucocerebrosidasa mutada i comparar-ne les propietats bioquímiques amb les de l'enzim normal. En el cas de mutacions noves, aquest estudi ens permetrà confirmar que el canvi trobat és realment la mutació causant de la malaltia. A més, conèixer les característiques de l'enzim pot resultar útil per a la prognosi de la malaltia. Per a l'expressió estem utilitzant d'una banda el sistema de baculovirus, caracteritzat per una gran eficiència de producció de proteïna heteròloga, i de l'altra, hem començat a utilitzar adenovirus com a vectors. Aquest darrer mètode utilitza cèl·lules humanes en cultiu i, en conseqüència, pot resultar interessant de cara a possibles aplicacions futures relacionades amb la teràpia gènica com a alternativa als protocols actuals, basats en sistemes retrovírics.

## AGRAÏMENTS

Els autors agraeixen a tots els metges i famílies dels malalts la seva col·laboració. Així mateix donen les gràcies a les persones que en diferents moments han col·laborat en aquesta recerca: R. González-Duarte, S. Balcells, M. Bayés, R. Valero, T. L. Harboe, N. García-Giralt, S. Guidi, A. Díaz, M. Martínez, J. Jarque, H. Sellés, N. Chamoles, A. Fiumara i R. Barone. També volen agrair a S. Atrian la revisió lingüística del manuscrit. Aquest treball ha estat finançat per la DGICYT (SAF93/0479-C02/01 i SAF97-0074). Bru Cormand fou becari del Pla de Formació de Personal Investigador de la CIRIT i Laura Gort ho és actualment.

## BIBLIOGRAFIA

- ABRAHAMOV, A.; D. ELSTEIN; V. GROSSTUR; B. FARBER; Y. GLASER; I. HADASHALPERN; S. RONEN; M. TAFKJDI; M. HOROWITZ; A. ZIMRAN (1995). «Gaucher's disease variant characterised by progressive calcification of heart valves and unique genotype». *Lancet*, núm. 346, pàg. 1000-1003.
- AMARAL, O.; E. PINTO; M. FORTUNA; L. LACERDA; M. MIRANDA (1996). «Type 1 Gaucher disease: Identification of N396T and prevalence of glucocerebrosidase mutations in the Portuguese». *Hum Mutat*, núm. 8, pàg. 280-281.
- BALICKI, D.; E. BEUTLER (1995). «Gaucher disease». *Medicine*, núm. 74, pàg. 305-323.
- BARTON, N. W.; R. O. BRADY; J. M. DAMBROSIA [et al.] (1991). «Replacement therapy for inherited enzyme deficiency-Macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease». *N Engl J Med*, núm. 324, pàg. 1464-1470.
- BEUTLER, E.; A. DEMINA; T. GELBART (1994). «Glucocerebrosidase mutations in Gaucher disease». *Mol Med*, núm. 1, pàg. 82-92.
- BEUTLER, E.; T. GELBART (1997). «Hematologically important mutations: Gaucher disease». *Blood Cells Molecules And Diseases*, núm. 23, pàg. 2-7.
- BEUTLER, E.; T. GELBART; W. KUHL; A. ZIMRAN; C. WEST (1992). «Mutations in Jewish patients with Gaucher disease». *Blood*, núm. 79, pàg. 1662-1666.
- BEUTLER, E.; G. A. GRABOWSKI (1995). «Gaucher disease». A: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly and D. Valle. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 7th Ed. New York: [s.n.], pàg. 2641-2669.
- BEUTLER, E.; C. KATTAMIS; J. SIPE; M. LIPSON (1995). «1342C mutation in Gaucher's disease». *Lancet*, núm. 346, pàg. 1637.
- BEUTLER, E.; C. WEST; T. GELBART (1992). «Polymorphisms in the human glucocerebrosidase gene». *Genomics*, núm. 12, pàg. 795-800.
- BRADY, R. O.; J. N. KANFER; D. SHAPIRO (1965). «Metabolism of glucocerebrosides. II. Evidence of enzymatic deficiency in Gaucher's disease». *Biochem Biophys Res Commun*, núm. 18, pàg. 221-225.
- CHABÁS, A.; B. CORMAND; S. BALCELLS; R. GONZÁLEZ-DUARTE; C. CASANOVA; J. COLOMER; L. VILAGELIU; D. GRINBERG (1996). «Neuropathic and non-neuropathic presentation of Gaucher disease in patients with the third most common mutation (D409H) in Spain». *J Inherited Metab Dis*, núm. 19, pàg. 798-800.
- CHABÁS, A.; B. CORMAND; D. GRINBERG; J. M. BURGUEIRA; S. BALCELLS; J. L. MERINO; I. MATE; J. A. SOBRINO; R. GONZÁLEZ-DUARTE; L. VILAGELIU (1995). «Unusual expression of Gaucher's disease: Cardiovascular calcifications in three sibs homozygous for the D409H mutation». *J Med Genet*, núm. 32, pàg. 740-742.
- CHABÁS, A.; L. GORT; M. MONTFORT; F. CASTELLÓ; M. C. DOMÍNGUEZ; D. GRINBERG; L. VILAGELIU (1998). «Recurrence of the D409H mutation in Spanish Gaucher's disease patients: description of a new homozygous patient and haplotype analysis». *J Med Genet*, núm. 35, pàg. 775-777.
- CHRISTOMANOU, H.; A. AIGNESBERGER; R. P. LINKE (1986). «Immunochemical characterization of two activator proteins stimulating enzymatic sphingomyelin degradation in vitro. Absence of one of them in a human Gaucher disease variant». *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, núm. 367, pàg. 879.
- CHRISTOMANOU, H.; A. CHABÁS; T. PÁMPOLS; A. GUARDIOLA (1989). «Activator protein deficient Gaucher's disease. A second patient with the new identified lipid storage disorder». *Klin Wochenschr*, núm. 67, pàg. 999-1003.
- CORMAND, B.; D. GRINBERG; L. GORT; A. CHABÁS; L. VILAGELIU (1998a). «Molecular analysis and clinical findings in the Spanish Gaucher disease population: putative haplotype of the N370S ancestral chromosome». *Hum Mutat*, núm. 11, pàg. 295-305.
- CORMAND, B.; D. GRINBERG; L. GORT; A. FIUMARA; R. BARONE; L. VILAGELIU; A. CHABÁS (1997a). «Two new mild homozygous mutations in Gaucher disease patients: clinical signs and biochemical analyses». *American Journal of Medical Genetics*. núm. 70, pàg. 437-443.
- CORMAND, B.; T. L. HARBOE; L. GORT; C. CAMPOY; M. BLANCO; N. CHAMOLE; A. CHABÁS; L. VILAGELIU;

- D. GRINBERG (1998b). «Mutation analysis of Gaucher disease patients from Argentina: high prevalence of the RecNciI mutation». *American Journal of Medical Genetics*, núm. 80, pàg. 343-351.
- CORMAND, B.; M. MONTFORT; A. CHABÁS; D. GRINBERG; L. VILAGELIU (1998c). «Reliable co-segregation analysis for prenatal diagnosis and heterozygote detection in Gaucher disease». *Prenat Diagn*, núm. 18, pàg. 207-212.
- CORMAND, B.; M. MONTFORT; A. CHABÁS; L. VILAGELIU; D. GRINBERG (1997b). «Genetic fine localization of the beta glucocerebrosidase (GBA) and prosaposin (PSAP) genes: implications for Gaucher disease». *Human Genetics*, núm. 100, pàg. 75-79.
- CORMAND, B.; L. VILAGELIU; S. BALCELLS.; R. GONZÁLEZ-DUARTE; A. CHABÁS; D. GRINBERG (1996). «Two novel (1098insA and Y313H) and one rare (R359Q) mutations detected in exon 8 of the beta-glucocerebrosidase gene in Gaucher's disease patients». *Hum Mutat*, núm. 7, pàg. 272-274.
- CORMAND, B.; L. VILAGELIU; J. M. BURGUERA.; S. BALCELLS.; R. GONZÁLEZ-DUARTE; D. GRINBERG; A. CHABÁS (1995). «Gaucher disease in Spanish patients: Analysis of eight mutations». *Hum Mutat*, núm. 5, pàg. 303-309.
- DAHL, N.; M. LAGERSTROM; A. ERIKSON; U. PETTERSSON (1990). «Gaucher disease Type III (Norrbottnian type) is caused by a single mutation in exon 10 of the glucocerebrosidase gene». *Am J Hum Genet*, núm. 47, pàg. 275-278.
- DUNBAR, C.; D. KOHN; S. KARLSSON; N. BARTON; R. BRADY [et al.] (1996). «Retroviral Mediated Transfer of the cDNA for Human Glucocerebrosidase into Hematopoietic Stem Cells of Patients with Gaucher Disease. A Phase I Study». *Hum Gene Ther*, núm. 7, pàg. 231-253.
- GINNS, E. I.; P. V. CHOUDARY.; S. TSUJI; B. MARTIN; B. STUBBLEFIELD; J. SAWYER; J. HOZIER; J. A. BARRANGER (1985). «Gene mapping and leader polypeptide sequence of human glucocerebrosidase: implications for Gaucher disease». *Proc Natl Acad Sci USA*, núm. 82, pàg. 7101-7105.
- HOROWITZ, M.; G. TZURI; N. EYAL; A. BEREBI; E. H. KOLODNY; R. O. BRADY.; N. W. BARTON.; A. ABRAHAMOV; A. ZIMRAN (1993). «Prevalence of 9 Mutations Among Jewish and Non-Jewish Gaucher Disease Patients». *Am J Hum Genet*, núm. 53, pàg. 921-930.
- HOROWITZ, M.; S. WILDER; Z. HOROWITZ; O. REINER; T. GELBART; E. BEUTLER (1989). «The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: structure and evolution». *Genomics*, núm. 4, pàg. 87-96.
- LE COUTRE, P.; A. DEMINA; E. BEUTLER; M. BECK; P. PETRIDES (1997). «Molecular analysis of Gaucher disease: distribution of eight mutations and the complete gene deletion in 27 patients from Germany». *Human Genetics*, núm. 99, pàg. 816-821.
- LEWIS, B. D.; P. V. NELSON; E. F. ROBERTSON.; C. P. MORRIS (1994). «Mutation Analysis of 28 Gaucher Disease Patients - The Australasian Experience». *Am J Med Genet*, núm. 49, pàg. 218-223.
- MICHELAKAKIS, H.; E. DIMITRIOU; S. VANWEELY; R. G. BOOT; I. MAVRIDOU; M. VERHOEK; J. AERTS (1995). «Characterization of glucocerebrosidase in Greek Gaucher disease patients: Mutation analysis and biochemical studies». *J Inherited Metab Dis*, núm. 18, pàg. 609-615.
- NELSON, P. V.; W. F. CAREY; C. P. MORRIS; B. D. LEWIS (1995). «Mutation analysis of Australasian Gaucher disease patients». *Am J Med Genet*, núm. 58, pàg. 382.
- SIBILLE, A.; C. M. ENG; S. J. KIM; G. PASTORES; G. A. GRABOWSKI (1993). «Phenotype/Genotype Correlations in Gaucher Disease Type-I - Clinical and Therapeutic Implications». *Am J Hum Genet*, núm. 52, pàg. 1094-1101.
- THEOPHILUS, B.; T. LATHAM; G. A. GRABOWSKI; F. I. SMITH (1989). «Gaucher disease: Molecular heterogeneity and phenotype-genotype correlations». *Am J Hum Genet*, núm. 45, pàg. 212-225.
- TSUJI, S.; B. M. MARTIN; J. A. BARRANGER; B. K. STUBBLEFIELD; M. E. LAMARCA; E. I. GINNS (1988). «Genetic heterogeneity in Type I Gaucher disease: Multiple genotypes in Ashkenazic and non-Ashkenazic individuals». *Proc Natl Acad Sci USA*, núm. 85, pàg. 2349-2352.
- TUTEJA, R.; B. BEMBI; E. AGOSTI; F. E. BARALLE (1993). «1448C mutation linked to the Pv1.1- genotype in Italian patients with Gaucher disease». *Hum Mol Genet*, núm. 2, pàg. 781-784.
- TYLKI-SZYMANSKA, A.; G. MILLAT; I. MAIRE; B. CZARTORYSKA (1996). «Types I and III Gaucher disease in Poland: incidence of the most common mutations and phenotypic manifestations». *Eur J Hum Genet*, núm. 4, pàg. 334-337.
- UYAMA, E.; M. UCHINO; H. IDA; Y. ETO; M. OWADA (1997). «D409H/D409H genotype in Gaucher-like disease». *Journal Of Medical Genetics*, núm. 34, pàg. 175.
- WALLEY, A. J.; M. L. BARTH; I. ELLIS; A. H. FENSOM; A. HARRIS (1993). «Gaucher's disease in the United-Kingdom - Screening non-Jewish patients for the two common mutations». *J Med Genet*, núm. 30, pàg. 280-283.