
De GRACILA barnen

VINETA FELLMAN

GRACILE-syndromet (Fellmans syndrom, MIM 603358) hör till det finländska genetiska sjukdoms-arvet. Sjukdomen är orsakad av en missens mutation (S78G) i BCS1L, ett protein som fungerar som en "chaperon" eller sammankopplande länk vid bildning av komplex III i andningskedjan. Syndromet uttrycker sig som en grav tillväxthämning redan under fostertiden, och efter födseln utvecklar barnet en uttalad metabolisk acidosis pga. av nedsatt funktion i komplex III. Övriga symtom är proximal tubulopati, nedsatt leverfunktion med cirrhos och uttalad järnupplagring, störd järnmetabolism och tidig död. Diagnosen ställs med hjälp av mutationen, alla barn av finländskt ursprung har haft samma homozygota mutation S78G. I andra länder förekommer olika mutationer i BCS1L och fenotypen varierar. Behandlingen är än så länge enbart symptomatisk.

I regionala små populationer som har varit isolerade under en längre tid uppstår ofta en ansamling specifika genetiska sjukdomar orsakade av mutationer (s.k. grundareffekt från engelskans founder effect), som anrikats då populationen blivit föremål för en reduktion med efterföljande ökning (1). Finland är ett sådant geografiskt isolat med sammanlagt 36 typiska genetiska sjukdomar, vilka i andra länder är exceptionellt sällsynta eller inte förekommer (1, 2). Detta har lett till att man talar om det "finländska genetiska arvet" (Finnish Disease Heritage). Sjukdomarna har schematiskt presenterats i form av en trappa med ett trappsteg ("Perheentupas trappsteg") för varje enskild sjukdom och årtal i den ordning som sjukdomen publicerats (1). GRACILE-syndromet (Fellmans syndrom MIM 603358), vars kliniska symtombild vi publicerade år 1998 (3), är den senaste sjukdomen på det översta trappsteget (1). De första patienterna observerades redan på 1960-talet, men en specifik sjukdomsbild var svår att definiera till en början eftersom det enda typiska fyndet var en uttalad metabolisk acidosis med dödlig utgång under neonatalperioden.

FÖRFATTAREN

Vineta Fellman är nordisk professor i neonatologi vid Lunds universitet och Helsingfors universitet samt överläkare vid neonatalavdelningen vid universitetssjukhuset i Lund

Fenotyp

Kartläggningen av 17 barn från 12 familjer resulterade i att sex karakteristiska fynd kunde identifieras hos alla barnen (Tabell I):

1) Uttalad tillväxthämning under fostertiden är det första symtomet. I vissa fall kunde man observera tillväxthämningen redan under den första trimestern, vilket ledde till senareläggning av den beräknade tiden för förlossningen (4).

2) En grav metabolisk acidosis, som utvecklas under det första dygnet. Utvecklingen av acidosen var dramatisk från ett ofta normalt pH vid födseln till ett pH-värde på 7,00 eller lägre och ett laktatvärde över 10 mmol/l vid intagning till neonatalavdelning vanligtvis redan under det första levnadsdygnet.

3) Fanconis syndrom med extrem aminoaciduri, som vanligtvis diagnostiserades i ett tidigt skede genom metabolisk skanning/screeningsundersökning av urinen. Den nedsatta reabsorptionen i proximala tubulus med bikarbonatförlust medverkar till den metabola acidosen.

4) Leverpåverkan med cholestas, cirrhos och fibros speciellt hos de barn som hade en längre överlevnad (5).

5) Avvikelse i järnmetabolismen med uttalad hemosideros i levern, högt ferritinvärde, lågt transferrinvärde och hög transferrinsaturation i blodet. Senare kunde vi även påvisa fritt järn i blodet (6, 7).

6) Tidig död, som i hälften av fallen inträffade under de två första veckorna efter födseln.

	Medelvärde	SD	
Födelsedata			
Graviditetslängd, veckor	37,6	3,03	
Födelsevikt, g	1655	495	
SD-värde	-3,9	0,7	
Födelselängd, cm	42,4	4	
Huvudomkrets	30,8	1,9	
	Median	Interkvartil-intervall	Referensvärde
Acidos			
Apgar vid 1 minut	9	7-9	8-10
pH, navelartär (n=8)	7,27	7,19-7,30	>7,20
pH, vid intagning	7,00	6,95 - 7,02	7,35-7,43
BE, vid intagning	-22	-4,5	-5,5
Laktat mmol/l (n=22)	13,7	8,2 - 20	0,7-1,8
Pyruvat mikromol/l (n=17)	141	80-156	40-70
Laktat/Pyruvat (n=17)	91	53 - 140	< 25
Järnmetabolism			
S-järn, mikromol/l (n=8)	16,3	9,6-19,4	19-48
Transferrin, g/l (n=7)	0,72	0,68-0,96	1,1-1,8
Transferrinsaturation, % (n=7)	81	61-100	30-60
Ferritin, mikrog/l (n=9)	1260	1120 - 2275	< 150
Järnhalt i leverbiopsi, mikrog/g (n=4)	5590	5290-5700	990-2800 (n=4)
Leverfunktion			
Bilirubin mikromol/l (n=12)	145	90-183	åldersrelaterat
Bilirubin, konjugerat mikromol/l (n=12)	58	35-112	< 6
ASAT, U/l (n=11)	134	83-220	< 80
ALAT, U/l (n=12)	58	52-93	< 40
Utfall			
Maximal alkalidos, mmol/kg/d (n=12)	15	12-18,5	
Tillväxt efter 1 vecka, g/vecka (n=9)	33	-12 - 63	
Överlevnadstid, dagar	23	2,5 - 65	

Tabell I.

Kliniska karakteristika hos 26 patienter med GRACILE syndrom (18 flickor och 8 pojkar).

Barnen hade inga tecken på neurologisk eller kardiovaskulär sjukdom eller avvikelse.

Akronymen GRACILE har jag härlett från de engelska orden på symtomen: Growth Retardation, Aminoaciduria, Cholestasis, Iron overload, Lactacidosis, och Early death. Begreppet GRACILE alluderar också på barnens utseende, de är små, slanka och sköra (Figur 1). Deras vakenhet och kommunikativa förmåga gör att föräldrarna får god kontakt om överlevnaden överstiger några dagar. Ansträngningar att få barnen att överleva under så bra förhållanden som möjligt åt-

minstone någon vecka är motiverade för att familjen skall få en gemensam värdefull tid med barnet.

Ytterligare 9 patienter har jag kunnat diagnostisera prospektivt sedan publikationen 1998, vilket ger en incidens på ca 1 fall per år i Finland. Trots att man varit medveten om sjukdomens förekomst, har barnens acidosis vid intagningen till neonatalavdelning varit av samma svårighetsgrad som tidigare (Tabell I). Majoriteten av barnen är flickor, vilket tyder på att sjukdomen hos pojkar kan vara letal under ett tidigt embryonalt stadium, då familjerna

inte rapporterat tidigare missfall. Två aborter har utförts efter antenatal genetisk diagnostik.

Genotyp

Med kopplingsanalys kunde vi lokalisera mutationen till en väl bevarad haplotyp i andra kromosomen i regionen 2q33-37 (8). En homozygot 232A→G-mutation i andra exonet av BCS1L-genen med en Serin78Glycin (S78G)aminosyreförändring som följd (9) visade sig vara sjukdomens genetiska orsak (Figur 2). Alla finländska patienter med det typiska GRACILE-syndromet har varit S78G-homozygoter. Att denna s.k. polymorfism verkligen var den sjukdomsalstrande mutationen kunde påvisas genom undersökning av tre brittiska patienter med liknande symtom (9). De var alla heterozygota för olika BCS1L-mutationer (Figur 2). Hos en av dem påvisades två missens mutationer, S78G och R144Q (9). En hade R56STOP och V327A och den tredje en s.k. "splice site mutation" samt en nukleotidförändring i första intronet (Figur 2).

BCS1L-proteinet är "chaperon" för komplex III

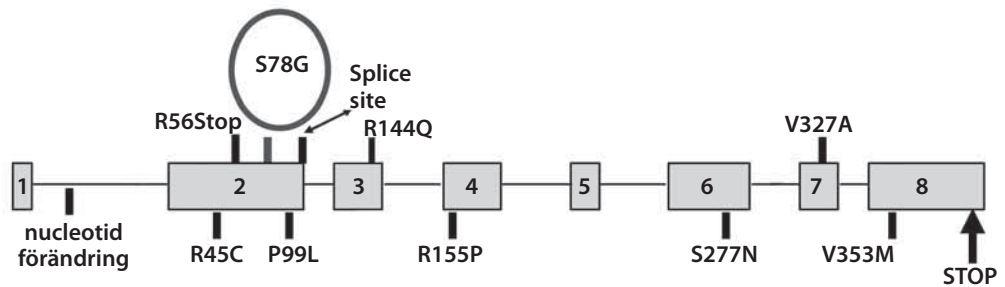
Proteinet BCS1 har först påvisats i jäst (10). Det hör till de s.k. AAA-proteinerna (ATPaser associerade med olika cellulära aktiviteter), vilkas viktigaste funktioner är degradering av proteiner, uppbyggnad av membrankomplex, fusion av membran och genuttryck. Deras aktivitet sker genom energiberöende nedbrytning eller omkonfigurering av proteiner (11, 12). BCS1 är förankrat i mitokondriets inre membran så att N-terminalen är placerad mellan membranen, en enkel domän går genom inre membranet och fortsätter i matrix först som en hårnålsstruktur och därefter som en klumpformad konfiguration med C-terminalen (13). I jästexperiment har man med hjälp av BCS1-mutationer visat att varken Rieske-FeS-proteinet eller Qcr10p inkorporeras i andningskedjans komplex III (11, 13, 14). BCS1-proteinet fungerar alltså som en "chaperon", dvs. kopplar samman Rieske-proteinet med prekomplexet så att komplex III blir en fungerande helhet (11). När den humana S78G-mutationen infördes i jäst uppstod en defekt i den aeroba energiproduktionen, vilket tyder på CIII-brist (9) i enlighet med fynden i jästexperimenten med de traditionella BCS1-mutationerna (10, 11).



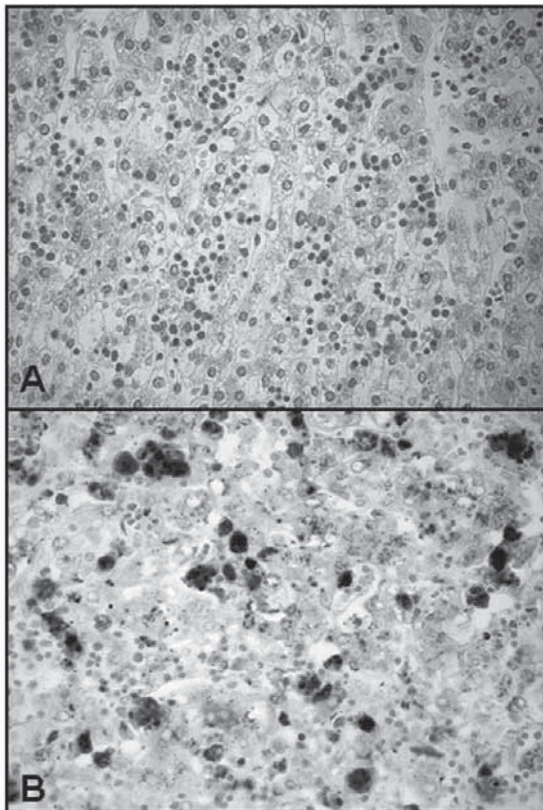
Figur 1.
En nyfödd fullgången flicka med GRACILE syndrom. Notera den uttalade tillväxthämningen (publiceras med föräldrarnas tillstånd)

Komplex III

Det humana komplex III är ett proteinkomplex bestående av 11 subenheter av vilka en, cytokrom b, är kodad i mitokondriellt DNA, medan de övriga tio är kodade i nukleärt DNA (15). Komplex III är lokaliserat till mitokondriemembranet där det har flera funktioner. Det katalyserar elektrontransporten från ubiquinol till cytokrom c men är också involverat bl.a. i protonpumpningen över inre mitokondriemembranet och i superoxidproduktion (16). Elektrontransporten sker via FeS-kärnan i Rieske-proteinet och därför är den oxidativa fosforyleringen hämmad då Rieske-proteinet saknas i komplexet (17). Sjukdomar pga. komplex III-defekter är sällsynta och heterogena, vanligtvis debuterar de i skolåldern som muskelsvaghet, speciellt i samband med muskelträning eller tidigare i barndomen som kardiomyopati och Leighs sjukdom (18, 19).



Figur 2. Schematisk bild av BCS1L-genen med kända mutationer angivna (9, 26, 27) och motsvarande aminosyre-förändring i proteinet. GRACILE- mutationen (9) 232Adenin-Guanin i exon 2 resulterar i ett utbyte av en konserverad aminosyra, serin till glycin (S78G).



Figur 3. Perls färgning för påvisande av järn i vävnader. A: lever från kontrollbarn saknar infärgning. B: stora järnkonglomerat ses i lever från GRACILE-patient.

Sjukdomar pga. funktionsbrist i komplex IV är fyra gånger vanligare, vilket kan vara ett tecken på att en funktionsbrist i komplex III kan kompenseras av de andra komplexen (19) samt möjligen genom att andningskedjans komplex kan bilda s.k. superkomplex (20).

Av alla mitokondriella sjukdomar beror endast sju procent på funktionsbrist i komplex III (18). Mutationer i den mitokondriellt kodade subenheten cytokrom b är den vanligaste orsaken till komplex III-brist (18). Den första mutationen i en nukleärt kodad subenhet (ubiquinonbindande proteinet, subenhet VII) konstaterades hos ett barn med metabol acidosis och hypoglycemi i samband med gastroenterit vid 8 månaders ålder (21). Barnet har därefter haft ett par perioder med hypoglykemi och metabol acidosis men ingen annan organpåverkan.

BCS1L och komplex III-funktionsbrist

GRACILE-syndromet manifesteras under det första dygnet med en uttalad acidosis, hög laktat/pyruvat-kvot tydande på en funktionsbrist i andningskedjan (Tabell I). Innan möjligheter till genetisk utredning fanns, gjordes ett flertal mitokondrieisoleringar från muskelbiopsier, fibroblaster och vävnader tagna vid metabola obduktioner någon timme efter döden, men vi kunde inte påvisa någon signifikant aktivitetsbrist i komplex III eller andra komplex (3, 9), vilket kan bero på svårigheter att bestämma komplex III-aktiviteten in vitro (22). Metoden som användes mäter inte komplex III separat från de andra (23), vilket av Rustins fors-

kargrupp har kritiserat vara en felkälla med falskt positivt aktivitetsresultat (22). Aktivitetsbestämningar från leverhomogenat med deras metod visade sänkt aktivitet hos två GRACILE-patienter men osäkert fynd i andra (24). Svårigheter att bestämma aktiviteten i andningskedjans komplex har också påtalats av andra, och en jämförande studie har utförts mellan resultat på samma vävnadsprov analyserade i 14 olika laboratorier i åtta länder (25). Ett av laboratorierna, där också GRACILE-patienters vävnader har blivit analyserade, presterade i jämförelsen medianvärden. Komplex III-aktiviteten i hjärtvävnad från sex patienter varierade mellan 9 och 70 procent av normalmedelvärdet och samma variation konstaterades för de andra komplexen. Hos en patient var komplex III-aktiviteten i levern endast en tredjedel av normalmedelvärdet, medan resultaten inte var diagnostiska för andra (24). Aktivitetsmätningarna och syrekonsumtionen i mitokondrier har alltså inte kunnat påvisa en klar funktionssänkning av komplex III, men med s.k. Blue Native Page elektrofores med immunoblotting kunde vi konstatera en klar sänkning av mängden komplex III och Rieske-protein i jämförelse med andra komplex (24). Laktacidosen i GRACILE kan alltså anses bero på funktionsbrist i komplex III.

Hos patienter i andra länder med påvisade BCS1L-mutationer har nedsatt komplex III-funktion varit den primära förändring som lett till diagnostisk utredning och sekvenser av BCS1L (26–28). Komplex III-defekt pga. BCS1L-mutationer har hittills påvisats hos 3 brittiska patienter (9), hos 6 patienter från tre familjer med turkiskt ursprung i Frankrike (26), hos 2 spanska barn från samma familj (27) och hos ett danskt barn med afrikanskt ursprung (28). I hälften av fallen var det frågan om en homozygot mutation, i andra hälften en kombinerad heterozygot mutation. Fenotypen hos dessa nyfödda har inte varit identisk med GRACILE-syndromet, men alla har haft laktacidosis och majoriteten proximal tubulopati samt leverdysfunktion. Tillväxthämningen har varit lindrig eller måttlig (födelsevikt 2,3–3,3 kg vid fullgången tid) och överlevnaden har i åtminstone tre fall varit längre än ett halvt år; den längsta uppföljningen varade till 9 års ålder. Inga uppgifter finns om störning i järnmetabolismen. Flera barn hade neurologiska avvikelser, som neonatala kramper, Leighs syndrom eller psykomotorisk retardation (26,

29). Vi har påvisat den typiska GRACILE-fenotypen och - mutationen i en svensk familj med finländskt ursprung (4).

Diagnostik

Det karakteristiska haplotypfyndet gjorde det möjligt att till en början utföra antenatala diagnoser med hjälp av haplotypbestämning (4, 8). Numera, efter påvisande av den specifika mutationen (9), ställs diagnosen med en SNP-metod ("single nucleotide polymorphism") vid HNS molekylärgenetiska laboratorium. Grav tillväxtrubbning hos foster som varken har en kromosomförändring eller tecken på placentala orsak till störningen, bör i Finland vara indikation för antenatal utredning av S78G-mutation.

Behandling

Järnansamlingen i levern (Figur 3) förefaller att spontant minska postnatalet (5, 6). Hittills har ingen behandling varit effektiv vid syndromet (3, 7). Behandlingsförsök med apotransferrin och blodbyte har utförts på två patienter, som båda levde längre än mediantiden. Behandlingens effekt var marginell och därför har ytterligare barn inte behandlats (7). Levertransplantation har visat sig effektiv vid neonatal hemokromatos (30). Transplantation har hittills inte varit aktuellt eftersom GRACILE-barnen har haft en lägre vikt än önskvärd för utförande av transplantation och eftersom det är oklart om deras neurologiska utveckling skulle vara normal i ett senare skede med tanke på de ofta förekommande neurologiska avvikelserna i samband med andra BCS1L-mutationer.

Varför är GRACILE-syndromet letalt?

Sammanfattningsvis kan man konstatera att GRACILE-syndromet är en typisk sjukdom för det finländska genetiska arvet, alla barn har samma homozygota mutation och fenotypen är distinkt. Med ökat medvetande om BCS1L-mutationernas existens torde de upptäckas i högre grad. Sjukdomsbilden vid komplex III-brist pga. mutationer i cytokrom b eller annan komplex III-subenhet (18) är betydligt lindrigare än vid GRACILE-syndromet. Därför är vår hypotes att BCS1L har en annan funktion förutom att bygga upp komplex III

relaterad till intracellulär järntransport. "Chaperon" för andningskedjans andra komplex, t.ex. GRIM-19 för komplex I (31) har andra funktioner än bara en chaperonuppgift. Vi har i en studie på möss konstaterat att uttrycket av BCS1L är uttalat i neuronal vävnad under embryonal utveckling och att proteinets lokalisering inte helt överlappar med komplex III och Rieske-proteinets placering i celler (32). Detta stöder hypotesen om en annan funktion än enbart chaperonens. Med hjälp av experimentella studier hoppas vi kunna klarlägga BCS1L-funktionen i en snar framtid.

Prof. Vineta Fellman

Barn- och ungdomssjukhuset

PB 281

00029 HNS

vineta.fellman@helsinki.fi

Forskningsprojektet har fått understöd av Finska Läkaresällskapet.

Referenser

- Norio R. Finnish Disease Heritage I: characteristics, causes, background. *Hum Genet.* 2003; 112:441–456.
- Norio R. The Finnish Disease Heritage III: the individual diseases. *Hum Genet.* 2003; 112:470–526.
- Fellman V, Rapola J, Pihko H, Varilo T, Raivio KO. Iron overload disease in infants involving fetal growth retardation, lactic acidosis, liver haemosiderosis, and aminoaciduria. *Lancet* 1998; 351:490–493.
- Fellman V, Visapää I, Vujic M, Wennerholm U-B, Peltonen L. Antenatal diagnosis of hereditary fetal growth retardation with aminoaciduria, cholestasis, iron overload, and lactic acidosis in the newborn infant. *Acta Obstetr Gynecol Scand* 2002; 81:398–402.
- Rapola J, Heikkilä P, Fellman V. Pathology of lethal fetal growth retardation syndrome with, aminoaciduria, iron overload, and lactic acidosis (GRACILE). *Pediatr Pathol Mol Med* 2002;21:183–193.
- Fellman V. The GRACILE syndrome, a neonatal lethal metabolic disorders with iron overload. *Blood Cell Mol Dis* 2002;29:444–450.
- Fellman V, von Bonsdorff L, Parkkinen J. Exogenous apotransferrin and exchange transfusions in hereditary iron overload disease. *Pediatrics* 2000;105:398–401.
- Visapää I, Fellman V, Varilo T, Palotie A, Raivio KO, Peltonen L. Assignment of the locus for a new lethal neonatal metabolic syndrome to 2q33-37. *Am J Hum Genet* 1998;63:1396–1403.
- Visapää I, Fellman V, Vesa J, Dasvarma A, Hutton JL, Kumar V et al. GRACILE syndrome, a lethal metabolic disorder with iron overload, is caused by a point mutation in BCS1L. *Am J Hum Genet* 2002;4:863–876.
- Nobrega FG, Nobrega MP, Tzagoloff A. BCS1, a novel gene required for the expression of functional Rieske iron-sulfur protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 1992;11:3821–29.
- Cruciat, C.-M., Hell, K., Fölsch, H., Neupert, W., Stuart, R.A. Bcs1p, an AAAfamily member, is a chaperone for the assembly of the cytochrome *bc1* complex (1999) *Embo J* 18,226–33.
- Frickey T, Lupas AN. Phylogenetic analysis of AAA proteins. *J Struct Biol.* 2004;146:2–10.
- Fölsch H, Guiard B, Neupert W, Stuart RA. Internal targeting signal of the BCS1 protein: a novel mechanism of import into mitochondria. *EMBO J* 1996;15:479–87.
- Petruzzella V, Tiranti V, Fernandez P, Ianna P, Carozzo R, Zeviani M. Identification and characterization of human cDNAs specific to BCS1, PET112, SCO1, COX15, and COX11, five genes involved in the formation and function of the mitochondrial respiratory chain. *Genomics* 1998;54:494–504.
- DiMauro S. Mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1658:80–88.
- Guzy RD, Hoyos B, Robin E, Chen H, Liu L, Mansfield KD et al Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metabolism* 2005;1:401–408.
- Birch-Manin, M.A., Shepherd, I.M., Watmough, J. et al. Fatal lactic acidosis in infancy with a defect of complex III of the respiratory chain. *Pediatr Res* 1989;25:553–9.
- Rotig A, Lebon S, Zinovieva E, Mollet J, Sarzi E, Bonnefont JP, Munnich A. Molecular diagnostics of mitochondrial disorders. *Biochim Biophys Acta* 2004;1659: 129–135.
- Borisov VB. Defects in mitochondrial respiratory complexes III and IV, and human pathologies. *Mol Aspects Med* 2002; 23:382–412.
- D'Aurelio M, Gajewski CD, Lenaz G, Manfredi G. Respiratory chain supercomplexes set the threshold for respiration defects in human mtDNA mutant cybrids. *Hum Mol Genet.* 2006;15:2157–69.
- Haut S, Brivet M, Touati G, Rustin P, Lebon S, Garcia-Cazorla A et al A deletion in the human QP-C gene causes a complex III deficiency resulting in hypoglycaemia and lactic acidosis. *Hum Genet.* 2003;113:118–122.
- Chretien D, Slama A, Briere JJ, Munnich A, et al. Revisiting pitfalls, problems and tentative solutions for assaying mitochondrial respiratory chain complex III in human samples. *Curr Med Chem* 2004;11:233–239.
- Majander A, Rapola J, Sariola H, Suomalainen A, et al. Diagnosis of fatal infantile defects of the mitochondrial respiratory chain: age dependence and postmortem analysis of enzyme activities. *J Neurol Sci* 1995;134:95–102.
- Kotarsky H, Karikoski R, van Coster R, Fellman V. GRACILE syndrome – complex III deficiency with iron overload. Society for Pediatric Research, Annual Meeting 2006, abstract.
- Gellerich FN, Mayr JA, Reuter S, Sperl W, Zierz S. The problem of interlab variation in methods for mitochondrial disease diagnosis: enzymatic measurement of respiratory chain complexes. *Mitochondrion.* 2004;4:427–439.
- de Lonlay P, Valnot I, Barrientos A, Gorbatyuk M, et al. A mutant mitochondrial respiratory chain assembly protein causes complex III deficiency in patients with tubulopathy, encephalopathy and liver failure. *Nat Genet* 2001;29:57–60.
- De Meirleir L, Seneca S, Damis E, Sepulchre B, Hoorens A, Gerlo E, Garcia Silva MT, Hernandez EM, Lissens W, van Coster R. Clinical and diagnostic characteristics of complex III deficiency due to mutations in the BCS1L gene. *Am J Med Genet* 2003;121A:126–31.
- Ostergaard E. personlig kommunikation
- Morris, A.A.M., Taylor, R.W., Birch-Manin, M.A. et al. Neonatal Fanconi syndrome due to deficiency of complex III of the respiratory chain. *Pediatr Nephrol* 1995;9: 407–411.
- Sigurdsson L, Reyes J, Kocoshis SA, Hansen TW, Rosh J, Knisely AS. Neonatal hemochromatosis: outcomes of pharmacologic and surgical therapies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1998;26:85–89.
- Huang G, Lu H, Ng DC, Ponniah S, Guo K Lufe C et al. GRIM-19, a cell death regulatory protein, is essential for assembly and function of mitochondrial complex I. *Mol Cell Biol* 2004;24:8447–56.
- Kotarsky H, Imran T, Mannisto S, Heikinheimo M, Hansson S, Fellman V. BCS1L is expressed in critical regions for neural development during ontogenesis in mice. *Gen Expr Patterns*, in press 2006.