

### 3-Methylcrotonyl-CoA-carboxylasedeficiëntie; wat is de betekenis van deze biochemische afwijking?

D.J. REIJNGOUD

In deze publicatie wordt een gezin beschreven waarvan drie leden een geïsoleerde, biotine-resistente, deficiëntie bezitten van het enzym 3-methylcrotonyl-CoA-carboxylase. De presentatie van het ziektebeeld in deze drie personen is zeer verschillend. Bij de indexpatiënt is er sprake van een gedilateerde cardiomyopathie, bij de tweede persoon is er sprake van een psychomotore achterstand, terwijl de derde persoon asymptomatisch is. De chemische diagnostiek van deze erfelijke metabole ziekte wordt beschreven.

*Trefwoorden: casuïstiek, erfelijke metabole ziekte, stofwisselingsziekte, methylcrotonyl-CoA-carboxylase deficiëntie, betekenis*

Er zijn een aantal erfelijke metabole ziekten waarbij het onduidelijk is wat de relatie is tussen de biochemische afwijking en het ziektebeeld waarmee de patiënt zich in de kliniek presenteert. Zo'n ziektebeeld is de biotine-resistente vorm van 3-methylcrotonyl-CoA-carboxylase (MCC)-deficiëntie. MCC-deficiëntie was een tot voor kort zeldzame erfelijke metabole afwijking in de afbraak van het vertakte-keten-aminozuur leucine (1). Recente publicaties werpen nieuw licht op dit metabole defect. De klinische presentatie van MCC-deficiëntie is zeer variabel. Daarnaast worden bij bevolkingsonderzoek bij pasgeborenen een groeiend aantal asymptomatische personen geïdentificeerd met MCC-deficiëntie. Dit doet de vraag rijzen naar de betekenis van deze biochemische afwijking. In de nu volgende presentatie wordt ter illustratie hiervan een gezin besproken met MCC-deficiëntie (2).

#### Casusbeschrijving

##### *Presentatie en kliniek casus 1*

De indexpatiënt, een meisje, is het derde kind van gezonde, niet-consanguïne Nederlandse ouders. Zij werd à terme geboren na een normale zwangerschap en bevalling. Na 7 weken ontwikkelde zij voedingsproblemen, ging zweten en vertoonde tekenen van

vertraagde hartactie. Op verdenking van decompensatio cordis werd zij opgenomen in een perifeer ziekenhuis om de volgende dag overgebracht te worden naar de Beatrix Kinderkliniek. Bij opname waren de harttonen zacht zonder hartgeruis en galopritmen. Zij had geen dysmorfe kenmerken, noch werden bij haar neurologische afwijkingen geconstateerd. De thoraxfoto liet een sterk vergroot hart zien. Het ECG liet afwijkingen zien indicatief voor ventrikel hypertrofie. Bij echografisch onderzoek werd een gecombineerde gedilateerde hypertrofische cardiomyopathie geconstateerd. Laboratoriumonderzoek was normaal voor de glucoseconcentratie, pH, transaminases, creatinekinase, aminozuren, lactaat, pyruvaat en lactaat/pyruvaatratio in plasma. Hierop werd onderzoek ingezet naar een mogelijke erfelijke metabole ziekte als oorzaak van de hartafwijking. Onderzoek naar mogelijke lysosomale enzymdeficiënties (de ziekten van Pompe, Fabry, Gaucher en GM2-gangliosidose) liet geen afwijkingen zien. De serum-carnitineconcentraties waren zeer laag (vrij 10  $\mu\text{mol/l}$  en totaal 29  $\mu\text{mol/l}$ ; normaal: 25-55  $\mu\text{mol/l}$  en 35-70  $\mu\text{mol/l}$ , resp.) en de excretie van carnitine in urine was hoog (vrij carnitine 20 mmol/mol creatinine, totaal carnitine 155 mmol/mol creatinine). Analyse van organische zuren in urine liet een 3-methylcrotonylglycinurie zien. Op basis hiervan werd de activiteit gemeten van MCC in een homogenaat van geïsoleerde lymfocyten. Deze bleek duidelijk verlaagd te zijn (tabel 1). Deze resultaten leidden tot de diagnose MCC-deficiëntie. Daarop werd behandeling gestart met biotine (10 mg/dag), carnitine (100 mg/kg/dag) en eiwitrestrictie van 2.0 g/kg/dag naar 0.8 g/kg/dag. Er werden klinisch geen verbeteringen gezien. Tevens veranderde de excretie van de afwijkende metabolieten niet of nauwelijks. Hierop werd besloten te beginnen met captopril, een ACE-remmer, waarop haar klinische conditie verbeterde. Gedurende een aantal jaren is het relatief goed gegaan met haar, echter recent is zij overleden aan de gevolgen van de ernstig cardiomyopathie. Naar aanleiding van de bevindingen bij de indexpatiënt werden de overige gezinsleden, vader, moeder en twee broers van 6 en 10 jaar, eveneens onderzocht op het voorkomen van MCC-deficiëntie.

##### *Kliniek casus 2*

De tweede persoon waarbij de deficiëntie werd aangetoond was de vader van de indexpatiënt. Klinisch

---

Laboratorium voor Metabole Ziekten, Academisch Ziekenhuis, Groningen

Correspondentie: Dr. D.J. Reijngoud Laboratorium voor Metabole Ziekten, CMC IV/2, Beatrix Kinderkliniek, Academisch Ziekenhuis Groningen, Postbus 30.001, 9700 RB Groningen  
E-mail: d.j.reijngoud@med.rug.nl

onderzoek van vader, vooral naar eventueel voorkomen van hartafwijkingen, liet geen abnormaliteiten zien. Urineanalyse van de excretie van organische zuren liet een profiel zien niet essentieel verschillend van dat waargenomen bij de indexpatiënt. De concentratie vrij carnitine in serum was zeer laag (vrij 7  $\mu\text{mol/l}$ ). Bij meting van de enzymactiviteit in een homogenaat van geïsoleerde lymfocyten werd een deficiëntie van MCC vastgesteld (tabel 1). Vader werd behandeld met carnitine (990 mg/kg/dag) vanwege de zeer lage concentratie vrij carnitine in serum. Hij is recent overleden aan de gevolgen van Legionella-infectie, opgelopen tijdens vakantie.

### Kliniek casus 3

In het gezin werd de 10-jaar oude broer eveneens geïdentificeerd met een MCC-deficiëntie. Klinisch onderzoek van de broer van de index-patiënt liet geen hartafwijkingen zien. Analyse van de excretie van organische zuren in urine liet een profiel zien niet essentieel verschillend van dat waargenomen bij de indexpatiënt. De concentratie vrij carnitine in serum was zeer laag (vrij 8  $\mu\text{mol/l}$ ). Deficiëntie van MCC werd bevestigd na meting van de enzymactiviteit in homogenaat van geïsoleerde lymfocyten (tabel 1). In het verleden, 6 weken post-partum, was hij opgenomen geweest in een perifeer ziekenhuis met voedingsproblemen en apathie, mogelijk als gevolg van een infectie. Echter, er werden toen geen aanwijzingen gevonden voor een infectie. Nadien vertoonde hij tekenen van een psychomotorische achterstand (IQ van ~80) zonder dat hiervoor een oorzaak kon worden gevonden. Verder neurologisch onderzoek liet geen afwijkingen zien, behalve dat hij wat houterig bewoog. Hij vertoonde geen dysmorphe kenmerken. Hij volgt speciaal onderwijs. Intercurrente infecties verdroeg hij op normale wijze. De zeer lage concentratie vrij carnitine in serum werd behandeld met carnitine 50 mg/kg/dag.

Naast deze aangedane gezinsleden van de indexpatiënt, waren de analyses van de organische zuren in urine normaal bij moeder en de 6-jaar oude broer. Op basis van het recessief overervingpatroon van deze

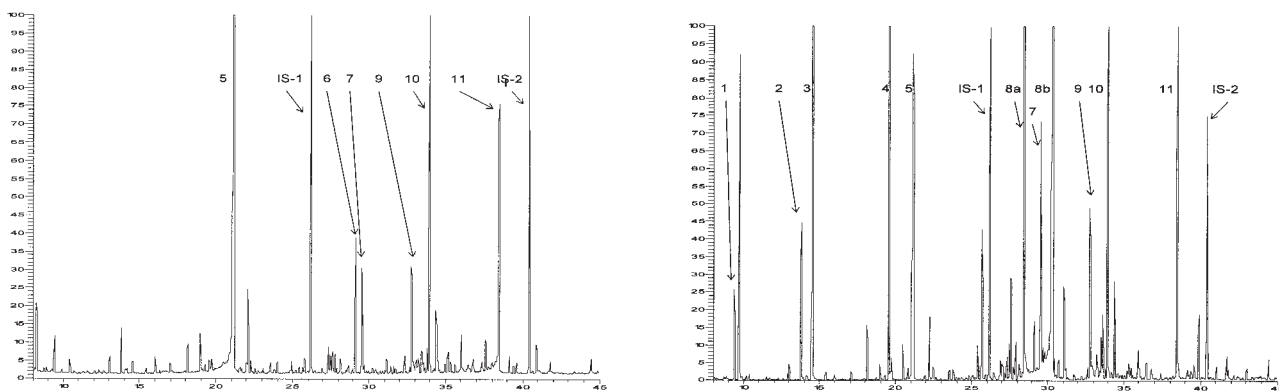
**Tabel 1.** Enzymactiviteit van het mitochondriële biotine-afhankelijke 3-methylcrotonyl-CoA-carboxylase (MCC), propionyl-CoA-carboxylase (PCC) en pyruvaatcarboxylase (PC) in homogenaten van geïsoleerde lymfocyten en gekweekte huidcellen.

Onderzoeksmateriaal	Enzymactiviteit (pmol/min/mg eiwit)		
	MCC	PCC	PC
<b>Lymfocyten</b>			
casus 1	8,6	566	112
casus 2	8,9	647	51,7
casus 3	12,2	658	63,1
Referentiewaarden (n=24)	123-738	227-784	28,2-133
<b>Huidcellen</b>			
casus 1	5,4	351	745
Referentiewaarden (n=24)	130-831	221-1742	279-3461

afwijking moet moeder heterozygoot voor de deficiëntie zijn. De genetische status van de 6-jaar oude broer van de indexpatiënt m.b.t. MCC-deficiëntie is niet nader onderzocht.

### Laboratoriumonderzoek en diagnose

Figuur 1 geeft de gaschromatografie-massaspectrometriechromatogrammen weer van de analyse van de ethoxim, trimethylsilylderivaten van de organische zuren in urine van een willekeurige patiënt, waarin geen erfelijke metabole ziekte gevonden werd, en van de indexpatiënt. In deze figuur is duidelijk te zien dat in vergelijking met de niet aangedane persoon de excretie van 3-hydroxyisovaleriaat en *N*-3-methylcrotonylglycine zeer sterk verhoogd zijn bij de indexpatiënt, 4,0 mmol/mol creatinine en 1,7 mmol/mol creatinine, respectievelijk. Tevens is duidelijk dat er slechts een geringe hoeveelheid lactaat, en geen 3-hydroxypropionaat, 3-methylglutaconaat en methylcitraat werden waargenomen. De overige verschillen tussen de beide chromatogrammen zijn dit kader niet informatief. De conclusie uit deze analyse was dat bij



**Figuur 1.** Gaschromatografische-massaspectrometrische analyse van de ethoxim, trimethylsilylderivaten van de organische zuren in urine. Organische zurenprofiel van een willekeurig persoon, waarbij geen erfelijke metabole ziekte kon worden gediagnosticeerd (A), en van de indexpatiënt (B). De volgende organische zuren zijn aangegeven: 1. Lactaat, 2. Oxalaat, 3. 3-Hydroxyisovaleriaat, 4. Succinaat, 5. Ureum, 6. 2-Ketoglutaraat, 7. *p*-Hydroxyfenylacetaat, 8a. *N*-3-methylcrotonylglycine-di-TMS, 8b. *N*-3-methylcrotonylglycine-mono-TMS, 9. Aconitaat, 10. Citraat, 11. Hippuraat. IS-1 is de eerste interne standaard (fenylbutyraat) en IS-2 is de tweede interne standaard (heptanoaat).

deze patiënt sprake was van een 3-methylcrotonylglycinurie.

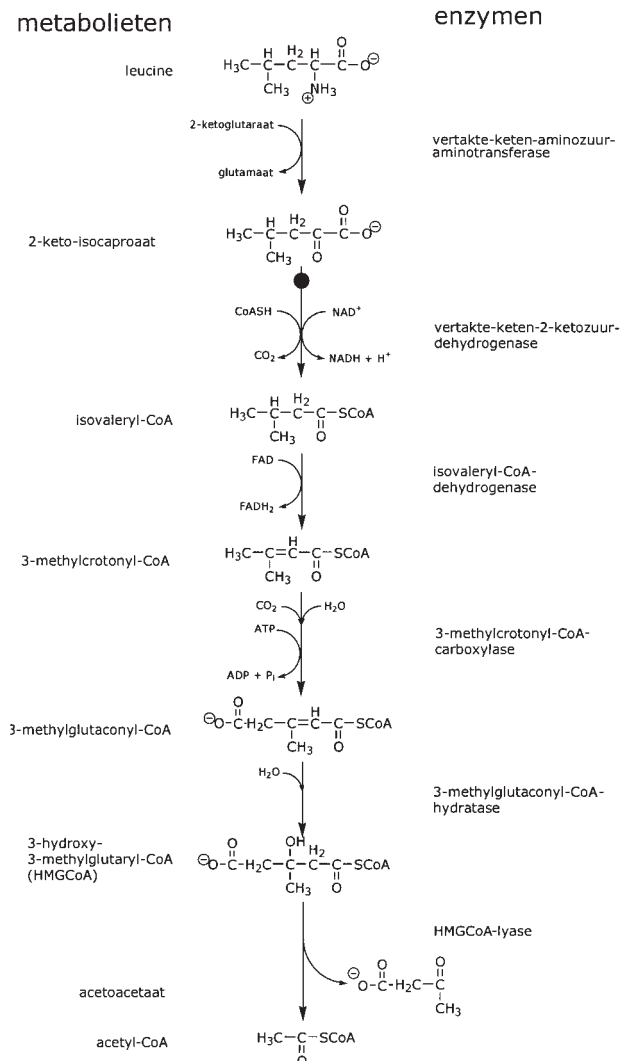
Op grond van deze resultaten werd de activiteit gemeten van MCC, te samen met de andere carboxylases, pyruvaatcarboxylase (PC) en propionyl-CoA-carboxylase (PCC). In tabel 1 zijn de activiteiten weergegeven van de drie carboxylases gemeten in homogenaten van geïsoleerde lymfocyten van de indexpatiënt, de vader en 10 jaar oude broer van de indexpatiënt. Het is duidelijk dat er zeer lage enzymactiviteiten werden gemeten voor alleen MCC. De activiteiten van PC en PCC waren normaal. Verder zijn de activiteiten weergegeven van de drie carboxylases in een homogenaat van gekweekte huidcellen van de indexpatiënt. Daarnaast werd in huidcellen van de indexpatiënt het effect bestudeerd van de aanwezigheid van biotine in het kweekmedium op de restactiviteit van MCC en de activiteit van PC en PCC. Het bleek dat de restactiviteit van MCC niet toeneemt bij aanwezigheid van biotine in het kweekmedium. De activiteit van de andere carboxylases was wederom binnen het referentiewaardengebied (resultaten niet getoond). Er was dus sprake van een geïsoleerde, biotine-resistente, deficiëntie van MCC.

### Beschouwing

In het gezin zijn 3 personen met een MCC-deficiëntie geïdentificeerd op grond van de afwijkende analyse van organische zuren in urine. Er werd een sterk verhoogde excretie waargenomen van 3-hydroxyisovaleriaat en *N*-3-methylcrotonylglycine. Deze metabolieten zijn het gevolg van het alternatieve metabolisme van het substraat van MCC, 3-methylcrotonyl-CoA. In figuur 2 is een samenvatting gegeven van de afbraak van leucine. De afbraak begint met een transaminering van leucine tot 2-keto-isocaproaat, gevolgd door een oxidatieve decarboxylering onder de vorming van isovaleryl-CoA. Hierna volgt een serie reacties tot 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA, waaruit acetoacetaat en acetylCoA worden gevormd door HMG-CoA-lyase. In het reactiepad naar 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA katalyseert MCC de carboxylering van 3-methylcrotonyl-CoA tot 3-methylglutaconyl-CoA. De acylering van 3-methylcrotonyl-CoA blijkt niet plaats te vinden. Er werd geen 3-methylcrotonaat in urine gevonden. Het lijkt erop dat eerst water geaddeerd wordt over de dubbele binding in 3-methylcrotonyl-CoA onder vorming van 3-hydroxyisovaleryl-CoA. Waarschijnlijk wordt deze reactie gekatalyseerd door "crotonase" (enoyl-CoA-hydratase). Daarna volgt de de-acylering van 3-hydroxyisovaleryl-CoA tot 3-hydroxyisovaleriaat, dat vervolgens wordt uitgescheiden in de urine. 3-Methylcrotonyl-CoA kan wel als substraat dienen voor glycine: *N*-acylase onder de vorming van *N*-3-methylcrotonylglycine, dat eveneens in grote hoeveelheden in urine wordt uitgescheiden.

In de diagnostiek van carboxylasedeficiënties is het van belang om onderscheid te maken tussen de deficiëntie van de individuele carboxylases en de deficiënties van enzymen in het biotinemetabolisme, de cofactor in de carboxylasereactie. Biotine wordt door holocarboxylasesynthetase gebonden aan een lysine-

residu in de carboxylases, waarna de enzymen actief worden. Biotinidase verbreekt de binding tussen biotine en lysine in biocytine, dat vrijkomt tijdens afbraak van het enzym. Wanneer het biotinemetabolisme verstoord is dan verschijnen in urine de substraten van alle carboxylases en hun alternatieve metabole producten. Voor PC is dit lactaat, voor PCC zijn dit o.a. 3-hydroxypropionaat en methylcitraat. Vandaar dat het voor de diagnose van MCC-deficiëntie van belang was dat lactaat, 3-hydroxypropionaat en methylcitraat niet tot nauwelijks detecteerbaar waren. De afwezigheid van deze producten maakte een holocarboxylasesynthetase- of een biotinidasedeficiëntie in de indexpatiënt onwaarschijnlijk. De klinische presentatie deed dit ook niet vermoeden. De observatie dat alleen MCC een lage restactiviteit had en dat deze restactiviteit in een homogenaat van gekweekte huidcellen niet beïnvloed werd door biotinesuppletie van het kweekmedium ondersteunde de resultaten van de analyse van organische zuren in urine. Bij de personen met MCC-deficiëntie werd een zeer lage concentratie vrij carnitine in serum gevonden, secundair aan een hoge excretie van vooral carnitineesters (totaal min vrij carnitine) in urine. Men zou



**Figuur 2.** Een schema van de afbraak van het vertakte-keten-aminozuur leucine met de metabolieten en enzymen.

verwachten dat de belangrijkste carnitine-ester 3-methylcrotonylcarnitine zou zijn. Echter, literatuurgegevens geven aan dat dit niet het geval is. Profilering van carnitine-esters bij patiënten met MCC-deficiëntie met tandem-massaspectrometrie heeft aangetoond dat de belangrijkste carnitine-ester 3-hydroxyisovaleryl-carnitine ( $C_5OHcarn$ ) was. Dit is een ongebruikelijke bevinding, vooral in het licht van de specificiteit van carnitine-acyltransferase. 3-Hydroxyisovaleryl-CoA blijkt geen substraat te zijn voor dit enzym. Hoogstwaarschijnlijk wordt eerst 3-methylcrotonylcarnitine gevormd uit de overeenkomstige CoA-thioester, waarna additie van water over de dubbele binding in het 3-methylcrotonyl-residue van de carnitine-ester plaatsvindt onder de vorming van  $C_5OHcarn$ .

In het beschreven gezin werden 3 personen geïdentificeerd met MCC-deficiëntie. De indexpatiënt had een ernstige gedilateerde cardiomyopathie, haar 10-jaar oude broer had in het verleden eenmalig een ernstige ziekteperiode doorgemaakt en was vertraagd in zijn psychomotorische ontwikkeling, en haar vader had geen klinische verschijnselen. Dit brede scala aan presentaties past bij de beschrijvingen in de literatuur van personen met een aangetoonde MCC-deficiëntie. Bij een aantal patiënten wordt tijdens een acute episode een Reye-achtig beeld beschreven als gevolg van een infectie of een eiwitrijke maaltijd. De klinische presentatie is veelal tussen een half tot 3 jaar na geboorte. Tijdens zo'n crisis worden voedingsproblemen, braken, lethargie, apneu's en hypotonie beschreven. Laboratoriumonderzoek laat veelal hypoglykemie, metabole acidose en hyperammonemie zien. De concentratie van vrij carnitine in serum is meestal laag. Deze patiënten genezen over het algemeen zonder restverschijnselen en ontwikkelen zich normaal. Patiënten worden behandeld met carnitine. Toch rijst de vraag of deze behandeling noodzakelijk is. In het onderzochte gezin had vader, naar alle waarschijnlijkheid, gedurende vele jaren lage carnitineconcentraties in serum zonder dat dit leidde tot klinische verschijnselen. Daarnaast kan het defect zich bij pasgeborenen presenteren met ernstige neurologische afwijkingen, zoals stuipen, hypotonie en ontwikkelingsachterstand. Deze kinderen hebben een slechte prognose en behandeling is ineffectief. Ook de indexpatiënt reageerde niet op carnitinesuppletie en eiwitrestrictie. Behandeling had geen effect op haar cardiomyopathie. Met andere woorden, wij hebben te maken met een erfelijke metabole ziekte (MCC-deficiëntie) waarvan niet duidelijk is of deze aanleiding geeft tot de gevonden afwijkingen. Recent genetisch onderzoek naar de mutaties in de genen die coderen voor de beide subeenheden waaruit MCC is opgebouwd, heeft geen relatie laten zien tussen het genotype en het klinisch beeld (3).

De associatie van MCC-deficiëntie en 3-hydroxyisovaleryl-carnitine in bloed maakt dat MCC-deficiëntie kan worden opgespoord in bevolkingsonderzoek van

pasgeborenen met tandem-massaspectrometrie aan de hand van een verhoogde  $C_5OHcarn$  in serum ( $> 5 \times SD = 1,36 \mu\text{mol/l}$ ). Verhoogde  $C_5OHcarn$  in serum bleek zeer vaak gevonden te worden (4). Afgaande op de gegevens uit het "North Carolina Newborn Screening Program" bleek bij 1 op de ca. 25.000 pasgeborenen  $C_5OHcarn$  verhoogd te zijn. Slechts de helft van de pasgeborenen met een verhoogde  $C_5OHcarn$  bleek daadwerkelijk MCC-deficiënt te zijn, resulterend in een incidentie van MCC-deficiëntie van 1 op de ca. 50.000 pasgeborenen. Deze getallen geven aan dat verhoogde  $C_5OHcarn$  een zeer hoge kans geeft op fout-positieve uitslagen, d.w.z. pasgeborenen met een verhoogde  $C_5OHcarn$  en een normale MCC-activiteit. Eén van de belangrijkste oorzaken voor deze fout-positieve uitslagen was maternale MCC-deficiëntie bij asymptomatische moeders van pasgeborenen met verhoogde  $C_5OHcarn$ .

Niet alleen is de klinische expressie van het ziektebeeld zeer variabel en de effectiviteit van de behandeling onbekend, tevens blijkt MCC-deficiëntie slechts in beperkte mate tot klinische expressie te komen, m.a.w. de penetrantie is gering.

#### Literatuur

1. Sweetman L, Williams J C. Branched chain organic acidurias, in: The metabolic and molecular basis of inherited disease, 8 ed. Scriver C R, Beaudet A L, Sly W S, Valle D, Childs B, Kinzler K W, Vogelstein B, eds. New York: McGraw-Hill, 2001: 2125-2163.
2. Visser G, Suormalis T, Smit G P, Reijngoud D-J, Bink-Boelkens M Th E, Niezen-Koning K, Baumgartner E R. 3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency in an infant with cardiomyopathy, in het brother with developmental delay and in their asymptomatic father. *Eur J Pediatr* 2000; 159: 901-904.
3. Baumgartner M R, Almashanu S, Suormala T, Obie C, Cole R N, Packman S, Baumgartner E R, Valle D. The molecular basis of human 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *J Clin Invest* 2001; 107: 495-504.
4. Koeberl D D, Millington D S, Smith W E, Weavil S D, Muenzer J, McCandless S E, Kishnani P S, McDonald M T, Chaing S, Boney A, Moore E, Frazier D M. Evaluation of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency detected by tandem mass spectrometry newborn screening. *J Inher Metab Dis* 2003; 26: 25-35.

#### Summary

*3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. What is the meaning of this biochemical abnormality? Reijngoud D.J. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2003; 28: 337-340.*

We describe a family with 3 affected members with isolated biotin-resistant 3-methylcrotonyl-CoA-carboxylase deficiency, each with a different presentation. In the indexpatient the predominant symptom was a dilatative cardiomyopathy, the second affected member was developmentally delayed and the third member was without symptoms. The chemical diagnosis of this inherited metabolic disease is described.

*Key words: casuistic; inborn error of metabolism; inherited metabolic disease; methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency; significance*