

# Deficiencia de 3-fosfoglicerato deshidrogenasa: un error congénito de la biosíntesis de serina.

J. Jaeken, M. Detheux, L. Van Maldergem, M. Foulon, H. Carchon, E. Van Schaftingen

## Resumen

Las concentraciones de serina mostraban valores especialmente bajos en el líquido cefalorraquídeo de los dos hermanos con microcefalia congénita, retraso psicomotor profundo, hipertonia, epilepsia, retraso en el crecimiento e hipogonadismo. Además, el hermano más pequeño tenía cataratas congénitas bilaterales. La resonancia magnética del cerebro mostró signos de desmielinización. También las concentraciones de serina en plasma, y de glicina en plasma y en líquido cefalorraquídeo estaban disminuidas, aunque en menor medida. El tratamiento con serina por vía oral aumentó considerablemente las concentraciones de serina en el líquido cefalorraquídeo, y eliminó las convulsiones. Los fibroblastos de ambos pacientes presentaban un descenso de la actividad del 3-fosfoglicerato deshidrogenasa, el primer paso para la biosíntesis de serina (22 % y 13 % del valor medio del grupo de control). Este trastorno es poco frecuente, ya que la gran mayoría de las aminoacidopatías se producen por un error del catabolismo. Este error congénito del metabolismo del que no se conoce ningún caso previo puede ser potencialmente tratable a pesar de su gravedad.

(*Archives of Disease in Childhood* 1996; 74:542-545)

Palabras clave: líquido cefalorraquídeo, 3-fosfoglicerato deshidrogenasa, serina.

La serina es un aminoácido clave, ya que no solo contribuye de forma esencial en la síntesis de proteínas sino que también es precursora de la síntesis de

numerosos compuestos, como la glicina, la cisteína, la fosfatidilserina, la esfingomielina y los cerebrosidos. Además, se considera la mayor fuente de metilentetrahidrofolato y de otros donantes de unidades de un solo carbono necesarios para la síntesis de purina y timidina.<sup>1,2</sup> La serina es un aminoácido no esencial que se sintetiza *de novo* a partir del 3-fosfoglicerato, un intermediario glucolítico. En la Figura 1 podemos observar cómo este intermediario se transforma en serina mediante la actuación sucesiva del 3-fosfoglicerato deshidrogenasa (EC 1.1.1.95), de la 3-fosfoserina aminotransferasa (EC 2.6.1.52) y de la fosfoserina fosfatasa (EC 3.1.3.3).<sup>3</sup> Esta vía ocurre en numerosos tejidos, entre los que se incluyen el cerebro, el riñón, los testículos y el hígado; y se encuentra activa en las células en crecimiento.<sup>4-7</sup> La serina también se puede sintetizar a partir de glicina mediante una reacción reversible catalizada por la serina hidroximetil transferasa.

Durante un análisis sistemático de aminoácidos en plasma y en el líquido cefalorraquídeo en niños con retraso psicomotor, observamos que las concentraciones de serina y glicina habían disminuido en los dos hermanos. Una investigación posterior reveló un error en la síntesis de serina debido a una deficiencia de 3-fosfoglicerato deshidrogenasa.

## Estudio de casos

Los pacientes, dos hermanos, provenían de una familia turca. Los padres eran primos hermanos sanos, con estatura y perímetro cefálico normales.

Departamento de  
Pediatria, Hospital  
universitario  
Gasthuisberg (Hôpital  
Universitaire  
Gasthuisberg),  
Herestraat 49,  
B-3000 Lovaina  
(Bélgica)  
J. Jaeken  
H. Carchon

Laboratorio de  
Química Fisiológica,  
Instituto de Patología  
Celular y Molecular  
(L'Institut de  
Pathologie Cellulaire  
et Moléculaire),  
Bruselas (Bélgica)  
M. Detheux  
E. Van Schaftingen

Instituto de  
Morfología (Institut de  
Morphologie),  
Loverval (Bélgica)  
L. Van Maldergem

Hospital Civil (Hôpital  
Civil), Charleroi  
(Bélgica)  
M. Foulon

Enviado a: Dr. Jaeken  
Aceptado el de febrero  
de 1996

El primer hijo estaba sano y mostraba concentraciones normales de aminoácidos en plasma. El tercer hijo (caso 1) nació tras un embarazo a término normal con un peso de 2130 g (siendo el percentil tres 2600 g), una talla de 43 cm (percentil tres 47 cm) y un perímetro cefálico de 29 cm (percentil tres 33 cm). Se ingresó al paciente por cataratas congénitas bilaterales y dificultades en la alimentación a los 3 meses y medio. El peso era 3700 g (siendo el percentil tres 5100 g), la talla de 50,5 cm (percentil tres 58 cm) y el perímetro cefálico de 34,2 cm (percentil tres 39 cm). Tenía retraso mental grave, hipertonia e hiperexcitación. Además, tenía los pulgares en aducción y pie calcáneo vago aunque los reflejos tendinosos eran normales. Y tenía testículos pequeños. Cuando tenía un año desarrolló epilepsia. La investigación en el laboratorio no pudo demostrar la existencia de una infección intrauterina. El análisis cromosómico era normal. Los análisis de aminoácidos en plasma mediante cromatografía de intercambio iónico y detección por fluorescencia mostraron bajas concentraciones de serina en ayunas (29 y 55  $\mu\text{mol/l}$  respectivamente, siendo el rango normal para la misma edad entre 70 y 187  $\mu\text{mol/l}$ ) y de glicina en ayunas (77 y 97  $\mu\text{mol/l}$  respectivamente, siendo el rango normal entre 80 y 341  $\mu\text{mol/l}$ ). En el líquido cefalorraquídeo, los niveles proteicos eran normales, los de serina se habían reducido drásticamente (6  $\mu\text{mol/l}$ , siendo el rango normal entre 38 y 80  $\mu\text{mol/l}$ ) y los de glicina también se habían reducido, pero en menor medida (2,8  $\mu\text{mol/l}$ , siendo el rango normal entre 3,6 y 9,0  $\mu\text{mol/l}$ ). Los ácidos orgánicos en orina presentaban concentraciones normales. El tratamiento por vía oral con serina aumentó considerablemente las concentraciones de serina en el líquido cefalorraquídeo siendo dosis dependiente: La serina en el líquido cefalorraquídeo alcanzó los 15  $\mu\text{mol/l}$  tras una semana administrando 100 mg/kg/día en tres dosis. Además, alcanzó los 20  $\mu\text{mol/l}$  tras una semana administrando 200 mg/kg/día. Las convulsiones remitieron una semana

después de comenzar con la segunda dosis. No se pudieron realizar estudios adicionales debido a la falta de colaboración de los padres. El electroencefalograma mostró actividad epiléptica, y la resonancia magnética mostró tanto hipotrofia cortical y subcortical como signos de desmielinización.

El segundo hijo (caso 2) mostró un cuadro clínico similar al de su hermano, pero no presentaba cataratas. El peso al nacer fue de 3040 g. Desarrolló epilepsia a los dos meses. A los 7 años, el peso era 13 kg (siendo el percentil tres 18 kg), la talla 104 cm (percentil tres 110 cm) y el perímetro cefálico 42,2 cm (percentil tres 49 cm). El desarrollo psicomotor era casi inexistente. Tenía plagiocefalia occipital, las orejas grandes, pulgares en aducción, tetraparesia espástica e hipogonadismo. Las concentraciones de serina en plasma eran normales dos horas después de la ingesta de alimentos (113  $\mu\text{mol/l}$ , siendo el rango normal entre 70 y 187  $\mu\text{mol/l}$ ). Sin embargo, las concentraciones de serina en el líquido cefalorraquídeo disminuyeron (8  $\mu\text{mol/l}$ , siendo el rango normal entre 20 y 40  $\mu\text{mol/l}$ ) y los niveles de glicina eran normal-bajos (3  $\mu\text{mol/l}$ , siendo el rango normal entre 3 y 7  $\mu\text{mol/l}$ ). El examen oftalmológico era normal. El electroencefalograma mostró actividad epiléptica, y la resonancia magnética del cerebro mostró tanto hipotrofia cortical y subcortical como desmielinización.



Figura 1 Vía de síntesis de novo de serina. I: 3-Fosfoglicerato deshidrogenasa; II: 3-fosfohidroxipiruvato transaminasa y III: 3-Fosfoserina fosfatasa (Pi = Fosfato inorgánico)

## Métodos

### REACTIVOS

3-Fosfoserina, 3-fosfoglicerato, 3-fosfohidroxipiruvato, α-cetoglutarato y 3-fosfoglicerato deshidrogenasa provenientes del hígado de pollo eran de Sigma; [<sup>14</sup>C]-serina de Amersham International; químicos de Merck; y reactivo para el cultivo de tejidos de Gibco

BRL.

#### CULTIVO CELULAR

Los fibroblastos (pasos 3-11) se cultivaron en el medio de Eagle modificado por Dulbecco con un 10 % de suero fetal bovino, 1 mM de piruvato sódico, GlutaMax I, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Las células adheridas se liberaron tras el lavado con un tampón de fosfato salino sin magnesio y calcio ( $Mg^{2+}/Ca^{2+}$ ) por exposición breve (3-5 min) al mismo medio que contiene 0,02 % de tripsina. Las células liberadas se diluyeron en el medio de cultivo, se sedimentaron mediante centrifugado (1000 x g, 10 min) y se lavaron dos veces en un tampón de fosfato salino sin  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$ . Los sedimentos celulares o bien se alteraron inmediatamente por análisis enzimáticos o bien se guardaron a -80 °C durante más de tres meses sin que se produjese una pérdida de la actividad. Para preparar la extracción celular, los sedimentos (10 células) se volvieron a suspender en 250 µl de un medio que contenía HEPES pH 7,1, 1 mM de ditiotreitól (DTT), 50 mM de cloruro de sodio (NaCl) y 10 µg/ml tanto de leupeptina como de antipaína. Las células se alteraron mediante tres ciclos congelación-descongelación, y se tomó una muestra para la determinación de proteínas.

#### PURIFICACIÓN PARCIAL DE 3-FOSFOSERINA FOSFATASA

Los hígados de tres ratas nutridas se homogenizaron en 3 volúmenes de un tampón que contenía 25 mM de 2-[N-morfolino] ácido etanosulfónico (MES) pH 6,5, 10 mM de cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ), 1 mM de DTT, 100 mM de NaCl y 10 µ/ml tanto de leupeptina como de antipaína. El homogeneizado se calentó durante 5 min a 65 °C y se transfirió a hielo. A continuación, se añadieron 0,1 g de polietilenglicol 6000 por cada ml de extracto calentado, y el preparado resultante se centrifugó durante 10 min a 15000 x g. Más adelante, se añadieron 15 g de un tampón de pH 8,5 que contiene 10 mM de  $MgCl_2$ , 1 mM de DTT y 20 mM de NaCl. Luego, esto se añadió a 40 cm<sup>3</sup> de columna de flujo rápido DEAE-Sepharose. Las proteínas retenidas se eluyeron con un gradiente de NaCl de 20-500 mM preparado en 200 ml del mismo

tampón. La 3-fosfoserina fosfatasa alcanzó su máximo en una concentración de sodio de 100 mM. Su actividad específica asciende a 40 mU/mg de proteína, que corresponde a 80 % de pureza con un rendimiento del 30 %.

#### PREPARACIÓN DE [<sup>14</sup>C]

##### 3-FOSFOSERINA

La [<sup>14</sup>C] 3-fosfoserina se sintetizó mediante la reacción de intercambio catalizada por 3-fosfoserina fosfatasa. La mezcla de la reacción (3 ml) contenía 500 µM de 3-fosfoserina, 80 µM de serina, 12,5 µM de [<sup>14</sup>C] serina, 10 mM de  $MgCl_2$ , 4 M de urea para favorecer la reacción de intercambio y 12 mU de 3-fosfoserina fosfatasa. Tras una hora de incubación, la reacción se interrumpió al añadir 100 µl de una concentración de 10 % de ácido perclórico ( $HClO_4$ ). La mezcla de la reacción se neutralizó con 3 M de carbonato potásico y se centrifugó. El sobrenadante se diluyó en 20 ml de agua añadida a 40 cm<sup>3</sup> de una columna de flujo rápido DEAE-Sepharose. Un gradiente de NaCl (0-500 mM en 150 ml de 25 mM de HEPES pH 7,1) se añadió para eludir la [<sup>14</sup>C] 3-fosfoserina.

##### ANÁLISIS ENZIMÁTICOS

EL 3-fosfoglicerato deshidrogenasa se analizó por espectrofotometría en una mezcla que contenía 25 mM de HEPES pH 7,1; 400 mM de cloruro de potasio (KCl), 0,15 mM de NADH, 0,1 mM de 3-fosfohidroxipiruvato y 10 µg/ml de lactato deshidrogenasa. Se decidió añadir una concentración tan elevada de KCl debido a que la sal estimula la reducción del 3-fosfohidroxipiruvato en esta enzima.<sup>9</sup> El lactato deshidrogenasa se añadió antes del extracto celular. Con esto se consiguió eliminar el hidroxipiruvato contaminante del sustrato al convertirlo en glicerato.<sup>10</sup>

La 3-fosfoserina aminotransferasa se midió mediante la formación de [<sup>14</sup>C] 3-fosfohidroxipiruvato a partir de [<sup>14</sup>C] 3-fosfoserina. La mezcla de la reacción (0,1 ml) contenía 1 mM de 3-fosfoserina, 12.500 cpm/ml de [<sup>14</sup>C] 3-fosfoserina, 10 mM de α-cetoglutarato, 50 mM TRIS HCl pH 8 y 2,5 mM de NADH.

Además, contenía 15 mU de 3-fosfoglicerato deshidrogenasa de pollo para iniciar la reacción hacia la

formación de 3-fosfoglicerato. La reacción se detuvo al añadir un volumen del 10 % de  $\text{HClO}_4$  y la mezcla se centrifugó durante 5 minutos a 2000 x g. El sobrenadante resultante se transfirió a 500  $\mu\text{l}$  con agua y se añadió a una columna Dowex AG 1-X8 (1  $\text{cm}^3$ , forma de Cl). La columna se lavó con 5 ml de 25 mM de NaCl, 5 ml de 150 mM de NaCl y 4 ml de 300 mM de NaCl en 10 mM de HEPES pH 7,1 para eludir sucesivamente serina, 3-fosfoserina y 3-fosfohidroxipiruvato. Las fracciones se mezclaron con OptiPhase 2 y se examinaron en busca de radioactividad.

Tabla 1 Actividades enzimáticas de la vía de la biosíntesis de serina en los fibroblastos en mU/mg de proteínas. Los valores son medios (SD). Número de controles o número de experimentos para pacientes se encuentran entre corchetes.

	3-Fosfoglicerato deshidrogenasa	3-Fosfoserina aminotransferasa	3-Fosfoserina fosfatasa
Pacientes de control	29,5 (2,6) [15]	2,0 (0,3) [9]	1,7 (0,2) [14]
Caso 1	6,6 (0,5) [8]	2,6 (0,7) [3]	2,0 (0,2) [10]
Caso 2	3,7 (0,6) [9]	2,0 (0,3) [4]	1,3 (0,1) [8]

La 3-fosfoserina fosfatasa se midió mediante la liberación de [ $^{14}\text{C}$ ]-serina proveniente de [ $^{14}\text{C}$ ] 3-fosfoserina. La mezcla de la reacción contenía 25 mM de tampón MES pH 6,5, 1 mM de DTT, 0,1 mM de serina y 12.500 cpm de 3-fosfoserina radioactiva en un volumen de 0,1 ml. La mezcla de la reacción se incubó durante 30 min a 30° C y las muestras se trataron de la forma que se explica previamente, con el único cambio de que la elusión se realizó con 3 ml de 25 mM de NaCl y 3 ml de 200mM de NaCl.

Una unidad de enzima es la cantidad de enzima que cataliza 1  $\mu\text{mol}/\text{min}$  bajo las condiciones específicas del análisis.

## Resultados

Tal y como se muestra en la Tabla 1, la actividad del 3-fosfoglicerato deshidrogenasa se redujo considerablemente en los fibroblastos de ambos pacientes (22 % y 13 % del valor de la media respectivamente) mientras que las otras actividades enzimáticas de la vía de serina mostraban concentraciones normales. La Figura 2 ilustra el efecto de las concentraciones de 3-fosfohidroxipiruvato en la actividad enzimática tanto en el caso 1 como en el control. La enzima se inhibió

notablemente mediante el aumento de las concentraciones de 3-fosfohidroxipiruvato. El KCl liberó la inhibición y sustituyó la concentración óptima de sustrato de 10  $\mu\text{M}$  en 100 mM de KCl por 100 mM de 50  $\mu\text{M}$  en 400 mM de KCl. Este efecto salino es análogo al descrito para el D-glicerato deshidrogenasa, cuya inhibición por hidroxipiruvato se libera por sal.<sup>11</sup> El comportamiento cinético de la enzima del paciente es similar al control, a excepción de que el  $V_{\text{max}}$  se redujo considerablemente. La actividad del 3-fosfoglicerato deshidrogenasa se midió también en la dirección fisiológica mediante la reducción de  $\text{NAD}^+$  en presencia de 3-fosfoglicerato, tal y como describieron Willis y Sallach.<sup>9</sup> La actividad en los fibroblastos de los dos controles fue de 0,3 y 0,5 mU/mg de proteínas e imposible de detectar (< 0,1 mU/mg de proteínas) en los dos pacientes.

## Discusión

Los dos hermanos expuestos en este estudio han reducido los niveles de serina y glicina en el líquido cefalorraquídeo y en cierta medida en sangre, que se asocia con un síndrome neurológico grave similar. Si las cataratas presentes en uno de los pacientes son parte de la enfermedad se desconoce hasta que se detecten más pacientes con el mismo síndrome. Como se mencionó en la introducción, la serina puede ser sintetizada mediante intermediarios glucolíticos y puede convertirse en glicina mediante una reacción que genera metilentetrahidrofolato ( $\text{N}_5\text{N}_{10}$ ). Recíprocamente, la serina se puede formar a partir de dos moléculas de glicina mediante la intervención de serina hidroximetiltransferasas y del sistema de degradación de la glicina. Un descenso tanto en las concentraciones de serina como de glicina en el líquido cefalorraquídeo de ambos pacientes indicaba un defecto en la síntesis *de novo* de serina. Esto se confirmó al encontrar en los fibroblastos de los dos pacientes un notable descenso de la actividad del fosfoglicerato deshidrogenasa, el primer paso de esta vía (ver figura 1).

Por lo tanto, esta enfermedad debe clasificarse en el pequeño grupo de aminoacidopatías «anabólicas» debido a que la gran mayoría de trastornos relacionados con los aminoácidos se deben a errores del catabolismo.<sup>12</sup> Otros errores

de síntesis son los trastornos del ciclo de la urea relacionados con la arginasa, la homocisteinemia y la fenilketonuria, ya que causan una deficiencia en la síntesis de arginasa, cisteína y tirosina respectivamente. La patogenia de estas enfermedades está determinada en su mayoría por la acumulación de sustratos (los intermediarios en el ciclo de amoníaco y urea: homocisteína y fenilalanina respectivamente). En el trastorno actual, es poco frecuente que el 3-fosfoglicerato deshidrogenasa de lugar a una acumulación significativa de 3-fosfoglicerato debido a que este metabolito puede utilizarse de inmediato en la glucólisis. Por ello, la deficiencia de serina cerebral parece ser el factor más determinante de la enfermedad. La serina tiene un papel fundamental en numerosas y diferentes reacciones biosintéticas, especialmente en la síntesis de importantes constituyentes cerebrales como las proteínas, la glicina, la cisteína, los fosfolípidos de serina, la esfingomielina y los cerebrósidos. El hecho de que el tratamiento con serina cause algunas mejoras en la sintomatología indica que la deficiencia de serina es, como mínimo, parcialmente responsable del cuadro clínico en estos pacientes.

Se pueden facilitar diferentes explicaciones debido a que aún hay una actividad residual del 3-fosfoglicerato deshidrogenasa del 20 % con propiedades cinéticas aparentemente normales. La primera posibilidad es que la mutación presente en los pacientes produce una reducción de la expresión de una proteína intacta, ya sea por una disminución en la transcripción o por un aumento de la inestabilidad del ARN mensajero. La segunda posibilidad es que dé lugar a la formación de una proteína con una estabilidad reducida, un  $V_{max}$  reducido o incluso con una enzima completamente inactiva. En este último caso, la actividad residual podría explicarse

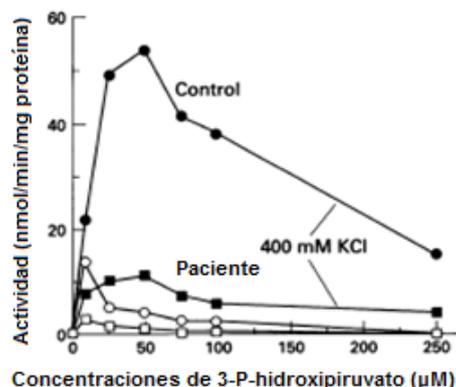


Figura 2. Efectos de las concentraciones de 3-hidroxipiruvato y KCl (símbolos blanco: 100 mM; símbolos negros: 400 mM) en la actividad de fosfoglicerato deshidrogenasa en extractos de fibroblastos de control (círculos) y de pacientes (cuadrados, caso 1).

por la presencia de una isoenzima diferente. Por ello, podría ser interesante determinar la distribución de formas isoenzimáticas en los diferentes tejidos para averiguar cuáles podrían verse más afectados por la mutación. Si la falta de la enzima es la única que se expresa en el cerebro, entonces este órgano dependerá en gran medida del suministro de serina de la sangre. Se ha declarado que el cerebro depende de su propia biosíntesis de L-serina porque existe un transporte limitado de L-serina a través de la barrera hematoencefálica debido a la competición con varios aminoácidos al nivel de transportador de aminoácidos neutros.<sup>13-15</sup>

Este informe es el primero con respecto a un defecto enzimático en la vía de la biosíntesis de serina. La razón por la que esta deficiencia no se ha estudiado previamente puede deberse a que los análisis de aminoácidos en plasma siguen realizándose por cromatografía en capa fina, lo que no permite detectar reducciones moderadas. Por otro lado, el análisis cuantitativo de aminoácidos debe realizarse en ayunas —se encontraron las concentraciones de serina normales dos horas después de una alimentación proteica normal. Asimismo, el análisis de aminoácidos en orina no es nada fiable en la detección de esta enfermedad, ya que las concentraciones de serina en orina suelen ser muy bajas. Por último, es probable que la contribución de serina alimentaria sea menos importante en el

líquido cefalorraquídeo que en las concentraciones de serina en suero. Por ello, este estudio es una petición para conseguir un análisis más sistemático de aminoácidos en el líquido cefalorraquídeo en pacientes con síntomas neurológicos que no tienen explicación, especialmente en aquellos con encefalopatía aguda.<sup>16 17</sup> Esta investigación es una herramienta importante en el diagnóstico de trastornos neurometabólicos<sup>18</sup> y puede que revele otros defectos en la biosíntesis de aminoácidos.

Nos gustaría darle las gracias a la Sra. G. Berghenouse por su competente ayuda técnica. Este trabajo ha tenido el apoyo del National Fund for Scientific Research (grants 3.0115.94 y 3.4596.92), the Accions de Recherche Concertées, y the Belgian Federal Service for Scientific, Technical and Cultural Affairs. EVS es director del Recherche del National Fund for Scientific Research.

1. Snell K. Enzymes of serine metabolism in normal, developing and neoplastic rat tissues. *Adv Enzyme Regul* 1983; **22**: 325-400.
2. Barrett AJ. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. *Methods Enzymol* 1994; **244**: 1-460.
3. Snell K. The duality of pathways for serine biosynthesis is a fallacy. *Trends Biochem Sci* 1986; **11**: 241-3.
4. Knox WE, Herzfeld A, Hudson J. Phosphoserine phosphatase distribution in normal and neoplastic rat tissues. *Arch Biochem Biophys* 1969; **132**: 397-403.
5. Snell K. Enzymes of serine metabolism in normal and neoplastic rat tissues. *Biochim Biophys Acta* 1985; **843**: 276-81.
6. Snell K, Weber G. Enzymic imbalance in serine metabolism in rat hepatomas. *Biochem J* 1986; **233**: 617-20.
7. Snell K, Natsumeda Y, Eble JN, Glover JL, Weber G. Enzymic imbalance in serine metabolism in human colon carcinoma and rat sarcoma. *Br J Cancer* 1988; **57**: 87-90.
8. Bridgers WF. Mouse brain phosphoserine, phosphohydrolase and phosphotransferase. *J Biol Chem* 1967; **242**: 2080-5.
9. Willis JE, Sallach HJ. The occurrence of D-3-phosphoglycerate dehydrogenase in animal tissues. *Biochim Biophys Acta* 1964; **81**: 39-54.
10. Dawkins PD, Dickens F. The oxidation of D- and L-glycerate by rat liver. *Biochem J* 1965; **94**: 353-67.
11. Sugimoto E, Kitagawa Y, Hirose M, Chiba H. Mechanisms of inhibition and activation of beef liver D-glycerate dehydrogenase by inorganic anions. *J Biochem* 1972; **72**: 1317-25.
12. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. Amino acids. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, 1995:1015-368.
13. Felig P, Wahren J, Ahlborg G. Uptake of individual amino acids by the human brain. *Proc Soc Exp Biol Med* 1973; **142**: 230-1.
14. Oldendorf WH, Szabo J. Amino acid assignment to one of three blood-brain barrier amino acid carriers. *Am J Physiol* 1976; **230**: 94-8.
15. Smith QR, Momma S, Aoyagi M, Rapoport SI. Kinetics of neutral amino acid transport across the blood-brain barrier. *J Neurochem* 1987; **49**: 1651-8.
16. Scheffer IE, Baraitser M, Wilson J, Godfrey C, Brett EM. Autosomal recessive microcephaly with severe psychomotor retardation. *Neuropediatrics* 1992; **23**: 53-6.
17. Gross-Tsur V, Joseph A, Blinder G, Amir N. Familial microcephaly with severe neurological deficits: a description of five affected siblings. *Clin Genet* 1995; **47**: 33-7.
18. Jaeken J. Cerebrospinal fluid as a tool in the diagnosis of neurometabolic diseases: amino acid analysis before and after acid hydrolysis. *Eur J Pediatr* 1994; **153** (suppl 1):S86-9.