

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas**

**Identificação de Mutações no Gene *GNPTAB* em Pacientes
Brasileiros com Mucopolidose II e III**

Gabriela Kampf Cury

Orientadora: Prof^a Dr^a Ida Vanessa Doederlein Schwartz

Porto Alegre, 2010.

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas**

**Identificação de Mutações no Gene *GNPTAB* em Pacientes
Brasileiros com Mucopolidose II e III**

GABRIELA KAMPF CURY

Orientadora: Prof^a Dr^a Ida Vanessa Doederlein Schwartz

**Dissertação apresentada como
requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre em Ciências Médicas, à
Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina:
Ciências Médicas.**

Porto Alegre, 2011

**FOLHA DE APROVAÇÃO DA BANCA EXAMINADORA
GABRIELA KAMPF CURY**

**IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE *GNPTAB* EM
PACIENTES BRASILEIROS COM MUCOLIPIDOSE II E III**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre, 31 de janeiro de 2011.

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação *Identificação de Mutações no Gene GNPTAB em Pacientes Brasileiros com Mucopolidose II e III* elaborada por *Gabriela Kampf Cury*, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Médicas.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Roberto Giugliani
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular - UFRGS

Prof^a. Dr^a. Sandra Leistner-Segal
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas - UFRGS

Prof^a. Dr^a. Sandra Alves
Investigadora Auxiliar responsável pelo Grupo de Investigação em Doenças Lisossomais de Sobrecarga - Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge

Dedicatória

À minha família, em especial à minha mãe, por tudo o que as palavras não são suficientes para explicar.

Aos familiares e pacientes pela disponibilidade e compreensão de que estamos juntos no início desta caminhada pelo conhecimento mais profundo das Mucopolioses II e III que, certamente, irão contribuir para pesquisas futuras que auxiliarão no desenvolvimento de terapia adequada.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Ida Vanessa Doederlein Schwartz, pela orientação e pela paciência com o meu processo de aprendizagem.

À Ursula Matte pelos comentários valorosos e pela suave condução nos momentos em que tudo parecia não fazer sentido.

Aos colegas do Centro de Terapia Gênica e do Serviço de Genética Médica pela forma terna com que fui recebida e pela ótima convivência nestes dois anos, que pretendo transpor para os próximos quatro!

Às amigas seculares: Débora Spengler, Cristina Paul e Andrea Brandi por compreenderem minha ausência física e por compartilharem momentos virtuais revigorantes, fundamentais neste período!

À minha família, por compreender minha ausência nos momentos finais desta etapa.

RESUMO

Introdução: As Mucopolidoses II e III (MLII e MLIII) são doenças lisossômicas raras causadas pela deficiência da GlcNac-1-fosfotransferase (fosfotransferase), enzima envolvida na síntese do marcador M₆P responsável pelo direcionamento de várias enzimas lisossomais para o lisossomo. A fosfotransferase é codificada pelos genes *GNPTAB* e *GNPTG*. O gene *GNPTAB* codifica as subunidades α e β da enzima; mutações neste gene provocam tanto a MLII, forma mais grave, quanto a MLIII, forma mais atenuada da doença. O gene *GNPTG* codifica a subunidade γ ; mutações neste gene provocam a MLIII. **Objetivos:** Identificar as mutações no gene *GNPTAB* presentes em pacientes brasileiros com MLII e MLIII. **Metodologia:** Os pacientes com diagnóstico bioquímico de ML II/III foram identificados pelo Laboratório de Referência para EIM do HCPA (LREIM-HCPA), Brasil, de 1983 até 2009. Treze pacientes não relacionados (MLII:6, MLIII:5, ML tipo não definido: 2), filhos de casais não-consanguíneos, e oriundos de várias regiões do Brasil, foram incluídos no estudo. Informações clínicas foram obtidas a partir do banco de dados do LREIM-HCPA, sendo que o tipo de ML e a altura foram fornecidos pelo médico assistente. Amostras de sangue periférico foram coletadas para extração de DNA genômico. Os 21 exons que compreendem o gene *GNPTAB*, e respectivas regiões flangeadoras, foram amplificados a partir de sequências específicas de oligonucleotídeos projetadas para este trabalho. A sequência do gene *GNPTAB* utilizada como referência para o sequenciamento foi a GenBank NM_024312.3. **Resultados:** Com a estratégia utilizada, foi possível a identificação de ambas as mutações patogênicas em 6/13 pacientes, e de apenas uma mutação patogênica em cinco pacientes. Em dois pacientes, ambos com MLIII, não foram identificadas mutações patogênicas. Em todos os pacientes foi encontrada pelo menos uma variante não-patogênica, sendo a mais frequente a c.-41-39delGGC (16/26 alelos). A mutação c.3503_3504delTC (p.L1168QfsX5) foi a mais frequente na amostra estudada (n=7/26 alelos). Considerando regiões codificantes e não-codificantes, quatro novas mutações estão sendo descritas: c.2269_2273delGAAAC (exon 13), c.2808A>G (exon 14), c.323+20delT (intron 3) e c.365+96_97delGT (intron 4). Mutações sem

sentido e deleções com alteração na fase de leitura parecem estar relacionadas ao fenótipo grave enquanto, mutações de sentido trocado, estão relacionadas ao fenótipo atenuado. **Discussão/Conclusões:** Este é o primeiro estudo do gênero realizado em pacientes brasileiros com MLII/III. Assim como é descrito em pacientes de outras populações, o gene *GNPTAB* apresentou grande heterogeneidade alélica e a mutação patogênica mais frequente encontrada foi a c.3503_3504delTC. Desta forma, sugere-se que a análise de DNA dos pacientes brasileiros com MLII/III seja iniciada pela pesquisa dessa mutação. Como a estratégia empregada detectou 17/26 dos alelos patogênicos, novas análises deverão ser realizadas para os pacientes que apresentam o genótipo parcialmente ou não estabelecido, incluindo a análise do *GNPTG*. **Palavras-chaves:** *GNPTAB*. Mucopolidose. Doenças Lisossômicas. M₆P. Doença da Célula de Inclusão. Polidistrofia Pseudo-Hurler.

ABSTRACT

Introduction: Mucopolidosis II and III (MLII and MLIII) are rare lysosomal diseases caused by a deficiency of GlcNac-1-phosphotransferase (phosphotransferase), the enzyme responsible for the synthesis of marker M₆P, which directs several lysosomal enzymes to the lysosome. Phosphotransferase is codified by the GNPTAB and the GNPTG genes. The GNPTAB gene codifies subunits α and β of the enzyme; mutations in this gene cause both MLII, the most severe form, and MLIII, the most attenuated form of the disease. The GNPTG gene codifies subunit γ ; mutations in this gene cause MLIII. **Objectives:** To identify mutations in the GNPTAB gene that are present in Brazilian patients with MLII and MLIII. **Methodology:** Patients with a biochemical diagnosis of ML II/III were identified at the Reference Laboratory of Inborn Errors of Metabolism of HCPA, Brazil, from 1983 to 2009. Thirteen unrelated patients (MLII: 6, MLIII: 5, undefined ML: 2), born to nonconsanguineous couples and from several regions of Brazil were included in the study. Clinical information was obtained from the database of the LREIM-HCPA, and the type of ML and height of patients were obtained with the assistant physician. Peripheral blood samples were collected for extraction of genomic DNA. The 21 exons that comprise the GNPTAB gene and their respective flanking regions were amplified from the specific sequences of primers designed for this study. The sequence of the GNPTAB gene used as reference for sequencing was GenBank NM_024312.3. **Results:** As a result of the strategy used, it was possible to identify both pathogenic mutations in 6/13 patients and only one pathogenic mutation in five patients. In two patients, both with MLIII, no pathogenic mutations were identified. At least one non-pathogenic variant was found in all patients, and the most frequently found was c.-41-39delGGC (16/26 alleles). Mutation c.3503_3504delTC (p.L1168QfsX5) was the most frequently found pathogenic mutation in the sample studied (n= 7/26 alleles). As to codifying and non-codifying regions, four novel mutations are being described herein: c.2269_2273delGAAAC (exon 13), c.2808A>G (exon 14), c.323+20delT (intron 3), and c.365+96_97delGT (intron 4). Nonsense mutations and frameshift mutations seem to be related to the severe phenotype, while inverse mutations are related to

the attenuated phenotype. **Discussion/Conclusions:** This is the first study of its kind conducted in Brazilian patients with ML II/III. As it is described in patients of other populations, the GNPTAB gene presented great allelic heterogeneity, and the most frequently found pathogenic mutation was c.3503_3504delTC. Thus, we suggest the DNA analysis of Brazilian patients with MLII/III to be initiated by testing this mutation. As the strategy applied herein detected 17/26 of the pathogenic alleles, new analyses should be conducted for the patients who present a partial or unestablished genotype, including the analysis of the GNPTG gene. **Key words:** GNPTAB. Mucopolidosis. Lysosomal Disease. M₆P. I-cell Disease. Pseudo-Hurler Polydystrophy.

,

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cultura de fibroblastos de pele de paciente com Mucopolidose mostrando densas inclusões em todo o citoplasma.	15
Figura 2 - Topologia proposta para os precursores das subunidades α/β da fosfotransferase demonstrando os seus dois domínios transmembrana. A seta vermelha indica o sítio de clivagem proposto entre o aminoácido Lisina ⁹²⁹ e Asparagina ⁹³⁰ . Fonte: Braulke et al. (4).	18
Figura 3 - Ilustração da síntese do marcador M ₆ P em enzimas lisossomais. Fonte: Kang et al. (29).	19
Figura 4 - (A) Ideograma do cromossomo 12 mostrando a localização do gene <i>GNPTAB</i> . (B) Ideograma do cromossomo 16 mostrando a localização do gene <i>GNPTG</i> . Fonte: www.ncbi.nlm.nih.gov	21
Figura 5 - (A e B) Fotos de uma paciente com Mucopolidose II. (C e D) Fotos de pacientes com Mucopolidose III. Fonte: Kornfeld & Sly (7).....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alterações em pacientes com ML II e III no HGMD - banco de dados público *	22
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ML – Mucopolidose

EIM – Erro Inato do Metabolismo

DL – Doença Lisossômica

UDP-N-acetilglicosamina: hidrolase lisossomal N-acetil-1-fosfotransferase –
fosfotransferase

EC – *Enzyme Code* (Código de Enzima)

M₆P – Manose-6-Fosfato

MLII – Mucopolidose tipo II

MIM – *Mendelian Inheritance in Man* (Herança Mendeliana em Humanos)

MLIII – Mucopolidose tipo III

MLIIIA – Mucopolidose tipo IIIA

α - alfa

β - beta

γ - gama

MLIIIC – Mucopolidose tipo IIIC

MLIIIB – Mucopolidose tipo IIIB

MLIV – Mucopolidose tipo IV

MLIIα/β – Mucopolidose tipo II alfa/beta

MLIIIα/β – Mucopolidose tipo III alfa-beta

MLIIIγ – Mucopolidose tipo III gama

RNs – Recém-nascidos

LREIM – Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

SGM – Serviço de Genética Médica

MPS - Mucopolissacaridoses

cDNA – DNA complementar

HGMD – *Human Gene Mutation Database* (Bando de dados de Mutações Gênicas em Humanos)

PCR – *Polimerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO	14
2.2 DOENÇAS LISOSSÔMICAS.....	14
2.3 MUCOLIPIDOSES	15
2.3.1 Histórico e classificação das Mucolipidoses	15
2.3.2 Mucolipidoses II e III	16
2.3.3 Características Bioquímicas	17
2.3.4 Características Genéticas.....	20
2.3.5 Características Clínicas	22
2.4 DIAGNÓSTICO	24
2.5 TRATAMENTO.....	25
2.6 JUSTIFICATIVA	26
3 OBJETIVOS	27
3.1 OBJETIVO GERAL.....	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
REFERÊNCIAS	28
ARTIGO VERSÃO EM PORTUGUÊS	32
ARTIGO VERSÃO EM LÍNGUA INGLESA	54
CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
AÇÕES COMPLEMENTARES	76
PERSPECTIVAS	77
CONCLUSÕES	78
ANEXOS	80
Anexo 1 – Artigo em Parceria com Grupo de Pesquisadores Portugueses	80
Anexo 2 – Termos de Consentimento Livre e Esclarecido.....	88
Anexo 3 – Sequências de oligonucleotídeos e temperaturas de anelamento para a amplificação do gene <i>GNPTAB</i>	91

1 INTRODUÇÃO

As Mucopolioses (ML) fazem parte de um grupo de doenças metabólicas denominadas Erros Inatos do Metabolismo (EIM), mais especificamente das doenças lisossômicas (DL). As Mucopolioses (ML) II e III (MIM#252500 e MIM#252600) apresentam herança autossômica recessiva, e são causadas pela deficiência total ou parcial na atividade enzimática da UDP-N-acetilglicosamina: hidrolase lisossomal N-acetil-1-fosfotransferase, comumente conhecida como UDP-GlcNac-1-fosfotransferase (GlcNac-PT ou fosfotransferase; EC 2.7.8.17) (1-3). Esta enzima participa do processo de síntese do marcador manose-6-fosfato (M_6P) responsável pelo direcionamento de hidrolases recém-sintetizadas ao lisossomo (2,4,5). Sem a adição dos resíduos M_6P às hidrolases lisossômicas, o direcionamento correto aos lisossomos é prejudicado, resultando em uma secreção massiva destas hidrolases no espaço extracelular e nos fluídos corpóreos, e uma diminuição da sua concentração no interior de várias células, como nos fibroblastos (4-6). A ausência total da atividade enzimática causa MLII, forma grave, enquanto a atividade parcial causa MLIII, forma atenuada (6-8).

Até o momento não há tratamento específico que reverta o curso natural tanto das MLII/III quanto da maioria das DL (7). A intervenção adotada é essencialmente sintomática e paliativa, baseada no atendimento global ao paciente e no aconselhamento genético (1,9). Desta forma, o conhecimento da variabilidade genética humana associada ao *GNPTAB* poderá contribuir para um maior conhecimento sobre a dinâmica de direcionamento das enzimas lisossômicas, através da via M_6P ou pela via alternativa, e para o avanço no tratamento das ML (10).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO

Os EIM são distúrbios geneticamente determinados que afetam a síntese, degradação, atividade ou transporte de proteínas importantes para o funcionamento normal do organismo (11). Eles compreendem aproximadamente 500 doenças, sendo a maioria de herança autossômica recessiva e individualmente raras (11,12). Em geral, as manifestações clínicas são precoces e graves (11). O diagnóstico é feito com base na anamnese, exame físico e, na maioria dos casos, por meio da medida da atividade enzimática da enzima deficiente (13).

2.2 DOENÇAS LISOSSÔMICAS

Os lisossomos são organelas que contêm numerosas hidrolases ácidas cuja função é a degradação de substratos como proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos, sulfatos, fosfatos e carboidratos complexos (14). Além disso, os lisossomos possuem outras funções como, por exemplo, a exocitose regulada de cálcio, importante para o reparo da membrana (9).

Doenças lisossômicas (DL) são doenças, geralmente de herança autossômica recessiva, que compreendem um grupo de mais de 50 doenças genéticas (14). Estas doenças ocorrem quando uma ou várias enzimas lisossomais, especialmente as hidrolases catabólicas, estão deficientes. Nestes casos, o substrato da enzima afetada não é degradado, acumulando-se no organismo (15). Muitas destas doenças são decorrentes de defeitos nas hidrolases; no entanto, os defeitos de co-ativadores de enzimas, de transportadores de membrana, ou defeitos tendo como alvo os mecanismos de localização de proteínas para o lisossomo e/ou o tráfego vesicular intracelular, também podem causar DL (9).

2.3 MUCOLIPIDOSES

2.3.1 Histórico e classificação das Mucopolisacarídeos

O termo Mucopolisacarídeo foi introduzido em 1970 por Spranger e Wiedmann para descrever as condições que apresentavam características de Mucopolisacarídeos e Esfingolipídeos (1).

A MLII (MIM#252500) foi primeiramente descrita por Leroy & DeMars em 1967 tendo sido denominada de “Doença das células de inclusão” (I-Cell Disease) devido aos corpos de inclusão que podem ser observados no interior das células de pacientes com esta patologia (Figura 1).



Figura 1 - Cultura de fibroblastos de pele de paciente com Mucopolisacarídeo II mostrando densas inclusões em todo o citoplasma.
Fonte: Kornfeld & Sly (7).

A MLIII (MIM#252600 e MIM#252605) foi identificada posteriormente pelos autores Maroteaux e Lamy em 1966 e Taylor et al. em 1973 como uma doença semelhante, mas na qual os pacientes, em geral, apresentavam fenótipo atenuado. Na época, esta variante foi denominada de Polidistrofia Pseudo-Hurler (1). Estudos de complementação em fibroblastos mostraram a existência de três grupos complementares para ML III: A, B e C (7). O grupo A é o mais comum, o grupo B é raro e o C é incomum. (16). As MLII e MLIIIA são caracterizadas por mutações no

gene que codifica as subunidades α e β , onde reside o domínio catalítico da enzima. A MLIIIC é caracterizada por mutações no gene que codifica a subunidade γ e que pode ser responsável pelo reconhecimento do substrato (17). MLIIIA é o tipo mais leve, em que a atividade enzimática é reduzida, mas não ausente (3). Clinicamente, a MLIIIA e MLIIIC são indistinguíveis, mas bioquimicamente, a MLIIIC é caracterizada por um nível normal de atividade enzimática da fosfotransferase para substrato sintético e atividade reduzida para hidrolase lisossomal fisiológica (3). A MLIIIB é o grupo raro e, assim como a MLIIIA, apresenta atividade enzimática defeituosa para todos os substratos (16). Até o momento, apenas um paciente foi descrito para este subtipo de ML (18).

A MLIV caracteriza-se por ser uma doença lentamente progressiva tendo apenas o gene *MCOLN-1* envolvido na sua fisiopatologia. Entre as características fenotípicas estão o atraso psicomotor severo e a deficiência visual na primeira década de vida, resultante de opacificação da córnea e degeneração da retina. Alguns pacientes podem ainda apresentar neurodegeneração. E, segundo a literatura, 70% dos indivíduos com MLIV são de ascendência judaica (Judeus Ashkenazi) (19).

No estado de Michigan/EUA, em 2007, durante a Segunda Conferência Internacional sobre Glicoproteínas e Doenças Lisossômicas Relacionadas, um grupo de pesquisadores sugeriu uma nova nomenclatura com base nos conhecimentos adquiridos sobre a etiologia molecular das ML. Assim, as MLII e MLIIIA, que apresentam mutações no gene *GNPTAB*, foram classificadas como MLII α/β e MLIII α/β , respectivamente. E a MLIIIC, que apresenta mutações no gene *GNPTG*, foi classificada como MLIII γ (5).

2.3.2 Mucopolidoses II e III

MLII α/β (MIM#252500), MLIII α/β (MIM#252600) e MLIII γ (MIM#252605) são doenças autossômicas recessivas do tráfego de hidrolases lisossômicas causadas pela deficiência total ou parcial da fosfotransferase. Na deficiência desta enzima as hidrolases ácidas não entram nos lisossomos da maioria das células/tecidos, sendo

lançadas no espaço intercelular e nos fluídos corpóreos e tendo, conseqüentemente, a sua atividade diminuída no meio intracelular (4-6,20).

A perda total da atividade enzimática da fosfotransferase causa a MLII α/β , clinicamente mais grave e evidente ao nascimento. Nos pacientes com MLIII α/β ou MLIII γ , uma atividade residual desta enzima é detectável, o início dos sintomas é mais tardio e a progressão da doença, mais lenta (1,5,6).

De acordo com informações do site *Gene Clinics* (21) as estimativas de incidência para as Mucopolioses estão entre 2.5×10^{-6} e 1×10^{-5} recém-nascidos vivos (RNs), mostrando que a mesma é bastante rara. As estimativas de prevalência destas doenças no mundo também cursam com valores baixos. Conforme estudos, na República Tcheca, a prevalência é de 0,22/100.000 RNs (22), na Holanda, 0,24/100.000 e na Austrália, 0,31/100.000 (23). Em Portugal, Pinto et al. (2004) estimaram uma prevalência de 2,7/100.000 para o norte de Portugal enquanto Coutinho et al. (2010) estimam para Portugal, uma prevalência de 0,16/100.000 RNs. No Brasil, possuímos 30 casos de ML diagnosticados pelo Laboratório de Referência de Erros Inatos do Metabolismo do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (LREIM-HCPA) desde o início do seu funcionamento em 1983, até dezembro de 2009. Considerando a estimativa internacional, acreditamos que o número de pacientes brasileiros com MLII/III seja maior. Nossa hipótese é de que estejam ocorrendo possíveis subdiagnósticos destes casos, devido a semelhanças fenotípicas com outras doenças lisossômicas, como as Mucopolissacaridoses (MPS).

2.3.3 Características Bioquímicas

A fosfotransferase é uma enzima heterohexamérica com peso molecular de 540 kDa, composta por duas cadeias α , duas β e duas γ , tendo sido caracterizada por Bao et al.(1996). As subunidades α e β são codificadas pelo gene *GNPTAB* e a subunidade γ , pelo gene *GNPTG* (2,4,17,24).

O precursor das subunidades α/β , com peso molecular de 144 kDa, contém a porção catalítica da fosfotransferase e sua atividade é dependente da clivagem destas subunidades entre a Lisina⁹²⁹ e a Asparagina⁹³⁰ no exon 14. Acredita-se que

este processamento ocorra pela ação de uma protease ainda desconhecida e localizada no retículo endoplasmático (4,8,20). As subunidades α/β maduras apresentam peso molecular de 105 e 39 kDa, respectivamente (4). A fosfotransferase encontra-se na rede *cis*-Golgi e possui dois domínios transmembrana, como pode ser visto na Figura 1 (4,25)

A porção γ não apresenta domínios transmembrana e acredita-se que esta subunidade tenha a função de reconhecimento de enzimas lisossomais (17). No entanto, Kollmann et al. (2010) salientam que os estudos apresentados até o momento não sustentam a idéia de que a subunidade γ tenha função de reconhecimento geral vinculado a enzimas lisossomais. Estes autores ainda comentam que a capacidade das subunidades γ reconhecerem seletivamente subconjuntos de enzimas lisossomais, quando complexadas às subunidades α e β , não pode ser excluída. Alternativamente, esta subunidade pode facilitar o dobramento apropriado das subunidades α/β ou mantê-las em uma conformação competente para o reconhecimento e ligação desta enzima (4,7,17).

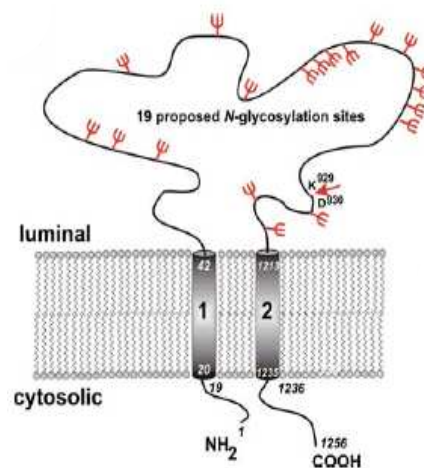


Figura 2 - Topologia proposta para os precursores das subunidades α/β da fosfotransferase demonstrando os seus dois domínios transmembrana. A seta vermelha indica o sítio de clivagem proposto entre o aminoácido Lisina⁹²⁹ e Asparagina⁹³⁰. Fonte: Braulke et al. (4).

Em eucariotos superiores, muitas hidrolases lisossômicas são direcionadas para o lisossomo através da via dependente de M_6P . Antes do direcionamento, as enzimas lisossômicas são modificadas pela adição de M_6P em uma reação de duas etapas (27). O primeiro passo acontece nas cisternas do *cis*-Golgi com a transferência de resíduos α -N-acetilglicosamina-1-fosfato da fosfotransferase para o grupo hidroxila do carbono 6 (C_6) da manose terminal ou penúltima manose de hidrolases lisossômicas que contenham oligossacarídeos com muitas manoses, gerando um fosfodiéster (4,8,27). Em um segundo passo, na rede *trans*-Golgi, os resíduos N-acetilglicosamina são removidos pela N-acetilglicosamina-1-fosfodiéster α -N-acetilglicosaminidase (MIM#607985; EC 3.1.4.45), também chamada de “*uncovering enzyme*” ou fosfodiesterase, expondo os resíduos de M_6P (4,27). A partir desta modificação pós-traducional, as hidrolases são reconhecidas por um dos dois receptores M_6P (MPRs) que medeiam a triagem e o transporte de enzimas lisossômicas pela rede *trans*-Golgi e pela membrana plasmática, dentro de vesículas revestidas por clatrina que, posteriormente, se fundem a compartimentos ácidos pré-lisossômicos (4,7,20,28). O processo pode ser visto na Figura 3.

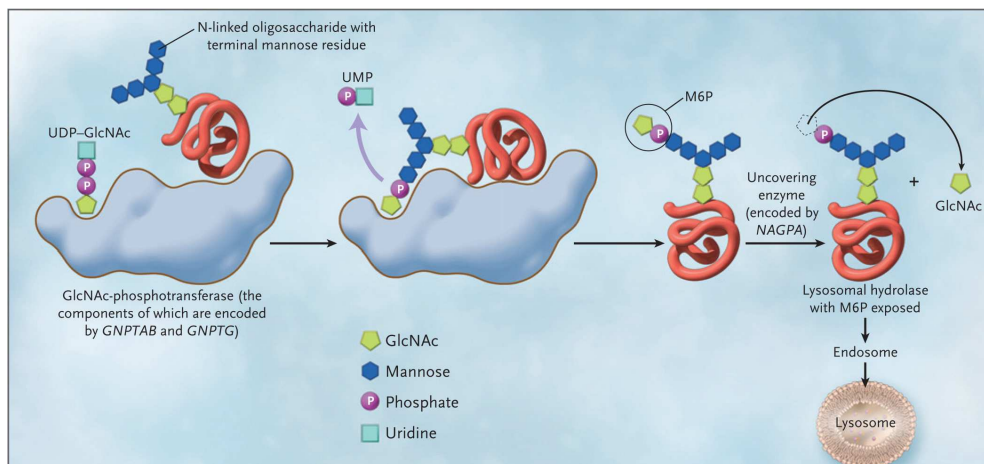


Figura 3 - Ilustração da síntese do marcador M_6P em enzimas lisossômicas.

Fonte: Kang et al. (29).

O reconhecimento de hidrolases lisossômicas pela fosfotransferase é o passo inicial no tráfego de hidrolases lisossômicas (27). Na ausência de direcionamento destas enzimas ao lisossomo, os seus substratos se acumulam resultando no

aparecimento de corpos de inclusão no interior das células. Originalmente foram estes achados que inspiraram o nome da doença como “Doença da célula de inclusão” (18).

Apesar de todas as células e tecidos examinados de pacientes com MLII ou MLIII apresentarem atividade deficiente da fosfotransferase, a deficiência das hidrolases lisossômicas parece ser tecido específica, pois as atividades destas enzimas costumam ser normais em hepatócitos, células de Kupffer, leucócitos, fígado, baço, rim e cérebro. Isto indica a existência de uma via de direcionamento ao lisossomo independente da via M_6P (7). Estudos anteriores com certos tecidos isolados de paciente com ML já demonstraram esta característica, conforme citado por Glickman e Kornfeld (1993). No entanto, estudos com linfoblastos B de pacientes com ML, para internalização de catepsina D, mostraram que a via independente de M_6P é menos eficiente que via dependente de M_6P em linfoblastos normais. Neste mesmo estudo, os autores ainda mostraram que esta internalização de proteínas pela via independente de M_6P é seletiva para hidrolases ácidas (30).

2.3.4 Características Genéticas

O gene *GNPTAB* (MIM#607840) localiza-se no cromossomo 12q23.3, é composto por 21 exons e apresenta um tamanho aproximado de 85 Kb (2,4) (Figura 4). Este gene codifica os precursores das subunidades α e β , gerando uma proteína madura com 1256 aminoácidos, com massa molecular de 144 kDa (2,4). Este gene foi identificado em humanos por Tiede et al. (2005), indicando que as subunidades α e β eram derivadas de um único DNA complementar (cDNA).

O gene *GNPTG* (MIM#607838) localiza-se no cromossomo 16p13.3, é composto por 11 exons e apresenta um tamanho aproximado de 11,13 Kb (Figura 4). Este gene codifica a subunidade γ da enzima, uma proteína madura com 305 aminoácidos, com massa molecular de 34 kDa (4,5).

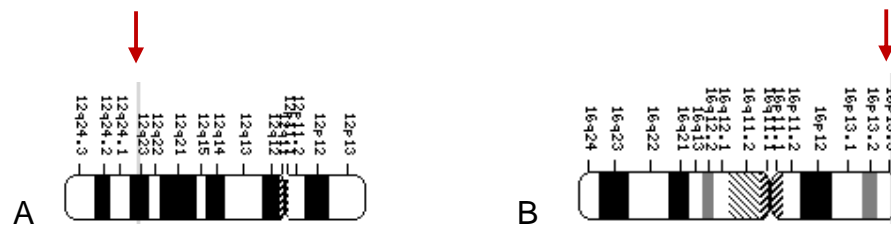


Figura 4 - (A) Ideograma do cromossomo 12 mostrando a localização do gene *GNPTAB*. (B) Ideograma do cromossomo 16 mostrando a localização do gene *GNPTG*. Fonte: www.ncbi.nlm.nih.gov.

Estudos anteriores demonstraram alta heterogeneidade alélica para os genes *GNPTAB* e *GNPTG*, havendo poucas mutações recorrentes (2,8,18,20,31). Algumas destas mutações podem ser encontradas no *Human Gene Mutation Database* (HGMD) (32) e estão agrupados na Tabela 1.

O estudo de Coutinho et al. (2010) sobre a origem da deleção comum c.3503_3504delTC e no qual três dos nossos pacientes integraram a amostragem, demonstrou que o haplótipo composto pelos marcadores c.-41-39delGGC, c.18G>A, c.1932A>G e D12S1607 está em forte desequilíbrio de ligação com c.3503_3504delTC, indicando que esta deleção ocorreu pela primeira vez em um haplótipo fundador.

Tabela 1 - Alterações em pacientes com ML II e III no HGMD - banco de dados público *

Alteração na proteína	Fenótipo apresentado pelo paciente	Referência
p.K4Q	ML IIIA	Kudo (2006) Am J Hum Genet 78, 451
p.S399F	ML III	Bargal (2006) Mol Genet Metab 88, 359
p.N407A	ML III	Tiede (2005) Am J Med Genet A 137*, 235
p.R587P	ML IIIA	Lam (2007) Clin Chim Acta 376, 250
p.K1236M	ML II	Tiede (2006) Hum Mutat 27, 830
p.Q104X	ML II	Paik (2005) Hum Mutat 26, 308
p.Q278X	ML IIIA	Kudo (2006) Am J Hum Genet 78, 451
p.Q845X	ML II	Tiede (2005) Nat Med 11, 1109
p.W894X	ML II	Paik (2005) Hum Mutat 26, 308
p.S1058X	ML II	Paik (2005) Hum Mutat 26, 308
p.R1189X	ML II	Paik (2005) Hum Mutat 26, 308
p.R1205X	ML II	Tiede (2006) Nat Med 11, 1109
p.R1112fsX2	ML II	Bargal (2006) Mol Genet Metab 88, 359
p.R68fsX8	ML II	Bargal (2006) Mol Genet Metab 88, 359
p.D190fsX211	ML IIIA	Kudo (2006) Am J Hum Genet 78, 451
p.P1084fsX1085	ML IIIA	Kudo (2006) Am J Hum Genet 78, 451
p.W1201fsX1202	ML IIIA	Kudo (2006) Am J Hum Genet 78, 451
Skipping of exon 17	ML II	Tiede (2005) Nat Med 11, 1109
-	ML III	Paik (2005) Hum Mutat 26, 308
p.L730KfsX737	ML II	Kudo (2006) Am J Hum Genet 78, 451
p.E858EfsX3	ML IIIA	Paik (2005) Hum Mutat 26, 308
p.H1158QfsX15	ML II	Paik (2005) Hum Mutat 26, 308
p.P1085RfsX6	ML II	Tiede (2005) Nat Med 11, 1109
p.M972IfsX3	ML II	Bargal (2006) Mol Genet Metab 88, 359
p.E542AfsX4	ML II	Tiede (2005) Nat Med 11, 1109
p.G1049RfsX16	ML II	Tiede (2005) Nat Med 11, 1109
p.R1189QfsX9	ML II	Tiede (2005) Nat Med 11, 1109
p.S581IfsX7	MLII	Kudo (2006) Am J Hum Genet 78, 451
p.Y1079LfsX2	ML II	Kudo (2006) Am J Hum Genet 78, 451
p.T206QfsX6	ML II	Kudo (2006) Am J Hum Genet 78, 451
p.T284LfsX4	ML II	Kudo (2006) Am J Hum Genet 78, 451
p.C528VfsX18	ML II	Kudo (2006) Am J Hum Genet 78, 451
p.L1168QfsX5	ML II	Kudo (2006) Am J Hum Genet 78, 451
p.S685LfsX60	ML II	Kudo (2006) Am J Hum Genet 78, 451
p.D760EfsX11	ML IIIA?	Lam (2007) Clin Chim Acta 376, 250

*Não inclui todas as mutações descritas.

2.3.5 Características Clínicas

As manifestações clínicas na MLII α / β são perceptíveis ao nascimento, progredindo para o óbito ainda na infância. O crescimento pós-natal é limitado, deixando de acontecer no segundo ano de vida. Contraturas articulares, pele espessa, face grosseira, gengiva hipertrófica, alterações ósseas no tórax, nos pés, na coluna, nos ossos longos e luxação no quadril podem estar presentes em

conjunto ou não. Em geral, o comprometimento cardíaco destas crianças parece dever-se ao espessamento e à insuficiência da válvula mitral e, mais raramente, ao da válvula aórtica. A causa mais comum de morte é a insuficiência respiratória devido ao enrijecimento da caixa torácica e ao espessamento progressivo da mucosa que estreita as vias aéreas (7,33).

Nas MLIII α/β e MLIII γ o quadro clínico é menos grave e o início dos sintomas é mais tardio, com progressão mais lenta. A rigidez articular está presente, as dismorfias faciais são menos graves, a taxa de crescimento é lenta e a inteligência pode ser normal, mas a maioria das crianças apresenta dificuldade de aprendizado e isto pode estar relacionado com a redução da acuidade auditiva destes pacientes (17,34,35). Assim como na MLII α/β , as complicações cardiorespiratórias são as causas mais comuns de morte no início da vida adulta e na meia idade. No entanto, podem sobreviver até a oitava década (35).

A variabilidade dos sinais/sintomas clínicos nas Mucopolidroses corresponde aos diferentes níveis de atividade residual da fosfotransferase, resultando em amplo espectro de gravidade (Figura 5) (15).

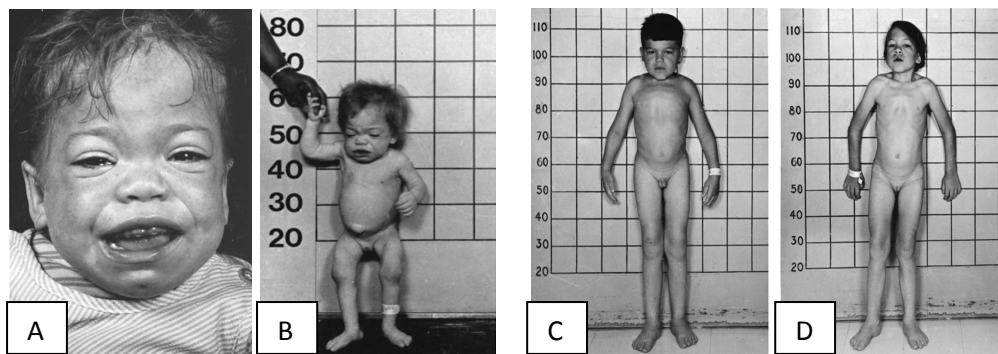


Figura 5 - (A e B) Fotos de uma paciente com Mucopolidrose II. (C e D) Fotos de pacientes com Mucopolidrose III. Fonte: Kornfeld & Sly (7).

2.4 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico das Mucopolidoses inicia com a suspeita clínica. O exame físico é seguido de testes laboratoriais que verificam a atividade de enzimas lisossomais no plasma e a atividade enzimática da fosfotransferase em leucócitos ou fibroblastos. Aceita-se como diagnóstico um aumento de 10 a 20 vezes o valor de referência de enzimas lisossomais no plasma e atividade reduzida em fibroblastos (16,17,33,35,36). Na ausência destas amostras, também é possível realizar a análise de algumas enzimas a partir de amostra de sangue impregnado em papel filtro (37).

2.5 TRATAMENTO

Não há tratamento específico que possa mudar significativamente a história natural das ML, apesar de já ser possível realizar o diagnóstico pré-natal (15).

Estudos com um número limitado de pacientes com MLII α/β têm descrito o transplante de medula óssea como benéfico no que diz respeito à melhoria no desenvolvimento neuropsicomotor e nas complicações cardiopulmonares, embora os mecanismos de ação permaneçam obscuros. E em pacientes com MLIII, o tratamento com pamidronato bisfosfonado tem sido relatado para redução de dor óssea e para o melhoramento da mobilidade (15).

Em geral a intervenção adotada é, essencialmente, sintomática e paliativa, baseada no atendimento global ao paciente e no aconselhamento genético (9,33,35,36). Assim, faz-se necessário uma abordagem de equipe multidisciplinar envolvendo geneticista, ortopedista, gastroenterologista, pneumologista, oftalmologista, reumatologista, oncologista (transplante de células hematopoiéticas), fisioterapeuta, terapeuta ocupacional, fonoaudiólogo, assistente social, nutricionista, professores e psicólogo. O apoio psicológico é fundamental para o paciente e para a família e os grupos de apoio podem proporcionar um fórum de grande valor para o suporte emocional além de conselhos práticos nascidos da experiência (14).

2.6 JUSTIFICATIVA

Este estudo deverá gerar informações inéditas sobre o perfil genético das MLII e III no Brasil e possibilitará o estudo de associação dos perfis clínico-genético e genético-bioquímico, ainda não realizado em nossa população. Futuramente estas informações poderão ser utilizadas para o entendimento e tratamento não somente das ML, mas também de outras DL.

O Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM-HCPA) possui longa tradição na área de DL e possui uma equipe de profissionais qualificados que realizam atendimento multidisciplinar a estes pacientes e o LREIM-HCPA é o laboratório brasileiro de referência para o diagnóstico de EIM. No entanto, a investigação molecular para esta doença ainda não se encontra disponível em serviços públicos ou privados, como teste assistencial ou procedimento ligado à pesquisa. Desta forma, estes fatores tornam o nosso trabalho pioneiro e, certamente, os resultados irão contribuir para o diagnóstico complementar dos pacientes com MLII e III e para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nesta doença.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Identificar as mutações no gene *GNPTAB* presentes em pacientes brasileiros com MLII e MLIII, por meio de sequenciamento direto de DNA genômico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Delinear os aspectos genéticos das MLII e III no Brasil.
- Estudar a associação genótipo-fenótipo neste grupo de pacientes.

REFERÊNCIAS

1. Brooks D, Turner C, Muller V, Hopwood J, Meikle P. I-cell disease. In Barranger JA, Cabrera-Salazar MA. Lysosomal storage disease. New York: Springer; 2007. p.529-36.
2. Tiede S, Storch S, Lübke T, Henrissat B, Bargal R, Raas-Rothschild A, Braulke T. Mucopolidosis II is caused by mutations in *GNPTA* encoding the α/β GlcNac-1-phosphotransferase. *Nat Med* 2005 (10): 1109-12.
3. Zarghooni M, Dittakavi SS. Molecular analysis of cell lines from patients with mucopolidosis II and mucopolidosis III. *Am J Med Genet* 2009 149A(12): 2753-61.
4. Braulke T, Pohl S, Storch S. Molecular analysis of the GlcNac-1-phosphotransferase. *J Inherit Metab Dis* 2008 (31): 253-57.
5. Cathey SS, Kudo M, Tiede S, Raas-Rothschild A, Braulke T, Beck M, Taylor HA, Canfield WM, Leroy JG, Neufeld EF, McKusick VA. Molecular order in mucopolidosis II and III nomenclature. *Am J Med Genet* 2008 149A(4): 512-3.
6. Encarnação M, Lacerda L, Costa R, Prata MJ, Coutinho MF, Ribeiro H, Lopes L, Pineda M, Ignatus J, Galvez H, Mustonen A, Vieira P, Lima MR, Alves S. Molecular analysis of the *GNPTAB* and *GNPTG* gene in 13 patients with mucopolidosis type II or type III – identification of eight novel mutations. *Clin Genet* 2009 (76): 76-84.
7. Kornfeld S, Sly W. I-cell disease and pseudo-hurler polydystrophy: Disorders of lysosomal enzyme phosphorylation and localization. In: Scriver CH, Beaudet A, Sly W, Valle D (Eds.): *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. New York, McGraw-Hill; 2001. p. 3469-82.
8. Cathey SS, Leroy JG, Wood T, Eaves K, Simensen RJ, Kudo M, Stevenson RE, Friez, MJ. Phenotype and genotype in mucopolidosis II and III alpha/beta: a study of 61 probands. *J Med Genet* 2010 (47): 38-48.
9. Vellodi A. Lysosomal storage disorders. *Br J Haematol* 2005 (128): 413-431.

10. Beutler E, Grabowski GA. Goucher Disease. In: Scriver CH, Beaudet A, Sly W, Valle D (Eds.): The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York, McGraw-Hill, 2001; 3635-68.
11. Childs B, Valle D, Jimenez-Sanchez G. The inborn error and biochemical individuality. In: Scriver CH, Beaudet A, Sly W, Valle D (Eds.): The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York, McGraw-Hill, 2001; 155-66.
12. Brustolin S, Souza C, Puga AC, Refosco L, Pires R, Peres R, et al. Assessment of a pioneer metabolic information service in Brazil. *Comm Genet* 2006; 9(2):127-32.
13. Souza CFM, Schwartz IVD, Netto CBO, Giugliani R. Erros inatos do metabolismo. In: Lopes AC e cols: Diagnóstico e tratamento. São Paulo, Manole, 2007; p.281-93.
14. Wilcox, WR. Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care. *J Pediatr* 2004 (144):S3-S14.
15. Dierks T, Schlotawa L, Frese M-A, Radhakrishnan K, von Figura K, Schmidt B. Molecular basis of multiple sulfatase deficiency, mucopolipidosis II/III and Niemann-Pick C1 disease – lysosomal storage disorders caused by defect of non-lysosomal proteins. *Biochem et Biophys Acta* 2009 (1793):710-25.
16. Nyhan WL, Barshop BA, Ozand PT. Atlas of metabolic disease. London, Hodden Arnold, 2005; p.553-565.
17. Raas-Rothschild A, Cormier-Daire V, Bao M, Genin E, Salomon R, Brewer K, Zeigler M, Mandel H, Toth S, Roe B, Munnich A, Canfield WM. Molecular basis of variant pseudo-Hurler polydystrophy (mucopolipidosis IIIC). *J Clin Invest* 2000 (105):673-681.
18. Paik KH, Song SM, Ki CS, Yu HW, Kim JS, Min KH, et al. Identification of mutation in the *GNPTA* (MGC4170) gene coding for GlcNac-phosphotransferase alpha/beta subunits in Korean patients with mucopolipidosis type II or type IIIA. *Hum Mutat* 2005; 26(4):308-14.

19. Schiffmann R, Slaugenhaupt S, Goldin E. Mucopolidosis IV. In: Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephen K (Eds.): Gene Reviews 2010. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/book/NBK1116/. Último acesso em: 20/06/2010.
20. Bargal R, Zeigler M, Abu-Lidden B, Zuri V, Mandel H, Ben Neriah Z. et al. When mucopolidosis III meets mucopolidosis II: *GNPTA* gene mutations in 24 patients. *Mol Genet Metab* 2006 (88):359-63.
21. Gene Clinics (2011). <http://www.geneclinics.org>. Último acesso: 10/01/2011.
22. Poupètová H, Ledvinova J, Berná L, Dvůráková L, Kozich V, Elleder M. The birth prevalence of lysosomal storage disorders in the Czech Republic: comparison with data in different populations. *J Inher Metab Dis* 2010 (33):387-96.
23. Pinto R, Caseiro C, Lemos M, Lopes L, Fontes A, Ribeiro H, et al. Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur J Hum Genet* 2004; 12(2):87-92.
24. Bao M, Elmendorf BJ, Booth L, Drake RR, Canfield WM. Bovine UDP-N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. II. Enzymatic characterization and identification of the catalytic subunit. *J Biol Chem* 1996; 271 (49):31446-51.
25. Tappino B, Chuzhanova NA, Regis S, Dardis A, Corsolini F, Stroppiano M, et al. Molecular characterization of 22 novel UDP-N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase α - and β -subunit (*GNPTAB*) gene mutations causing mucopolidosis types II α / β and III α / β in 46 patients. *Hum Mutat* 2009; 30(11):E956-73.
26. Kollmann K, Pohl S, Marschner K, Encarnação M, Sakwa I, Tiede S, et al. Mannose phosphorylation in health and disease. *Eur J Cell Biol* 2010; 89(1):117-23.
27. Kudo M, Bao M, D'Souza A, Ying F, Pan H, Roe BA, et al. The alpha- and beta-subunits of the human UDP-N-acetylglucosamine: lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase [corrected] are encoded by a single cDNA. *J Biol Chem* 2005; 280(43):36141-9.
28. Tiede S, Cantz M, Spranger J, Bräulke T. Missense mutation in the N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase gene (*GNPTA*) in patient with mucopolidosis II induces changes in the size and cellular distribution of *GNPTG*. *Hum Mutat* 2006; 27(8):830-1.

29. Kang C, Riazuddin S, Mundorff J, Krasnewish D, Friedman P, Mullikin JC. et al. Mutations in the lysosomal enzyme-targeting pathway and persistent stuttering. *N Engl J Med* 2010; 362(8):677-85.
30. Glickmann JN, Kornfeld S. Mannose-6-phosphate-independent targeting of lysosomal enzymes in I-cell disease B lymphoblasts. *J Cell Biol* 1993; 123(1):99-108.
31. David-Vizcarra G, Briody J, Ault J, Fietz M, Fletcher J, Savarirayan R, et al. The natural history and osteodystrophy of mucopolipidosis types II and III. *J Paediatr Child Health* 2010; 46(6):316-22.
32. Human Gene Mutation Database (HGMD). Disponível em: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/>. Último acesso: 13/11/2010.
33. Leroy JG, Cathey SS, Friez MJ. Mucopolipidosis II. In: Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephen K, (Eds.): *Gene Reviews*. Disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov/book/NBK1116/. Último acesso: 28/01/2010.
34. Robinson C, Baker N, Noble J, King A, David G, Sillence D, et al. The osteodystrophy of mucopolipidosis type III and the effects of intravenous pamidronate treatment. *J Inher Metab Dis* 2002; 25(8):681-93.
35. Leroy JG, Cathey SS, Friez MJ. Mucopolipidosis III alpha/beta. In: Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephen K, (Eds.): *Gene Reviews* 2008. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/book/NBK1116/. Último acesso: 28/01/2010.
36. Raas-Rothschilds A, Spiegel R. Mucopolipidosis III gamma. In: Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephen K, (Eds.): *Gene Reviews* 2008. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/book/NBK1116/. Último acesso: 28/01/2010.
37. Chamoles NA, Blanco M, Gaggioni D. Diagnosis of alpha-L-iduronidase deficiency in dried blood spots on filter paper: the possibility of newborn diagnosis. *Clin Chem* 2001; 47(4):780-1.

ARTIGO VERSÃO EM PORTUGUÊS

Artigo a ser submetido, em língua inglesa, a Molecular Genetics and Metabolism.

Qualis A2 para Medicina I e II (ano base: 2008)

Fator de Impacto 2,897 (ano base: 2009)

Título**Mucopolidose II e III no Brasil: o gene *GNPTAB* também mostrou ampla heterogeneidade alélica****Autores e Afiliações**

Cury, G.K.^a, Matte, U.^{b,c,d}, Artigalás, O.^c, Alegria T.^c, Burin, M.^{b,e}, Ribeiro, E.M.^f, Lourenço, C.M.^g, Kim, C.A.^h, Valadares, E.R.ⁱ, Schwartz, I.V.D^{a,b,c,d}

^a Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil (gcury1@hotmail.com; ischwartz@hcpa.ufrgs.br);

^b Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil (umatte@hcpa.ufrgs.br; mburin@hcpa.ufrs.br; ischwartz@hcpa.ufrs.br);

^c Departamento de Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil (umatte@hcpa.ufrgs.br; artigalas@gmail.com; tacianealegra@gmail.com; ischwartz@hcpa.ufrs.br);

^d Centro de Terapia Gênica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil (umatte@hcpa.ufrgs.br; ischwartz@hcpa.ufrgs.br);

^e Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil (mburin@hcpa.ufrgs.br);

^f Associação Cearense de Doenças Genética, Ceará, Brasil (erlaneribeiro@yahoo.com.br);

^g Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil (charlesgenetica@gmail.com);

^h Unidade de Genética, Instituto da Criança da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil (chong.kim@icr.usp.br);

ⁱ Departamento de Propedêutica Complementar. Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil (eugeniavaladares@gmail.com).

Autor correspondente:

Prof^a Dr^a Ida Vanessa Doederlein Schwartz

Serviço de Genética Médica

Rua Ramiro Barcelos, 2350

90035-903 Porto Alegre, RS, Brasil

email: ischwartz@hcpa.ufrgs.br

Resumo

As Mucopolidioses II e III (MLII e MLIII) são doenças lisossômicas raras causadas pela deficiência da fosfotransferase, enzima responsável pela síntese do M₆P, marcador que direciona as enzimas lisossômicas ao lisossomo. O gene *GNPTAB* codifica as subunidades α e β , enquanto o gene *GNPTG* codifica a subunidade γ desta enzima. **Objetivos:** Identificar as mutações no gene *GNPTAB* presentes em pacientes brasileiros com MLII e MLIII. **Metodologia:** O sequenciamento do gene *GNPTAB* foi realizado em amostras de DNAg, extraídas de sangue periférico, de pacientes com MLII/III identificados a partir do banco de diagnósticos do Laboratório de Referência para Erros Inatos do Metabolismo do HCPA, Brasil. **Resultados:** Foram incluídos no estudo 13 pacientes não relacionados, filhos de casais não-consanguíneos, oriundos de várias regiões do Brasil. Ambas as mutações patogênicas foram identificadas em 6/13 pacientes; em cinco pacientes, apenas uma mutação foi identificada. Dois pacientes com MLIII não apresentaram mutações patogênicas no gene *GNPTAB*. A mutação c.3503_3504delTC foi a mutação patogênica mais frequente (n=7/26 alelos), sendo que quatro novas mutações estão sendo descritas: c.2269_2273delGAAAC, c.2808A>G, c.323+20delT e c.365+96_97delGT. **Discussão/Conclusões:** Este é o primeiro estudo do gênero realizado em pacientes brasileiros com ML II/III. Os nossos achados confirmam que o gene *GNPTAB* apresenta grande heterogeneidade alélica, e sugerem que a triagem de mutações neste gene, em pacientes brasileiros, deva ser iniciada pelo exon 19. Novas análises deverão ser realizadas para os pacientes que apresentam o genótipo parcialmente ou não estabelecido, incluindo a análise do *GNPTG*.

Palavras-chaves: *GNPTAB*; Mucopolidiose; Doenças Lisossômicas; M₆P; Doença de Células I; Polidistrofia Pseudo-Hurler

Introdução

As Mucopolidoses tipo II (MLII; OMIM#252500) e tipo III (MLIII; OMIM#252600) são doenças lisossômicas, de herança autossômica recessiva, causadas pela atividade deficiente da UDP-N-acetilglicosamina: hidrolase lisossomal N-acetil-1-fosfotransferase (UDP-GlcNac-fosfotransferase, GlcNac-PT ou fosfotransferase; EC 2.7.8.17) [1-3]. A fosfotransferase participa do processo de síntese do marcador manose-6-fosfato (M_6P) responsável pelo direcionamento de hidrolases lisossômicas ao lisossomo [2,4,5]. Na ausência dos resíduos M_6P , o direcionamento correto das hidrolases lisossômicas é prejudicado, resultando em secreção massiva destas enzimas no espaço extracelular e nos fluídos corpóreos, e diminuição da sua atividade em células como os fibroblastos [4-6]. A MLII é a forma mais grave, frequentemente aparente ao nascimento e de rápida progressão, e que leva ao óbito ainda na primeira década de vida por complicações cardiorrespiratórias. Na MLIII, a progressão da doença é mais lenta e o paciente pode sobreviver até a oitava década de vida [6-8]. Embora as MLII e III correspondam aos fenótipos clássicos extremos associados à deficiência de fosfotransferase, são descritos pacientes com manifestações clínicas intermediárias a estes [8].

A fosfotransferase é uma proteína hexamérica composta por duas subunidades α , duas β e duas γ [2,9], onde as subunidades α e β são codificadas pelo gene *GNPTAB*, localizado no cromossomo 12q23.3, e a subunidade γ é codificada pelo gene *GNPTG*, localizado no cromossomo 16p13.3 [3,5,6,10]. Pacientes homozigotos ou heterozigotos compostos para mutações em *GNPTAB* ($ML\alpha/\beta$) apresentam fenótipo compatível com MLII ou MLIII, enquanto homozigotos ou heterozigotos para mutações em *GNPTG* ($ML\gamma$) apresentam fenótipo compatível com MLIII [6,8,11-13].

Este estudo teve como objetivo principal analisar o gene *GNPTAB* em pacientes brasileiros com MLII e III.

Metodologia

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brasil.

Os pacientes com diagnóstico bioquímico de ML II/III foram identificados a partir do grupo de pacientes (aproximadamente 40.000) investigados para confirmação ou exclusão do diagnóstico de erros inatos do metabolismo (EIM) pelo Laboratório de Referência para EIM do HCPA (LREIM-HCPA), Brasil, de 1983 (data de início do funcionamento do laboratório) até 2009. O LREIM-HCPA é laboratório de referência nacional para o diagnóstico de doenças lisossômicas, e o seu banco de diagnósticos provavelmente inclui a maioria dos casos de MLII/III diagnosticados no Brasil. O protocolo de diagnóstico bioquímico das MLII/II aplicado pelo LREIM-HCPA inclui a verificação, em plasma, da presença de Arilsulfatase A (ARSA; EC 3.1.6.8) e da medida da atividade de várias hidrolases lisossômicas, incluindo α -L-Iduronidase (IDUA; EC 3.2.1.76), Iduronato-sulfatase (IDS; EC 3.1.6.12), β -Glicuronidase (GUSB; EC 3.2.1.31) e β -Hexosaminidase (EC 3.2.1.30). Sempre que existe amostra disponível, também é realizada a medida da atividade de tais enzimas em fibroblastos. Se somente amostra em papel-filtro é disponível, são pesquisadas, entre outras, as atividades da IDS, GUSB e Hexosaminidases.

No período analisado, o LREIM-HCPA diagnosticou 30 pacientes brasileiros com MLII/III, provenientes de todas as regiões brasileiras. Na maioria dos casos, havia suspeita prévia de mucopolissacaridose (MPS), a qual havia sido descartada por meio de análise urinária ou enzimática (dados não mostrados). Os médicos responsáveis por estes 30 pacientes foram contatados para verificação da possibilidade de inclusão dos mesmos no estudo. Caso houvesse concordância por parte dos pacientes/familiares, um termo de consentimento livre e esclarecido era assinado, e amostra de sangue total, para extração de DNAg, era coletada. Informações clínicas (idade atual, idade ao diagnóstico, sexo, presença de consanguinidade parental) foram obtidas a partir do banco de dados do LREIM-HCPA, enquanto que o tipo de ML e a altura atual foram informados pelo médico assistente. Sempre que possível, também era obtida amostra de DNAg dos pais para confirmação da presença das mutações encontradas no probando.

Os 21 éxons que compreendem o gene *GNPTAB*, bem como as regiões de junção intron-exon e parte das regiões 5' e 3' não traduzidas, foram amplificados a partir de sequências específicas de oligonucleotídeos projetados para este trabalho. Para as amplificações por reação em cadeia da polimerase (PCR) foram utilizados 50ng de DNAg, 16 pmol de cada oligonucleotídeo, 0,6 mM de dNTPs, 2,4 mM MgCl₂, 1x de Tampão de reação e 1 unidade de *taq* DNA polimerase. As temperaturas de anelamento e as sequências dos oligonucleotídeos serão disponibilizadas caso haja interesse. O sequenciamento das amostras foi realizado utilizando o sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyser* (Applied Biosystems). A sequência do gene *GNPTAB* utilizada como referência foi a GenBank NM_024312.3. Cada mutação encontrada foi confirmada com um novo sequenciamento realizado a partir de um novo produto de amplificação e com o oligonucleotídeo de sentido inverso ao utilizado na primeira etapa. A análise *in silico* do potencial efeito de mutações com sentido contrário foi feita por meio do PolyPhen2 (Polymorphism Phenotyping) [14] e do SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) [15].

Resultados

Treze pacientes com ML II/III, não-relacionados, foram incluídos no estudo (Tabelas 1 e 2; pacientes A a M). Os resultados encontrados estão descritos na Tabela 3 (mutações patogênicas e associação genótipo-fenótipo) e na Tabela 4 (mutações não-patogênicas). A Figura 1 mostra a localização das mutações encontradas em região codificante.

Foram identificadas ambas as mutações patogênicas em 6/13 pacientes, e apenas uma mutação patogênica em cinco pacientes. Em dois pacientes, ambos com MLIII, não foram identificadas mutações patogênicas (Tabela 3). Em todos os pacientes foi encontrada pelo menos uma variante não-patogênica, sendo a mais frequente a c.-41-39delGGC (n= 16/26 alelos) (Tabela 4). A mutação c.3503_3504delTC [p.L1168QfsX5], localizada no exon 19, foi a mais frequente mutação patogênica encontrada na amostra estudada (n= 7/26 alelos) (Tabela 3). Considerando regiões codificantes e não-codificantes, quatro novas mutações estão

sendo descritas: c.2269_2273delGAAAC, c.2808A>G, c.323+20delT e c.365+96_97delGT (Tabelas 3 e 4; Figura 1).

Discussão

Este é o primeiro estudo que descreve a variação patogênica/não-patogênica de *GNPTAB* em pacientes brasileiros com MLII/III. A análise realizada confirmou, assim como é descrito para outras populações, que esse gene apresenta grande heterogeneidade alélica, havendo poucas mutações recorrentes, e que c.3503_3504delTC é a mutação patogênica com maior prevalência [2,8,11,16,17]. Além disso, quatro novas variantes estão sendo descritas.

O número de pacientes incluídos (n= 13) é altamente significativo, considerando que todos são oriundos de uma mesma população e que as estimativas de incidência da doença (entre 2.5/1.000.000 e 1/100.000 recém-nascidos vivos) [18] mostram que a mesma é bastante rara. Estudos semelhantes, mas com maior tamanho amostral, incluem pacientes oriundos de diferentes países/etnias ou com alto grau de consanguinidade/endogamia. Por exemplo, Tappino et al. [12], investigaram 46 pacientes originários da Itália (n=37), Argentina (n=4), Bulgária (n=1), Hungria (n=1), Paquistão (n=2) e Bangladesh (n=1). Bargal et al. [11], por sua vez, investigaram 24 pacientes; destes, 16 eram filhos de casais consanguíneos de origem árabe-muçulmana advindos de Israel e da Palestina, três eram de origem turca, três eram de origem irlandesa e um era francês. Já Plante et al. [19], investigaram 16 famílias com MLII na província de Quebec/Canadá, local que apresenta maior incidência mundial dessa doença, e encontraram evidências para a existência de efeito fundador.

A obtenção de amostras, em nosso estudo, para um número significativo de pacientes, só foi possível porque o LREIM-HCPA é um centro de referência nacional para o diagnóstico de doenças lisossômicas. Infelizmente, nem todos os pacientes incluídos apresentavam investigação bioquímica realizada em plasma e em fibroblastos, o que teria sido mais adequado. Uma das pacientes, inclusive, havia sido investigada somente em papel-filtro (paciente H), mas a análise de *GNPTAB* confirmou o seu diagnóstico de ML α / β ; a possibilidade de identificação de pacientes

com MLII/III, por meio de ensaios enzimáticos realizados em papel-filtro, foi descrita pela primeira vez por Chamoles et al. [20]. É importante frisar, entretanto, que todos os pacientes apresentavam fenótipo clínico compatível com MLII/III e que o diagnóstico de MPS já havia sido excluído para todos eles.

Gene GNPTAB

A estratégia utilizada no presente estudo foi capaz de identificar 17/26 alelos patogênicos (aproximadamente 65%) da amostra. Excluindo os dois pacientes MLIII sem mutações patogênicas identificadas (e que, portanto, podem apresentar mutações em *GNPTG*), a sensibilidade da estratégia aumentaria para 17/22 alelos (aproximadamente 80%), taxa inferior àquela descrita na literatura (aproximadamente 95%) [18]. Consideramos que esta diferença seja possivelmente secundária a uma maior frequência de alelos, em nossa amostra, com duplicações completas do gene, ou que não tenham sido identificados por estarem em uma área da região promotora ou da região 3'UTR não contempladas pelos nossos oligonucleotídeos, o que deverá ser averiguado em estudos futuros. A hipótese de deleção completa de um dos alelos não se aplica para estes casos porque eles apresentam alterações em heterozigose. A paciente H é a única paciente da nossa amostra que é homozigota para todos os marcadores avaliados, embora consanguinidade parental não seja relatada; neste caso, a possibilidade de existência de alelo com deleção completa do gene deverá ser excluída.

A mutação patogênica mais frequentemente encontrada em nosso estudo foi a c.3503_3504delTC, presente em homozigose em um paciente com MLII e em heterozigose em outros cinco pacientes (MLII=2; MLIII=1; tipo não-definido: 2). Entretanto, essa mutação parece apresentar uma prevalência menor em nossa amostra (aproximadamente 27% dos alelos) do que aquela descrita para outras populações. Bargal et al. [11], por exemplo, encontraram esta mesma mutação em homozigose para 11/24 pacientes, sendo 10 pacientes filhos de casais consanguíneos, a maioria de origem árabe-muçulmana e todos com MLII. Encarnação et al. [6] encontraram esta microdeleção em cinco pacientes MLII (n=9/18 alelos), sendo quatro pacientes homozigotos para esta mutação. Tappino et al.

[12] identificaram esta mutação em 47/92 alelos, tendo sido encontrada em homozigose para 14 pacientes MLII, a maioria italianos e filhos de casais não consanguíneos. A c.3503_3504delTC foi a única mutação patogênica identificada na amostra estudada por Plante et al. [19].

Três dos nossos pacientes com a mutação c.3503_3504delTC (pacientes E, F e I) foram incluídos no estudo de haplótipos realizado por Coutinho et al. [21]. Neste estudo foi verificado que a região que engloba os marcadores polimórficos c.-41-39delGGC, c.18G>A, c.1932A>G e D12S1607, que formam a matriz alélica 7:G:G:12, está em forte desequilíbrio de ligação com c.3503_3504delTC, indicando que esta mutação ocorreu apenas uma vez em um haplótipo fundador. O Brasil possui uma população constituída de uma mistura étnica de europeus, africanos e ameríndios. Por um longo período recebeu uma imigração colonizadora constante das mais diversas regiões de Portugal, em especial, no século XVI de judeus e cristãos-novos (judeus e muçulmanos convertidos ao cristianismo) que vinham do Velho Continente para a América. Durante o século XIX, imigrantes da Itália, Alemanha e Espanha se somaram aos primeiros e também vieram se estabelecer no país, especialmente nas regiões Sul e Sudeste, contribuindo indubitavelmente para a formação do *background* genético da população brasileira [22]. Devido ao fato do Brasil ter sido colonizado por portugueses, italianos, alemães e espanhóis faz com que levantemos a hipótese de que a mutação c.3503_3504delTC tenha uma origem mediterrânea na nossa amostra de pacientes. Evidentemente, o nosso número de pacientes analisados é ainda pequeno, mas estudos de reconstrução genealógica como o apresentado por Plante M. et al. [19], bem como a realização de estudos de perfis haplotípicos destes indivíduos como o realizado por Coutinho et al. [21] serão fundamentais para esclarecer o motivo da alta frequência dessa mutação no Brasil e a sua possível origem ancestral por um efeito fundador.

A mutação silenciosa c.2808A>G, no exon 14, está descrita pela primeira vez em um paciente com o genótipo c.[3503_3504delTC]+[?]. Para nos certificarmos de que não se tratava da segunda mutação patogênica, uma vez que esta mutação ocorre muito próximo ao sítio de clivagem proteolítica das subunidades α e β , além de criar uma sequência canônica semelhante à do sítio do doador (AGGTRAGT – GT), submetemos esta alteração ao NetGene2 [23], ferramenta que faz previsões por bioinformática para regiões de *Splicing*, e nenhuma alteração foi demonstrada.

Ainda assim, investigamos nos bancos de dados de *codon usage* [24] e, tanto o AGA quanto o AGG, possuem frequência semelhante de 12.2 e 12.0.

Associação genótipo-fenótipo

Os nossos dados sugerem que mutações sem sentido e deleções com alteração na fase de leitura parecem estar relacionadas ao fenótipo grave (MLII), enquanto mutações de sentido trocado estão relacionadas ao fenótipo atenuado (MLIII). Estes achados estão de acordo com o que é descrito na literatura [2,6,11].

A mutação c.3503_3504delTC causa uma troca de fase de leitura, gerando um códon prematuro de parada [p.L1168QfsX5]. Esta microdeleção está presente na região que codifica a subunidade β , resultando em ausência do produto final da proteína. Segundo Kudo e Canfield [25], a subunidade β contém o domínio transmembrana carboxi-terminal que é essencial para a clivagem das subunidades α e β para uma ótima atividade enzimática. Até o momento, a c.3503_3504delTC apresentou-se associada ao fenótipo grave quando encontrada em homozigose ou quando encontrada em heterozigose com mutações sem sentido ou com deleções que geram alteração na fase de leitura. A associação ao fenótipo atenuado é feita quando esta deleção é encontrada em heterozigose com mutações de sentido trocado [6,11]. Estudos funcionais de Kudo et al. [17] com expressão transiente do plamídeo FS1172X (c.3503_3504delTC) em células 273T não mostraram qualquer aumento na atividade enzimática da fosfotransferase, indicando que a presença desta mutação em homozigose é suficiente para provocar MLII.

Apenas um dos nossos pacientes com MLII apresentou esta deleção em homozigose. Outros dois pacientes com MLII e um ML não definido, que apresentam esta alteração, permanecem com a segunda mutação desconhecida. No entanto, um paciente ML tipo não definido e um MLIII apresentaram esta deleção com mutações de sentido trocado, sendo elas, respectivamente: c.1208T>C [p.I403T] e c.1196C>T [p.S399F], ambas no éxon 10, na região que codifica a subunidade α da proteína. Este mesmo genótipo c.[1196C>T]+[3503_3504delTC] também foi apresentado por um paciente francês com MLIII estudado por Bargal et al. [11]. Segundo estes autores, a c.1196C>T está localizada em um domínio conservado da subunidade α .

Neste mesmo estudo, os autores relatam que este paciente apresenta fenótipo MLIII grave e que exames em fibroblastos mostraram inclusões citoplasmáticas típicas de pacientes com MLII; o nosso paciente também pode ser considerado um paciente com MLIII grave, haja vista a gravidade do seu comprometimento esquelético e que é refletido na sua altura atual (Tabela 2). Outros autores também relataram casos de pacientes heterozigotos compostos para mutações nas subunidades α e β [8,12] e Bargal et al. [11] sugerem que não existe uma complementação intragênica entre estas subunidades.

O genótipo c.[1208T>C]+[3503_3504delTC] está sendo descrito pela primeira vez no paciente E, ML tipo não definido. No entanto, a mutação c.1208T>C [p.I403T] já foi relatada por Tappino et al. [12], em homozigose, em um paciente italiano com MLIII e por Encarnação et al. [6], em heterozigose, em um paciente português. Estudos de expressão da proteína mutante p.I403T em células COS realizados por Tappino et al. [12], revelaram que esta mutação exibiu massa molecular esperada (170 kDa) e presumiram que a proteína é parcialmente disfuncional.

O genótipo c.[1514G>A]+[1759C>T] foi encontrado em dois pacientes com MLIII, não relacionados, originários das regiões sul e sudeste do Brasil, de cidades que distam aproximadamente 1500 Km. O paciente da região sul ainda possui um irmão com MLIII com o mesmo genótipo e fenótipo, mas que não está incluído nesta amostra. Estas mutações encontram-se na região que codifica a subunidade α da fosfotransferase. A primeira é uma mutação de sentido trocado, [p.C505Y], enquanto a outra é uma mutação sem sentido, [p. R587X]. Este genótipo está sendo relatado pela primeira vez, mas estas mutações já foram mostradas por Cathey et al. [8], em heterozigose, em um paciente MLII (c.1759C>T; [p.R587X]; presente na subunidade α) e em um MLIII (c.1514G>A; [p.C505Y]; presente na subunidade α).

O genótipo c.[1123C>T]+[?] foi encontrado em um paciente com MLII. A outra mutação permanece desconhecida. Esta mesma mutação foi diagnosticada por Tappino et al. [12], em homozigose, para um paciente com fenótipo grave e, em heterozigose, em um paciente com fenótipo atenuado (c.[1965delC]+[1123C>T]), ambos italianos. Cathey et al. [8] também diagnosticaram a mutação c.1123C>T em quatro dos seus pacientes heterozigotos compostos, um com fenótipo grave (c.[1123C>T]+[2693insA]) e três com o fenótipo atenuado (c.[1123C>T]+[1196C>T] e c.[3335+6T>G]+[1123C>T]). Esta mutação está presente no exon 10 e gera um códon de terminação prematuro, formando uma proteína truncada na região α

[p.R375X]. Tappino et al. [12] em seus estudos de expressão transiente em células COS7 demonstrou que a mutação c.1123C>T gera uma proteína de menor tamanho (~50kDa), sugerindo que a atividade funcional desta enzima tenha sido perdida.

O genótipo c.[242G>T]+[?]; [p.W81L] foi encontrado em um paciente com MLII. A outra mutação permanece desconhecida. Encarnação et al. [6] apresentaram esta mutação, em homozigose, para um dos seus pacientes portugueses com MLIII. Neste mesmo estudo ainda relatam que pacientes que apresentam as mutações c.242G>T [p.W81L], c.1196C>T [p.S399F] e c.1208T>C [p.I403T] possuem redução nos níveis de mRNA do gene *GNPTG*, sugerindo que este evento pode estar relacionado com a existência de um mecanismo de *feedback* entre as subunidades codificadas pelos genes *GNPTG* e *GNPTAB* e que os padrões de expressão destes genes parece depender da presença de mutações específicas. Outra hipótese que justificaria o fenótipo do paciente G, com apenas uma mutação patogênica identificada, seria a presença de duas mutações silenciosas no exon 1: c.18G>A e c.27G>A. A primeira induz a troca do sexto códon de CUG (frequência de *codon usage*= 39,6) para CUA (frequência de *codon usage*= 7,2). A segunda mutação troca o nono códon de CAG (frequência de *codon usage*= 34,2) para CAA (frequência de *codon usage*= 12,3). Isso poderia explicar uma maior alteração na cinética de translação da proteína, gerando uma proteína final com conformação alterada [24,26].

Conclusões

Este é o primeiro estudo do gênero realizado em pacientes brasileiros com MLII/III. Os seus dados sugerem que a análise de *GNPTAB*, nesses pacientes, deva ser iniciada pelo exon 19, otimizando dessa forma a investigação e reduzindo custos. Os resultados obtidos forneceram importantes informações que enfatizam a necessidade de realização de estudos adicionais, tais como: a aplicação de outras técnicas que nos permitam concluir a genotipagem para os pacientes com genótipo não completamente identificado; a determinação da alteração protéica conferida pela mutação c.2269_2273delGAAAC; a realização do estudo de expressão gênica para a mutação c.2808A>G; a realização do estudo de haplótipos para a deleção

c.3503_3504delTC na população brasileira; e a determinação da frequência das variantes recorrentes em indivíduos saudáveis.

Agradecimentos: Este estudo foi financiado pelo Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX) do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS); pelo CNPq; pela FAPERGS; e pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil.

Referências

- [1] D. Brooks, C.Turner, V.Muller, J. Hopwood, P. Meikle, I-cell disease, in J.A. Barranger, M.A. Cabrera-Salazar, *Lysosomal Storage Disease*, Springer, 2007, pp. 529-535.
- [2] S. Tiede, S. Storch, T. Lübke, B. Henrissat, R. Bargal, A. Raas-Rothschild, T. Braulke, Mucopolidosis II is caused by mutations in *GNPTA* encoding the alpha/beta GlcNac-1-phosphotransferase, *Nat. Med.* 11(2005) 1109-1112.
- [3] M. Zarghooni, S.S.R. Dittakavi, Molecular analysis of cell lines from patients with mucopolidosis II and mucopolidosis III, *Am. J. Med. Genet.* 149A(2009) 2753-2761.
- [4] T. Braulke, P.S. Storch, Molecular analysis of the GlcNac-1-phosphotransferase, *J. Inherit Metab Dis* 31 (2008) 253-257.
- [5] S.S. Cathey, M.Kudo, S. Tiede, A. Raas-Rothschild, T. Braulke, M. Beck, H.A. Taylor, W.M. Canfield, J.G. Leroy, E.F. Neufeld, V.A.McKusick, Molecular order in mucopolidosis II and III nomenclature, *Am. J. Med. Genet.* 146(A) (2008) 512-513.
- [6] M. Encarnação, L. Lacerda, R. Costa, M.J. Prata, M.F. Coutinho, H. Ribeiro, L. Lopes, M. Pineda, J. Ignatus, A. Mustonen, P. Vieira, M.R. Lima, S. Alves, Molecular analysis of the *GNPTAB* and *GNPTG* gene in 13 patients with mucopolidosis type II or type III – identification of eight novel mutations, *Clin Genet* 76 (2009) 76-84.
- [7] S. Kornfeld, W.S. Sly, I-cell disease and pseudo-hurler polydystrophy: disorders of lysosomal enzyme phosphorylation and localization, in: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle (Eds), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw-Hill, New York, 2001, pp. 3469-3482.
- [8] S.S. Cathey, J.G. Leroy, T. Wood, Phenotype and genotype in mucopolidosis II and III alpha/beta: a study of 61 probands, *J.Med.Genet.* 4 (2010) 38-48.
- [9] M. Bao, B.J. Elmendorf, J.L. Booth, R.R. Drake, W.M. Canfield, Bovine UDP-*N*-acetylglucosamine: lysosomal-enzyme *N*-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. II Enzymatic characterization and identification of the catalytic subunit, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 31446-31451.

- [10] M. Kudo, M. Bao, A. D'Souza, F. Ying, H. Pain, B.A. Roe, W.M. Canfield, The alpha- and beta-subunits of the human UDP-N-acetylglucosamine: lysosomal enzyme *N*-acetylglucosamine-1-phosphotransferase [corrected] are encoded by a single cDNA, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 36141-36149.
- [11] R. Bargal, M. Zeigler, B. Abu-Libdeh, V. Zuri, H. Mandel, Z. Ben Neriah, F. Stewart, N. Elcioglu, T. Hindi, M. Le Merrer, G. Bach, A. Raas-Rothschild, When mucopolidosis III meets mucopolidosis II: GNPTA gene mutations in 24 patients, *Mol. Genet. Metab.* 88 (2006) 359-363.
- [12] B. Tappino, N.A. Chuzhanova, S. Regis, A. Dardis, F. Corsolini, M. Stroppiano, E. Tonoli, T. Beccari, C. Rosano, J. Mucha, M. Blanco, M. Szlago, M. Di Rocco, D.N. Cooper, M. Filocomo, Molecular characterization of 22 novel UDP-N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase α - and β -subunits (GNPTAB) gene mutations causing mucopolidosis types II α / β and III α / β in 46 patients, *Hum. Mutat.* 30 (2009) E956-973.
- [13] E. Persichetti, N.A. Chuzhanova, A. Dardis, B. Tappino, S. Pohl, N.S. Thomas, C. Rosano, C. Balducci, S. Paciotti, S. Dominissini, A.L. Montalvo, M. Sibilio, R. Parini, M. Rigoldi, M. Di Rocco, G. Parenti, A. Orlacchio, B. Bembi, D.N. Cooper, M. Filocomo, T. Beccari, Identification and molecular characterization of six novel mutations in the UDP-N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase gamma subunit (GNPTG) gene in patients with mucopolidosis III gamma, *Hum. Mutat.* 30 (2009) 978-984.
- [14] <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>. Último acceso: 01/12/2010.
- [15] http://sift.jcvi.org/www.SIFT_seq_submit2.html. Último acceso: 01/12/2010.
- [16] K.H. Paik, S.M. Song, C.S. Ki, H.W. Yu, J.S. Kim, K.H. Min, S.H. Chang, E.J. Yoo, I.J. Lee, E.K. Kwan, S.J. Han, D.K. Jin, Identification of mutations in the GNPTA (MGC4170) gene coding for GlcNac-phosphotransferase alpha/beta subunits in Korean patients with mucopolidosis type II or type IIIA, *Hum. Mutat.* 26 (2005) 308-314.
- [17] M. Kudo, M.S. Brem, W.M. Canfield, Mucopolidosis II (I-cell disease) and mucopolidosis IIIA (classical pseudo-hurler polydysplasia) are caused by mutations

the GlcNac-phosphotransferase α/β -subunits precursor gene, *Am. J. Hum. Genet.* 78 (2006) 451-463.

[18] <http://www.geneclinics.org>. Último acesso: 10/01/2011.

[19] M. Plante, S. Claveau, P. Lepage, È-M. Lavoie, S. Brunet, D. Roquis, C. Morin, H. Vézina, C. Laprise, Mucopolidosis II: a single causal mutation in the N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase gene (GNPTAB) in a French Canadian founder population, *Clin. Genet.* 73 (2008) 236-244.

[20] N.A. Chamoles, M.B. Blanco, D. Gaggioli, C. Casentini, Hurler-like phenotype: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper, *Clin. Chem* 47 (2001) 2098-2102.

[21] M.F.Coutinho, M. Encarnação, R. Gomes, L. da Silva Santos, S. Martins, D. Sirois-Gagnon, R. Bargal, M. Filocarmo, A. Rass-Rothschild, B. Tappino, C. Laprise, G.K. Cury, I.V.D. Schwartz, O. Artigalás, M.J. Prata, S. Alves, Origin and spread of a common deletion causing mucopolidosis type II: insights from patterns of haplotypic diversity, *Clin. Genet* (2010) 1-8.

[22] S. Mozer, V. Telles, *Descobrimos a história – descobrimos a independente*, Ática, São Paulo, 2007, pp. 86-96.

[23] <http://www.cbs.dtu.dk/service/NetGene2/>. Último acesso: 06/01/2011.

[24] <http://www.kasuga.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=9606>. Último acesso: 06/01/2011.

[25] M. Kudo, W.M. Canfield, Structural requirements for efficient processing and activation of recombinant human UDP-N-acetylglucosamine: lysosomal-enzyme-N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase, *J.Biol.Chem.* 28 (2006) 11761-11768.

[26] A.A. Komar, SNPs, silent but not invisible, 2006, 10.1126/science. 1138239, disponível em www.scienceexpress.org.

Tabela 1. Mucolipidose II e III. Caracterização bioquímica dos pacientes incluídos neste estudo (n=13)

Enzimas	Amostra	Paciente A	Paciente B	Paciente C	Paciente D	Paciente E	Paciente F	Paciente G	Paciente I	Paciente J	Paciente K	Paciente L	Paciente M	Valores de referência
Arilsulfatase A	Plasma	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
β -Glicuronidase	Plasma	795	475	1195	1037	1078	1058	994	900	906	818	2253	875	30-300 nmol/h/mL
β -Hexosaminidases totais	Plasma	21640	12675	14876	36533	11368	26417	21350	22155	39282	12888	10098	27427	1000-13490 nmol/h/mL
Iduronato-sulfatase	Plasma	NA	1864	2363	1707	1589	2510	2624	3038	1716	1575	1791	NA	122-463 nmol/4h/mL
α -Manosidase	Fibroblastos	NA	16	NA	13	NA	19,1	NA	NA	NA	44	NA	4,6	60-400 nmol/h/mg
β -Galactosidase	Fibroblastos	11	132	NA	178	NA	6,7	2,3	NA	NA	220	NA	6,5	394-1440 nmol/h/mg
B-Glicuronidase	Fibroblastos	4,7	8,6	NA	4,5	NA	40	NA	NA	NA	37	NA	23	62-361 nmol/h/mg
α -Iduronidase	Fibroblastos	0,97	NA	NA	9,0	NA	6	2,5	NA	NA	67	NA	3,4	74-148 nmol/h/mg
Iduronato-sulfatase	Fibroblastos	NA	NA	NA	12	NA	17	NA	NA	NA	22	NA	5,4	35-80 nmol/4h/mg

NA: não analisado; +: presente; -: ausente. A paciente H foi investigada somente em papel filtro, apresentando os seguintes resultados: β -Glicuronidase: 44 nmol/h/mL (valor de referência: 4,02-14,79); β -Hexosaminidases totais: 463 nmol/h/mL (valor de referência: 28,8-132,7); Iduronato-sulfatase: 108 nmol/h/mL (valor de referência: 12-23).

Tabela 2. Resumo das características clínicas dos pacientes com Mucopolipidose II/III incluídos no presente

Paciente	Tipo de ML*	Sexo	Região brasileira de origem	Consanguinidade parental	Idade ao diagnóstico (anos)	Idade na inclusão no estudo (anos)	Altura (cm)	Escore Z altura**
A	II	F	Sudeste	Não	0,2	0,2	?	NA
B	III	F	Norte	Não	8,0	14,1	141,5	-2,66
C	III	M	Sudeste	Não	17,2	25,8	144,3	-4,42
D	III	M	Sul	Não	35,7	38	149,0	-3,77
E	Não definido	M	Nordeste	Não	4,3	4,3	83,0	-5,43
F	II	F	Sudeste	Não	1,6	4,0	70,0	-7,8
G	II	F	Sudeste	Não	2,0	2,0	73,0	-4,05
H	II	F	Sudeste	Não	1,8	3,4	73,0	-6,25
I	II	M	Centro-oeste	Não	2,9	5,1	86,0	-5,38
J	III	M	Sudeste	Não	12,3	12,3	141,0	-1,5
K	III	M	Sul	Não	5,4	17,9	107,5	-9,16
L	Não definido	M	Nordeste	Não	12,7	13,2	?	NA
M	II	M	Nordeste	Não	0,1	0,1	?	NA

* A classificação do tipo de Mucopolipidose foi feita de acordo com o médico assistente. De acordo com Cathey et al. [8], a altura final dos pacientes com MLII é <80cm, e dos pacientes com MLIII é >115 cm ; ** de acordo com a Organização Mundial da Saúde (http://www.who.int/growthref/who2007_height_for_age/en/index.html) ; ? : Informação não disponível; NA: não avaliado.

Tabela 3. Mutações patogênicas encontradas no gene *GNPTAB* em 13 pacientes brasileiros não relacionados com Mucopolidose II/III

Pacientes	Genótipo (cDNA)	Genótipo (proteína)	Fenótipo	Análise <i>in silico</i> do efeito na proteína**		Genótipo pais***
				Polyphen2	SIFT	
A	c.[1123C>T]+[?]	p.[R375X]+[?]	ML II	NA	NA	Mãe: c.[1123C>T]+[N]
B	c.[?]+[?]	NA	ML III	NA	NA	NA
C	c.[1514G>A]+[1759C>T]	p.[C505Y]+[R587X]	ML III	Provavelmente deletéria	Não tolerável	Mãe: c.[1514G>A]+[N] Pai: c.[1759C>T]+[N]
D	c.[1514G>A]+[1759C>T]	p.[C505TY]+[R587X]	ML III	Provavelmente deletéria	Não tolerável	NA
E	c.[1208T>C]+[3503_3504delITC]	p.[I403T]+[L1168QfsX5]	Não definido	Provavelmente deletéria	Não tolerável	Mãe: c.[1208T>C]+[N] Pai: c.[3503_3504delITC]+[N]
F	c.[3503_3504delITC]+[?]	p.[L1168QfsX5]+[?]	ML II	NA	NA	NA
G	c.[242G>T]+[?]	p.[W81L]+[?]	ML II	Provavelmente deletéria	Não tolerável	NA
H	c.[2269_2273delGAAC]+[2269_2273delGAAC]	p.[E757KfsX1]+[E757KfsX1]*	ML II	NA	NA	NA
I	c.[3503_3504delITC]+[?]	p.[L1168QfsX5]+[?]	ML II	NA	NA	NA
J	c.[?]+[?]	NA	ML III	NA	NA	NA
K	c.[1196C>T]+[3503_3504delITC]	p.[S399F]+[L1168QfsX5]	ML III	Provavelmente deletéria	Não tolerável	Mãe: c.[1196C>T]+[N] Pai: c.[3503_3504delITC]+[N]
L	c.[3503_3504delITC]+[?]	p.[L1168QfsX5]+[?]	Não definido	NA	NA	NA
M	c.[3503_3504delITC]+[3503_3504delITC]	p.[L1168QfsX5]+[L1168QfsX5]	ML II	NA	NA	NA

?: mutação não-identificada; NA: não analisada; N: alelo normal; *: inferência sobre a possível alteração na proteína, não foram realizados estudos de expressão; **Realizada somente no caso de mutações de ponto com sentido trocado; o Polyphen2 é disponível em <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>, e classifica as variações em benignas/possivelmente deletérias/ou provavelmente deletérias, enquanto o SIFT é disponível em http://sift.jcvi.org/www/SIFT_seq_submit2.html e classifica as variações em toleráveis ou não-toleráveis; ***Os pais foram analisados somente em relação às mutações encontradas no probando.

Tabela 4. Mutações não patogênicas encontradas no gene *GNPTAB* de pacientes brasileiros com Mucopolidose II/III

Mutações		c.-41-39delGGC rs76300806*	c.18G>A rs4764655*	c.27G>A rs222504*	c.323+20delT **	c.365+96_97delGT **	c.1285-166G>A ***	c.1932A>G rs10778148*	c.2808A>G **	c.3135+5T>C rs759935*	c.3336-25T>C rs3736476*
localização		5'UTR	exon 1	exon 1	intron 3	intron 4	intron 10	exon 13	exon 14	intron 15	intron 17
A	mãe	+/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-
B	pai	+/-	NA	NA	-/-	+/-	-/-	-/-	NA	NA	-/-
	mãe	+/+	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-
C	pai	+/+	NA	NA	+/-	+/+	+/+	+/+	NA	NA	+/+
	mãe	+/+	NA	NA	+/-	-/-	-/-	-/-	NA	NA	-/-
D	pai	+/+	+/-	-/-	+/+	+/-	+/+	+/+	NA	NA	+/-
	mãe	+/+	+/-	-/-	+/+	+/-	+/+	+/+	NA	NA	+/-
E	pai	+/+	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-	NA	NA	+/+
	mãe	+/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	NA	NA	NA	+/-
F	pai	+/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-	NA	NA	+/-
	mãe	+/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-	NA	NA	+/-
G	pai	+/+	+/-	+/-	+/-	-/-	+/+	+/+	-/-	+/+	-/-
	mãe	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
H	pai	+/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-
	mãe	+/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-
I	pai	+/-	+/-	-/-	+/-	-/-	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-
	mãe	+/-	-/-	-/-	+/-	-/-	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-
J	pai	+/+	+/-	-/-	+/-	NA	+/+	+/+	NA	NA	NA
	mãe	+/-	-/-	-/-	+/-	NA	-/-	NA	NA	NA	NA
K	pai	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-
	mãe	+/+	-/-	-/-	+/-	+/-	NA	+/+	NA	NA	+/-
L	pai	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	NA	+/+	NA	NA	+/-
	mãe	+/-	-/-	-/-	-/-	+/-	NA	-/-	NA	NA	+/-
M	pai	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+
	mãe	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+

-/-: normal para a mutação; +/-: heterozigoto para a mutação; +/+ : homozigoto para a mutação; NA: não analisado; *dsSNP RS (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>); ** : mutações descritas pela primeira vez neste estudo; ***: mutação descrita por Kudo et al. [17]. As regiões sequenciadas nos pais foram aquelas que apresentaram alterações nos probandos.

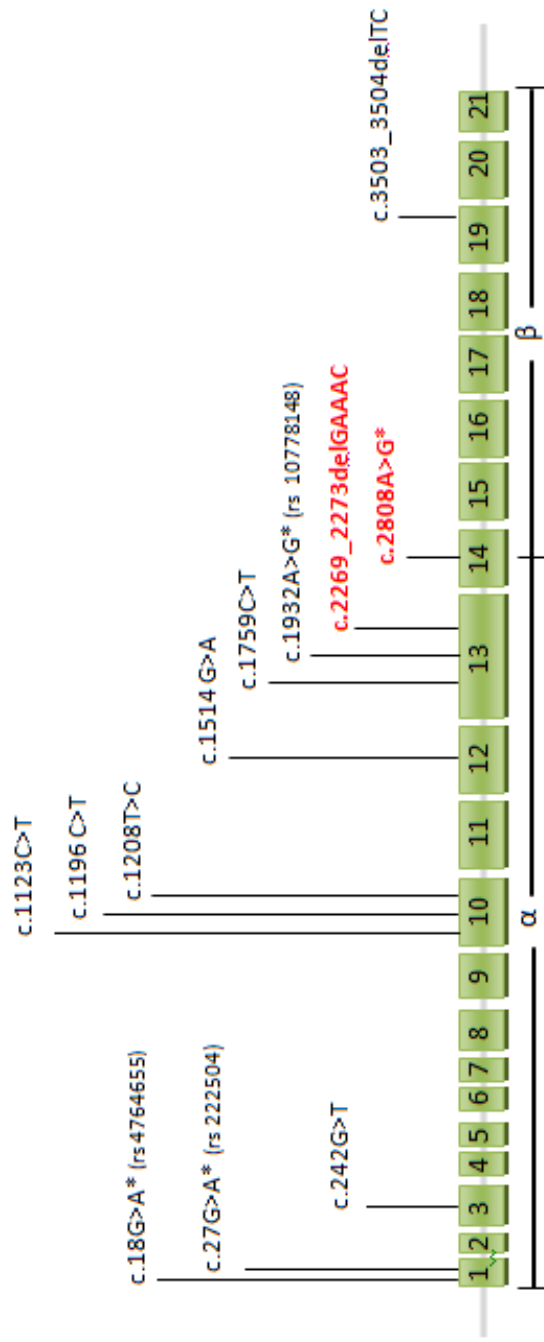


Figura 1. Distribuição das mutações encontradas, no presente estudo, na região codificante do gene *GNPTAB* (modificado de Tappino et al. [12]). Em vermelho: mutações descritas pela primeira vez no presente estudo. Em preto: mutações já descritas na literatura. *Mutações consideradas não patogênicas. Estão representadas as unidades α e β da fosfotransferase.

ARTIGO VERSÃO EM LÍNGUA INGLESA

Artigo a ser submetido, em língua inglesa, a Molecular Genetics and Metabolism.

Qualis A2 para Medicina I e II (ano base: 2008)

Fator de Impacto 2,897 (ano base: 2009)

Title**Mucopolidosis II and III in Brazil: the *GNPTAB* gene also shows broad allelic heterogeneity****Authors and Affiliations**

Cury, G.K.^a, Matte, U.^{b,c,d}, Artigalás, O.^c, Alegra T.^c, Burin, M.^{b,e}, Ribeiro, E.M.^f, Lourenço, C.M.^g, Kim, C.A.^h, Valadares, E.R.ⁱ, Schwartz, I.V.D^{a,b,c,d}

^a Post Graduation Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil (gcury1@hotmail.com; ischwartz@hcpa.ufrgs.br);

^b Medical Genetics Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil (umatte@hcpa.ufrgs.br; mburin@hcpa.ufrs.br; ischwartz@hcpa.ufrs.br);

^c Department of Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil (umatte@hcpa.ufrgs.br; artigalas@gmail.com; tacianealegra@gmail.com; ischwartz@hcpa.ufrs.br);

^d Center of Genic Therapy of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil (umatte@hcpa.ufrgs.br; ischwartz@hcpa.ufrgs.br);

^e Laboratory of Inborn Errors of Metabolism of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil (mburin@hcpa.ufrgs.br);

^f Association of Genetic Diseases of the State of Ceará, Ceará, Brazil (erlaneribeiro@yahoo.com.br);

^g Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil (charlesgenetica@gmail.com);

^h Genetics Unit, Children Institute of Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil (chong.kim@icr.usp.br);

ⁱ Department of Complementary Propedeutics, School of Medicine of Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil (eugeniavaladares@gmail.com).

Corresponding author:

Prof Dr Ida Vanessa Doederlein Schwartz

Service de Genética Médica

Rua Ramiro Barcelos, 2350

90035-903 Porto Alegre, RS, Brazil

email: ischwartz@hcpa.ufrgs.br

Abstract

Mucopolysaccharidosis II and III (MLII and MLIII) are rare lysosomal diseases caused by a deficiency of phosphotransferase, the enzyme responsible for the synthesis of M6P, a marker that directs lysosomal enzymes to the lysosome. The *GNPTAB* gene codifies subunits α and β , while the *GNPTG* gene codifies subunit γ of this enzyme. **Objectives:** To identify mutations in the *GNPTAB* gene that are present in Brazilian patients with MLII and MLIII. **Methodology:** The sequencing of the *GNPTAB* gene was performed in samples of DNA extracted from the peripheral blood of patients with MLII/III identified at the diagnostic database of the Reference Laboratory of Inborn Errors of Metabolism of HCPA, Brazil. **Results:** Thirteen unrelated patients, born to nonconsanguineous couples from several regions of Brazil were included in this study. Both pathogenic mutations were identified in 6/13 patients; in five patients, only one mutation was identified. Two patients with MLIII did not present pathogenic mutations in the *GNPTAB* gene. Mutation c.3503_3504delTC was the most frequent pathogenic mutation found (n=7/26 alleles), and four novel mutations are being described herein: c.2269_2273delGAAAC, c.2808A>G, c.323+20delT, and c.365+96_97delGT. **Discussion/Conclusions:** This is the first study of its kind conducted in Brazilian patients with ML II/III. Our findings confirm that the *GNPTAB* gene presents great allelic heterogeneity and suggest that in Brazilian patients the screening of mutations in this gene should be initiated in exon 19. Further analyses should be conducted for patients who present a partial or unestablished genotype, including the analysis of *GNPTG*.

Key words: *GNPTAB*; Mucopolysaccharidosis; Lysosomal Disease; M₆P; I-cell Disease; Pseudo-Hurler Polydystrophy

Introduction

Mucopolidoses type II (MLII; MIM#252500) and type III (MLIII; MIM#252600) are inherited autosomal recessive diseases caused by the deficient activity of UDP-N-acetylglucosamine: lysosomal hydrolase N-acetyl-1-phosphotransferase (UDP-GlcNac-phosphotransferase, GlcNac-PT or phosphotransferase; EC 2.7.8.17) [1-3]. Phosphotransferase participates in the process of synthesis of marker mannose-6-phosphate (M₆P), which is responsible for directing lysosomal hydrolases to the lysosome [2,4,5]. In the absence of M₆P residues, the correct directing of lysosomal hydrolases is hampered, which results in the massive secretion of these enzymes in both the extracellular space and bodily fluids, as well as in a decrease in its activity in cells such as fibroblasts [4-6]. The MLII type is the most severe form of the disease and is frequently apparent at birth; its progression is rapid, and it leads to death as early as in the first decade of life due to cardiorespiratory complications. On the other hand, the progression of MLIII is slower, and patients may survive until their eighth decade of life [6-8]. Although MLII and III correspond to the extreme classic phenotypes associated to the deficiency of phosphotransferase, patients with intermediate clinical manifestations have also been described [8].

Phosphotransferase is a hexameric protein composed of two subunits α , two β , and two γ [2,9], where subunits α and β are codified by the *GNPTAB* gene, located in chromosome 12q23.3, and subunit γ is codified by the *GNPTG* gene, located in chromosome 16p13.3 [3,5,6,10]. Patients who are homozygous or compound heterozygous for mutations in *GNPTAB* (ML α/β) present a phenotype compatible with MLII or MLIII, while homozygous or heterozygous for mutations in *GNPTG* (ML γ) present a phenotype compatible with MLIII [6,8,11-13].

The present study had as main objective the analysis of the *GNPTAB* gene in Brazilian patients with MLII/III.

Methodology

This study was approved by the Research Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil.

Patients with a biochemical diagnosis of ML II/III were identified from the group of patients (approximately 40,000) investigated for diagnostic confirmation or exclusion of inborn errors of metabolism (IEM) at the Reference Laboratory for IEM of HCPA (LREIM-HCPA in its Portuguese abbreviation), Brazil, from 1983 (when the laboratory opened) until 2009. The LREIM-HCPA is the national reference laboratory for the diagnosis of lysosomal diseases, and its database of diagnoses probably includes most cases of MLII/III diagnosed in Brazil. The biochemical diagnosis of MLII/III applied by the LREIM-HCPA includes the verification in plasma of the presence of Arylsulfatase A (ARSA; EC 3.1.6.8) and the measure of the activity of several lysosomal hydrolases, including α -L-Iduronidase (IDUA; EC 3.2.1.76), Iduronate-sulfatase (IDS; EC 3.1.6.12), β -Glucuronidase (GUSB; EC 3.2.1.31), and β -Hexosaminidase (EC 3.2.1.30). The measure of the activity of these enzymes in fibroblasts is also performed whenever samples are available. If only samples in filter paper are available, the activity of IDS, GUSB, and Hexosaminidases, among other are tested.

In the period analyzed, the LREIM-HCPA diagnosed 30 Brazilian patients with MLII/III from all the Brazilian regions. In most cases, mucopolysaccharidosis (MPS) had been previously suspected and had been ruled out by means of urinary or enzyme analysis (data not shown). The physicians in charge of these 30 patients were contacted and asked about the possibility of inclusion of these patients in the study. When patients/relatives agreed to participate in the study, a free and clarified consent form was signed, and a sample of total blood was collected for the extraction of DNAg. Clinical information (present age, age at diagnosis, sex, presence of parental consanguinity) was obtained from the database of the LREIM-HCPA, while the type of ML and the present height of the patient were informed by the assistant physician. Whenever possible, a sample of DNAg from the parents was also obtained for the confirmation of the presence of the mutations found in the proband.

The 21 exons that comprise the *GNPTAB* gene, as well as the intron-exon boundary regions and part of the 5' and 3' untranslated regions, were amplified from the specific sequences of oligonucleotides projected for this study. The following were used for the amplifications by polymerase chain reaction (PCR): 50ng of DNAg, 16 pmol of each oligonucleotide, 0.6 mM of dNTPs, 2.4 mM of MgCl₂, 1x reaction buffer, and 1 unit of *taq* DNA polymerase. The annealing temperatures and the sequences of oligonucleotides can be made available in case of interest. Sample sequencing was performed using the automatic sequencer *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). The sequence of the *GNPTAB* gene used as reference was GenBank NM_024312.3. Each mutation found was confirmed by a new sequencing performed with a new product of amplification and with the oligonucleotide inverse to that used in the first stage. The *in silico* analysis of the potential effect of non-silent missense mutations was done by means of PolyPhen2 (Polymorphism Phenotyping) [14] and SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) [15].

Results

Thirteen unrelated patients with ML II/III were included in the study (Tables 1 and 2; patients A and M). The results found are described in Table 3 (pathogenic mutations and genotype-phenotype association) and in Table 4 (nonpathogenic mutations). Figure 1 shows the location of the mutations found in codifying regions. Both pathogenic mutations were identified in 6/13 patients, and only one pathogenic mutation was identified in five patients. In two patients, both with MLIII, no pathogenic mutations were identified (Table 3). In all patients at least one nonpathogenic variant was found, and c.-41-39delGGC was the most frequent variant (n= 16/26 alleles) (Table 4). Mutation c.3503_3504delTC [p.L1168QfsX5], located in exon 19, was the most frequent pathogenic mutation found in the sample studied (n= 7/26 alleles) (Table 3). As for codifying and non-codifying regions, four novel mutations are being described herein: c.2269_2273delGAAAC, c.2808A>G, c.323+20delT, and c.365+96_97delGT (Tables 3 and 4; Figure 1).

Discussion

This is the first study to describe the pathogenic/non-pathogenic variation of *GNPTAB* in Brazilian patients with MLII/III. As described for other populations, the analysis performed confirmed that this gene presents great allelic heterogeneity, that there are few recurrent mutations, and that c.3503_3504delTC is the pathogenic mutation with the highest prevalence [2,8,11,16,17]. Moreover, four novel variants are being described.

The number of patients included in this study (n= 13) is highly significant considering that all patients were from the same population and that the estimates of disease incidence (between 2.5×10^{-6} and 1.10^{-5} live newborns) [18] show that this disease is quite rare. Similar studies but with a bigger sample include patients from different countries/ethnic backgrounds or with high levels of consanguinity/endogamy. For instance, Tappino et al. [12] investigated 46 patients from Italy (n=37), Argentina (n=4), Bulgaria (n=1), Hungary (n=1), Pakistan (n=2), and Bangladesh (n=1). Bargal et al. [11], on their turn, investigated 24 patients; of these, 16 were born to consanguineous couples of Arab or Muslim descent from Israel or Palestine; three were Turkish; three were Irish, and one was French. Moreover, Plante et al. [19] investigated 16 families with MLII in the province of Quebec, Canada, where the incidence of this disease is the highest in the world, and found evidence for the existence of a founding effect.

In our study, it was only possible to obtain a significant number of patients for our sample because the LREIM-HCPA is a national reference center for the diagnosis of lysosomal diseases. Unfortunately, not all patients included in the study had a biochemical investigation conducted in plasma and in fibroblasts available; this would have been more adequate. One of the patients had even been investigated using only filter paper (patient H), but the analysis of *GNPTAB* confirmed her diagnosis of ML α / β ; the possibility of the identification of patients with MLII/III by means of enzyme assays conducted using filter paper was first described by Chamoles et al. [20]. It is important to highlight, however, that all patients presented a clinical phenotype compatible with MLII/III and that the diagnosis of MPS had already been excluded for most of them.

The GNPTAB gene

The strategy used in the present study was able to identify 17/26 pathogenic alleles (approximately 65%) of the sample. Excluding the two patients with MLIII without any pathogenic mutations identified (who, therefore, may present mutations in *GNPTG*), the sensibility of the strategy would increase to 17/22 alleles (approximately 80%), that is, a lower rate when compared to the one described in the literature (approximately 95%) [18]. We consider this difference to be possibly secondary to a higher frequency of alleles in our sample with complete duplications of the gene or that were not identified because they were in an area of the promoter region or the 3'UTR region not contemplated by our primers; this shall be investigated in future studies. The hypothesis of complete deletion of one of the alleles does not apply to these cases because they present alterations in heterozygosis. Patient H was the only patient in our sample that was homozygous for all the markers assessed, although parental consanguinity was not reported; in this case, the possible existence of an allele with a complete deletion of the gene shall be excluded.

In our study, the most frequently found pathogenic mutation was c.3503_3504delTC, which was present in homozygosis in one patient with MLII and in heterozygosis in another five patients (MLII=2; MLIII=1; undefined type: 2). However, this mutation seems to present a smaller prevalence in our sample (approximately 27% of the alleles) when compared to that described for other populations. For example, Bargal et al. [11] found this same mutation in homozygosis in 11/24 patients: 10 born to consanguineous couples, most of Arab- Muslim origin, all with MLII. Encarnação et al. [6] found this microdeletion in five patients with MLII (n= 9/18 alleles); of these, four patients were homozygous for this mutation. Tappino et al. [12] identified this mutation in 47/92 alleles, which was found in homozygosis in 14 patients with MLII, most of whom were Italian and born to non-consanguineous couples. Mutation c.3503_3504delTC was the only pathogenic mutation identified in the sample studied by Plante et al. [19].

Three of our patients with mutation c.3503_3504delTC (patients E, F, and I) were included in the study of haplotypes conducted by Coutinho et al. [21]. In that study it was verified that the region that encompasses the polymorphic markers c.-

41-39delGGC, c.18G>A, c.1932A>G, and D12S1607, which form the allelic matrix 7:G:G:12, is in linkage disequilibrium with c.3503_3504delTC, which indicated that this mutation happened only once in a founding haplotype. The Brazilian population is composed of an ethnic mix of European, African and Amerindian peoples. For a long time, Brazil received constant colonizing immigration coming from the most diverse regions of Portugal and, especially in the 16th century, of Jews and New Christians (Jews and Muslims converted to Christianity) who came from the Old Continent to America. During the 19th century, immigrants from Italy, Germany, and Spain were added to the Portuguese and also came to Brazil, mostly to the south and southeast regions, thus contributing to the formation of the genetic background of the Brazilian population [22]. The fact that Brazil was colonized by Portuguese, Italian, German, and Spanish people makes us raise the hypothesis that mutation c.3503_3504delTC has a Mediterranean origin in our sample of patients. Evidently, the number of patients analyzed herein is still small, but studies of genealogic reconstruction, such as the one presented by Plante M. et al. [19], and the conduction of studies of the haplotypic profiles of these individuals, such as the one conducted by Coutinho et al. [21], will be instrumental to clarify the reason for the high frequency of this mutation in Brazil as well as its possible ancestral origin by a founding effect.

For the first time, the silent mutation c.2808A>G in exon 14 is described in a patient with genotype c.[3503_3504delTC]+[?]. In order to certify that it was not the second pathogenic mutation, since this mutation happens very close to the cleavage site of subunits α and β , besides creating a canonic sequence similar to that of the donor site (AGGTRAGT – GT), we submitted this alteration to NetGene2 [23], a tool that uses bioinformatics to make predictions for splicing regions; no alteration was present. Nevertheless, we investigated in codon usage databases [24], and both AGA and AGG have similar frequencies of 12.2 and 12.0.

Genotype-phenotype association

Our data suggest that nonsense mutations and frameshift mutations seem to be related to the severe phenotype (MLII), while missense mutations are related to

the attenuated phenotype (MLIII). These findings are in line with what is described in the literature [2,6,11].

Mutation c.3503_3504delTC causes a change during the reading phase, generating a premature stop codon [p.L1168QfsX5]. This microdeletion is present in the region that codifies subunit β , resulting in the absence of the final product of the protein. According to Kudo and Canfield [25], subunit β contains the carboxi-terminal transmembrane domain that is essential to the cleavage of subunits α and β for optimum enzyme activity. So far, c.3503_3504delTC was shown to be associated to the severe phenotype when found in homozygosis or when found in heterozygosis with nonsense mutations or with frameshift mutations. The association to the attenuated phenotype is made when this deletion is found in heterozygosis with missense mutations [6,11]. Functional studies conducted by Kudo et al. [17] with a transient expression of plasmids for FS1172X (c.3503_3504delTC) in 273T cells did not show any increase in the enzyme activity of phosphotransferase, which indicates that the presence of this mutation in homozygosis is enough to cause MLII.

Only one of our patients with MLII presented this deletion in homozygosis. The second mutation remains unknown in another two patients with MLII and one with undefined ML, who presented this alteration. However, one patient with the undefined ML type and one with MLIII presented this deletion with missense mutations; these being, respectively: c.1208T>C [p.I403T] and c.1196C>T [p.S399F], both in exon 10, in the region that codifies subunit α of protein. This same genotype, c.[1196C>T]+[3503_3504delTC], was also presented by a French patient with MLIII that was studied by Bargal et al. [11]. According to those authors, c.1196C>T is located in a conserved domain of subunit α . In that same study, the authors report that this patient presented a severe MLIII phenotype and that tests in fibroblasts showed cytoplasmatic inclusions typical of patients with MLII; our patient may also be considered a patient with severe MLIII given the severity of his skeletal compromise, which is reflected in his present height (Table 2). Other authors have also reported cases of compound heterozygous patients for mutations in subunits α and β [8,12], and Bargal et al. [11] suggest that there is no intragenic complementation between these subunits.

Genotype c.[1208T>C]+[3503_3504delTC] is being described for the first time in patient E, who is an undefined ML type. However, mutation c.1208T>C [p.I403T] has already been described by Tappino et al. [12], in homozygosis, in an Italian

patient with MLIII, as well as by Encarnação et al. [6], in heterozygosis, in a Portuguese patient. Expression studies of the mutant protein p.I403T in COS cells conducted by Tappino et al. (1) have showed that this mutation showed an expected molecular mass (170kDa), and they presumed that that protein is partially dysfunctional.

Genotype c.[1514G>A]+[1759C>T] was found in two unrelated patients with MLIII who were from the south and southeast regions of Brazil, from cities that are approximately 1,500 Km apart from each other. The patient from the south region has a brother with MLIII who has the same genotype and phenotype but who was not included in the present sample. These mutations are in the region that codifies subunit α of phosphotransferase. The first is a missense mutation, [p.C505Y], while the other is a nonsense mutation, [p. R587X]. This genotype is being reported for the first time, but these mutations have already been showed by Cathey et al. [8], in heterozygosis, in a patient with MLII (c.1759C>T; [p.R587X]; present in subunit α and in one patient with MLIII (c.1514G>A; [p.C505Y]; present in subunit α).

Genotype c.[1123C>T]+[?] was found in one patient with MLII. The other mutation remains unknown. This same mutation was diagnosed by Tappino et al. [12], in homozygosis, in a patient with the severe phenotype, and, in heterozygosis, in a patient with the attenuated phenotype (c.[1965delC]+[1123C>T]); both patients were Italian. Cathey et al. [8] have also diagnosed mutation c.1123C>T in four of the their compound heterozygous patients, one with the severe phenotype (c.[1123C>T]+[2693insA]) and three with the attenuated phenotype (c.[1123C>T]+[1196C>T] and c.[3335+6T>G]+[1123C>T]. This mutation is present in exon 10 and generates a premature termination codon, thus forming a truncated protein in the α region [p.R375X]. In their studies of transient expression in COS7 cells, Tappino et al. [12] showed that mutation c.1123C>T generates a protein of smaller size (~50kDa), thus suggesting that the functional activity of this enzyme has been lost.

Genotype c.[242G>T]+[?]; [p.W81L] was found in a patient with ML II. The other mutation remains unknown. Encarnação et al. [6] presented this mutation, in homozygosis, in one of their Portuguese patients with MLIII. In that same study, those authors also reported that patients who present mutations c.242G>T [p.W81L], c.1196C>T [p.S399F], and c.1208T>C [p.I403T] show a decrease in their levels of mRNA of the *GNPTG* gene, thus suggesting that this event may be related to the

existence of a feedback mechanism between the subunits codified by the *GNPTG* and *GNPTAB* genes and that patterns of expression of these genes seem to depend on the presence of specific mutations. Another hypothesis that could justify the phenotype of patient G, with only one pathogenic mutation identified, would be the presence of two silent mutations in exon 1: c.18G>A and c.27G>A. The first induces the change from the sixth CUG codon (frequency of codon usage= 39.6) to CUA (frequency of codon usage= 7.2). The second mutation changes the ninth CAG codon (frequency of codon usage= 34.2) to CAA (frequency of codon usage= 12.3). This could explain a greater alteration in the translation kinetics of the protein, generating an end protein with an altered conformation [24,26].

Conclusions

This is the first study of its kind conducted in Brazilian patients with MLII/III. Its findings suggest that the analysis of *GNPTAB* in these patients should be initiated by exon 19, thus optimizing the investigation and reducing costs. The results obtained herein have provided important information that emphasize the need for further studies to be performed, such as: the application of other techniques that will allow us to conclude the genotyping of the patients whose genotype has not been completely identified; the determination of the protein alteration conferred by mutation c.2269_2273delGAAAC; the performance of the gene expression study for mutation c.2808A>G; the performance of the study of haplotypes for deletion c.3503_3504delTC in the Brazilian population; and the determination of the frequency of the recurrent variants in healthy individuals.

Acknowledgements: This study was financed by *Programa de Apoio a Núcleos de Excelência* (PRONEX) of *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) and *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul* (FAPERGS); by CNPq; by FAPERGS; and by *Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos* (FIPE) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

References

- [1] D. Brooks, C.Turner, V.Muller, J. Hopwood, P. Meikle, I-cell disease, in J.A. Barranger, M.A. Cabrera-Salazar, *Lysosomal Storage Disease*, Springer, 2007, pp. 529-535.
- [2] S. Tiede, S. Storch, T. Lübke, B. Henrissat, R. Bargal, A. Raas-Rothschild, T. Braulke, Mucopolidosis II is caused by mutations in *GNPTA* encoding the alpha/beta GlcNac-1-phosphotransferase, *Nat. Med.* 11(2005) 1109-1112.
- [3] M. Zarghooni, S.S.R. Dittakavi, Molecular analysis of cell lines from patients with mucopolidosis II and mucopolidosis III, *Am. J. Med. Genet.* 149A(2009) 2753-2761.
- [4] T. Braulke, P.S. Storch, Molecular analysis of the GlcNac-1-phosphotransferase, *J. Inherit Metab Dis* 31 (2008) 253-257.
- [5] S.S. Cathey, M.Kudo, S. Tiede, A. Raas-Rothschild, T. Braulke, M. Beck, H.A. Taylor, W.M. Canfield, J.G. Leroy, E.F. Neufeld, V.A.McKusick, Molecular order in mucopolidosis II and III nomenclature, *Am. J. Med. Genet.* 146(A) (2008) 512-513.
- [6] M. Encarnação, L. Lacerda, R. Costa, M.J. Prata, M.F. Coutinho, H. Ribeiro, L. Lopes, M. Pineda, J. Ignatus, A. Mustonen, P. Vieira, M.R. Lima, S. Alves, Molecular analysis of the *GNPTAB* and *GNPTG* gene in 13 patients with mucopolidosis type II or type III – identification of eight novel mutations, *Clin Genet* 76 (2009) 76-84.
- [7] S. Kornfeld, W.S. Sly, I-cell disease and pseudo-hurler polydystrophy: disorders of lysosomal enzyme phosphorylation and localization, in: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle (Eds), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw-Hill, New York, 2001, pp. 3469-3482.
- [8] S.S. Cathey, J.G. Leroy, T. Wood, Phenotype and genotype in mucopolidosis II and III alpha/beta: a study of 61 probands, *J.Med.Genet.* 4 (2010) 38-48.
- [9] M. Bao, B.J. Elmendorf, J.L. Booth, R.R. Drake, W.M. Canfield, Bovine UDP-*N*-acetylglucosamine: lysosomal-enzyme *N*-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. II Enzymatic characterization and identification of the catalytic subunit, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 31446-31451.

- [10] M. Kudo, M. Bao, A. D'Souza, F. Ying, H. Pain, B.A. Roe, W.M. Canfield, The alpha- and beta-subunits of the human UDP-N-acetylglucosamine: lysosomal enzyme *N*-acetylglucosamine-1-phosphotransferase [corrected] are encoded by a single cDNA, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 36141-36149.
- [11] R. Bargal, M. Zeigler, B. Abu-Libdeh, V. Zuri, H. Mandel, Z. Ben Neriah, F. Stewart, N. Elcioglu, T. Hindi, M. Le Merrer, G. Bach, A. Raas-Rothschild, When mucopolidosis III meets mucopolidosis II: GNPTA gene mutations in 24 patients, *Mol. Genet. Metab.* 88 (2006) 359-363.
- [12] B. Tappino, N.A. Chuzhanova, S. Regis, A. Dardis, F. Corsolini, M. Stroppiano, E. Tonoli, T. Beccari, C. Rosano, J. Mucha, M. Blanco, M. Szlago, M. Di Rocco, D.N. Cooper, M. Filocomo, Molecular characterization of 22 novel UDP-N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase α - and β -subunits (GNPTAB) gene mutations causing mucopolidosis types II α / β and III α / β in 46 patients, *Hum. Mutat.* 30 (2009) E956-973.
- [13] E. Persichetti, N.A. Chuzhanova, A. Dardis, B. Tappino, S. Pohl, N.S. Thomas, C. Rosano, C. Balducci, S. Paciotti, S. Dominissini, A.L. Montalvo, M. Sibilio, R. Parini, M. Rigoldi, M. Di Rocco, G. Parenti, A. Orlacchio, B. Bembi, D.N. Cooper, M. Filocomo, T. Beccari, Identification and molecular characterization of six novel mutations in the UDP-N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase gamma subunit (GNPTG) gene in patients with mucopolidosis III gamma, *Hum. Mutat.* 30 (2009) 978-984.
- [14] <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>. Last access: 12/01/2010.
- [15] http://sift.jcvi.org/www.SIFT_seq_submit2.html. Last access: 12/01/2010.
- [16] K.H. Paik, S.M. Song, C.S. Ki, H.W. Yu, J.S. Kim, K.H. Min, S.H. Chang, E.J. Yoo, I.J. Lee, E.K. Kwan, S.J. Han, D.K. Jin, Identification of mutations in the GNPTA (MGC4170) gene coding for GlcNac-phosphotransferase alpha/beta subunits in Korean patients with mucopolidosis type II or type IIIA, *Hum. Mutat.* 26 (2005) 308-314.
- [17] M. Kudo, M.S. Brem, W.M. Canfield, Mucopolidosis II (I-cell disease) and mucopolidosis IIIA (classical pseudo-hurler polydysplasia) are caused by mutations

the GlcNac-phosphotransferase α/β -subunits precursor gene, *Am. J. Hum. Genet.* 78 (2006) 451-463.

[18] <http://www.geneclinics.org>. Last access: 01/10/2011.

[19] M. Plante, S. Claveau, P. Lepage, È-M. Lavoie, S. Brunet, D. Roquis, C. Morin, H. Vézina, C. Laprise, Mucopolidosis II: a single causal mutation in the N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase gene (GNPTAB) in a French Canadian founder population, *Clin. Genet.* 73 (2008) 236-244.

[20] N.A. Chamoles, M.B. Blanco, D. Gaggioli, C. Casentini, Hurler-like phenotype: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper, *Clin. Chem* 47 (2001) 2098-2102.

[21] M.F.Coutinho, M. Encarnação, R. Gomes, L. da Silva Santos, S. Martins, D. Sirois-Gagnon, R. Bargal, M. Filocarmo, A. Rass-Rothschild, B. Tappino, C. Laprise, G.K. Cury, I.V.D. Schwartz, O. Artigalás, M.J. Prata, S. Alves, Origin and spread of a common deletion causing mucopolidosis type II: insights from patterns of haplotypic diversity, *Clin. Genet* (2010) 1-8.

[22] S. Mozer, V. Telles, *Descobrimos a história – descobrimos a independente*, Ática, São Paulo, 2007, pp. 86-96.

[23] <http://www.cbs.dtu.dk/service/NetGene2/>. Last access: 01/06/2011.

[24] <http://www.kasuga.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=9606>. Last access: 01/06/2011.

[25] M. Kudo, W.M. Canfield, Structural requirements for efficient processing and activation of recombinant human UDP-N-acetylglucosamine: lysosomal-enzyme-N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase, *J.Biol.Chem.* 28 (2006) 11761-11768.

[26] A.A. Komar, SNPs, silent but not invisible, 2006, 10.1126/science. 1138239, disponível em www.scienceexpress.org.

Table 1. Mucopolipidosis II and III. Biochemical characterization of patients included in this study (n= 13)

Enzymes	Sample	Patient A	Patient B	Patient C	Patient D	Patient E	Patient F	Patient G	Patient I	Patient J	Patient K	Patient L	Patient M	Reference Values
Arylsulfatase A	Plasma	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
β -Glucuronidase	Plasma	795	475	1195	1037	1078	1058	994	900	906	818	2253	875	30-300 nmol/h/mL
Total β -Hexosaminidases	Plasma	21640	12675	14876	36533	11368	26417	21350	22155	39282	12888	10098	27427	1000-13490 nmol/h/mL
Iduronate-sulfatase	Plasma	NA	1864	2363	1707	1589	2510	2624	3038	1716	1575	1791	NA	122-463 nmol/4h/mL
α -Mannosidase	Fibroblasts	NA	16	NA	13	NA	19.1	NA	NA	NA	44	NA	4.6	60-400 nmol/h/mg
β -Galactosidase	Fibroblasts	11	132	NA	178	NA	6.7	2.3	NA	NA	220	NA	6.5	394-1440 nmol/h/mg
β -Glucuronidase	Fibroblasts	4.7	8.6	NA	4.5	NA	40	NA	NA	NA	37	NA	23	62-361 nmol/h/mg
α -Iduronidase	Fibroblasts	0.97	NA	NA	9.0	NA	6	2.5	NA	NA	67	NA	3.4	74-148 nmol/h/mg
Iduronate-sulfatase	Fibroblasts	NA	NA	NA	12	NA	17	NA	NA	NA	22	NA	5.4	35-80 nmol/4h/mg

NA: not analyzed; +: present; -: absent. Patient H was only investigated using filter paper and presented the following results: β -Glucuronidase: 44 nmol/h/mL (reference value: 4.02-14.79); Total β -Hexosaminidases: 463 nmol/h/mL (reference value: 28.8-132.7); Iduronate-sulfatase: 108 nmol/h/mL (reference value: 12-23).

Table 2. Summary of clinical characteristics of patients with Mucopolipidosis II/III included in the present study

Patient	ML Type*	Sex	Brazilian region of origin	Parental consanguinity	Age at diagnosis (years)	Age at study inclusion (years)	Height (cm)	Height Z score**
A	II	F	Southeast	No	0.2	0.2	?	NE
B	III	F	North	No	8.0	14.1	141.5	-2.66
C	III	M	Southeast	No	17.2	25.8	144.3	-4.42
D	III	M	South	No	35.7	38	149.0	-3.77
E	Undefined	M	Northeast	No	4.3	4.3	83.0	-5.43
F	II	F	Southeast	No	1.6	4.0	70.0	-7.8
G	II	F	Southeast	No	2.0	2.0	73.0	-4.05
H	II	F	Southeast	No	1.8	3.4	73.0	-6.25
I	II	M	Center-west	No	2.9	5.1	86.0	-5.38
J	III	M	Southeast	No	12.3	12.3	141.0	-1.5
K	III	M	South	No	5.4	17.9	107.5	-9.16
L	Undefined	M	Northeast	No	12.7	13.2	?	NE
M	II	M	Northeast	No	0.1	0.1	?	NE

*The classification of the type of Mucopolipidosis was done by the assistant physician. According to Cathey et al. [8], the final height of patients with MLII is <80cm, and of patients with MLIII is >115cm; **according to the World Health Organization (http://www.who.int/growthref/who2007_height_for_age/en/index.html); ?: Information unavailable; NE: not evaluated.

Table 3. Pathogenic mutations found in the *GNPTAB* gene of 13 unrelated Brazilian patients with Mucopolipidosis II/III

Patients	Genotype (cDNA)	Genotype (protein)	Phenotype	In silico analysis of the effect in the protein**		Parental genotype***
				Polyphen2	SIFT	
A	c.[1123C>T]+[?]	p.[R375X]+[?]	ML II	NA	NA	Mother: c.[1123C>T]+[N]
B	c.[?]+[?]	NA	ML III	NA	NA	NA
C	c.[1514G>A]+[1759C>T]	p.[C505Y]+[R587X]	ML III	Probably deleterious	Intolerable	Mother: c.[1514G>A]+[N] Father: c.[1759C>T]+[N]
D	c.[1514G>A]+[1759C>T]	p.[C505Y]+[R587X]	ML III	Probably deleterious	Intolerable	NA
E	c.[1208T>C]+[3503_3504delITC]	p.[I403T]+[L1168QfsX5]	Undefined	Probably deleterious	Intolerable	Mother: c.[1208T>C]+[N] Father: c.[3503_3504delITC]+[N]
F	c.[3503_3504delITC]+[?]	p.[L1168QfsX5]+[?]	ML II	NA	NA	NA
G	c.[242G>T]+[?]	p.[W81L]+[?]	ML II	Probably deleterious	Intolerable	NA
H	c.[2269_2273del(GAAC)+[2269_2273del(GAAC)]	p.[E757KfsX1]+[E757KfsX1]*	ML II	NA	NA	NA
I	c.[3503_3504delITC]+[?]	p.[L1168QfsX5]+[?]	ML II	NA	NA	NA
J	c.[?]+[?]	NA	ML III	NA	NA	NA
K	c.[1196C>T]+[3503_3504delITC]	p.[S399F]+[L1168QfsX5]	ML III	Probably deleterious	Intolerable	Mother: c.[1196C>T]+[N] Father: c.[3503_3504delITC]+[N]
L	c.[3503_3504delITC]+[?]	p.[L1168QfsX5]+[?]	Undefined	NA	NA	NA
M	c.[3503_3504delITC]+[3503_3504delITC]	p.[L1168QfsX5]+[L1168QfsX5]	ML II	NA	NA	NA

?: Unidentified mutation; NA: not analyzed; N: normal allele; *: inference about the possible alteration in the protein, no expression studies were conducted; **: Conducted only in case of missense mutations; Polyphen2 is available at <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2> and classifies variations as benign/possibly deleterious/or probably deleterious, and SIFT is available at http://sift.jcvi.org/www/SIFT_seq_submit2.htm and classifies variation as tolerable or intolerable; ***: Parents were analyzed only in relation to the mutations found in the proband.

Table 4. Non-pathogenic mutations found in the *GNPTAB* gene of Brazilian patients with Mucopolidosis II/III

Mutations		c.-41-39delGGC rs76300806*	c.18G>A rs4764655*	c.27G>A rs222504*	c.323+20delT **	c.365+96_97delGT **	c.1285-166G>A ***	c.1932A>G rs10778148*	c.2808A>G **	c.3135+5T>C rs759935*	c.3336-25T>C rs3736476*
Patients	location	5'UTR	exon 1	exon 1	intron 3	intron 4	intron 10	exon 13	exon 14	intron 15	intron 17
A	mother	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+
B	father	-/-	NA	NA	-/-	+/+	-/-	-/-	NA	NA	-/-
	mother	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+
C	father	+/+	NA	NA	+/+	+/+	-/-	-/-	NA	NA	-/-
	mother	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
D	father	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	NA	NA	+/+
	mother	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	NA	NA	+/+
E	father	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+
	mother	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	NA	NA	+/+
F	father	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	NA	NA	+/+
	mother	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	NA	NA	+/+
G	father	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+
	mother	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+
H	father	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+
	mother	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
I	father	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+
	mother	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
J	father	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	NA	NA	NA
	mother	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	NA	NA	NA
K	father	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	NA	NA	+/+
	mother	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	NA	NA	+/+
L	father	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	NA	NA	+/+
	mother	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	NA	NA	+/+
M	father	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+
	mother	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+

-/-: normal for the mutation; +/-: heterozygous for the mutation; +/+ : homozygous for the mutation; NA: not analyzed; *dsSNP RS (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>); ** : mutations described for the first time in this study; *** : mutation described by Kudo et al. [17]. The regions sequenced in parents were those that presented alterations in probands.

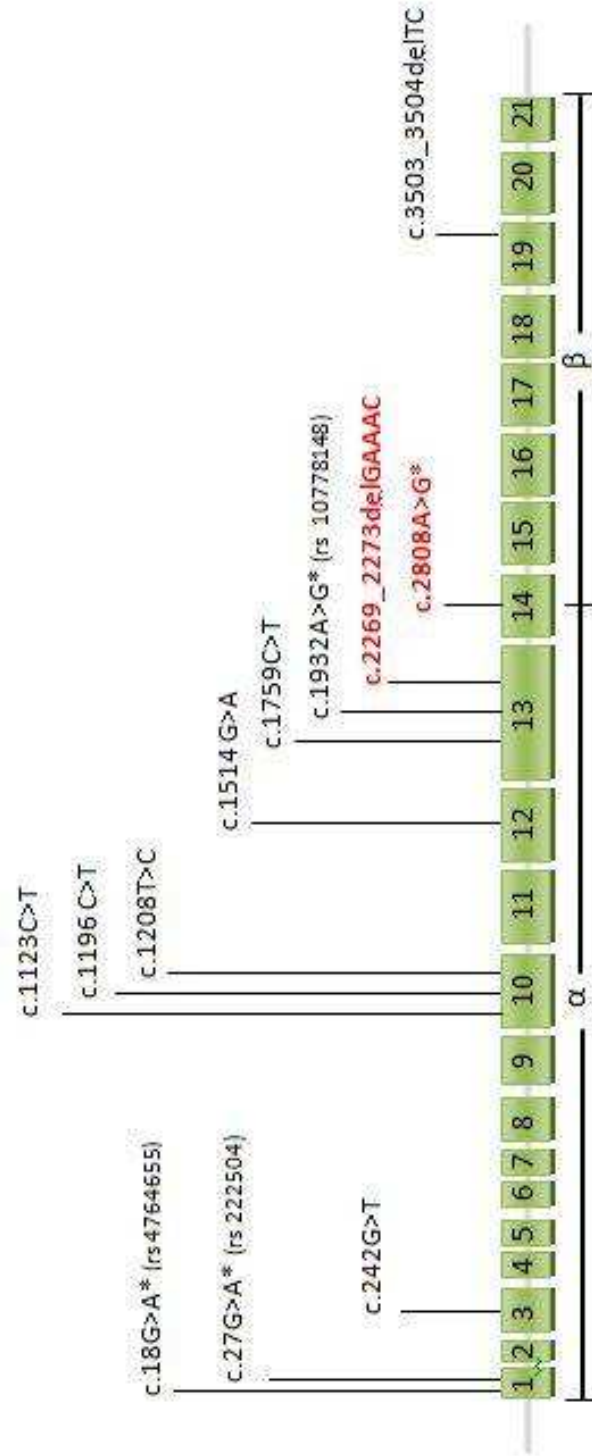


Figure 1. Distribution of mutations found in the present study in the coding region of GNPTAB gene (modified by Tappino et al [12]). In red: mutations described for the first time in the present study. In black: mutations already described in the literature. *Mutations considered non-pathogenic. α and β units of phosphotransferase are represented.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No decorrer deste estudo tivemos alguns empecilhos. Eles iniciaram com a imensa dificuldade na padronização das reações de PCR e na falta de reprodutibilidade das reações com amostras de pacientes e genitores. Isto gerou um atraso no cronograma proposto, devido à necessidade de ajustes nas reações. Além disto, pelo fato do gene possuir grande heterogeneidade alélica, foi necessária a repetição de muitos sequenciamentos para a confirmação dos achados.

Neste período, dois sequenciadores foram danificados de forma irreversível devido à grande variação na corrente elétrica local. Assim, tivemos que nos adaptar à falta destes equipamentos por um longo período, até que fossem adquiridos novos termocicladores por meio de editais de pesquisa. Atualmente, a rede elétrica já se encontra ajustada e estabilizadores adequados garantem a proteção dos novos equipamentos.

As ausências de crescimento de algumas culturas de fibroblastos também causaram transtornos, pois não foi possível realizar a confirmação do diagnóstico de ML com a medição de atividade enzimática nestas células.

AÇÕES COMPLEMENTARES

Como possuíamos amostras de 11 genitores, optamos por analisar as mutações também nestas amostras. Desta forma, confirmamos todas as mutações encontradas nos pacientes e iniciamos o banco de dados para o estudo de haplótipos.

PERSPECTIVAS

Para os próximos anos pretendemos realizar:

1. A investigação em controles e o estudo de expressão gênica para a mutação c.2808A>G, descrita pela primeira vez neste estudo, a fim de confirmá-la como alteração patogênica ou como a segunda mutação do paciente J deste estudo.
2. O estudo de haplótipos na nossa população.
3. A análise do gene *GNPTG* para os dois pacientes para os quais não encontramos mutações no gene *GNPTAB*.
4. A investigação complementar dos pacientes para os quais a segunda mutação permanece desconhecida (exclusão de duplicação e de mutações em região não sequenciadas neste estudo).
5. Estudos de expressão gênica em amostras de fibroblastos para os pacientes genotipados pelo SGM-HCPA.

CONCLUSÕES

As conclusões serão apresentadas em relação aos objetivos específicos desse trabalho.

Objetivo Específico 1:

- Delinear os aspectos genéticos das MLII e III no Brasil.

Conclusões:

1. O *GNPTAB* é um gene de difícil análise e que apresenta grande heterogeneidade alélica;

2. A estratégia utilizada neste estudo (sequenciamento direto das regiões codificantes e das junções exon-intron do *GNPTAB*) mostrou sensibilidade inferior àquela descrita na literatura, achado que talvez indique a presença de perfil diverso de mutações em nosso meio;

3. A análise de DNAg possibilitou a identificação de novas mutações não-patogênicas em regiões não-codificantes, as quais não teriam sido identificadas caso fosse analisado RNA;

4. A maioria dos pacientes brasileiros com MLII/III apresenta ML α / β ;

5. A deleção c.3503_3504delTC localizada no exon 19 é a mutação patogênica mais frequente em pacientes brasileiros com MLII/III. Desta forma, sugere-se que a análise de DNA desses pacientes seja iniciada com a análise de tal exon.

Objetivo Específico 2:

- Estudar a associação genótipo-fenótipo neste grupo de pacientes.

Conclusões:

1. O estudo da associação genótipo-fenótipo não foi realizado de forma completa devido à falta de dados clínicos.

2. Em virtude da distância física dos pacientes estudados, os ensaios bioquímicos não puderam ser confirmados na sua totalidade, pela impossibilidade de coleta de fibroblastos. Além disso, algumas amostras coletadas não puderam ser analisadas devido à ausência de crescimento dos fibroblastos em cultura.

3. Os nossos dados sugerem que mutações sem sentido e deleções com alteração na fase de leitura estão relacionadas ao fenótipo grave (MLII), enquanto mutações de sentido trocado estão relacionadas ao fenótipo atenuado (MLIII).

ANEXOS

Anexo 1 – Artigo em Parceria com Grupo de Pesquisadores Portugueses



Short Report

Origin and spread of a common deletion causing mucopolipidosis type II: insights from patterns of haplotypic diversity

Coutinho MP, Encarnação M, Gomes R, da Silva Santos L, Martins S, Sirois-Gagnon D, Barga R, Filocamo M, Rasz-Rothschild A, Tappino B, Laprise C, Cury GK, Schwartz IV, Artigales G, Prata MJ, Alves S. Origin and spread of a common deletion causing mucopolipidosis type II: insights from patterns of haplotypic diversity.

Clin Genet 2010. © John Wiley & Sons A/S, 2010

Mucopolipidosis II (ML II alpha/beta), or I-cell disease, is a rare genetic disease in which activity of the uridine diphosphate (UDP)-N-acetylglucosaminyl-lysosomal enzyme

N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase (GlcNAc-1-phosphotransferase) is absent. GlcNAc-1-phosphotransferase is a multimeric enzyme encoded by two genes, *GNPTAB* and *GNPTG*. A spectrum of mutations in *GNPTAB* has been recently reported to cause ML II alpha/beta. Most of these mutations were found to be private or rare. However, the mutation c.3503_3504delTC has been detected among Israeli and Palestinian Arab-Muslim, Turkish, Canadian, Belgian, Portuguese, Irish traveller and US patients. We analysed 44 patients who were either homozygous or compound heterozygous for this deletion (22 Italian, 8 Arab-Muslim, 1 Turk, 3 Argentinians, 3 Brazilians, 2 Irish travellers and 5 Portuguese) and 18 carriers (15 Canadian and 1 Italian) for three intragenic

polymorphisms: c.-41_39delGTC, c.160>A and c.1912A>G as well as two microsatellite markers flanking the *GNPTAB* gene (D12S1607 and D12S1727). We identified a common haplotype in all chromosomes bearing the c.3503_3504delTC mutation. In summary, we showed that patients carrying the c.3503_3504delTC deletion presented with a common haplotype, which implies a common origin of this mutation. Additionally, the level of diversity observed at the most distant locus indicates that the mutation is relatively ancient (around 2063 years old), and the geographical distribution further suggests that it probably arose in a peri-Mediterranean region.

Conflict of Interest

None of the authors declare any conflict of interest. The study sponsors played no role in study design, collection, analysis and interpretation of data.

MF Coutinho^{1,2},
M Encarnação¹, R Gomes¹,
L da Silva Santos¹, S Martins¹,
D Sirois-Gagnon³, R Barga⁴,
M Filocamo⁵,
A Rasz-Rothschild⁶,
B Tappino⁷, G Laprise⁸,
GK Cury⁹, IV Schwartz^{10,11},
G Artigales¹², MJ Prata¹³ and
S Alves²

¹Medical Genetics Center Jacinto Magalhães, Research and Development Unit, Department of Genetics, ICSA, Portugal; ²Department of Biology, Faculty of Sciences, Porto, Portugal; ³STATMUP, Porto, Portugal; ⁴Université du Québec à Chicoutimi, Département des Sciences Paramédicales, Saguenay, Québec, Canada; ⁵Department of Human Genetics and Metabolic Diseases, Hadassah Hebrew University Medical Center, Jerusalem, Israel; ⁶Diagnostic Pro-Pediatrics Malattia Metabolica Laboratory-ROO G. Galati, Genova, Italy; ⁷Post Graduate Program in Medicine, Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; ⁸Medical Genetics Service, Clinical Hospital of Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil; ⁹Genetics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, and ¹⁰Post Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Key words: c.3503_3504delTC – common origin – haplotype analysis – mucopolipidosis

Corresponding author: Sandra Alves, Medical Genetics Center Jacinto Magalhães, ICSA, Praça Padre Nuno, 85, 4150-125 Porto, Portugal
Tel.: +351 228370000;
fax: +351 228172388

Maculipigment II (ML II) is an autosomal recessive disease of lysosomal hydrolase trafficking caused by total or near total deficiency of the uridine diphosphate (UDP)-*N*-acetylglucosamine:lysosomal enzyme *N*-acetylglucosamine-1-phosphotransferase (GlcNAc-phosphotransferase, EC 2.7.8.17). GlcNAc-phosphotransferase is a hexameric complex of $\alpha 2\beta 2\gamma 2$ whose α and β subunits are encoded by the *GNPTAB* gene (MIM# 603840). A spectrum of mutations in this gene has been reported to cause ML II alpha/beta, and most of the mutations have been found to be private or rare. However, the microdeletion mutation c.3503_3504delTC was found to be a common founder mutation in a French-Canadian population (1). Furthermore, it shows a remarkably wide geographical distribution, having been detected among Israeli and Palestinian Arab-Muslim, Turkish, Irish traveller (2), Italian (3), Portuguese (4) and US patients (5).

Up to now, c.3503_3504delTC has been considered the most common pathogenic mutation associated with ML II. Because the molecular defect involves a 2-bp deletion from a small repeat CTCT sequence, which appears to have originated through slippage mispairing (5), the question arises whether such an error occurred more than once, suggesting that the c.3503_3504delTC mutation has a recurrent origin.

To investigate whether the worldwide spread and frequent c.3503_3504delTC mutation was due to a unique founder molecular lesion or if the deletion arose more than once through a recurrent mutational event, we assessed the diversity at two microsatellite markers flanking the *GNPTAB* gene and three *GNPTAB* intragenic polymorphisms among 44 ML II patients whose previous molecular characterization revealed them to be homozygous or compound heterozygous for c.3503delTC (1–4). This sample corresponds to the majority of characterized patients harbouring this deletion and is comprised of individuals from very distinct populations: Portuguese, Italian, Israeli Arab-Muslim, Brazilian, Turkish, Argentinean and Irish travellers. The criterion for their selection was the availability of biological material for the analyses. Additionally, healthy individuals of French-Canadian and Italian origin known to be obligatory carriers of c.3503_3504delTC were

also enrolled in the study. It is important to stress that this sample is highly representative because ML II is a rare disease, with an estimated birth prevalence in Portugal of 0.16 cases per 100,000 live births (6). This rate is in accordance with other values of birth prevalence calculated for different populations including 3 cases per 1,000,000 births in Australia (7) and 0.8 cases per 1,000,000 live births in the Netherlands (8).

Results from the haplotypic backgrounds clearly pointed to a common origin of the analysed c.3503delTC chromosomes. Furthermore, an age estimate of the mutation indicates that it is ancient enough to explain the present-day broad geographical distribution.

Materials and methods

Patients and controls

We analysed 44 patients who were either homozygous or compound heterozygous for the c.3503_3504delTC mutation (22 Italians, 8 Israeli Arab-Muslims, 5 Portuguese, 3 Argentineans, 3 Brazilians, 1 Turk and 2 Irish travellers). Additionally, 15 healthy carriers from Canada and 1 from Italy who were parents of children with ML II and known to be homozygous for c.3503_3504delTC were studied (see Table S1). Portuguese, Italian and Argentinean, Israeli Arab-Muslim and Canadian patients and/or carriers were previously characterized for the *GNPTAB* gene (1–4). A sample of 45 healthy Portuguese individuals was also analysed.

Polymorphisms and genotyping procedures

Three *GNPTAB* intragenic polymorphisms, c.-41_39delGGC (rs76300806), c.18G>A (rs4764655) and c.1932A>G (rs10778148), located in the 5' UTR region, exon 1 and exon 13, respectively, as well as two microsatellite markers, D12S1607 and D12S1727, flanking *GNPTAB* and 0.034 and 0.43 Mb distant from the gene, respectively, were used for the haplotypic analysis (see Fig. 1). D12S1607 and D12S1727 are dinucleotide repeats, whereas c.-41_39delGGC is a 3-bp Indel. The three intragenic polymorphisms of c.-41_39delGGC, c.18G>A and c.1932A>G

Origin and spread of a common deletion causing mucopolysaccharidosis type II

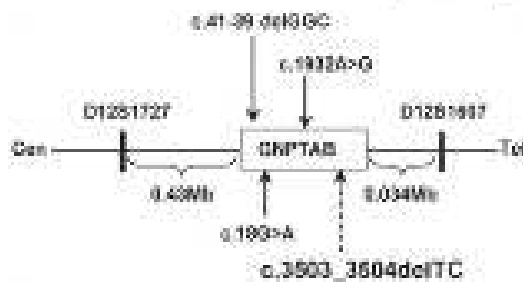


Fig. 1. Schematic representation of the polymorphisms studied and their relative distance to the c.3503_3504delTC mutation. Gen, Centromere; Tel, Telomere.

were screened by direct sequencing as previously described in Encarnação et al. (4).

As for the two microsatellites, D12S1607 and D12S1727, the polymerase chain reaction (PCR) products were separated in an ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) after amplification with fluorescently labelled primers. A multiplex system for the simultaneous detection of the two microsatellites was developed (primers and PCR conditions upon request).

Haplotype determination

In patients homozygous for the c.3503delTC deletion, the haplotype phase was directly inferred.

In patients who were compound heterozygous for the deletion or in healthy carriers, PHASE software version 2.0 (<http://www.stat.washington.edu/stephens/software.html>) was used to reconstruct the haplotypes from genetic data while taking into account allele frequencies and phase-known haplotypes. Only haplotype pairs with a probability greater than 0.6 were used for further analyses.

Allele frequency distributions in mutant and control Portuguese chromosomes were compared by evaluating the significance of the difference in proportions as previously described (9). The Z statistic was calculated using the Differ program of the *pcis* package (<http://sagebrushpress.com/pep.html>).

Standard diversity indices were calculated according to Nei (10) using the *ARLROUTS* program (11).

Estimation of age

To estimate the age of the deletion from the variation accumulated in their ancestral haplotypes, both recombination (c) and mutation (μ) rates were considered in the generation of variation as described in Ref. (12). The probability of change

per generation was given by $\lambda = 1 - [(1 - c)(1 - \mu)]$, and the average of the mutation and recombination events (λ) equals λt , where t is the number of generations.

The recombination rate (c) was based on the physical distance between the two most distant markers D12S1727 and D12S1607 (540 Kb): $c = 0.0054$, when using a conversion factor of 1 Mb = 1 cM as reported for this genomic region (13). The estimated probability of mutation per generation and per polymorphism was 1.56×10^{-3} [as two dinucleotides and three single nucleotide polymorphisms (SNPs) were used]. The mutation rate for the dinucleotides was considered to be 7.8×10^{-4} (14). For the two SNPs and the Indel c.41_39delG, the assumed mutation rate was 2×10^{-4} (15). Moreover, a mean value of 25 years was presumed to correspond to each generation.

Results and discussion

Ancestral haplotype identification

Table 1 contains a list of the inferred or reconstructed haplotypes that were found as background in 61 chromosomes harbouring the c.3503_3504delTC mutation. Haplotypes were defined by variation at the five markers of D12S1727, c.41_39delGGC, c.18G>A, c.1932A>G and D12S1607, whose order is indicated according to the chromosomal location presented in Fig. 1.

Without accounting for the population of origin, a total of nine different haplotypes were detected. One of them, H1:13:7:G:G:12, was clearly predominant and present in 29 out of the 61 mutant chromosomes (49%). This haplotype was shared by Italian, Portuguese and Israeli Arab-Muslim patients. Among the Italians, H1 reached the especially high frequency of 70% (21/30 chromosomes); among the Portuguese, it was also the most common haplotype occurring at a frequency of 37.5% (3/8 chromosomes). Among Israeli Arab-Muslims, 25% of the chromosomes were found to contain c.3503_3504delTC (4/16), despite it not being the most frequent haplotype.

It is noteworthy that 59 of the 61 disease-associated chromosomes (97%) shared a core haplotype covering four of the five polymorphic markers analysed. This core haplotype showed the allelic array of 7:G:G:12 at c.41_39delGGC, c.18G>A, c.1932A>G and D12S1607, respectively, which was found to be distinct in only two chromosomes from Italian patients: one harboured the 4-locus haplotype 8:G:G:12, and the other contained 7:G:G:18 according to the same locus order as the core haplotype. When compared to the core,

Coutinho et al.

Table 1. Haplotypes present on the 3503_3504delTC chromosome and age estimation

	Haplotype	D12S1807	c.41_39delGGC	c.182>A	c.1839A>G	D12S1807	Chromosome	Mutation	Age (years)
							No.	no.	
All samples	H1	13	T	G	G	13	38	0	3002 ± 738
	H2	13	T	G	G	13	2	1	
	H3	14	T	G	G	13	8	1	
	H4	18	T	G	G	13	2	2	
	H5	16	T	G	G	13	10	1	
	H6	17	T	G	G	13	4	1	
	H7	13	T	G	G	13	2	2	
	H8	17	A	G	G	13	1	1	
	H9	13	T	G	G	13	15	1	
Italians	H1	13	T	G	G	13	27	0	1070 ± 521
	H2	13	T	G	G	13	2	1	
	H3	14	T	G	G	13	4	1	
	H6	17	T	G	G	13	1	1	
	H9	13	T	G	G	13	1	1	
Portuguese	H1	13	T	G	G	13	3	0	2147 ± 803
	H2	14	T	G	G	13	1	1	
	H4	18	T	G	G	13	2	2	
	H6	17	T	G	G	13	2	1	
Arab-Muslims	H1	13	T	G	G	13	8	0	2687 ± 3147
	H5	16	T	G	G	13	10	1	
Argentines	H2	13	T	G	G	13	2	—	—
Dutchers	H2	17	T	G	G	13	1	—	—
Travellers	H1	13	T	G	G	13	1	—	—
	H3	14	T	G	G	13	2	—	—
	H6	17	T	G	G	13	1	—	—

each of the remaining two haplotypes differed by alleles at only one marker.

This finding indicates that the region encompassing the four polymorphic markers is in strong linkage disequilibrium with c.3503_3504delTC, which leads to the conclusion that this disease-causing mutation in *GNPTAB* occurred only once in a founder-haplotype. Furthermore, the pattern of 7-G-G-12 distribution together with its wide population dissemination strongly support the hypothesis that this 4-locus haplotype was the ancestral configuration from which the molecular lesion c.3503_3504delTC first arose.

A network was constructed with the nine detected haplotypes (Fig. 2), assuming the most parsimonious relationships between them as well as taking into consideration the number of stepwise events required, the distance between the markers involved, the presence of intermediate haplotypes in the populations to which the patients belonged and data on allele and haplotype frequency in the controls when available.

The network illustrates the close molecular relationships between the distinct haplotypes and shows that relative to the most frequent haplotype H1 the majority of the remaining haplotypes are connected through simple stepwise events of mutation or recombination. Except for

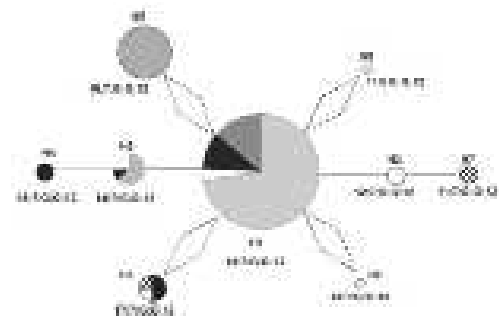


Fig. 2. Network showing the most parsimonious relationships among the nine detected haplotypes. The link between haplotypes (mutation or recombination) was determined while taking into consideration the number of stepwise events required, the distance between the genetic markers involved, the presence of intermediate haplotypes in the populations to which the patients belonged and data on the allele and haplotype frequencies in the controls (when available). Dashed diamonds expressed the occurrence of recombination (haplotype H1 to haplotypes H2, H3, H8 and H9) and straight lines represent the occurrence of mutation (haplotype H1 to haplotypes H2, H3, H4 and H7). Circles are proportional to the absolute frequency of the haplotypes. White: Italian; Black: Portuguese; Grey: Arab-Muslims; Square: Argentines.

the two molecular steps that underlie the origin of H8 and H9, which involved the markers c.41_39delGGC and D12S1807, respectively, all

Origin and spread of a common deletion causing mucopolidosis type II

other diversification events occurred at the locus D12S1727. This result is fairly understandable given that this marker is the furthest away from the target molecular lesion *c.3503-3504delTC*, which allows for more recombination opportunities. This observation explains why the second most frequent haplotype H5, which harbours the 5-allelic background 16:7:G:G:12, differs only from the most common haplotype at allele 16, which is present at D12S1727 instead of allele 13. H5 was found exclusively in Israeli Arab-Muslim patients, where it reached the elevated frequency of 75%, probably due to the effects of genetic drift.

To better evaluate the extent of linkage disequilibrium in mutation-bearing chromosomes, we compared the allele frequencies at the five polymorphic markers used to define haplotypes with the values estimated in healthy controls. Because our control sample contained only Portuguese subjects, we excluded the Israeli Arab-Muslims, Brazilians and Argentinians from the comparison. Consequently, the analysis was performed with only the haplotypes inferred for the European individuals from Table 1 (Italian and Portuguese) under the assumption that the Portuguese controls would work as a reasonable reference for healthy Europeans.

The graphical representation of allele frequencies in normal and mutation-bearing chromosomes is presented in Fig. 3. The five alleles defining the haplotype 13:7:G:G:12 had frequencies in chromosomes without the deletion that were significantly different from values in *c.3503-3504delTC* chromosomes. Extreme linkage disequilibrium was observed between the mutation and the polymorphic markers *c.18G>A* and *c.1932A>G*, but all five alleles were over-represented among the mutant chromosomes when compared to controls: allele 13 (D12S1727) 0.66 vs 0.43 ($p = 0.028$); allele 7 (*c.-41_-39delTGGC*) 0.97 vs 0.56 ($p = 0$); allele G (*c.18G>A*) 1.0 vs 0.87 ($p = 0.046$); allele G (*c.1932A>G*) 1.0 vs 0.47 ($p = 0$); allele 12 (D12S1607) 0.97 vs 0.27 ($p = 0$). Phase-inferred 5-locus haplotypes were achieved for 84 normal chromosomes, among which 35 different haplotypes could be found. In the controls, the haplotype diversity reached the very high value of 0.954 as compared to 0.709, which was estimated for the overall sample of mutated chromosomes. Furthermore, the most common haplotypic background occurred at a moderate frequency of 14% for the extended haplotype 13:7:G:G:12 and 21% for the core 7:G:G:12, which sharply contrasted with 49% and 97%, respectively, in

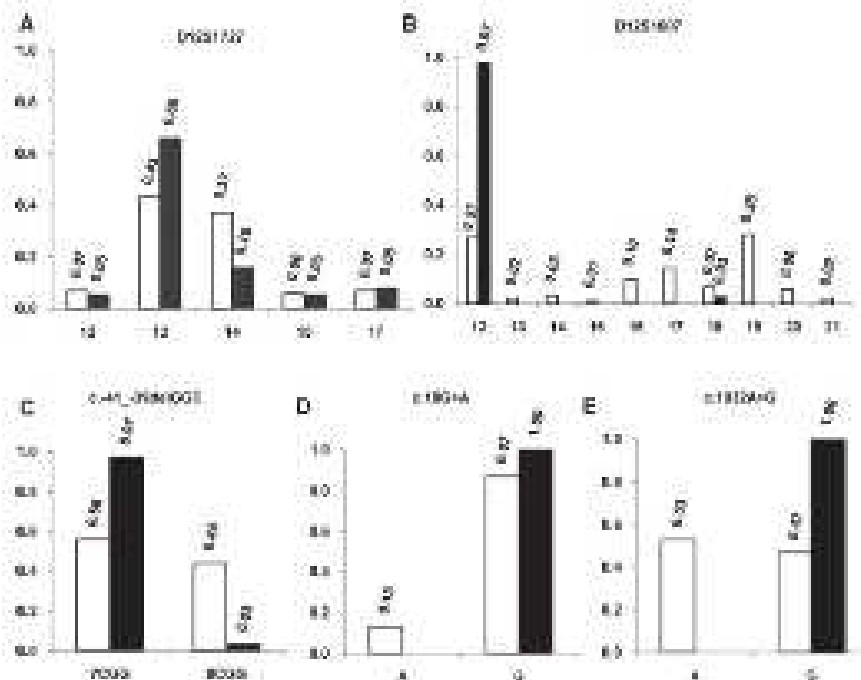


Fig. 3. Polymorphism allele frequency distributions within the wild-type Portuguese chromosomes and the *3503-3504delTC* Italian and Portuguese chromosomes. (a) D12S1727; (b) D12S1607; (c) *c.-41_-39delTGGC*; (d) *c.18G>A*; (e) *c.1932A>G*. White bars: wild type; black bars: *3503-3504delTC*.

Coutinho et al.

the mutated chromosomes. Therefore, it seems extremely unlikely that independent events leading to the same pathogenic deletion could have occurred in an identical haplotypic background, which reinforces the hypothesis of a single origin for the mutation under analysis.

In this study, 15 Canadian carriers of *c.3503_3504delTC* were also enrolled. They were healthy parents of confirmed homozygous patients for the deletion, but the PHASE program failed to determine their 5-locus haplotypes with enough certainty; however, this limitation could be overcome if the homozygous children were available. However, when haplotypes were inferred based upon the three polymorphic markers of *c.41_39delGGC*, *c.18C>A*, and D12S1607, the threshold of confidence was attained for the majority of chromosomes, and all shared the inferred haplotypic combination of 7:G:12. Furthermore, when looking at genotypes of the Canadian individuals (Table S1), it is possible to observe the presence of the common haplotype of 12:7:G:G:12 in all subjects, which is very likely in phase with the deletion. Because this haplotype is only one mutational step away from 13:7:G:G:12, this observation adds evidence of a common origin of the chromosomes carrying the molecular lesion.

The PHASE program was also unable to infer haplotypes with enough certainty in all the Argentinian, Brazilian and Turkish patients who carried the *c.3503_3504delTC* mutation together with a second pathogenic mutation, probably due to the very small number of studied patients. However, examination of their genotypes at the five polymorphic markers (Table S1) did not exclude the possibility that they harbour either 13:7:G:G:12 or other haplotypes with close molecular features.

c.3503_3504delTC age estimation

The presence of detectable linkage disequilibrium at markers flanking the *c.3503_3504delTC* mutation and the availability of defined map distances for each marker allowed for an estimation of the coalescent time of the mutated chromosomes.

Because 13:7:G:G:12 was the most widespread and well-represented haplotype, we first assumed that it was the most ancestral lineage when calculating the time needed for haplotypic diversification and assuming the events used to construct the network in Fig. 2 (also explicitly indicated in Table 1). Calculations were performed individually for chromosomes belonging to Italian, Israeli Arab-Muslim and Portuguese subjects and yielded ages of 1079, 2697 and 3147 years, respectively (Table 1). When the entire set of

chromosomes was considered, the obtained age was 2063 years. Next, an alternative scenario for the founder haplotype was modelled. Only two haplotypes were detected among the Israeli Arab-Muslims, and we assumed that the most prevalent one, 16:7:G:G:12, was the founder from which the latter, 13:7:G:G:12, was derived through recombination. In this population, the derived age estimate was 899 ± 716 years, whereas it was 4186 ± 1504 years in the whole set of chromosomes (data not shown in Table 1). Because 16:7:G:G:12 was restricted to Israeli Arab-Muslim individuals, no other computations were performed.

Whichever founder was assumed, the range of ages was in agreement with the levels of haplotypic diversity within mutation-bearing chromosomes across the three populations, which were 0.492 ± 0.099 in Italians, 0.400 ± 0.114 in Israeli Arab-Muslims and 0.21 ± 0.100 in Portuguese individuals.

The greatest diversity found in Portuguese individuals does not necessarily mean that this population was the ancestral one where the mutation first arose. Low representation of Portuguese samples with respect to the total number of individuals may generate an ascertained bias. Patterns of diversity and, consequently, age estimates are highly influenced by selective pressures and demographic effects. While no reasons are envisioned for why selection over mutated chromosomes would have acted differently in Italian, Israeli Arab-Muslim and Portuguese individuals, reasons do exist to believe that demography might have played a role in the reduced level of diversity in Italians and Israeli Arab-Muslims. In fact, approximately 40% of the Italian patients studied here are from Sicily, a region where extensive genetic drift effects have been documented (16); whereas among Israeli Arab-Muslims, consanguineous unions are a common tradition (17). If one admits that demographic effects very probably account for the reduced haplotypic diversity in Italians and Israeli Arab-Muslims, then the age estimates of the mutation in both population groups must be a serious underestimate.

To address questions about the region where *c.3503_3504delTC* initially originated and its subsequent dispersion route, it would be essential to have a more comprehensive picture of the worldwide haplotypic distribution within mutated chromosomes. Nevertheless, given the strong molecular evidence gathered here that this mutation arose only once and knowing that it is well represented both in Europe and the Middle East, the

Origin and spread of a common deletion causing mucopolidiosis type II

answer certainly lies within the most important past migrations of the people into the two regions.

The timeframe of our age estimates either accommodates the demographic expansion subsequent to the Neolithic transition, which was initiated approximately 10,000 years ago in the Near East, or the movement associated with the expansion of the Phoenicians who spread their civilisation across the entire Mediterranean region during the more recent Bronze Age. Both of these movements of people were directed from the Eastern Mediterranean towards Europe, whereas no migration with an equivalent impact was recorded in the reverse direction.

For now, the best reconstruction for the origin and spread of the c.3503_3504delTC mutation is to assume that it probably arose in an Eastern peri-Mediterranean region of Europe, having later been introduced to the continent by migrants coming from the region encompassing the Middle/Near East. The remarkable frequency of the c.3503_3504delTC mutation among Arab-Muslims clearly favours this hypothesis, but once this population is examined, the deletion is anchored in two well-represented haplotypes, 13:7:G:G:12 and 16:7:G:G:12. Thus, some doubt persists about in which background the original mutational event occurred. Whatever the case, only 13:7:G:G:12 appears to have entered Europe or at least underwent successful dissemination throughout the continent.

In very recent historical times, the massive emigration of Europeans to the New World represented the travelling vehicle of the mutation to the American continent. All examined mutated chromosomes from individuals belonging to North or South American countries fell into the category of the European founder haplotype or its closest molecular derivatives (for instance, in Quebec, Canada, the introduced haplotype seems to be 12:7:G:G:12).

In summary, the assessment of haplotypic diversity within a considerable worldwide sample of chromosomes bearing the pathogenic c.3503_3504delTC mutation allowed for the inference that they are descendents of a single founder ancestor. This result means that the molecular damage from which the most prevalent pathogenic mutation associated with ML II arose appears to have occurred only once, probably in a peri-Mediterranean region out of Europe. Its introduction in Europe is ancient enough to explain the present-day broad geographical distribution in the continent as well as in populations of recent European ancestry. Demography appears to have acted as a major determinant of the pattern of distribution

of the c.3503_3504delTC mutation across distinct populations.

Supporting Information

The following Supporting Information is available for this article: Table S1. Samples analysed and genotypes.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Please note: Wiley-Blackwell Publishing is not responsible for the content or functionality of any supplementary materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

Acknowledgements

This work was supported by PCT - project PRONUT012012007 (<http://dhh.fhc.unesp.br>), C. M. F. and M. S. received grants from the PCT (SPR010104410002008, SPR010103022008000), Italian samples were obtained from the 'Cell Line and DNA Bank from Patients Affected by Genetic Diseases' (IG. Gaslini Institute) - Telethon Genetic Biobank Network (Project No. 010070014). The Brazilian Research Agency (CNPq) financed the characterization of Brazilian patients. C. G. S. received a grant from CAPES/Brasil.

References

- Flaris M, Chrousos S, Lopez F et al. Mucopolidiosis II: a single causal mutation in the N-acetylglucosaminase-1-phosphotransferase gene (GNPTAB) in a French Canadian founder population. *Clin Genet* 2000; 73: 236-244.
- Bergel R, Ziegler M, Abu-Libid B et al. When Mucopolidiosis III meets Mucopolidiosis II: GNPTA gene mutations in 24 patients. *Mol Genet Metab* 2009; 98: 199-203.
- Tappero B, Chiancone NA, Bergel R et al. Molecular characterization of 22 novel UDP-N-acetylglucosaminase-1-phosphotransferase alpha- and beta-subunit (GNPTAB) gene mutations causing mucopolidiosis (types IIIalpha/beta and IIIalpha/beta) in 40 patients. *Hum Mutat* 2009; 30: E1958-E1973.
- Encarnação M, Lucena L, Costa R et al. Molecular analysis of the GNPTAB and GNPTD genes in 13 patients with mucopolidiosis type II or type III - identification of eight novel mutations. *Clin Genet* 2009; 76: 70-84.
- Kado M, Bruni ME, Carroll WM. Mucopolidiosis II (cell disease) and mucopolidiosis IIIA (clinical pseudo-hurler polydystrophy) are caused by mutations in the GlcNAc-6-phosphotransferase alpha/beta-subunit precursor gene. *Am J Hum Genet* 2000; 70: 441-460.
- Fiala R, Coimbra C, Lemos M et al. Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur J Hum Genet* 2004; 12: 87-92.
- Makitie FT, Hyyrönen H, Giegler AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *LAMA* 1999; 281 (3): 246-254.
- Pearlsbuis HJ, Wiersma EA, Kleijer WJ et al. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum Genet* 1999; 105: 181-190.
- Duro R, Colomero R, Hoptman S et al. Recent origin and spread of a common L185del mutation (G187del L185R, causing familial hypercholesterolemia) positive selection is not always necessary to account for disease incidence among Ashkenazi Jews. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 1172-1188.
- Nei M. *Molecular evolutionary genetics*. New York, NY: Columbia University Press, 1987.

Coutinho et al.

11. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 2003; 1: 47-50.
12. Martin S, Calafat F, Queipo C et al. Asian origin for the worldwide-spread mitochondrial event in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol* 2003; 64: 1502-1504.
13. King A, Dahlgaard DP, Sainz J et al. A high-resolution recombination map of the human genome. *Nat Genet* 2002; 31 (3): 241-247.
14. Crayney G, Mortrudta I, Vignal A et al. The 1993-94 Christian human genetic linkage map. *Nat Genet* 1994; 7: 246-259.
15. Nicholas MW, Crowell SL. Estimate of the mutation rate per nucleotide in humans. *Genetics* 2000; 156: 297-304.
16. Francalanci P, Moroldi L, Underhill PA et al. Peopling of three Mediterranean islands (Corsica, Sardinia, and Sicily) inferred by Y-chromosomal haplotype variability. *Am J Phys Anthropol* 2003; 121: 270-279.
17. Zengjira I, Habiballa H, Chiballa A, Burgin S. Changing family structure in a modernizing society: a study of marriage patterns in a single Muslim village in Senegal. *Am J Hum Biol* 2002; 14: 682-683.

Anexo 2 – Termos de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: ESTUDO ABRANGENTE SOBRE AS MUCOLIPIDOSES II E III NO BRASIL: UMA OPORTUNIDADE PARA A COMPREENSÃO DOS PROCESSOS GENÉTICOS QUE CONTROLAM O TRÁFEGO INTRACELULAR DE PROTEÍNAS

Investigador Responsável: Dra. Ida Vanessa D. Schwartz, Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350. Porto Alegre-RS. Tel: 51-21018011.

Paciente: _____

Prezado paciente ou responsável,

Esta pesquisa tem por objetivo a obtenção de informações relativas aos sintomas de pessoas com Mucopolidose II ou Mucopolidose III, às alterações presentes em suas enzimas e às alterações presentes no gene que ocasiona estas doenças. Estas informações serão obtidas por meio de entrevistas com você e/ou com os seus médicos, e mediante consulta a seu prontuário.

Caso a dosagem de todas as enzimas que podem estar alteradas na Mucopolidose II ou na Mucopolidose III não tenha sido ainda realizada em você, será necessário que você (paciente) seja submetido à coleta de sangue (10 mL para a análise das enzimas que podem estar alteradas em sangue) e realização de biópsia de pele (para a análise das enzimas que podem estar alteradas na pele). Caso a análise dos genes envolvidos na Mucopolidose II e na Mucopolidose III não tenha ainda sido realizada em você (paciente), também será necessária a coleta adicional de 05 mL de sangue. Você pode concordar ou não com a realização destes exames. Os riscos e desconfortos causados pela coleta de sangue são semelhantes aos riscos envolvidos na coleta de sangue para exames laboratoriais de rotina (manchas roxas e dor no local da coleta). A biópsia de pele deverá ser realizada em condições higiênicas e sob anestesia local; o fragmento a ser retirado é pequeno (em torno de 0,3 cm) e superficial, não sendo, portanto, necessária a realização de pontos. O desconforto e os riscos associados a estas avaliações serão minimizados pela realização da

1

MCFA / GPPG
VERSÃO APROVADA
15/09/2007
WL 09244

GPPG - Recebido
03 SET. 2007
Por Jussara nº 072011

coleta por profissional treinado. Se você permitir, o material coletado, e que restar após a realização dos exames previstos neste estudo, será armazenado e utilizado em estudos futuros. Em relação a estas coletas, você declara que autorizou a coleta de (marcar com um X):

- () 5 mL de sangue para a análise do gene envolvido nas Mucopolídeos II e III
 () 10 mL de sangue para a análise das enzimas
 () biópsia de pele para análise das enzimas
 () eu não autorizei nenhuma das coletas acima relacionadas

Em relação ao armazenamento e utilização de algum material (sangue ou pele) que tenha restado após a realização dos exames previstos neste estudo, você declara que autorizou (marcar com um X):

- () que este material poderá ser armazenado e poderá vir a ser utilizado em estudos futuros, desde que você revise e assine o termo de consentimento de tais estudos futuros.
 () que este material não poderá ser armazenado e não poderá vir a ser utilizado em estudos futuros. O material coletado deverá ser utilizado somente neste estudo, e o material que sobrar não deverá ser armazenado.

Cabe salientar que as Mucopolídeos II e III não possuem, ainda, tratamento eficaz, e que esta pesquisa não tem como finalidade imediata a garantia de uma melhora para os pacientes. Pode, entretanto, contribuir para um melhor entendimento destas doenças, o qual, no futuro, pode levar ao desenvolvimento de uma terapia mais efetiva. A identificação das mutações (alterações do DNA) presentes no gene que ocasiona estas doenças poderá ser importante para o aconselhamento genético da sua família e para o diagnóstico pré-natal. Não existe um prazo exato ou estipulado para que você receba os resultados dos exames realizados nesta pesquisa, mas estes lhe serão informados assim que estiverem disponíveis. Você pode optar por não saber o resultado dos testes quando estes estiverem disponíveis.

DÚVIDAS

Se você tiver alguma dúvida em relação à pesquisa, deve contatar a Dra. Ida Vanessa D. Schwartz, no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

HCPA / GPPG
 VERSÃO APROVADA
 19/09/2003
 Vol 09244

AUTORIZAÇÃO PARA PERMITIR PESQUISA DOS REGISTROS MÉDICOS

Você tem direito à privacidade. Os resultados deste estudo poderão ser publicados, mas o seu nome não será revelado e todo esforço será feito que a sua identidade não seja revelada. Por meio deste termo, você autoriza que os pesquisadores envolvidos neste estudo pesquisem os seus registros médicos a fim de obter as informações necessárias para a realização desta pesquisa.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO NA PARTICIPAÇÃO DO ESTUDO

Sua participação no estudo é voluntária. Se você decidir não participar do estudo, isto não afetará em nada o seu tratamento no seu hospital. A sua participação pode também ser interrompida a qualquer momento por você mesmo (a). Em qualquer caso, você não será penalizado (a).

Pelo presente termo, você declara que foi informado (a), de forma clara e detalhada, sobre a presente pesquisa, e que teve suas dúvidas esclarecidas por _____, Declara ter sido esclarecido que não receberá nenhuma remuneração financeira pela participação no estudo. Declara que foi informado da garantia de receber resposta ou esclarecimento sobre a pesquisa a ser realizada, bem como da liberdade de não participar do estudo e da possibilidade de desistir, em qualquer momento, da participação. Além disso, declara que recebeu cópia deste termo de consentimento.

Data: ___/___/___

Paciente: _____

Responsável legal: _____

Eu expliquei a _____ os objetivos, riscos, benefícios e procedimentos necessários para esta pesquisa, e entreguei cópia deste termo de consentimento para o mesmo.

Data: ___/___/___

Nome: _____

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA
14/09/2007
WL 07244

Anexo 3 – Sequências de oligonucleotídeos e temperaturas de anelamento para a amplificação do gene *GNPTAB*.

Éxon	Sequência de oligonucleotídeos	Tamanho de fragmento de amplificação	Temperatura de anelamento (°C)
1	(F) GTCGCCGGAGCTGCAATG (R) GGCAAACCCCGTCTCTAATAATG	381 pb	66°C
2	(F) CCACATCCTTTTAAACCTCTTTG (R) GCTAAAGTGAACACATCAGATGG	498 pb	55°C
3	(F) CATAATCTCTGGGTTTAAACCTGTG (R) CCTCCACCTCCACCTCCC	425 pb	62°C
4	(F) CCGTCTTGGTTACAGTGGGAGG (R) CCTCCCCAGTGCAGTGAAGC	338 pb	65°C
5	(F) GGTGGGGATCTTATTAATGGGAG (R) GGTTAAGGCCAAAATACAATAGC	608 pb	59°C
6-7	(F) GTGTTCTGCCAGACACCATAGTTG (R) GGACCACAAGAAAAGAATCACAC	611 pb	61°C
8	(F) GGGAGGCGGAGGTTGAGG (R) CCTCTCTGTAAGTCCCCTTCC	441 pb	63°C
9-10	(F) GCACCTTGAGAGCAGACGGG (R) GATCCACCCACCTCCGCC	814 pb	66,5°C
11	(F) CGCTCAGTAAGAACGGTCAACG (R) CCTCCAGCTCAGCTTTGC	512 pb	57°C
12	(F) CACCACACCCAGTCCAGAACTG (R) GCAAGGCTGGTAAAGGGATACAC	402 pb	57°C
13 – A	(F) CAGAGGAAAAATGCCAGTT (R) GGTCTCCAAGTCCAGGGG	516 pb	66°C
13 – B	(F) CAACAAGGAGAGCCCAGGAAG (R) GTTCCATGGCCGGCAC	383 pb	66,5°C
14	(F) CCGTTAACATGTATTTTATTTGC (R) GCAAACAACCTCAAACACGAGC	367 pb	53°C
15	(F) GCTCGTGTGTTGAGTTGTTTGC (R) TGTCTCAGCCTCCCAAGTAGC	664 pb	64°C
16	(F) ACCACAGTCATTACTTACAATGCG (R) CCTGCTAGTTCTGAAGTGC	268 pb	61°C
17	(F) CCTCCAGAGAGCATAGAATCAA (R) AGCCAGACCTTTGTGATTACTCTT	254 pb	56°C
18	(F) GTGGATGTTGAGTCCACTACGGT (R) CTATCTCTCACTCAACCACAGCTC	353 pb	61°C
19	(F) CCCATAGCTAAAAGGCCATCTACC (R) GTATACACTCACCCACACATGC	436 pb	58°C
20	(F) GAAGTCCTCTCCTGCCTGG (R) GACTGTTATATTTGCTGCCTGAA	507 pb	65°C
21	(F) TTGGAAGAGGAATGATGGAGAT (R) GCAATCACTCCAGCTGGC	590 pb	62°C

F: forward; R: reverso