

DEPARTAMENT DE GENÈTICA
FACULTAT DE BIOLOGIA



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**ANÀLISI DE MUTACIONS I
EXPRESSIÓ D'AL·LELS
MUTATS A LA MALALTIA DE
GAUCHER I LA SÍNDROME DE
SANFILIPPO TIPUS A**

Magda Montfort Roca

2004

**ANÀLISI DE MUTACIONS I EXPRESSIÓ
D'AL·LELS MUTATS A LA MALALTIA DE
GAUCHER I LA SÍNDROME DE
SANFILIPPO TIPUS A**

Memòria presentada per

Magda Montfort Roca

Per optar al grau de

Doctora en Ciències Biològiques

*Tesi cursada sota la direcció de la Dra. Lluïsa
Vilageliu Arqués
i el Dr. Daniel Grinberg Vaisman
al Departament de Genètica de la Facultat de
Biologia
Universitat de Barcelona
Programa de Genètica (Bienni 1997-1999)*

Lluïsa Vilageliu

Daniel Grinberg

Magda Montfort

Barcelona, maig de 2004

*Al David i
a la meva família*

INDEX

| | |
|---|----|
| ABREVIATURES | 11 |
| INTRODUCCIÓ | 13 |
| MALALTIES D'ACUMULACIÓ LISOSÒMICA | 15 |
| MUCOPOLISACARIDOSI IIIA | 21 |
| 1- INTRODUCCIÓ | 23 |
| 2- CLÍNICA..... | 24 |
| 3- DIAGNÒSTIC | 25 |
| 3.1- DIAGNÒSTIC DIFERENCIAL | 25 |
| 3.2- DIAGNÒSTIC ENZIMÀTIC..... | 26 |
| 3.3- DIAGNÒSTIC MOLECULAR..... | 27 |
| 4- BIOQUÍMICA | 27 |
| 4.1- L'ENZIM: SGHS | 27 |
| 4.1.1- CENTRE ACTIU | 28 |
| 4.1.2- COMPARACIONS DE SEQÜÈNCIA | |
| INTERESPECÍFIQUES | 29 |
| 4.1.3- SÍNTESE I DEGRADACIÓ..... | 31 |
| 4.2- EL SUBSTRAT..... | 32 |
| 4.3- MECANISME CATALÍTIC..... | 33 |
| 5- GENÈTICA..... | 34 |
| 5.1- EL GEN: <i>SGSH</i> | 34 |
| 5.1.1- MAPATGE..... | 34 |
| 5.1.2- ESTRUCTURA, ORGANITZACIÓ I EXPRESSIÓ | 34 |
| 5.1.3- POLIMORFISMES | 36 |
| 5.2- MUTACIONS | 36 |
| 6- PREVENCIÓ GENÈTICA | 39 |
| 6.1- DIAGNÒSTIC PRENATAL..... | 39 |
| 6.2- CONSELL GENÈTIC..... | 39 |
| 7- CORRELACIÓ GENOTIP-FENOTIP..... | 39 |
| 8- EXPRESSIÓ D'AL·LELS MUTANTS | 40 |
| 9- MODELS ANIMALS | 42 |
| 10- TERÀPIA..... | 42 |
| 10.1- TERÀPIA DE SUPORT..... | 42 |
| 10.2- TRASPLANTAMENTS DE MEDULLA ÒSSIA | 43 |

| | |
|--|-----------|
| 10.3- REEMPLAÇAMENT ENZIMÀTIC..... | 43 |
| 10.4- TRANSFERÈNCIA GÈNICA | 43 |
| MALALTIA DE GAUCHER | 45 |
| 1- INTRODUCCIÓ | 47 |
| 2- CLÍNICA..... | 47 |
| 2.1- MANIFESTACIONS CLÍNiques | 47 |
| 2.2- TIPUS CLÍNICS | 50 |
| 2.2.1- TIPUS I: NO NEURONOPÀTIC | 50 |
| 2.2.2- TIPUS II: NEURONOPÀTIC AGUT | 51 |
| 2.2.3- TIPUS III: NEURONOPÀTIC SUBAGUT | 52 |
| 3- DIAGNÒSTIC..... | 52 |
| 3.1- DIAGNÒSTIC MORFOLÒGIC | 52 |
| 3.2- DIAGNÒSTIC ENZIMÀTIC..... | 53 |
| 3.3- DIAGNÒSTIC MOLECULAR..... | 54 |
| 4- BIOQUÍMICA..... | 54 |
| 4.1- L'ENZIM: GBA | 55 |
| 4.1.1- ESTRUCTURA I CENTRE ACTIU | 56 |
| 4.1.2- COMPARACIONS DE SEQÜÈNCIA INTERESPECÍFIQUES..... | 57 |
| 4.1.3- SÍNTESI I PROCESSAMENT..... | 58 |
| 4.2- EL SUBSTRAT..... | 59 |
| 4.3- MECANISME CATALÍTIC | 60 |
| 5- GENÈTICA | 61 |
| 5.1- EL GEN <i>GBA</i> | 61 |
| 5.1.1- ESTRUCTURA: GEN-PSEUDOGÈN..... | 61 |
| 5.1.2- MAPATGE..... | 62 |
| 5.1.3- POLIMORFISMES | 63 |
| 5.1.4- ESTRUCTURA, ORGANITZACIÓ I EXPRESSIÓ | 64 |
| 5.2- EL GEN DE LA PROSAPOSINA | 64 |
| 5.3- MUTACIONS EN EL GEN <i>GBA</i> | 65 |
| 5.3.1- PREVALENÇA..... | 65 |
| 5.3.2- DATACIÓ: MUTACIÓ N370S..... | 66 |
| 5.3.3- AL·LELS RECOMBINANTS..... | 66 |
| 5.3.4- CODONS D'ATURADA PREMATURA I PROCÉS DE NMD | 67 |

| | |
|--|-----|
| 5.4- MUTACIONS EN EL GEN PSAP RESPONSABLES DE LA MALALTIA DE GAUCHER..... | 68 |
| 6- PREVENCIÓ GENÈTICA | 69 |
| 6.1- DIAGNÒSTIC PRENATAL..... | 69 |
| 6.2- CONSELL GENÈTIC | 69 |
| 7- CORRELACIÓ GENOTIP-FENOTIP..... | 70 |
| 7.1- TIPUS I | 70 |
| 7.2- AFECTACIÓ NEUROLÒGICA..... | 71 |
| 7.3- FORMA LETAL PERINATAL | 71 |
| 7.4- FORMA ATÍPICA AMB IMPLICACIÓ CARDIOVASCULAR | 72 |
| 8- EXPRESSIÓ D'AL·LELS MUTANTS | 72 |
| 9- MODELS ANIMALS | 74 |
| 10- TERÀPIA..... | 75 |
| 10.1- TERÀPIA DE SUPORT..... | 75 |
| 10.2- REEMPLAÇAMENT ENZIMÀTIC..... | 76 |
| 10.3- TERÀPIA DE REDUCCIÓ DE SUBSTRAT..... | 77 |
| 10.4- TRASPLANTAMENTS DE MEDULLA ÒSSIA | 78 |
| 10.5 - TRANSFERÈNCIA GÈNICA | 78 |
| OBJECTIUS | 81 |
| RESULTATS | 85 |
| MUCOPOLISACARIDOSI IIIA | 87 |
| CAPÍTOL 1:..... | 89 |
| <i>Primera anàlisi de mutacions en 11 pacients espanyols: elevada prevalença de la mutació c.1079delC</i> | |
| CAPÍTOL 2:..... | 97 |
| <i>Anàlisi de mutacions i estudi d'haplotips en 26 pacients afectats per la mucopolisacaridosi IIIA: possible origen únic de la mutació c.1079delC</i> | |
| CAPÍTOL 3:..... | 105 |
| <i>Diagnòstic prenatal i de portadors de familiars de pacients afectes per la mucopolisacaridosi IIIA</i> | |
| CAPÍTOL 4:..... | 111 |
| <i>Expressió i caracterització funcional de mutacions responsables de la mucopolisacaridosi IIIA en cèl·lules d'insecte</i> | |

| | |
|---|-----|
| MALALTIA DE GAUCHER | 131 |
| CAPÍTOL 5: | 133 |
| <i>Expressió i caracterització funcional de diferents mutacions responsables de la malaltia de Gaucher en cèl·lules d'insecte</i> | |
| CAPÍTOL 6: | 145 |
| <i>Anàlisi de la disminució dels nivells de transcrits portadors de mutacions que donen lloc a senyals d'aturada prematura en el gen de la β-glucosidasa àcida</i> | |
| DISCUSSIÓ | 161 |
| | |
| MALALTIES D'ACUMULACIÓ LISOSÒMICA | 163 |
| IMPORTÀNCIA DE L'ESTUDI DE LES MALATIES D'ACUMULACIÓ LISOSÒMICA | 165 |
| | |
| MUCOPOLISACARIDOSI IIIA | 167 |
| 1- ANÀLISI MUTACIONAL | 169 |
| 2- DIAGNÒSTIC MOLECULAR | 181 |
| 3- EXPRESSIÓ D'AL·LELS MUTATS | 182 |
| 4- CORRELACIÓ GENOTIP-FENOTIP | 188 |
| | |
| MALALTIA DE GAUCHER | 191 |
| 1- EXPRESSIÓ D'AL·LELS MUTATS | 193 |
| 2- NMD | 200 |
| 3- CORRELACIÓ GENOTIP-FENOTIP | 205 |
| | |
| CONCLUSIONS | 211 |
| | |
| BIBLIOGRAFIA | 217 |
| | |
| ANNEX | 233 |

TAULES

INTRODUCCIÓ

| | |
|---|----|
| Taula 1: Malalties d'acumulació lisosòmica..... | 18 |
| Taula 2: Enzims responsables de la síndrome de Sanfilippo A,B,C i D..... | 23 |
| Taula 3: Aminoàcids presents en el centre actiu de la sulfamidasa per comparació amb els predits per l'ARSB..... | 30 |
| Taula 4: Mutacions en el SGSH causants de la MPS IIIA..... | 37 |
| Taula 4: (continuació) Mutacions en el SGSH causants de la MPS IIIA..... | 38 |
| Taula 5: Descripció dels tres tipus clínics de la malaltia de Gaucher..... | 50 |
| Taula 6: Gens o seqüències homòlogues trobades en diversos organismes que codifiquen per la β -glucosidasa àcida..... | 57 |
| Taula 7: Mutacions responsables de la malaltia de Gaucher en el gen de la prosaposina..... | 69 |
| Taula 8: Mutacions expressades en diferents estudis sobre l'activitat de l'enzim GBA..... | 73 |

DISCUSSIÓ

| | |
|--|-----|
| Taula 1: Freqüència de les mutacions S66W, R74C, R245H i 1079delC entre els pacients amb MPS IIIA en diferents regions geogràfiques..... | 173 |
| Taula 2: Associació entre mutacions i haplotips trobats en les mostres analitzades de la població espanyola..... | 178 |
| Taula 3: Freqüències al·lèliques dels polimorfismes IVS2-26T>C, IVS5+17C>T, IVS5- 37GC>CTGT i R456H G>A..... | 178 |
| Taula 4: Genotips dels pacients amb fenotips intermedi i lleu..... | 189 |
| Taula 5: Mostres, genotips, edat de diagnòstic i alguns trets clínics de pacients afectats de la malaltia de Gaucher..... | 201 |

FIGURES

INTRODUCCIÓ

| | |
|---|----|
| Figura 1: Pacients amb la mucopolisacaridosi IIIA | 24 |
| Figura 2: Cascada de degradació de l'heparà sulfat | 28 |
| Figura 3: Estructura de la sulfamidasa | 28 |
| Figura 4: Alineament de la seqüència aminoacídica de la sulfamidasa humana, canina i murina ... | 29 |
| Figura 5: Estructura tridimensional de la sulfamidasa canina predita a partir de l'estructura de l'ARSA i l'ARSB | 30 |
| Figura 5: (continuació) Estructura tridimensional de la sulfamidasa canina predita a partir de l'estructura de l'ARSA i l'ARSB | 31 |
| Figura 6: Mecanisme de transport dels enzims lisosòmics des del reticle endoplasmàtic fins als lisosomes | 32 |
| Figura 7: Estructura de l'heparà sulfat | 33 |
| Figura 8: Polimorfismes presents en el gen de la sulfamidasa i estructura gènica | 35 |
| Figura 9: Nen amb la malaltia de Gaucher tipus I | 48 |
| Figura 10: Macròfag carregat de lípids o "cèl·lula de Gaucher" | 53 |
| Figura 11: Relació química i metabòlica entre els principals esfingolípid | 55 |
| Figura 12: Estructura per raigs X de la β -glucosidasa àcida | 56 |
| Figura 13: Esquema de la biosíntesi de l'enzim β -glucosidasa àcida | 58 |
| Figura 14: Estructura del glucocerebròsid o glucosilceramida | 59 |
| Figura 15: Model per a la degradació de la glucosilceramida | 60 |
| Figura 16: Estructura del gen i el pseudogèn de la β -glucosidasa àcida | 61 |
| Figura 17: Localització cromosòmica del gen responsable de la malaltia de Gaucher | 63 |
| Figura 18: Seqüència aminoacídica de la SAP-C i localització dels seus ponts d'hidrogen | 65 |
| Figura 19: Freqüències relatives de les mutacions responsables de la malaltia de Gaucher en la població espanyola | 66 |
| Figura 20: Entrecreuament recíproc entre regions homòlogues de gen i pseudogèn (ψ) de la β -glucosidasa àcida | 67 |
| Figura 21: Model del procés de NMD | 68 |
| Figura 22: Pacient que presenta una important millora en la visceromegàlia després de sotmetre's a la teràpia de reemplaçament enzimàtic | 77 |

RESULTATS

| | |
|--|-----|
| Figura 1: Detecció de la mutació c.1079delC per anàlisi de restricció amb l'enzim <i>TaiI</i> | 120 |
| Figura 2: Arbre genealògic de tres famílies amb fills afectes per la MPS IIIA | 120 |

DISCUSSIÓ

| | |
|--|-----|
| Figura 1: Condicions emprades per a l'anàlisi de les cadenes senzilles en gels de poliacrilamida | 169 |
| Figura 2: Patrons d'SSCP de l'exó 2 dels pacients SFA-10 i SFA-9..... | 170 |
| Figura 3: Situació geogràfica de les mutacions més freqüents causants de la síndrome de Sanfilippo A en les diferents poblacions europees analitzades | 175 |
| Figura 4: Distribució de les mutacions causants de la MPS IIIA en la població espanyola | 179 |
| Figura 5: Número total de mutacions present en cadascun dels exons | 180 |
| Figura 6: Estructura tridimensional de la β -glucosidasa àcida. Localització dels residus mutats analitzats en el present treball..... | 195 |
| Figura 7: Localització dels residus Val394, Leu444 i Arg463. | 199 |
| Figura 8: Esquema de la PCR a temps real | 202 |

ABREVIATURES

| | |
|---------------------|--|
| aa | aminoàcid |
| ARSA | Arilsulfatasa A |
| ARSB | Arilsulfatasa B |
| Cèl·lules ES | Cèl·lules soca embrionàries |
| CNS | Sistema nerviós central |
| Col. | Col·laboradors |
| CRIM | <i>Cross-reacting immunological material</i> |
| GBA | Gen que codifica per la proteïna β -glucosidasa àcida |
| GBA | β -glucosidasa àcida |
| G-CSF | Factor d'estimulació de granulòcits de colònies |
| h | Hora |
| HS | Heparà sulfat |
| kDa | Kilodalton |
| LSD | Malaltia d'acumulació lisosòmica |
| M6P | Manosa-6-fosfat |
| MGB | <i>Minor groove binder</i> |
| MPS | Mucopolisacaridosi |
| NMD | Degradació de l'mRNA degut a la presència d'un codó sense sentit (<i>nonsense mediated mRNA-decay</i>) |
| NS | Heparà N-sulfatasa |
| PSAP | Gen que codifica per la proteïna activadora d'esfingolípids |
| PSAP | Precursor de la proteïna activadora d'esfingolípids |
| PTC | Codó de terminació prematura |
| rhNS | Sulfamidasa humana recombinant |
| SAP | Proteïna activadora d'esfingolípids |
| SGSH | Gen que codifica per la proteïna N-sulfoglucosamina sulfhidrolasa (sulfamidasa) |
| SGSH | N-sulfoglucosamina sulfhidrolasa (sulfamidasa) |
| SNC | Sistema nerviós central |
| SSCP | Polimorfisme en la conformació de les cadenes senzilles (<i>single strand conformation polymorphism</i>) |
| TRE | Teràpia de reemplaçament enzimàtic |

INTRODUCCIÓ

***MALALTIES
D'ACUMULACIÓ
LISOSÒMICA***

MALALTIES D'ACUMULACIÓ LISOSÒMICA

Les malalties d'acumulació lisosòmica estan causades per disfunció del sistema lisosòmic. Els primers estudis d'aquests tipus de malalties daten de finals del segle XIX i, algunes de les substàncies implicades van ser identificades en la primera meitat del segle XX. Els lisosomes van ser descoberts al 1955 (De Duve i col., 1955) i el concepte de malaltia d'acumulació lisosòmica s'originà al 1963 (Hers, 1963), amb el descobriment de que la glicogenosi tipus II (malaltia de Pompe) estava causada pel defecte en un enzim present normalment en els lisosomes i que el glicogen acumulat, presumiblement derivava del sistema lisosòmic.

Els lisosomes són vesícules intracel·lulars en les quals les (macro)molècules són degradades fins a components de baix pes molecular. La degradació lisosòmica està catalitzada per enzims que treballen sovint en coordinació per reduir (glico)proteïnes, (glico)lípid, glicosaminoglicans i un gran nombre de components, des de lipoproteïnes de baixa densitat (LDLs) fins a estructures monomèriques (aminoàcids, monosacàrids, etc.).

Les malalties d'acumulació lisosòmica comprenen un grup heterogeni de més de quaranta malalties diferents (taula 1). La característica comuna de totes elles és la

deficiència en alguna proteïna lisosòmica que forma part d'un pas catalític. Aquestes proteïnes poden ser hidrolases o cofactors generalment involucrats en la degradació de macromolècules o transportadors, que lliberen els productes al citosol. Com a resultat d'aquesta acumulació els lisosomes augmenten tant en nombre com en mida fet que pot afectar la fisiologia cel·lular.

Presenten una herència autosòmica recessiva, amb algunes excepcions com en el cas de les malalties de Fabry i Hunter, que estan lligades al cromosoma X.

Molts dels pacients que hereten alguna d'aquestes malalties no presenten símptomes en el moment del naixement però poden presentar un elevat rang de manifestacions clíniques durant els primers anys de vida. Aquestes manifestacions clíniques depenen de la malaltia concreta que presenta cada pacient, tot i que alguns dels símptomes són més freqüents que altres. Aquest seria el cas de l'afectació en el sistema nerviós central (CNS), present en major o menor grau, en la majoria de pacients amb malalties d'acumulació lisosòmica. També són freqüents els problemes esquelètics i l'organomegàlia, entre altres (Neufeld i Muenzer, 1995).