

OBJECTIUS

L'objectiu principal del present treball ha consistit en la estudi molecular de la mucopolisacaridosi IIIA i de la malaltia de Gaucher, fent una especial incidència sobre els següents aspectes:

MUCOPOLISACARIDOSI IIIA

- Determinació de l'espectre de les mutacions responsables de la mucopolisacaridosi IIIA en els pacients espanyols diagnosticats bioquímicament.
- Estudi de l'origen de les mutacions mitjançant haplotips, per tal de comprovar si les mutacions més prevalents són recurrents o tenen un origen únic.
- Caracterització d'al·lels mutats trobats en pacients espanyols, mitjançant expressió heteròloga en un sistema de baculovirus.
- Establiment de correlacions genotip i el fenotip.

MALALTIA DE GAUCHER

- Caracterització d'al·lels mutats trobats en pacients espanyols, mitjançant expressió heteròloga en un sistema de baculovirus.
- Anàlisi de correlacions genotip-fenotip tenint en compte les dades de l'expressió de la glucocerebrosidasa.
- Anàlisi de la possible degradació de trànscrips que contenen mutacions que provoquen codons de parada prematura, pel mecanisme de *nonsense mediated decay* (NMD).

RESULTATS

MUCOPOLISACARIDOSI
IIIA

CAPÍTOL 1:

Primera anàlisi de mutacions en 11 pacients espanyols: elevada prevalença de la mutació c.1079delC.

El gen de la sulfamidasa va ser clonat i caracteritzat a finals de l'any 1995 i principis del 1996 (Scott i col., 1995; Karageorgos i col., 1996). Des d'aleshores han estat identificades nombroses mutacions en els pacients afectes per la mucopolisacaridosi de tipus IIIA. En el present article es mostra el treball realitzat per a la cerca de les mutacions responsables de la MPS IIIA en 11 pacients espanyols. S'identificaren set mutacions diferents, quatre de les quals es descriuen per primera vegada, i quatre polimorfismes. Una de les mutacions, la c.1079delC (anomenada prèviament c.1091delC, en funció de la nomenclatura), fou la més prevalent (10/22), mentre que altres mutacions identificades com a majoritàries en altres països (R245H i R74C) no foren identificades en els nostres pacients. L'anàlisi d'haplotips suggereix la possible l'existència d'un efecte fundador com a la causa de l'elevada freqüència de la mutació c.1079delC en la població espanyola estudiada.

RESEARCH ARTICLE

Mutation 1091delC Is Highly Prevalent in Spanish Sanfilippo Syndrome Type A Patients

Magda Montfort,¹ Lluïsa Vilageliu,¹ Natàlia Garcia-Giralt,¹ Silvina Guidi,¹ Maria Josep Coll,² Amparo Chabás,² and Daniel Grinberg^{1*}

¹Departament de Genètica, Universitat de Barcelona, 08071 Barcelona, Spain; Fax: 34-3-411-0969

²Institut de Bioquímica Clínica, Mejia Lequerica s/n, 08028 Barcelona, Spain

Communicated by Elizabeth Neufeld

The gene responsible for Sanfilippo syndrome type A, a lysosomal disorder caused by deficiency of sulfamidase, was recently cloned and more than 40 mutations were identified. This paper presents the mutation analysis and clinical findings in 11 Spanish patients in whom 19 of the 22 mutant alleles have been identified. This is the first report on mutations in Spanish Sanfilippo A patients. Seven different mutations were found, four of which (Q85R, R206P, A354P, and L386R) were not previously described. Mutation 1091del C was the most prevalent, accounting for nearly one-half of the mutated alleles, while mutations R245H and R74C were not found. Haplotype analysis suggests a founder effect as the cause of the high frequency of 1091del C in this population. *Hum Mutat* 12:274-279, 1998. © 1998 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: mucopolysaccharidosis IIIA; Sanfilippo A; sulfamidase; mutation detection; SSCP; mutation frequencies; mutation 1091delC; clinical findings

INTRODUCTION

Sanfilippo syndrome, or mucopolysaccharidosis III (MPS III), is a lysosomal storage disorder caused by the defective degradation of heparan sulfate. The disease is inherited in an autosomal recessive fashion and four enzymatically distinct subtypes are now recognised: MPS IIIA (MIM 252900), MPS IIIB (MIM 252920), MPS IIIC (MIM 252930) and MPS IIID (MIM 252940). The Sanfilippo syndrome is characterized by severe central nervous system degeneration presenting in a child of 2 to 6 years who previously appeared normal. Mild somatic features are often present (Neufeld and Muenzer, 1995). The incidence ranges from 1:24,000 in the Netherlands (van de Kamp et al., 1981) to 1:324,000 in British Columbia (Lowry et al., 1990). Although data on the incidence of MPSIII in Spain are not available, the MPS IIIA is the most common subtype, as it is in Northern Europe but not in some other Mediterranean countries (Beratis et al., 1986; Michelakakis et al., 1995), accounting for 60% of the total number of patients with altered catabolism of heparan sulfate (A. Chabás, unpublished data).

The gene encoding sulfamidase has been cloned (Scott et al., 1995) and several mutations have been reported for MPS IIIA patients from various origins,

such as Germany, Poland, Australasia, the Netherlands, the United States, Britain, and Italy (Bunge et al., 1997; Weber et al., 1997; Di Natale et al., 1998). The prevalence of the mutations varies with the populations studied so far.

We have analyzed the complete sulfamidase gene in 11 Spanish patients with MPS IIIA and identified seven different mutations (of which four are novel) and four polymorphisms. This study reveals a high prevalence of the 1091delC mutation among the Spanish affected population, probably attributable to a founder effect, on the basis of haplotype data.

MATERIALS AND METHODS

Patients

The 11 patients with MPS IIIA were unrelated and originated from different locations in Spain, except for patients SFA-3 and SFA-7 whose families,

Received 9 February 1998; accepted 8 June 1998.

*Correspondence to: Daniel Grinberg, Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645, E-08071 Barcelona, Spain; E-mail: danielr@porthos.bio.ub.es

Grant sponsor: CICYT; Grant number: SAF 96-0329; Grant number: SAF 97-0074.

Silvina Guidi is currently at the Departamento de Química Biológica, Universidad de Buenos Aires, C. Universitaria, 1428 Buenos Aires, Argentina.

although unrelated to each other, came from the same location. A clinical evaluation including radiological and neurological studies was provided by the patient's physician. It is worth noting that, as the patients come from all over Spain, a minimum of 11 different physicians have been involved. In all patients, the diagnosis of MPS IIIA was confirmed by enzyme assay. In most cases, analysis of heparan sulfate in the urine was also carried out. For patient SFA-5 mutation analyses were performed on the parents' DNA.

Enzyme Analysis

Sulfamidase was assayed in cultured skin fibroblasts or leukocytes using [N-sulfonate-³⁵S]heparin, according to Matalon et al. (1988).

DNA Preparation

Genomic DNA was prepared from harvested skin fibroblasts or peripheral blood leukocytes, using a standard method (Miller et al., 1988).

PCR Amplification

Seven of the eight exons of the sulfamidase gene were amplified individually from genomic DNA, and exon 8 was amplified in three overlapping fragments. Primers used are depicted in Table 1. For all fragments, the polymerase chain reaction (PCR) was performed under the following conditions: 100 ng of template DNA, 1 U of Dynazyme DNA polymerase (Finnzymes Oy, Finland), 200 µM dNTPs, 20 pmol of each primer, in the recommended buffer (including 1.5 mM MgCl₂) in a final volume of 50 µl. The PCR program consisted of 35 cycles of denaturation at 94°C for 40 s and a single annealing/extension step

at 55–60°C for 30 s, with a final step of 5 min at 72°C, except for exon 1, for which the program was as follows: 5 min at 95°C, 35 cycles of 95°C for 1 min, 58°C for 1 min, and 72°C for 80 sec, with a final step of 5 min at 72°C. Amplification of this exon required 10% (v/v) dimethylsulfoxide (DMSO), and that of exon two required 1 mM MgCl₂.

SSCP Analysis

Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis was performed as described by Cormand et al. (1997). Four SSCP conditions were tested for each fragment, combining different polyacrylamide concentrations (8% or 12% acrylamide:bisacrylamide 29:1), different glycerol concentrations in the gel (0% or 5%), and two running conditions (RT at 150 V, or 4°C at 200 V).

Sequencing

Samples showing abnormal SSCP patterns were reamplified from genomic DNA and the new PCR reactions were subsequently purified by Wizard™ PCR Preps (Promega, Madison, WI) and sequenced by fluorescent dideoxy cycle sequencing (ABI 373A Fluorescent DNA Sequencer, Perkin Elmer). In some cases, to analyze each allele independently, one of the abnormal SSCP bands was cut out of the gel after silver staining and eluted in 300 µl of water for 2–4 h at 50°C. After ethanol precipitation DNA was resuspended in 10 µl of which 2–3 µl was used in a 50-µl PCR reaction. The PCR fragments were column-purified and sequenced. Sequence alterations were verified by sequencing the opposite strand and digestion with a restriction enzyme if possible.

TABLE 1. Sequence of the Primers Used to Amplify the Sulfamidase Gene Exons and Fragment Size

Exon	Sequence	T _m (°C)	Size (bp)
1	Forward: 5'-CCCAGTCCCAGTCCGAGCC-3'	70	239
	Reverse: 5'-GGCAGCGGGGATAACAAGGG-3'	68	
2	Forward: 5'-CCCAGTGTCTTCTCGTGA-3'	62	268
	Reverse: 5'-CTGTCTACTCCCTGCCACC-3'	68	
3	Forward: 5'-GATGGGAGGGCCATGGGAGA-3'	66	245
	Reverse: 5'-CTCTGCCTGCCTCTGTGCCT-3'	66	
4	Forward: 5'-AGAAAGGGTTGGGAGGCTGA-3'	66	264
	Reverse: 5'-CTCCGGGCTGTGCTCTGGTA-3'	66	
5	Forward: 5'-GCAGTGCCCCGCAGCCTTGG-3'	70	270
	Reverse: 5'-AGCTCGTAGGAGGCCAGGGT-3'	66	
6	Forward: 5'-CCGGGGAGAAGGCTGGACAC-3'	68	261
	Reverse: 5'-CTGCCACTGGACCCTCAC-3'	66	
7	Forward: 5'-GCTTGCCTCCCTCCGTGTCT-3'	66	304
	Reverse: 5'-GATCCACTCCACACCTTTC-3'	62	
8a	Forward: 5'-AGCTCCTGTGTGCTGAGGGC-3'	66	230
	Reverse: 5'-ATGGGGTAGGACATGGTGAC-3'	62	
8b	Forward: 5'-CCCCTCTGGGCCACCGTCTT-3'	68	284
	Reverse: 5'-TTCTGGGTCTCGTGGGGGTC-3'	66	
8c	Forward: 5'-CCTCCGTACTACTACTACC-3'	60	332
	Reverse: 5'-AGGGCTGTTGCCACTACTCC-3'	64	

Restriction Analysis

Mutations L386R (*MvnI*), A354P (*HaeIII*), 1091delC (*TaiI*), and polymorphism R456H (*BstUI*) were confirmed by digestion of the corresponding PCR products with the indicated enzyme. For the detection of the mutation R245H, digestion of the PCR product from exon 6 was performed with enzyme *EagI*.

RESULTS

Clinical Manifestations

In MPS III patients phenotypic variation is less marked than in other MPS. All patients had severe central nervous system (CNS) degeneration with relatively mild somatic symptoms. Visceromegaly was reported in 7 of 11 patients (cases SFA-1, 2, 5, 6, 10, 11, and 12). Skeletal involvement was present in cases SFA-1, 2, 3, 7, and 9. The clinical features were similar in the three patients homozygous for mutation 1091delC (SFA-2, 3, and 7). At onset of the disease (2.5–3 years of age) there was a progressive loss of contact with their environment, hyperactivity, and speech disorders. Patients presented also with coarse facies and severe deafness. In two cases (SFA-3 and 7), parents are not known to be related, even though they came from the same town in the southwest of Spain. The third family also came from the south, and the parents are distantly related. Minor phenotypic variability was also noticed in the patients with other genotypes. Both patients with genotype R206P/1091delC (SFA-4 and 12) when diagnosed at the ages of 13 and 9 years had an altered electroretinogram, while other clinical features as coarse facies, seizures, visceromegaly and gingival hypertrophy were present in only one of these two cases. Gingival hypertrophy was also present in patients with other genotypes (SFA-6 and 10). Some intrafamilial variability was observed in the affected sibling of SFA-12, who

showed important growth retardation and skeletal abnormalities when diagnosed at age 6 years.

Mutation Analysis

The coding region of the sulfamidase gene was analyzed in these 11 Spanish Sanfilippo A patients by PCR and SSCP analysis. This allowed the identification of 19 of the 22 mutant alleles (Table 2), corresponding to a 1-bp deletion in exon 8 (1091delC) and six missense mutations, two of which have been previously described (S66W in exon 2 and R150Q in exon 4) (Blanch et al., 1997; Di Natale et al., 1998). The four novel missense mutations are: an A-to-G transition in exon 3, at nucleotide position 266 of the cDNA, according to Scott et al. (1995) and corresponding to a glutamine to arginine change at amino acid 85 (Q85R); a G→C transversion in exon 5 (nt629), changing an arginine to a proline (R206P); another G→C substitution in exon 8 (nt1072), resulting in an alanine to proline change (A354P); and a T→G change also in exon 8 (nt1169) causing the substitution of a leucine to arginine (L386R). The mutation 1091delC is the most prevalent in this population, it accounts for nearly one-half of the mutant chromosomes (Table 2). It produces a frameshift that causes the incorporation of 51 amino acids not coded by the normal gene. The detection of this mutation by SSCP, by digestion with *TaiI*, and by direct PCR sequencing is shown in Figure A, B, and C, respectively. Three of the missense changes (Q85R, R206P, and L386R) are present in two alleles each, corresponding to a frequency of 9%. Mutations Q85R and L386R are carried in homozygosity by two patients, while R206P is present in two other patients, in both cases as compound heterozygous with mutation 1091delC. In addition, mutations S66W, R150Q, and A354P were found only once in this population (frequency of 4.5%).

TABLE 2. Genotypes and Polymorphisms

Patient ref. no.	Genotype	IVS2-26 T→C	IVS5+17 C→T	IVS5-37 GC→CTGT	R456H G→A
SFA-2	1091delC/1091delC	T/T	T/T	+ins/+ins	G/G
SFA-3	1091delC/1091delC	T/T	T/T	+ins/+ins	G/G
SFA-7	1091delC/1091delC	T/T	T/T	+ins/+ins	G/G
SFA-4	R206P/1091delC	T/C	C/T ^a	-ins/+ins	G/A
SFA-12	R206P/1091delC	T/C	C/T ^a	-ins/+ins	G/A
SFA-1	A354P/1091delC	T/C	T/T	+ins/+ins	G/G
SFA-5 ^b	1091delC/?	??	T/? ^a	+ins/? ^a	G/? ^a
SFA-11	Q85R/Q85R	C/C	C/C	-ins/-ins	G/G
SFA-6	L386R/L386R	C/C	C/C	-ins/-ins	A/A
SFA-9	S66W/R150Q	T/C	C/T	-ins/+ins	G/A
SFA-10	??	C/C	C/C	-ins/-ins	A/A

^aIn phase with the 1091delC mutation, determined in the patient with mutation R206P because the polymorphism lies in the same PCR fragment and was therefore sequenced and in patient SFA-5 by the analysis of parental DNA (see below).

^bHaplotype of patient SFA-5 was analysed from his parents DNA. The mother, carrier of mutation 1091delC, was heterozygous for the four polymorphisms, while the father was heterozygous for the IVS2-26 site and homozygous for the rest.

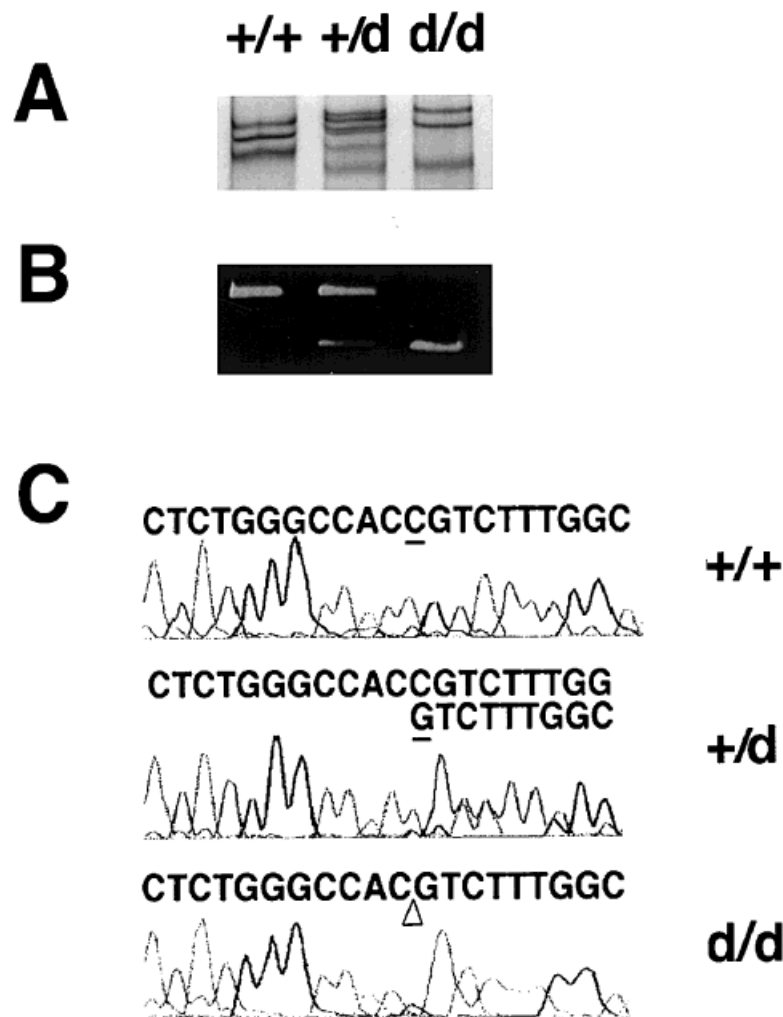


FIGURE 1. Detection and characterization of mutation 1091delC. **A:** SSCP analysis of DNA from an individual not bearing the mutation (+/+) and two patients, one heterozygous (+/d) and the other homozygous (d/d), for mutation 1091delC. **B:** Restriction analysis with enzyme *Tail* of the same DNAs as in A. The size of the PCR-amplified fragment is 210 bp. Mutation 1091delC creates a *Tail* site. *Tail* digestion produces one fragment of 160 bp and one of 50 bp (not shown) when the mutation is present. **C:** Direct PCR sequences of the same DNAs as in A showing the presence (underlined) or absence (arrowhead) of a C in the control (+/+) and in the homozygous patient (d/d), respectively. In the individual heterozygous for the mutation (+/d), overlapping chromatograms are observed starting at the mutation site (underlined).

Polymorphism and Haplotype Analyses

Four polymorphisms (IVS2-26T→C, IVS5+17C→T, IVS5-37GC→CTGT, and R456H, G→A) were detected in the search for mutations in the sulfamidase gene, which were first reported by Weber et al. (1997), while this work was under way. In that report, the first three changes were described as III C130T, V C259T, and VI ins2bp490, respectively. In the present work, we followed the recommendations of the Ad Hoc Committee on Mutation Nomenclature (Beaudet et al., 1996). Allele frequencies based on the analysis of about 100 control chromosomes are as follows: IVS2-26: T allele 0.57, C 0.43; IVS5+17: C allele 0.32, T 0.68; IVS5-37GC→CTGT: allele +ins

(with insertion) 0.68, allele -ins (without insertion) 0.32; and R456H: R allele 0.69, H 0.31. Our preliminary results seem to indicate that the polymorphism IVS5-37GC→CTGT is slightly different from that described by Bunge et al. (1997) as IVS5-36insTG. Most of the alleles with the 2-bp insertion share the same SSCP pattern. The sequence of one of them indicates the following change: **GTCTGTC** where the first G corresponds to position IVS5-39 and the last C is at position IVS5-35 in the normal sequence, and the nucleotides in boldface replace a TGC trinucleotide. Only three individuals of 50 controls presented particular SSCP patterns that suggest that one of their alleles is different from either the +ins or -ins alleles. Further characterization of this polymorphism is be-

ing undertaken. Table 2 shows the analysis of the polymorphisms for the 11 patients.

DISCUSSION

The sulfamidase gene was cloned at the end of 1995 (Scott et al., 1995) and since then, several different mutations have been found in Sanfilippo A patients. Figure 2 shows the mutations published so far and their position within the gene, including those described herein. Mutation R245H was the most prevalent in the first populations studied, accounting for 18 of 58 mutant alleles in Australasia, 52/90 in the Netherlands, 10/52 in the United Kingdom (Weber et al., 1997), and 17/48 in Germany (Bunge et al., 1997); however, in Poland, it was found in only 1 of 32 mutant alleles. Another mutation, R74C, is the most prevalent in Poland (18/32) and is the second most frequent in Germany (10/48) (Bunge et al., 1997), but it was found only once among 17 British patients (Weber et al., 1997).

Neither of these two prevalent mutations was detected among the 22 Spanish alleles analyzed. Moreover, we did not detect mutation R74H, described by Bunge et al. (1997) in one patient from Portugal and another from Spain. By contrast, another mutation, 1091delC, was found in 10 of the 22 mutant alleles. This mutation has also been reported in other populations but with much lower frequency: United Kingdom, 2 of 52 alleles; Australasia, 2/58; United States, 1/6; Netherlands, 2/90; Poland, 1/32; and

Germany, 0/48 (Weber et al., 1997; Bunge et al., 1997). Three Spanish patients carry mutation 1091delC in homozygosity. The clinical signs presented by these patients indicate that 1091delC is a severe mutation.

Two other previously described mutations were found once among the Spanish patients: S66W and R150Q. Mutation S66W was present at a low frequency in patients from the United Kingdom and the United States and with a slightly higher prevalence in Australasia (Weber et al., 1997). Interestingly, it seems to be the most prevalent mutation in Italy, with a frequency of 33% (Di Natale et al., 1998). R150Q was only reported twice, including one patient who was homozygous for this mutation (Bunge et al., 1997; Di Natale et al., 1998).

Four novel missense mutations have been identified: Q85R, R206P, A354P and L386R. Three of the mutations (Q85R, R206P, and L386R) result in changes in the amino acid charges which may be important for the correct enzyme function, and A354P (as well as R206P) introduces a proline that could cause a distortion in the protein structure. None was found in 100 control chromosomes, suggesting that they may be pathogenic. Comparison with N-acetylgalactosamine 4-sulfatase, the first human sulfatase for which crystallographic data are available (Bond et al., 1997), does not implicate these amino acid residues in any known important site of the enzyme. However, Q85 is relatively close to one

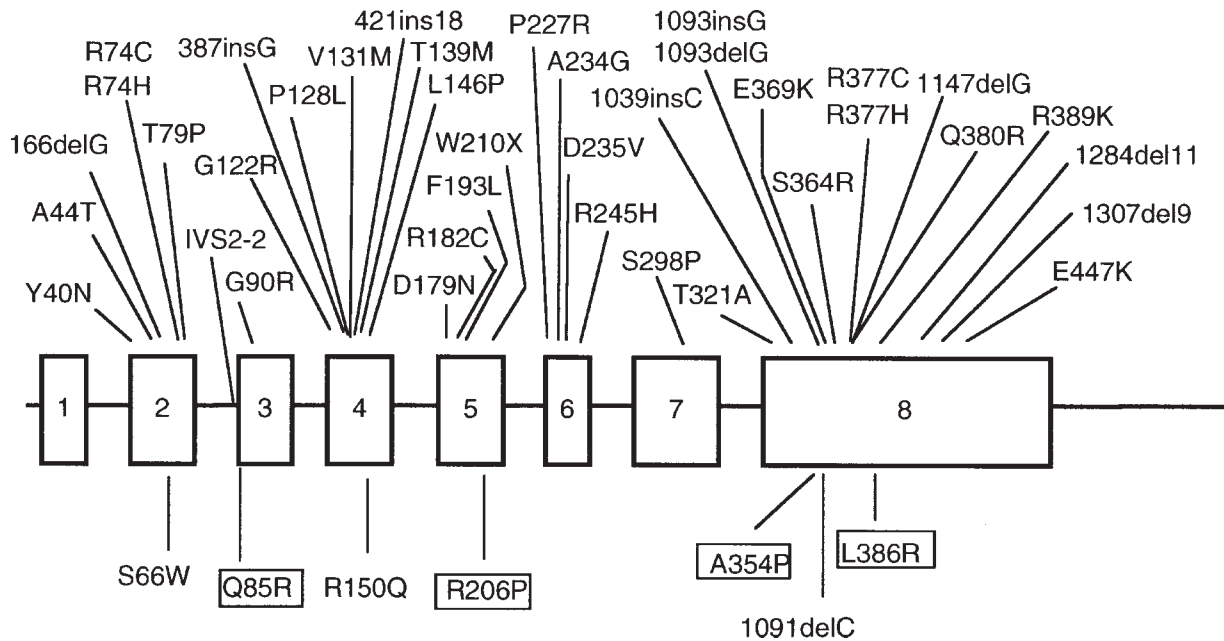


FIGURE 2. Identified mutations in the sulfamidase gene. The 8 exons of the gene are drawn to scale, while the introns are not. Only the coding part of exons 1 and 8 are depicted. Positions of mutations described elsewhere (and not found in this study) are shown above the gene scheme, while those detected here are shown below. Boxes, mutations described for the first time.

of the sulfatase consensus sequences (Bond et al., 1997; Schmidt et al., 1995) and a change at this residue might affect the enzyme function.

Few data are available on the allele frequencies of the polymorphisms detected in the sulfamidase gene in the nonaffected population. The H allele of the common variant R456H (which corresponds to an adenine at the DNA level) was reported to be present in 55% of the chromosomes isolated from the nonaffected population of Australia (Blanch et al., 1997) while we found it in 31% of the Spanish wild-type alleles. Bunge et al. (1997) studied the polymorphism IVS5+17C→T and found a frequency of 45% for the C allele in the control population. In Spain we detected a frequency of 32% for this allele after the analysis of a sample of 100 normal chromosomes. For polymorphisms IVS-26T→G and IVS5-37GC→CTGT no comparisons can be established, as no data are available for other populations. The rare polymorphism V361I, reported in 3 of 50 normal chromosomes (Bunge et al., 1997), was not detected in the Spanish patients and therefore was not studied in the general population.

Haplotype analysis shows a complete linkage disequilibrium for mutation 1091delC and the alleles T (IVS2-26), T (IVS5+17), +ins (IVS5-37), and G (R456H), in the homozygous patients, where phase was unequivocally established. The T allele of polymorphism IVS5+17 is also associated with 1091delC in three of the patients heterozygous for the mutation, and the alleles +ins and G for polymorphisms IVS5-37 and R456H are also associated with the mutation in another patient (Table 2). For the other polymorphisms, results for these patients are also consistent with the association of the haplotype T-T(+ins)-G and the mutation. These data strongly suggest a founder effect as the cause of the high prevalence of mutation 1091delC among Spanish MPSIIIA patients. This high prevalence and the easy detection of mutation 1091delC by PCR and restriction analysis provide a useful tool for the molecular diagnosis of the disease in the Spanish population.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all the physicians who referred the patients, particularly Dr. F. Gayoso and Dr. Merchante (Sevilla), Dr. J. Fornells (Cádiz), Dr. C. Roche, Dr. M.T. García-Silva, Dr. Wilhelmi (Madrid), Dr. Lloret (Alicante), Dr. Márquez (Ciudad Real), and Dr. Pedrola, Dr. Vernet, Dr. Pineda, and Dr. Rodrigo (Barcelona). We also thank Dr. B. Cormand for helpful suggestions and assistance and Dr. A. Gal for kindly

providing the primers to amplify exon 1. The technical assistance of H. Sellés, J. Jarque, A.M. Valle, A. Díaz, and M. Martínez is warmly acknowledged. We are grateful to the Serveis Científic-Tècnics, Universitat de Barcelona, for automated sequencing resources, and to R. Rycroft for revising the English.

REFERENCES

- Beaudet AL, Antonarakis SE, Beutler E, Cotton RGH, Desnick RJ, Kazazian HR, McAlpine PJ, McKusick VA, Motulsky AG, Scriver CR, Shows TB, Tsui L-C, Valle D (1996) Update on nomenclature for human gene mutations. *Hum Mutat* 8:197-202.
- Beratis NG, Sklower SL, Wilbur L, Matalon R (1986) Sanfilippo disease in Greece. *Clin Genet* 29:129-132.
- Blanch L, Weber B, Guo XH, Scott HS, Hopwood JJ (1997) Molecular defects in Sanfilippo syndrome type A. *Hum Mol Genet* 6:787-791.
- Bond CS, Clements PR, Ashby SJ, Collyer CA, Harrop SJ, Hopwood JJ, Guss JM (1997) Structure of a human lysosomal sulfatase. *Structure* 5:277-289.
- Bunge S, Ince H, Steglich C, Kleijer WJ, Beck M, Zaremba J, van Diggelen OP, Weber B, Hopwood JJ, Gal A (1997) Identification of 16 sulfamidase gene mutations including the common R74C in patients with mucopolysaccharidosis type IIIA (Sanfilippo A). *Hum Mutat* 10:479-485.
- Cormand B, Grinberg D, Gort L, Fiumara A, Barone R, Vilageliu L, Chabas A (1997) Two new mild homozygous mutations in Gaucher disease patients: Clinical signs and biochemical analyses. *Am J Med Genet* 70:437-443.
- Di Natale P, Balzano N, Esposito S, Villani G (1998) Identification of molecular defects in Italian Sanfilippo A patients including 13 novel mutations. *Hum Mutat* 11:313-320.
- Lowry RB, Applegarth DA, Toone JR, MacDonald E, Thunem NY (1990) An update on the frequency of mucopolysaccharide syndromes in British Columbia. *Hum Genet* 85:389-390.
- Matalon R, Deanching M, Marback R, Michals K (1988) Carrier detection for Sanfilippo A syndrome. *J Inher Metab Dis* 11:158-160.
- Michelakakis H, Dimitriou E, Tsagaraki S, Giouroukos S, Schulpis K, Bartsocas CS (1995) Lysosomal storage diseases in Greece. *Genet Couns* 6:43-47.
- Miller SA, Dyke DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215.
- Neufeld EF, Muenzer J (1995) The mucopolysaccharidoses. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 7th Ed. New York: McGraw-Hill, pp 2465-2494.
- Schmidt B, Selmer T, Ingendoh A, von Figura K (1995) A novel amino acid modification in sulfatases that is defective in multiple sulfatase deficiency. *Cell* 82:271-278.
- Scott HS, Blanch L, Guo XH, Freeman C, Orsborn A, Baker E, Sutherland GR, Morris CP, Hopwood JJ (1995) Cloning of the sulphamidase gene and identification of mutations in Sanfilippo A syndrome. *Nature Genet* 11:465-467.
- van de Kamp J, Niermeijer MF, von Figura K, Giesberts MA (1981) Genetic heterogeneity and clinical variability in the Sanfilippo syndrome (types A, B, and C). *Clin Genet* 20:152-160.
- Weber B, Guo XH, Wraith JE, Cooper A, Kleijer WJ, Bunge S, Hopwood JJ (1997) Novel mutations in Sanfilippo A syndrome: Implications for enzyme function. *Hum Mol Genet* 6:1573-1579.

CAPÍTOL 2:

Anàlisi de mutacions i estudi d'haplotips en 26 pacients afectats per la mucopolisacaridosi IIIA: possible origen únic de la mutació c.1079delC

Amb l'arribada de noves mostres de pacients afectes per la MPS IIIA, es procedí a la continuació de la cerca de mutacions realitzada prèviament. En el total de pacients espanyols analitzats (26) s'identificaren 14 mutacions diferents, el que correspon al 90% dels al·lels mutats. La mutació c.1079delC (abans c.1091delC) segueix sent la més prevalent amb un 36,5% del total d'al·lels mutats. Es van analitzar també quatre polimorfismes interns per construir els haplotips corresponents en aquesta mostra més amplia. Es va comprovar, que els cromosomes portadors de la mutació c.1079delC compartien el mateix haplotip [T, T, +ins, G], fet que suggereix un origen únic per aquesta mutació.

Mutation and Haplotype Analyses in 26 Spanish Sanfilippo Syndrome Type A Patients: Possible Single Origin for 1091delC Mutation

Amparo Chabás,^{1*} Magda Montfort,² Maruxa Martínez-Campos,² Anna Díaz,² Maria Josep Coll,¹ Daniel Grinberg,² and Lluïsa Vilageliu²

¹Institut de Bioquímica Clínica, Barcelona, Spain

²Departament de Genètica, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Mucopolysaccharidosis IIIA, also known as Sanfilippo syndrome type A, is an autosomal recessive storage disorder caused by deficiency of sulfamidase. The disease results in severe central nervous system degeneration often with mild somatic features that may delay the clinical diagnosis. Molecular analyses would allow early and unequivocal heterozygote detection, providing a useful tool for genetic counselling. About 40 mutations have been reported in the sulfamidase gene, with a very uneven distribution in different patient populations. We have previously described the high prevalence of mutation 1091delC in a small number of Spanish Sanfilippo A patients. The aim of the present work is to extend the mutational study to a total of 26 unrelated patients and perform haplotype analysis in order to study the origin of some mutations. The whole coding region of the gene was scanned by SSCP analysis and sequencing. This allowed the identification of 14 different mutations, corresponding to 90% of the mutant alleles. Seven of these mutations were only found in this Spanish group of patients, three of which, R150W, R433Q and R433W, are described here for the first time. We have also analyzed four internal polymorphisms and constructed the corresponding haplotypes. Chromosomes bearing mutation 1091delC show a conserved haplotype suggesting a common origin for this mutation. Moreover, all other mutations found twice or more also have con-

served haplotypes for those polymorphic markers. © 2001 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: Sanfilippo type A; Mucopolysaccharidosis IIIA; sulfamidase; mutation detection; haplotype analysis

INTRODUCTION

Mucopolysaccharidosis type III (MPS III, Sanfilippo syndrome, OMIM 252900) is an autosomal recessive lysosomal storage disorder affecting the degradation of heparan sulfate. The storage of heparan sulfate results from defects in the degradative action of four different enzymes. MPS IIIA is caused by deficiency of sulfamidase (EC 3.10.1.1). The disease results in a severe central nervous system degeneration often with mild somatic features (mild skeletal pathology and variable visceromegaly). This may delay the clinical diagnosis, particularly in patients without severe mental retardation.

Since the cloning of the cDNA encoding sulfamidase [Scott et al., 1995] and the gene structure characterization [Karageorgos et al., 1996] about 40 gene alterations have been identified, indicating that as in other lysosomal storage disorders, the phenotypic variability is associated with allelic heterogeneity. There is an uneven distribution of the common mutations throughout the different European populations. The R74C allele is the most frequent change found in Polish patients [Bunge et al., 1997], the R245H mutation has a high incidence among Dutch patients [Weber et al., 1998], and the S66W mutation is the most common in the Italian patient population [Di Natale et al., 1998; Esposito et al., 2000]. In Spanish MPS IIIA patients, mutation 1091delC is the most prevalent [Montfort et al., 1998], a mutation that is rather rare among patients in other European populations [Bunge et al., 1997; Weber et al., 1997]. In contrast to other Mediterranean countries [Michelakakis et al., 1995], MPS IIIA is by far the most common subtype among Spanish patients with Sanfilippo syndrome (60% of the

Grant sponsors: CICYT(SAF 97-0074) and the Fundació Marató TV3 (Proj Nrs. 98-1220 and 1221).

*Correspondence to: Dr. Amparo Chabás, Institut de Bioquímica Clínica, Mejía Lequerica s/n, Edificio Helios III, Planta Baixa, E-08028 Barcelona, Spain. E-mail: achabas@clinic.ub.es

Received 9 August 2000; Accepted 18 January 2001

Published online 19 March 2001

224 Chabás et al.

total number) and one of the most frequent MPS (A. Chabás, unpublished data). In order to provide these families with a reliable test for heterozygote detection, we present data on the molecular analysis of 26 MPS IIIA patients. This study has confirmed the relatively high prevalence of the 1091delC mutation and has allowed the identification of three new mutations in the sulfamidase gene. Moreover, analysis of four polymorphisms suggests a single origin for some of the mutations. We also report on the clinical manifestations of this group of patients.

MATERIALS AND METHODS

Patients

The 26 patients included in this work were unrelated and came from different locations in Spain. Eleven of these patients (1 to 12, note that there is no Patient 8) were partially described [Montfort et al., 1998]. A clinical evaluation, including radiological and neurological studies, was provided by the patient's physician and the diagnosis of MPS IIIA was confirmed by enzyme assay. In most cases the analysis of heparan sulfate in the urine was also carried out. For Patients SFA-5, SFA-21 and SFA-26, mutation analyses were performed on DNA of the parents. Appropriate informed consent was obtained from all patients and the Bioethics Commission of the University of Barcelona approved the study.

Enzyme Analysis

Sulfamidase was assayed in cultured skin fibroblasts or leukocytes using [*N*-sulfonate-³⁵S] heparin, according to Matalon et al. [1988].

DNA Preparation

Genomic DNA was prepared from harvested skin fibroblasts or peripheral blood leukocytes, using a standard method [Miller et al., 1988].

Detection of the Prevalent Mutation 1091delC and Four Polymorphisms

Mutation 1091delC, previously shown to be highly prevalent in the Spanish population, was detected by restriction analysis with *Tai*I enzyme as described [Montfort et al., 1998].

Polymorphisms IVS2-26T→C, IVS5 + 17C→T, and IVS5-37GC→CTGT were analyzed by SSCP (single-stranded conformation polymorphism) and sequencing. The polymorphic change R456H (G→A) was analyzed by digestion with *Bst*UI, as previously described [Montfort et al., 1998].

PCR Amplification and SSCP Analysis

PCR amplification and SSCP analysis of 10 DNA fragments covering the eight sulfamidase gene exons were performed from genomic DNA of the patients. Primers, PCR conditions and size of amplified fragments were as previously described [Montfort et al.,

1998], except for exon 2 amplification that was carried out using the following primers: sense, 5'GTCCCA-GCCTCCCTACTCCC-3', antisense, 5'-CCGGACGCA-GCCTGTCTACT-3', Tm 68°C and 66°C, respectively. The product was 296 bp long.

SSCP analysis was carried out as described in Cormand et al. [1997]. Four SSCP conditions were tested for each fragment, combining different polyacrylamide concentrations (8% and 12% acrylamide:bisacrylamide 29:1), different glycerol concentrations in the gel (0% and 5%) and two running conditions (RT at 150 V, or 4°C at 200 V).

Sequencing

Samples showing abnormal SSCP patterns were reamplified from genomic DNA and the new PCR reactions were subsequently purified by WizardTM PCR Prep (Promega) and sequenced by fluorescent dideoxy cycle sequencing (ABI 373 A Fluorescent DNA Sequencer, Perkin Elmer). In some cases, to analyze each allele independently, one of the abnormal SSCP bands was cut out of the gel after silver-staining and eluted in 300 µl of water for 2–4 hr at 50°C. After ethanol precipitation DNA was resuspended in 10 µl of water, 2–3 µl was used in a 50 µl PCR reaction. The PCR fragments were column-purified and sequenced. Nucleotide changes were verified by sequencing the opposite strand and digestion with a restriction enzyme if possible.

Restriction Analysis

Mutations S66W (*Eco*RII), R74H (*Bst*UI), A354P (*Hae*III), L386R (*Mun*I), R433W (*Msp*I), R433Q (*Msp*I) and R377H (*Hha*I) were confirmed by digestion of the PCR product with the enzyme indicated in brackets.

Statistical Analysis

The significance of linkage disequilibrium (LD) was assessed by a one-sided χ^2 test and Fisher's exact test. Only chromosomes in which phases were established were considered. Phases were determined either by homozygosity, family studies or sequencing.

RESULTS

Clinical Manifestations

All patients had severe central nervous system degeneration whereas visceromegaly, mainly hepatomegaly, and skeletal involvement were reported in 65% (17/26) and 53% (14/26) of patients, respectively.

In the five patients homozygous for mutation 1091 delC (SFA-2,3,7,13 and 27), the onset of the disease (age range: 18 months to 3 years) was characterized by a delay or progressive loss in their skills, mainly in the language area. Common findings were hyperactivity, behavioral disorders and psychomotor retardation. Other usual problems were hepatomegaly (3/5) and skeletal abnormalities similar to those observed in other MPS (4/5). Three patients had increased head circumference and four had severe deafness. Cardiomyopathy

TABLE I. Genotypes and Polymorphisms

Patient reference No.	Genotype	IVS2-26 T→C	IVS5 + 17 C→T	IVS5 – 37 GC→CTGT	R456H G→A
SFA-1	A354P/1091delC	T/C	T/T	+ ins/+ ins	G/G
SFA-2	1091delC/1091delC	T/T	T/T	+ ins/+ ins	G/G
SFA-3	1091delC/1091delC	T/T	T/T	+ ins/+ ins	G/G
SFA-4	R206P/1091delC	T/C	C/T ^a	- ins/+ ins	G/A
SFA-5 ^b	1091delC/?	?/?	T/? ^a	+ ins/? ^a	G/? ^a
SFA-5 father	?/+	T/C	T/T	+ ins/+ ins	G/G
SFA-5 mother	1091delC/+	T/C	T/C	- ins/+ ins	G/A
SFA-6	L386R/L386R	C/C	C/C	- ins/- ins	A/A
SFA-7	1091delC/1091delC	T/T	T/T	+ ins/+ ins	G/G
SFA-9	S66W/R150Q	T/C	C/T	- ins/+ ins	G/A
SFA-10	E447K/E447K	C/C	C/C	- ins/- ins	A/A
SFA-11	Q85R/Q85R	C/C	C/C	- ins/- ins	G/G
SFA-12	R206P/1091delC	T/C	C/T ^a	- ins/+ ins	G/A
SFA-13	1091delC/1091delC	T/T	T/T	+ ins/+ ins	G/G
SFA-14	R433W/R433W	C/C	C/C	- ins/- ins	G/G
SFA-15	R74H/S66W	T/T	T/T	+ ins/+ ins	G/G
SFA-16	E447K/E447K	C/C	C/C	- ins/- ins	A/A
SFA-17	S66W/1039insC	T/T	T/T	+ ins/+ ins	G/G
SFA-18	R74H/R74H	T/T	T/T	+ ins/+ ins	G/G
SFA-19	R150W/?	C/C	C/T	+ ins/- ins	G/A
SFA-20	1091delC/R433Q	T/T	T/T	+ ins/+ ins	G/G
SFA-21 ^b	1091delC/R433Q	T ^a ?/?	T ^a ?/?	?/?	G ^a ?/?
SFA-21 father	1091delC/+	T/T	T/T	+ ins/rare	G/G
SFA-21 mother	R433Q/+	T/C	T/C	+ ins/- ins	G/A
SFA-22	1091delC/1039insC	T/T	T/T	+ ins/+ ins	G/G
SFA-23	S66W/?	T/C	T/T	+ ins/+ ins	G/G
SFA-24	1091delC/A354P	T/C	T/T	+ ins/+ ins	G/G
SFA-25	1091delC/?	T/T	T/T	+ ins/+ ins	G/G
SFA-26 ^b	?/?	T/?	T/T	+ ins/+ ins	G/G
SFA-26 father	?/+	T/C	T/T	+ ins/+ ins	G/G
SFA-26 mother	?/+	T/T	T/T	+ ins/+ ins	G/G
SFA-27	1091delC/1091delC	T/T	T/T	+ ins/+ ins	G/G

^aIn phase with the 1091delC mutation.

^bHaplotype analyzed using parental DNA.

(left ventricle hypertrophy) was recorded in one case.

Patients SFA-10 and 16, homozygous for mutation E447K, had retarded psychomotor development, hepatomegaly and skeletal abnormalities. No hearing loss was noted. Other clinical findings were not different from those previously reported [Montfort et al., 1998].

Mutation Analysis

Mutation 1091delC was first analyzed due to the high prevalence found in a preliminary study on 11 patients [Montfort et al., 1998]. In the new set of 15 patients (SFA13-27) the mutation was found in nine out of 30 alleles (Table I). Altogether, it accounts for 36.5% (19/52) of the mutant alleles (Fig. 1).

For the rest of the mutant alleles, 10 fragments covering the whole coding region of the sulfamidase gene were amplified by PCR, analyzed by SSCP, and sequenced. This, together with the analysis of mutation 1091delC, allowed the identification of 47 out of the 52 mutant alleles (90%).

Three of the mutations identified were novel. They correspond to three missense changes: R150W (cDNA nt 460 C→T, in exon 4), R433Q (cDNA nt 1310 G→A, in exon 8), and R433W (cDNA nt 1309 C→T, in exon 8), all cDNA positions are according to Scott et al. [1995]. One

of the four new mutations described in Montfort et al. [1998], A354P, was found again in the new set of patients.

Mutations S66W and E447K were found in four alleles (Fig. 1); S66W was always found in heterozygosity and E447K in two homozygous patients (Table

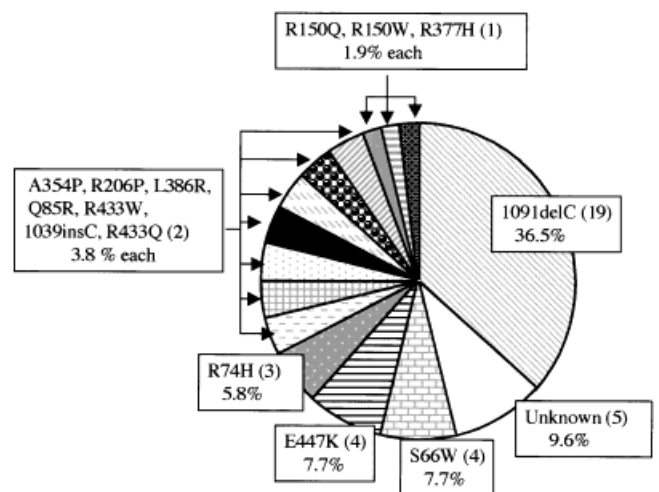


Fig. 1. Prevalence of sulfamidase gene mutations in 26 Spanish MPS IIIA patients. Number of alleles are shown in brackets.

226 Chabás et al.

Patient	IVS2-26 T→C	IVS5+17 C→T	IVS5-37 GC→CTGT	R456H G→A
SFA-1	T/C	T	+ins	G
SFA-2	T/T	T/T	+ins/+ins	G/G
SFA-3	T/T	T/T	+ins/+ins	G/G
SFA-4	T/C	T	+ins/-ins	G/A
SFA-5	T/T,T/C or C/C	T	+ins	G
SFA-7	T/T	T/T	+ins /+ins	G/G
SFA-12	T/C	T	+ins/-ins	G/A
SFA-13	T/T	T/T	+ins/+ins	G/G
SFA-20	T	T	+ins	G
SFA-21	T	T	+ins/rare	G
SFA-22	T	T	+ins	G
SFA-24	T/C	T	+ins	G
SFA-25	T	T	+ins	G
SFA-27	T/T	T/T	+ins/+ins	G/G

Fig. 2. Haplotype analysis in patients bearing the 1091delC mutation. Alleles shown to be in phase with the mutation are boxed.

D). Interestingly, these two patients were from the same central-eastern location in Spain. Three mutant alleles bore mutation R74H. Seven different mutations were found twice, three mutations once and only five out of 52 mutant alleles remain to be identified.

Polymorphism Analysis

The analysis of four common polymorphisms, IVS2-26T→C, IVS5 + 17C→T, IVS5-37GC→CTGT (alleles names “-ins” or “+ins” for the GC and CTGT alleles, respectively) and R456H G→A, previously carried out on the first set of patients [Montfort et al., 1998], was extended to include the new patients. The results for each patient are shown in Table I.

Haplotype analysis on the chromosomes bearing mutation 1091 delC shows a conserved haplotype [T,T,+ins,G] for the four polymorphic sites (Fig. 2), in all the cases in which in which the phase could be established, either by family studies by homozygosity or by sequencing. Phases for 1091 delC mutation and each of the four polymorphisms (IVS2-26T→C, IVS5 + 17C→T, IVS5-37GC→CTGT and R456H G→A)

were determined in 14 out of 19 cases, 19 out of 19, 16 out of 19 and 17 out of 19, respectively. In total, the complete haplotype was confirmed in 13 out of 19 chromosomes. In the six remaining cases, the alleles detected for each polymorphism are also consistent with the haplotype described above.

The alleles present in the haplotype associated with mutation 1091delC are the most frequent in the general population, as shown by the analysis of 50 control individuals: T = 0.57, T = 0.68, +ins = 0.68 and G = 0.69. LD, however, was significant ($P < 0.01$) for all the markers.

To evaluate LD between the 1091delC mutation and the whole haplotype, only healthy individuals, who were homozygous for all the markers included in the haplotype, were considered as controls ($n = 14$). The haplotype [T, T, +ins, G] was present in 16 out of these 28 chromosomes (57.2%). This figure could be considered a maximum value for the haplotype frequency because the analysis of only the homozygous individuals produces an overrepresentation of the common haplotypes, due to their higher probability of being in homozygosity. Even considering this overestimated value, LD between 1091delC and the whole haplotype is still highly significant ($P < 0.01$).

All other mutations found twice or more also have a conserved haplotype for these markers. Mutations S66W, R74H, R433Q and 1039insC seem to share the same haplotype associated with mutation 1091delC (Fig. 3). In fact, the association was shown for two of the four S66W, for all three R74H, for one of the two R433Q, and for both 1039insC alleles. For the three remaining cases phase was not established, but results are consistent with the association.

Three mutations, E447K, R206P and L386R, were found in the context of the haplotype [C, C, -ins, A]. Two of them, E447K and L386R, were detected only in homozygous patients who were also homozygous for the four polymorphic sites, and so these mutations are undoubtedly associated with the haplotype. Mutation R206P was found in two compound heterozygotes together with mutation 1091delC. In these patients phase was not established but, assuming that mutation 1091delC was probably associated with the [T, T, +ins, G] haplotype, mutation R206P should be in the context of haplotype [C, C, -ins, A].

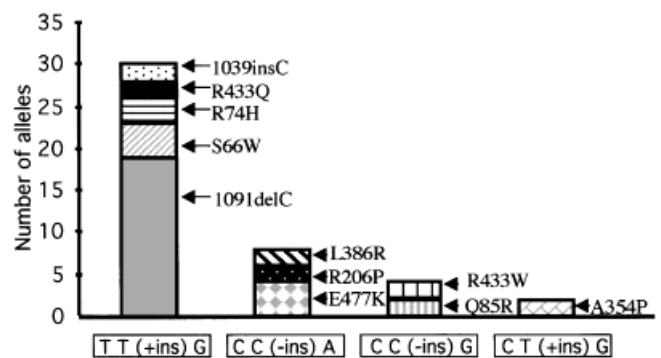


Fig. 3. Association between mutations and haplotypes. Number of alleles are shown on the Y axis.

Mutations Q85R and R433W are both in the context of the haplotype [C, C, - ins, G] as they were found in homozygous patients. Finally, mutation A354P was the only one found together with the haplotype [C,T, + ins, G]. The haplotype assignment was done as described above for mutation R206P.

DISCUSSION

The molecular analysis of the sulfamidase gene in 26 Spanish MPS IIIA patients allowed the identification of 47 of the 52 mutant alleles (90%), including 14 different mutations. Seven of these were only described in the Spanish group of patients, four previously reported [Montfort et al., 1998] and three novel described here. These three new mutations correspond to three missense changes, R150W, R433Q, R433W, which were not found in 100 control chromosomes. Also, each of these substitutions were the only change found in the coding region of the gene, and they represent amino acid changes that involve large alterations in charge, hydrophobicity or steric hindrance. All these data strongly suggest that these mutations are indeed disease causing mutations, although functional analyses were not carried out.

The prevalence of mutations in the sulfamidase gene is highly variable among different Sanfilippo A patient populations. In Spain, mutation 1091delC is the most frequent, accounting for nearly 37% of the mutant alleles, which allowed an additional routine molecular analysis for the MPS IIIA patients. Mutation 1091delC was also found in other populations (United Kingdom, Australasia, United States, Netherlands, Poland and Italy), but it never corresponded to more than a 8% of the mutant alleles [Weber et al., 1997; Bunge et al., 1997; Esposito et al., 2000] and was not found in nine German patients [Bunge et al., 1997]. In spite of the relatively high number of homozygous individuals for mutation 1091delC among the Spanish patients, no genotype-phenotype correlation could be established because they do not present clinical manifestations different from those of the rest of the patients.

Mutation R245H, the most prevalent in the Netherlands (57%), Germany (35%), Australasia (31%), and United Kingdom (17%), [Weber et al., 1998; Bunge et al., 1997; Weber et al., 1997], and mutation R74C, the most frequent in Poland (56%) and second in Germany (21%) [Bunge et al., 1997], were not found in the Spanish patients. Mutation S66W is the most common alteration found in Italian MPS IIIA patients, accounting for 29% of the alleles [Di Natale et al., 1998; Esposito et al., 2000]. In the Spanish population, it is present in 8% of the alleles, being the second most frequent. Mutation R74H had been identified in one Spanish and one Portuguese patient [Bunge et al., 1997], suggesting the possibility of it being a frequent mutation in South West Europe. In the Spanish disease population this mutation accounts for about 6% of the mutant alleles. This change is not present in a group of 28 Italian patients [Di Natale et al., 1998; Esposito et al., 2000].

These differences among populations suggest a single, recent origin for each mutation. If a mutation arises by a recurrent event (for example, due to a mutational hot spot) it should be found frequently in all the patient populations, which is not the case for MPS IIIA mutations. On the other hand, an ancient mutation could also be present worldwide due to population expansion. For example, in Gaucher disease, the two most frequent mutations in nearly all populations are N370S, which has a single, ancient origin [Díaz et al., 1999, 2000], and L444P, which is recurrent and occurred many times independently [Zimran et al., 1990; Beutler et al., 1992]. As in MPS IIIA there are no mutations found at high prevalence in the different patient populations, it seems that both recurrence and ancient origin might be discarded.

The hypothesis of a single origin for each Sanfilippo A mutation would be supported by the presence of a unique haplotype for the polymorphic sites within the sulfamidase gene. Our results are consistent with this idea. All chromosomes bearing the 1091delC mutation are in the context of the [T,T,+ins, G] haplotype. Moreover, all the other mutations that are present more than once are also associated with a single haplotype each. These results, however, should be taken with caution for those mutations present only in few alleles in our series. We are not aware of this type of analysis in other populations, but results from Blanch et al. [1997] for mutation R245H and the polymorphic site R456H are also consistent with this hypothesis.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the physicians who referred the patients. The technical assistance of H. Sellés, J. Jarque, and A.M. Valle is warmly acknowledged. We thank Dr. A. Gal for kindly providing the primers to amplify exon 1. We also thank the Serveis Científico-Tècnics, Universitat de Barcelona, for automated sequencing resources and R. Rycroft for revising the English.

REFERENCES

- Beutler E, Gelbart T, Kuhl W, Zimran A, West C. 1992. Mutations in Jewish patients with Gaucher disease. *Blood* 79:1662-1666.
- Blanch L, Weber B, Guo XH, Scott HS, Hopwood JJ. 1997. Molecular defects in Sanfilippo syndrome type A. *Hum Mol Genet* 6:787-791.
- Bunge S, Ince H, Steglich C, Kleijer WJ, Beck M, Zaremba J, van Diggelen OP, Weber B, Hopwood JJ, Gal A. 1997. Identification of 16 sulfamidase gene mutations including the common R74C in patients with mucopolysaccharidosis type IIIA (Sanfilippo A). *Hum Mutat* 10:479-485.
- Cormand B, Grinberg D, Gort L, Fiumara A, Barone R, Vilageliu L, Chabás A. 1997. Two new mild homozygous mutations in Gaucher disease patients: clinical signs and biochemical analyses. *Am J Med Genet* 70:437-443.
- Di Natale P, Balzano N, Esposito S, Villani G. 1998. Identification of molecular defects in Italian Sanfilippo A patients including 13 novel mutations. *Hum Mutat* 11:313-320.
- Díaz A, Montfort M, Cormand B, Zeng BJ, Pastores GM, Chabás A, Vilageliu L, Grinberg D. 1999. Gaucher disease: the N370S mutation in Ashkenazi Jewish and Spanish patients has a common origin and arose several thousand years ago. *Am J Hum Genet* 64:1233-1238.

228 Chabás et al.

- Díaz A, Montfort M, Cormand B, Zeng BJ, Pastores GM, Chabás A, Vilageliu L, Grinberg D. 2000. On the age of the most prevalent Gaucher disease-causing mutation, N370S. *Am J Hum Genet* 66:2014–2015.
- Eposito S, Balzano N, Daniele A, Villani G, Perkins K, Weber B, Hopwood JJ, Di Natale P. 2000. Heparan *N*-sulfatase gene: two novel mutations and transient expression of 15 defects. *Biochim Biophys Acta* 1501:1–11.
- Karageorgos LE, Guo XH, Blanch L, Weber B, Anson DS, Scott HS, Hopwood JJ. 1996. Structure and sequence of the human sulphamidase gene. *DNA Res* 3:269–271.
- Matalon R, Deanching M, Marback R, Michals K. 1988. Carrier detection for Sanfilippo A syndrome. *J Inher Metab Dis* 11:158–160.
- Michelakakis H, Dimitriou E, Tsagaraki S, Giouroukos S, Schulpis K, Bartsocas CS. 1995. Lysosomal storage diseases in Greece. *Genet Couns* 6:43–47.
- Miller SA, Dyke DD, Polesky HF. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res* 16:1215.
- Montfort M, Vilageliu L, García-Giralt N, Guidi S, Coll MJ, Chabás A, Grinberg D. 1998. Mutation 1091 delC is highly prevalent in Spanish Sanfilippo syndrome type A patients. *Hum Mutat* 12:274–279.
- Scott HS, Blanch L, Guo XH, Freeman C, Orsborn A, Baker E, Sutherland GR, Morris CP, Hopwood JJ. 1995. Cloning of the sulphamidase gene and identification of mutations in Sanfilippo A syndrome. *Nat Genet* 11:465–467.
- Weber B, Guo XH, Wraith JE, Cooper A, Kleijer WJ, Bunge S, Hopwood JJ. 1997. Novel mutations in Sanfilippo A syndrome: implications for enzyme function. *Hum Mol Genet* 6:1573–1579.
- Weber B, van de Kamp J, Kleijer WJ, Guo XH, Blanch L, van Diggelen OP, Wevers R, Poorthuis B, Hopwood JJ. 1998. Identification of a common mutation (R245H) in Sanfilippo A patients from the Netherlands. *J Inher Metab Dis* 21:416–422.
- Zimran A, Gelbart T, Beutler E. 1990. Linkage of the *Pvu*II polymorphism with the common Jewish mutation for Gaucher disease. *Am J Hum Genet* 46:902–905.

CAPÍTOL 3:

Diagnòstic prenatal i de portadors de familiars de pacients afectes per la mucopolisacaridosi IIIA

El diagnòstic enzimàtic de la MPS IIIA ens permet discriminar entre pacients i individus sans. En canvi, els valors d'activitat sulfamidasa que s'obtenen per aquest diagnòstic en el cas dels individus portadors, no ens permet diagnosticar-los amb total seguretat. És en aquests casos on el diagnòstic molecular de la malaltia es fa imprescindible.

La cerca de les mutacions responsables de la mucopolisacaridosi IIIA en la població espanyola serà i, de fet, ja ha estat útil per oferir el diagnòstic molecular a familiars dels pacients afectes per la MPS IIIA. En total, s'ha realitzat el diagnòstic molecular de 4 possibles portadors i s'han confirmat també dos diagnòstics prenatals estudiats enzimàticament.

Diagnòstic prenatal i de portadors de familiars de pacients afectes per la mucopolisacaridosi IIIA

Introducció

Els primers treballs realitzats pel nostre grup han estat encaminats a determinar l'espectre de les mutacions responsables de la MPS IIIA en pacients espanyols (Montfort i col., 1998; Chabás i col., 2001). D'un total de 26 pacients analitzats s'han detectats 47 dels al·lels responsables de la malaltia. S'han identificat 14 mutacions diferents de les quals una representa prop del 37% del total, és la c.1079delC (anomenada anteriorment c.1091delC).

L'estudi de les mutacions presents en la població espanyola ha estat útil per a la realització del diagnòstic prenatal i de portadors d'alguns dels familiars dels pacients analitzats anteriorment pel nostre grup. En total s'ha efectuat el diagnòstic molecular de 4 possibles portadors o afectes i de 2 fetus.

Materials i mètodes

Pacients

Mostres de DNA dels individus: I-3 de la família del pacient SFA-5 (?/c.1079delC); I-1, II-1 i II-3 de la família del pacient SFA-22 (c.1079delC/c.1027insC) i II-2 i III-1, de la família SFA15 (R74H/S66W), han estat emprats pel al seu diagnòstic molecular.

Amplificació per PCR i seqüenciació

L'existència de les mutacions S66W (exó 2), R74H (exó 2), c.1027insC (exó 8) i c.1079delC (exó 8), ha estat analitzada en les mostres a estudi per realitzar el seu diagnòstic molecular. Les amplificacions dels exons 2 i 8 es van realitzar a partir de les mostres de DNA genòmic dels familiars a diagnosticar seguint les condicions de PCR descrites en treballs anteriors (Montfort i col., 1998).

Els fragments amplificats van ser purificats emprant *WizardTM PCR Prep* (Promega) i seqüenciats (ABI 373 A Fluorescent DNA Sequencer, Perkin Elemer).

Anàlisi de restricció

La mutació c.1079delC fou detectada amb una anàlisi de restricció emprant l'enzim *TaiI* (Montfort i col., 1998).

Resultats i discussió

La cerca de les mutacions responsables de la MPS IIIA en el pacient SFA-5 havia estat realitzada anteriorment a partir de les mostres dels seus pares a causa de la manca de disponibilitat de mostres del pacient (Montfort i col., 1998).

L'amplificació per PCR i la posterior anàlisi de restricció amb l'enzim *TaiI* ens revela que l'individu I-3 és portador de la mutació c.1079delC (figura 1). Aquest fet ens aporta les pistes necessàries per saber que el I-2, el seu germà, i el II-2 són també portadors d'aquesta mutació. En conseqüència, el pare del pacient SFA-5 és el portador de la mutació que fins el moment no ha estat identificada en aquesta família (figura 2A). Tenir aquesta informació ens pot ser útil en cas de que sigui necessari realitzar un diagnòstic molecular d'un familiar del pare.

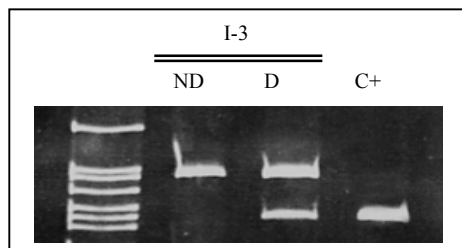


Figura 1: Detecció de la mutació c.1079delC per anàlisi de restricció amb l'enzim *TaiI*. ND, no digerit. D, digerit. C+, control positiu de digestió.

El pacient SFA-22 és portador de dues mutacions diferents a l'exó 8, la c.1079delC (abans c.1091delC) i la c.1027insC (abans c.1039insC) (Chabás i col., 2001). D'ells, la primera havia estat ja analitzada en totes les mostres de la present família seguint el protocol de detecció de la mutació, és a dir, per ampliació de l'exó 8 i posterior anàlisi de restricció amb l'enzim *TaiI*. Únicament l'I-3 i I-4, presentaven aquesta mutació (c.1079delC/wt).

Aquesta informació ens va permetre deduir que la mare del pacient SFA-22 era la portadora de

la mutació c.1027insC. Calia, però, determinar si la resta de familiars presentaven també aquesta mutació. Per saber-ho, s'analitzà per seqüenciació el fragment de l'exó 8 que conté la posició c.1027. La presència d'un doble pic en l'anàlisi de seqüenciació en l'individu II-3 en aquesta posició i posteriors, ens indicà que únicament la germana del pacient SFA-22 era portador d'aquesta mutació.

El diagnòstic molecular realitzat en aquesta família ens indica, per tant, que dels familiars analitzats únicament l'II-3 és portador d'una mutació responsables de la MPS IIIA, mentre que l'individu I-1 i el fetus II-1 no són portadors de cap de les mutacions presents en aquesta família (figura 2B).

L'estudi de les mutacions responsables de la MPS IIIA en el pacient SFA-15 fou realitzada en treballs anteriors (Chabás i col., 2001), detectant-se la S66W i la R74H. L'objectiu que ara ens plantejàvem era saber si l'individu II-2 i el fetus III-1, podien ser portadors d'alguna d'aquestes mutacions. Ambdues es troben a l'exó 2 del gen de la sulfamidasa. L'amplificació d'aquest exó i el seu posterior anàlisi per seqüenciació directa del producte de PCR amplificat ens va permetre saber que tant la mare com el fetus eren portadors de la mutació R74H. Aquest fet també ens va permetre saber, per tant, que el pacient SFA-15 havia heretat la mutació R74H del seu pare i la S66W de la seva mare (figura II.2C).

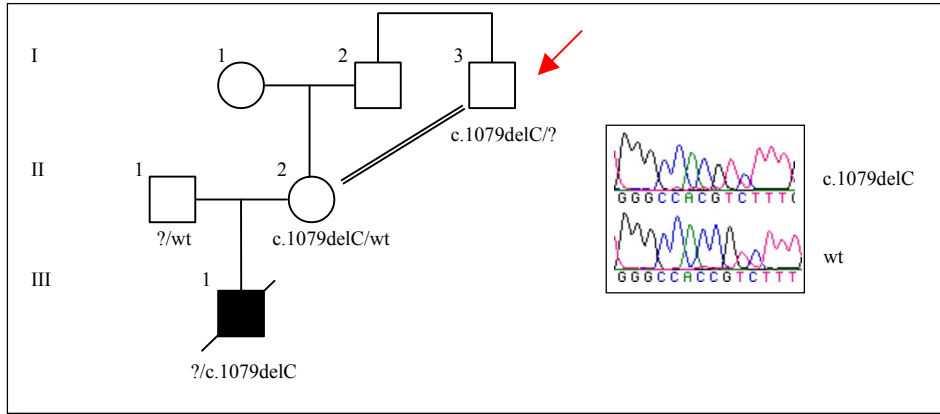
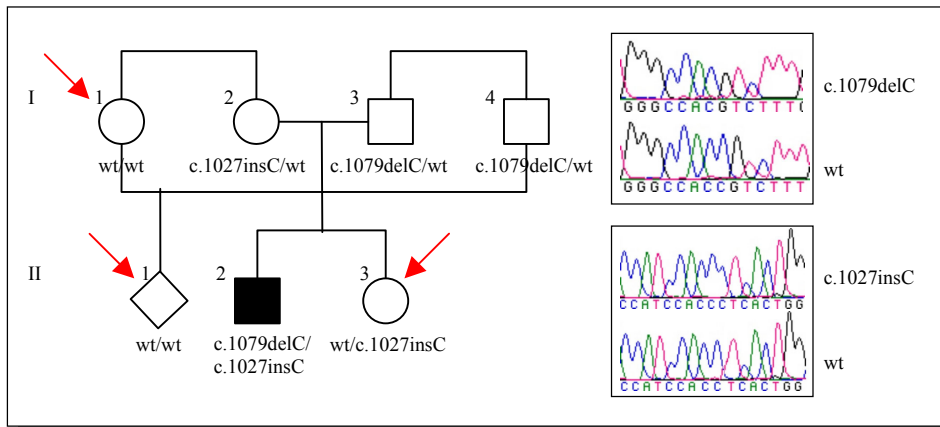
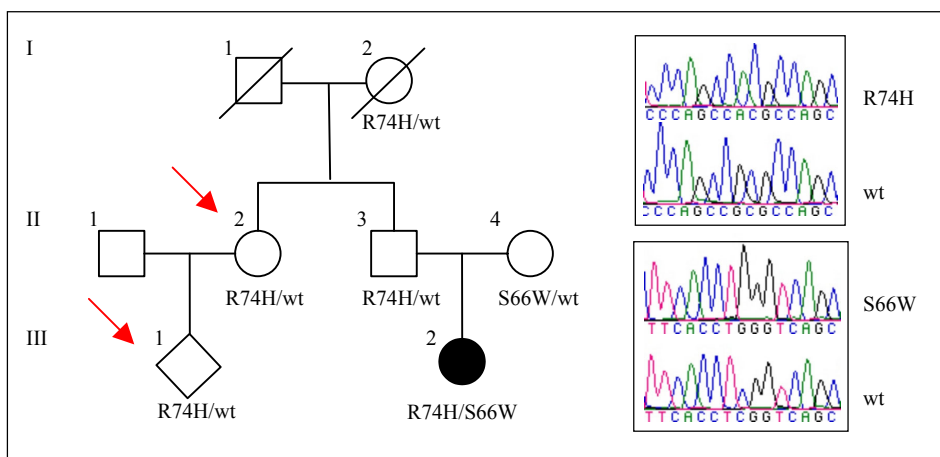
A. Família SFA-5**B.** Família SFA-22**C.** Família SFA-15

Figura 2: Arbre genealògic de tres famílies amb fills afectes per la MPS IIIA. (A) Família del pacient SFA-5. (B) Família del pacient SFA-22. (C) Família del pacient SFA-15.

El diagnòstic prenatal i de portadors dels familiars de pacients que pateixen la MPS IIIA, és fàcilment realitzable a partir d'un estudi genètic com el realitzat en el present treball, sempre i quan, es coneguin les mutacions responsables de la malaltia en la família d'estudi. En cas contrari, caldria (i) analitzar les mutacions més prevalents de la població espanyola, o (ii) efectuar un diagnòstic indirecte de la malaltia. Aquest diagnòstic indirecte podria realitzar-se amb l'ús de marcadors del tipus microsatèl·lits que cossegreixin amb el gen de la sulfamidasa o amb l'ús dels polimorfismes intragènics (Blanch i col., 1997; Bunge i col., 1997; Weber

i col., 1997; Di Natale i col., 1998; Montfort i col., 1998) sempre i quan siguin prou informatius.

El diagnòstic molecular resol els possibles dubtes que es puguin originar en la realització d'un diagnòstic enzimàtic degut a l'encavalcament entre els valors de l'activitat sulfamidasa dels portadors respecte als valors d'activitat dels controls sans. En conclusió, podem afirmar que el diagnòstic prenatal i de portadors de la síndrome de Sanfilippo A o mucopolisacaridosi IIIA basat en l'anàlisi de mutacions és possible i eficient.

CAPÍTOL 4:

Expressió i caracterització funcional de mutacions responsables de la mucopolisacaridosi IIIA en cèl·lules d'insecte

(Manuscrit sotmès per publicació a la revista *Molecular Genetics and Metabolism*)

La sulfamidasa és un dels enzims necessaris per a la degradació de l'heparà sulfat. La seva manca causa una malaltia d'acumulació lisosòmica, la mucopolisacaridosi IIIA. El pes molecular de la proteïna madura és d'uns 56 kDa, i en la seva forma natural es troba formant un dímer. La proteïna precursora és sintetitzada al reticle endoplasmàtic rugós i té un pes molecular d'uns 62 kDa.

La sulfamidasa és una N-sulfatasa. Per homologia de seqüència amb altres sulfatases s'ha comprovat que comparteix amb elles dues regions consensos, situades a l'extrem N-terminal. En els treballs anteriors s'havia procedit a la identificació de les mutacions responsables de la MPS IIIA en 26 pacients espanyols. S'identificaren 14 mutacions diferents, de les quals vuit han estat expressades en cèl·lules d'insecte (Sf9) en el present treball. Concretament, les mutacions p.S66W, p.R74H, p.Q85R, p.R206P, p.L386R, c.1079delC, p.R433W i R433Q han estat expressades emprant un sistema basat en l'obtenció de baculovirus recombinants mitjançant recombinació de lloc específic. Els resultats revelen que totes les mutacions presenten baixos, sinó nuls, nivells d'activitat, malgrat que en els anàlisis de *western blot* es detecten les dues bandes esperades en tots els mutants corresponents a la proteïna madura i precursora. Únicament la p.S66W i la p.R206P mantenen cert nivell d'activitat.

**EXPRESSION AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF HUMAN
MUTANT SULFAMIDASE IN INSECT CELLS.**

**Magda Montfort¹, Elena Garrido¹, John J. Hopwood², Daniel Grinberg¹, Amparo
Chabás³ and Lluïsa Vilageliu¹**

¹ Departament de Genètica, Universitat de Barcelona, Spain

² Lysosomal Diseases Research Unit, Department of Genetic Medicine, Women's and
Children's Hospital, Adelaide, Australia

³ Institut de Bioquímica Clínica, Hospital Clínic, Corporació Sanitària Clínic,
Barcelona, Spain

Corresponding author:

Dr. Lluïsa Vilageliu, Departament de Genètica, Universitat de Barcelona,
Av. Diagonal 645, E-08028 Barcelona, Spain.
Tel. 34-93-402-1494. Fax. 34-93-411-0969.
e-mail: lvilageliu@ub.edu

Abstract

Mucopolysaccharidosis IIIA (MPS IIIA; Sanfilippo syndrome) is an autosomal recessive lysosomal disorder caused by the deficiency of sulfamidase (EC 3.10.1.1), required for the degradation of the mucopolysaccharide heparan sulfate. The molecular defects of 26 unrelated Spanish MPS IIIA patients were recently reported by our group. Here we describe the heterologous expression, using a baculovirus system, of the cDNAs corresponding to 8 out of the 14 mutant alleles present in this patient group and the characterization of the corresponding mutant enzymes. In particular, we expressed the following alleles: p.S66W, p.R74H, p.Q85R, p.R206P, p.L386R, p.R433W, p.R433Q and c.1079delC (previously named as c.1091delC), and the two variants of the polymorphism p.R456H. The expression of the mutant alleles and the characterization of the corresponding enzymes revealed that their activity was severely compromised. Only mutations p.S66W and p.R206P retained low levels of residual activity. However, Western blot analysis showed in all cases the presence of the expected two forms of the sulfamidase, the precursor and the mature proteins, indicating a normal processing of the mutant enzyme.

Keywords: Heparan N-sulfatase; Sulfamidase; Mucopolysaccharidosis IIIA; Sanfilippo syndrome ; Transient expression; Bac-toBac Baculovirus Expression System

Introduction

Mucopolysaccharidosis IIIA (MPS IIIA; Sanfilippo syndrome; MIM# 252900) is one of the four MPS III subtypes (A, B, C and D) that result from deficiencies of different enzymes involved in the lysosomal degradation of the heparan sulfate. MPS IIIA is inherited as an autosomal recessive disorder and results from a deficiency of the lysosomal enzyme sulfamidase (SGSH; EC 3.10.1.1). The clinical presentation of MPS IIIA patients is predominantly characterized by severe central nervous system degradation resulting in progressive mental retardation. However, the mild somatic features and a relatively high incidence of false negative urinary screens for heparan sulfaturia often lead to a delayed diagnosis [1].

The sulfamidase cDNA was cloned, sequenced and mapped to chromosome 17q25.3 [2] and the organization of the coding sequences was characterized [3]. The molecular weight of the native protein is approximately 115 kDa, which seems to correspond to a dimer of the mature form characterized as a 56-kDa polypeptide [4]. The precursor protein is synthesized in the rough endoplasmatic reticulum (RER) and has a molecular weight of approximately 62 kDa [5]. The sequence contains five potential N-glycosylation sites (Asn 41, 142, 151, 265 and 413), all of which have been recently demonstrated to be functional [6, 7].

The analysis of sequence homology between sulfatases revealed the presence of two consensus sulfatase signatures, both in the N-terminal region [2]. The first of these sites is localized between amino acids 70 and 80, and the second, between amino acids 115 and 124. The first of these regions contains the Cys70, which is important for the catalytic function and for the correct processing of the enzyme [8]. As in other sulfatases, a conversion of this cysteine residue to a formylglycine is required for the

catalytic mechanism [8, 9]. The Arg74, also present in this region, seems to be analogous to Arg95 of arylsulfatase B, which is known to be involved in the formation and stabilization of the active site [10].

A total number of 14 different mutations have been identified for MPS IIIA in Spanish patients [11] and more than 60 worldwide (for a review see [12]). Although the majority of the identified mutations are private, one or a few mutant alleles predominate in specific populations [11, 12].

Expression studies have been widely used to demonstrate the pathogenicity of mutant alleles. Different methods have been used for the expression of sulfamidase mutant proteins. In the present study, we report the expression of several sulfamidase mutant alleles using a baculovirus-derived expression system, which has been reported to be very efficient for the expression of different enzymes [13-15].

In particular, we have expressed eight mutant alleles present in Spanish patients (p.S66W, p.R74H, p.Q85R, p.R206P, p.L386R, p.R433W, p.R433Q and c.1079delC) and the polymorphism of codon 456 (p.R456H). The corresponding mutant proteins have been characterized.

Materials and methods

Patients

The patients bearing the mutations included in this study are unrelated and came from different locations in Spain. Genotypes and fibroblast enzyme activity are shown in Table 1. These patients have been previously described [11, 16], except for patient

SFA-28. Mutation detection for this patient was performed as described for the other patient. All these patients presented with severe clinical features.

Sequence numbering.

Sequence numbering follows the recommendations indicated in den Dunnen and Antonarakis [17]. *SGSH* cDNA nucleotides were numbered considering the A of the first ATG as nucleotide +1 [12]. It should be noted that, due to the change in the nomenclature for the sulfamidase cDNA, the mutation previously described as c.1091delC, the most prevalent in Spanish patients, now corresponds to c.1079delC.

RNA isolation and PCR amplification.

For the wild-type construct, total RNA was isolated from fibroblast cultures using the RNeasy Minikit (Qiagen, Hilden, Germany). Single-stranded cDNA was synthesized using an oligo-dT primer and M-MLV reverse transcriptase, RNase H Minus (Promega, Madison, WI). Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed using Expand High Fidelity Taq polymerase (Roche, Mannheim, Germany) using the primers detailed in Table 2.

Wild-type cDNA was made in two fragments using primers 1F and 1R for fragment 1, and 2F and 2R for fragment 2. These two fragments were digested with *EagI* and then ligated to obtain the entire cDNA sequence. Subsequently, wild-type cDNA was cloned into *SmaI*-digested pUC18. The nucleotide sequence of the cDNA was verified by DNA sequencing.

Site-directed mutagenesis.

Sulfamidase cDNA mutants, and the R-bearing allele of the p.R456H polymorphism, were generated by site-directed mutagenesis using the QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA) according to the manufacturer instructions. All products were sequenced to verify that no spurious mutations were incorporated.

Construction of a donor vector.

The mutant as well as the wild-type and antisense sulfamidase cDNAs were subcloned into the *EcoRI/XbaI* sites of the pFastBac1 plasmid, the donor vector for the Bac-to-Bac baculovirus expression system (Invitrogen Life Technologies, Paisley, Scotland, UK).

Protein Expression in Sf9 cells.

Cell culture, transfections, selection of recombinant virus, and plaque assays were performed as described previously [18].

Enzyme analyses

Sulfamidase activity was assayed in wild-type and mutant cells using 4-Methylumbelliferyl-alpha-D-N-sulphoglucosaminide (MU-alpha-GlcNS) as reported by Karpova et al. [19]. In a few expression experiments, as well as in cultured fibroblasts

from patients, sulfamidase activity was measured with N-sulfonate-³⁵S heparin as substrate [20].

SDS-PAGE and Western blot analysis.

Western blotting analysis was performed as described previously [18]. Rabbit antiserum to recombinant human SGSH was used at a 1:2000 dilution in MTP. After a 2-hour incubation at room temperature, the membranes were washed three times with MTP. Afterwards, they were incubated with a secondary Ab-HRP (1:30000 in MTP) for 1 hour at room temperature and washed three times with PBS. The immunoreactive bands were detected with an ECL Western blotting detection system (RPN 2109, Amersham Life Science, Aylesbury, UK). To determine the cross-reacting immunological material (CRIM), bands were quantified using the UVIDocMw Software, version 99.03 (UVITEC, UK; www.uvitec.co.uk).

Results

Expression of wild-type and mutated sulfamidase cDNA in Sf9 insect cells.

In order to evaluate the differences in the activity between the normal sulfamidase enzyme and those coded by the p.S66W, p.R74H, p.Q85R, p.R206P, c.1079delC, p.L386R, p.R433W and p.R433Q mutant cDNAs, the Bac-to-Bac baculovirus expression system was used. It should be noted that all mutant enzymes, as well as the sense and antisense cDNA, bear a histidine at the polymorphic site p.R456H (c.1367G>A) since site directed mutagenesis was performed on a c.1367A-bearing

wild-type cDNA. The alternative wild-type p.456R protein was also expressed and characterized.

The average endogenous sulfamidase activity of Sf9 cells was assessed in cells infected with a recombinant baculovirus bearing the pFastBac1 plasmid but not the sulfamidase cDNA (pF). pF activity was used to correct the results of the expressed alleles in each experiment. The antisense cDNA as well as the pF control produced negligible levels, as expected. The activity of the different mutant enzymes are shown as the percentage of the wild type in Fig. 1B (white bars). No over-expression of wild-type enzyme, compared to that of fibroblasts, was observed in Sf9 cells. The p.R74H, p.Q85R, c.1079delC, p.L386R, p.R433W and p.R433Q mutant proteins had no significant activity, with levels similar to those observed for the antisense and pF controls. Only two of the mutant enzymes showed low but detectable activity values: p.S66W ($10\% \pm 6\%$) and p.R206P ($18\% \pm 9\%$). Surprisingly, the wild-type allele bearing arginine at residue 456 (p.456R) had approximately 50% higher activity than the one bearing histidine (p.456H). This difference was reduced to 20% when correction by CRIM was performed (see below).

Western blot analysis

Fig. 1A shows the immunoblot analysis of the expressed wild-type and mutant sulfamidase proteins. The wild-type human sulfamidase obtained in Sf9 cells reacted with the polyclonal anti-human sulfamidase antibody and produced the two expected bands corresponding to the precursor and the mature forms of the enzyme (approximately 62kDa and 56kDa, respectively). The same bands were observed for the different mutant sulfamidase proteins, except for the c.1079delC protein, which presented a band pattern consistent with the expected smaller size of the prematurely

terminated polypeptides. No protein was detected in alleles carrying the control pF or the antisense constructs.

To correct activity values by the amount of CRIM, densitometric analyses were performed. The corrected values are shown as grey bars in Fig. 1B. In addition, the densitometric analysis was also used to determine the mature protein to total sulfamidase ratio. These values were shown to be in the range of 36-41% of the total enzyme production for all constructs except for c.1079delC for which the amount of mature protein was 21% (Fig. 1C).

Discussion

The baculovirus expression system is a highly efficient method to produce high levels of recombinant enzyme [21]. Two of the advantages of the system are the extremely high expression of genes under the transcriptional control of the viral polyhedrin promoter and the ability of the insect cells to post-translationally modify the newly synthesized proteins. In particular, the Bac-to-Bac system used here, based on site-specific transposition in *E. coli* cells, allows to the rapid selection of recombinant baculovirus [18, 22]. In this study, the method has proved to be successful, although no overexpression of the wild-type allele was observed. In contrast, this overexpression had been reported in baculovirus expression of other genes such as that of glucocereborosidase, involved in Gaucher disease [23, 24].

Several mutant alleles of the sulfamidase gene have been expressed by different methods using either CHO [6, 25] or COS [26] cells. The present study is the first in which a baculovirus expression system, using Sf9 cells, has been used for this gene.

We have expressed 8 mutations, five of which (p.Q85R, p.R206P, p.L386R, p.R433W, and p.R433Q) were chosen because they had been described for the first time in Spanish patients [11, 16], although one of them (p.R433W) was simultaneously reported by Beesley et al [27]. The other three were among the most prevalent in the Spanish population: c.1079delC, previously known as c.1091delC (36.5%), p.S66W (7.7%) and p.R74H (5.8%) [11].

Our results showed very low, if any, activity for all the mutant proteins, highlighting the pathogenicity of these changes. These results are consistent with the low level of activity detected in fibroblast of patients bearing these mutations (see Table 1). Whilst most of the expressed enzymes had no activity at all, p.S66W (10% of wild-type, 13% if corrected by CRIM) and p.R206P (18% of wild-type, the same when corrected by CRIM) had detectable but low levels. Western blot analyses showed that proteins were actually produced by the baculovirus-Sf9 system and that they were correctly processed (Fig. 1A). The bands corresponding to the precursor and mature proteins had the expected sizes. In the case of c.1079delC, a lower band, consistent with the truncated protein size was observed.

Other groups, using different systems, have previously expressed some of the mutants included in this study. Perkins et al. [6] expressed the S66W mutation in a CHO system. They found that this mutant retained 15% of wild-type activity, similar to the results described here. This is also consistent with the fact that some homozygous patients for this mutation presented with an intermediate phenotype [28]. Mutation R206P was expressed in COS cells by Esposito et al. [26]. These authors found nearly no activity for this mutant allele whilst we have found 18% of wild-type activity. The patient described by Esposito et al. [26] was homozygous for this mutation and presented with an intermediate phenotype, consistent with a significant residual activity

for the mutant enzyme. The low number of expression studies precludes determining whether the different methods and cell types could account for these different results. Additionally, mutation p.R433W was reported to be expressed producing a mutant protein, that suffered rapid degradation [29]. This degradation was not observed in our study (Fig. 1A). Finally, although p.R74H has not been expressed before, Perkins et al. [6] expressed the p.R74C allele and obtained 12% of specific activity. Comparing these experiments, the substitution of arginine by histidine seems to have a larger effect on sulfamidase activity than a substitution by cysteine. It should be noted that p.R74 is a conserved residue among sulfatases within the first consensus region.

The processing of c.1079delC mutant protein seemed to be less efficient than that of the wild-type or of the rest of the mutants. As observed in Fig. 1C, the relative amount of c.1079delC mature protein was 21% whilst the average for all other proteins was 38%. Moreover, the total amount of protein for the c.1079delC mutant, detected by Western blot, was lower than that observed for the other constructs. Further, the change in the carboxy-terminus of the protein may affect protein stability. This diminished amount of protein would cause a higher specific activity (Fig. 1B).

All constructs were made by mutagenesis on a wild-type allele bearing a G at the c.1367 polymorphic position (coding for a histidine at residue 456). To detect possible differences between the two polymorphic variants, both wild-type alleles were expressed. Although the R-bearing protein seemed to be slightly more active (see Fig. 1B), the differences did not reach significant levels. This is consistent with previous data [30] and with the facts that the change affects amino acids of similar biochemical features and that it is localized to a non-conserved region in sulfatases.

One of the mutations that conserved some residual activity, p.R206P, is the only change of all the mutations expressed in this study that affects a non-conserved residue

between the murine and human SGSH [12], thus its effect on activity may be less dramatic.

In summary, all the SGSH mutations expressed to date seem to produce a significant effect on enzyme activity. The lack of 'mild' mutations, as found in other diseases, is rather surprising. Only a few cases with late onset were described. Recently, two such cases were reported. One was a Japanese patient bearing two novel mutations: p.S347F and p.D444G [31]. The other patient was a 53 year-old woman who did not presented with neurological symptoms [32]. No *SGSH* mutation was found in this patient after the complete sequencing of the gene. A threshold effect may be present where mutations that do not cause dramatic reduction in enzyme activity may not produce clinical manifestations. Moderate levels of activity might be enough to avoid the disease, a fact that should be taken into account for future enzyme replacement or gene therapy approaches.

Acknowledgments

We thank H. Sellés for technical assistance and R. Rycroft for revising the English. This research was supported by CICYT (SAF 2000-0200), Fundació Marató de TV3 (Proj. Nos. 98-1220/1221) and FIS (Redes Temáticas, G03/054).

References

- [1] E.F. Neufeld, J. Muenzer, The Mucopolysaccharidoses. in: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, et al. (Eds.) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, eighth ed., McGraw-Hill, New York, 2001.
- [2] H.S. Scott, L. Blanch, X.H. Guo, C. Freeman, A. Orsborn, E. Baker, G.R. Sutherland, C.P. Morris, J.J. Hopwood, Cloning of the sulphamidase gene and identification of mutations in Sanfilippo A syndrome. *Nat. Genet.* 11 (1995) 465-467.

- [3] L.E. Karageorgos, X.H. Guo, L. Blanch, B. Weber, D.S. Anson, H.S. Scott, J.J. Hopwood, Structure and Sequence of the human Sulphamidase Gene. *DNA Res.* 3 (1996) 269-271.
- [4] C. Freeman, J.J. Hopwood, Human liver sulphamate sulphohydrolase. Determinations of native protein and subunit Mr values and influence of substrate aglycone structure on catalytic properties. *Biochem. J.* 234 (1986) 83-92.
- [5] J. Bielicki, J.J. Hopwood, E.L. Melville, D.S. Anson, Recombinant human sulphamidase: Expression, amplification, purification and characterization. *Biochem. J.* 329 (1998) 145-150.
- [6] K.J. Perkins, S. Byers, G. Yogalingam, B. Weber, J.J. Hopwood, Expression and characterization of wild type and mutant recombinant human sulfamidase. Implications for Sanfilippo (Mucopolysaccharidosis IIIA) syndrome. *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 37193-37199.
- [7] P. Di Natale, B. Vanacore, A. Daniele, S. Esposito, Heparan N-sulfatase: in vitro mutagenesis of potential N-glycosylation sites. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 280 (2001) 1251-1257.
- [8] A. Daniele, P. Di Natale, Heparan N-sulfatase: cysteine 70 plays a role in the enzyme catalysis and processing. *FEBS Lett.* 505 (2001) 445-448.
- [9] B. Schmidt, T. Selmer, A. Ingendoh, F.K. von Figura, A novel amino acid modification in sulfatases that is defective in multiple sulfatase deficiency. *Cell* 82 (1995) 271-278.
- [10] C.S. Bond, P.R. Clements, S.J. Ashby, C.A. Collyer, S.J. Harrop, J.J. Hopwood, J.M. Guss, Structure of a human lysosomal sulfatase. *Structure* 5 (1997) 277-289.
- [11] A. Chabás, M. Montfort, M. Martinez-Campos, A. Diaz, M.J. Coll, D. Grinberg, L. Vilageliu, Mutation and haplotype analyses in 26 Spanish Sanfilippo syndrome type A patients: Possible single origin for 1091delC mutation. *Am. J. Med. Genet.* 100 (2001) 223-228.
- [12] G. Yogalingam, J.J. Hopwood, Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type IIIA and IIIB: Diagnostic, clinical, and biological implications. *Hum. Mutat.* 18 (2001) 264-281.
- [13] M.E. Grace, P.P. Ashton, G.M. Pastores, A. Soni, R.J. Desnick, Non-pseudogene-derived complex acid beta-glucosidase mutations causing mild type 1 and severe type 2 Gaucher disease. *J. Clin. Invest.* 103 (1999) 817-823.
- [14] Y. Chen, M. Jin, L. Goodrich, G. Smith, G. Coppola, D.H. Calhoun, Purification and characterization of human alpha-galactosidase A expressed in insect cells using a baculovirus vector. *Protein Expr Purif.* 20 (2000):228-236.
- [15] S. Lansmann, C.G. Schuette, O. Bartelsen, J. Hoernschemeyer, T. Linke, J. Weisgerber, K. Sandhoff, Human acid sphingomyelinase. *Eur. J. Biochem.* 270 (2003) 1076-1088.
- [16] M. Montfort, L. Vilageliu, N. Garcia-Giralt, S. Guidi, M.J. Coll, A. Chabás, D. Grinberg, Mutation 1091delC is highly prevalent in Spanish Sanfilippo syndrome type A patients. *Hum. Mutat.* 12 (1998) 274-279.
- [17] J.T. den Dunnen, S.E. Antonarakis, Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: A discussion. *Hum. Mutat.* 15 (2000) 7-12.
- [18] M. Montfort, A. Chabás, L. Vilageliu, D. Grinberg, Functional analysis of 13 mutant alleles identified in Gaucher disease patients: pathogenic changes and "modifier" polymorphisms. *Hum. Mutat.* (2004) in press.

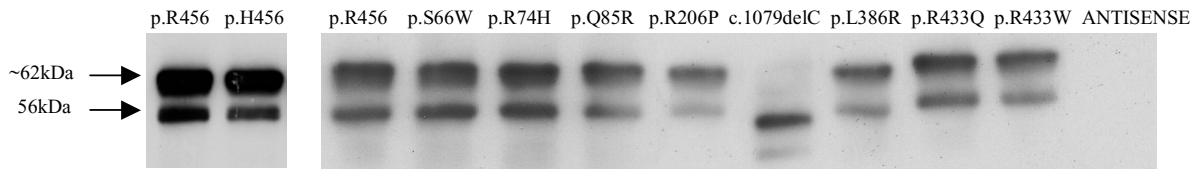
- [19] E.A. Karpova, V. Voznyi Ya, J.L. Keulemans, A.T. Hoogeveen, B. Winchester, I.V. Tsvetkova, O.P. van Diggelen, A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Sanfilippo disease type A (MPS IIIA). *J. Inherit. Metab. Dis.* 19 (1996) 278-285.
- [20] R. Matalon, M. Deanching, R. Marback, K. Michals, Carrier detection for Sanfilippo A syndrome. *J. Inherit. Metab. Dis.* 11 (1988) 158-160.
- [21] T.A. Pfeifer, Expression of heterologous proteins in stable insect cell culture. *Curr. Op. Biotech.* 9 (1998) 518-521.
- [22] V.A. Luckow, S.C. Lee, G.F. Barry, P.O. Olins, Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J. Virol.* 67 (1993) 4566-4579.
- [23] G.A. Grabowski, W.R. White, M.E. Grace, Expression of functional human acid β -glucosidase in COS-1 and *Spodoptera frugiperda* cells. *Enzyme* 41 (1989) 131-142.
- [24] M.E. Grace, P.N. Graves, F.I. Smith, G.A. Grabowski, Analyses of catalytic activity and inhibitor binding of human acid β -glucosidase by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 6827-6835.
- [25] J. Bielicki, J.J. Hopwood, D.S. Anson, Correction of Sanfilippo A skin fibroblasts by retroviral vector-mediated gene transfer. *Hum. Gene Ther.* 7 (1996) 1965-1970.
- [26] S. Esposito, N. Balzano, A. Daniele, G. Villani, K. Perkins, B. Weber, J.J. Hopwood, N.P. Di Natale, Heparan N-sulfatase gene: two novel mutations and transient expression of 15 defects. *Biochim. Biophys. Acta* 1501(2000) 1-11.
- [27] C.E. Beesley, E.P. Young, A. Vellodi, B.G. Winchester, Mutational analysis of Sanfilippo syndrome type A (MPS IIIA): identification of 13 novel mutations. *J. Med. Genet.* 37 (2000) 704-707.
- [28] P. Di Natale, N. Balzano, S. Esposito, G. Villani, Identification of molecular defects in Italian Sanfilippo A patients including 13 novel mutations. *Hum. Mutat.* 11 (1998) 313-320.
- [29] P. Di Natale, G.R.D. Villani, C. Di Domenico, A. Daniele, C.D. Vici, A. Bartuli, Analysis of Sanfilippo A gene mutations in a large pedigree. *Clin. Genet.* 63 (2003) 314-318.
- [30] G.J. Lee Chen, S.P. Lin, M.H. Ko, C.K. Chuang, C.P. Chen, H.H. Lee, S.C. Cheng, C.H. Shen, K.L. Tseng, C.L. Li, Identification and characterization of mutations underlying Sanfilippo syndrome type A (mucopolysaccharidosis type IIIA). *Clin. Genet.* 61 (2002) 192-197.
- [31] T. Miyazaki, N. Masuda, M. Waragai, Y. Motoyoshi, K. Kurokawa, T. Yuasa, An adult Japanese Sanfilippo A patient with novel compound heterozygous S347F and D444G mutations in the sulphamidase gene. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 73 (2002) 776-778.
- [32] J.L.K. Van Hove, R.A. Wevers, J. Van Cleemput, P. Moerman, R. Sciot, G. Matthijs, E. Schollen, J.G.N. de Jong, W.F. Carey, V. Muller, C. Nicholls, K. Perkins, J.J. Hopwood, Late-onset visceral presentation with cardiomyopathy and without neurological symptoms of adult Sanfilippo A syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 118 (2003) 382-387.

Figure legends

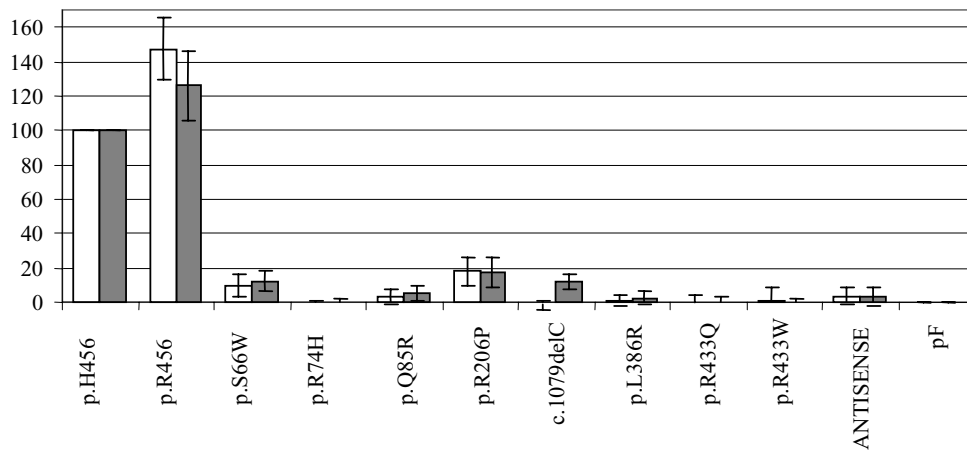
Fig. 1: (A) Western blotting analysis of wild-type and mutant sulfamidases expressed in Sf9 cells. The left panel shows the two variants of the R456H polymorphism while the right panel corresponds to several mutant sulfamidases (the product of the R456 allele of the polymorphism is included for comparison). Each lane contains 10µg of total protein that were analyzed by 10% SDS-PSGE, followed by immunoblotting using a polyclonal anti-human sulfamidase antibody. (B) Enzymatic activity of proteins expressed in Sf9 cells, presented as percentage of wild-type (H456) enzyme (white bars). Activities corrected by CRIM are also shown (grey bars). (C) Densitometric analysis of the precursor (62 kDa, dark) and mature (56 kDa, light) forms of the protein for the different alleles. Sizes are different for c.1079delC. For each construction, bars represent the relative amount (indicated as percentages) of each isoform.

Figure

A



B



C

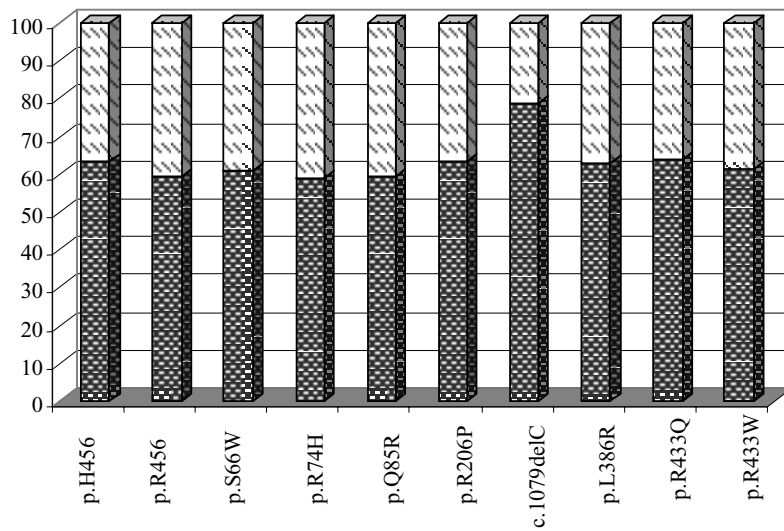


Table 1**Table 1. Genotypes and sulfamidase activity in fibroblasts of patients bearing the expressed mutations**

Patient	Genotype	Activity ^a	Ref.
SFA-2	c.1079delC/c.1079delC	7.5	[16]
SFA-3	c.1079delC/c.1079delC	6.0	[16]
SFA-7	c.1079delC/c.1079delC	3.2	[16]
SFA-13	c.1079delC/c.1079delC	1.2	[11]
SFA-27	c.1079delC/c.1079delC	0.0 ^b	[11]
SFA-4	p.R206P/c.1079delC	2.0	[16]
SFA-6	p.L386R/p.L386R	3.4	[16]
SFA-11	p.Q85R/p.Q85R	0.0 ^b	[16]
SFA-14	p.R433W/p.R433W	3.5	[11]
SFA-17	p.S66W/c.1027insC	0.1	[11]
SFA-15	p.S66W/p.R74H	7.0	[11]
SFA-18	p.R74H/p.R74H	0.1	[11]
SFA-20	c.1079delC /p.R433Q	0.0 ^b	[11]
SFA-28	c.1079delC /p.R433Q	0.5	unpublished

^a Expressed as percentage of control mean (control fibroblast activity was 10.89±4.10 nmols/h x mg; n=25)

^b Not detectable activity

Table 2

TABLE 2: Oligonucleotide primers used for synthesis of sulfamidase cDNAs.

PRIMERS	5' SEQUENCE 3'
1F	CCCGATCCCGAGTCCGAGCC
1R	GTTTTGGGTGCTCCGGGGAT
2F	GCCCCAGTACGGAACCTTCT
2R	AGGGCTGTTGCCACTACTCC
S66W (C/G)	GCAATGCCTTACCT <u>G</u> GGTCAGCAGCTGC
R74H (G/A)	GCTCTCCCAGCC <u>A</u> CGCCAGCCTCC
Q85R (A/G)	GCCCCAGCATC <u>G</u> GAATGGGATGTACGG
R206P (G/C)	GCGGCATGGGTC <u>C</u> TATCCCAGACTGG
1079delC	CCCCTCTGGGCCA* <u>C</u> GTCTTTGG
L386R (T/G)	GGCACTTCCGCC <u>G</u> CGTGCACAACCTC
R433Q (G/A)	CGTCATTACTACTACC <u>A</u> GGCGCGCTGGG
R433W (C/T)	CGTCATTACTACTACT <u>T</u> GGCGCGCTGGG
R456H (G/A)	CCACCGACCCGC <u>G</u> CTTTGCTCAGC

MALALTIA DE GAUCHER

CAPÍTOL 5:

Expressió i caracterització funcional de diferents mutacions responsables de la malaltia de Gaucher en cèl·lules d'insecte

La malaltia de Gaucher està causada per la deficiència en l'activitat de l'enzim β -glucosidasa àcida. Fins el moment, han estat descrites més de 200 mutacions diferents com a responsables de la malaltia, més de 25 de les quals en pacients espanyols. Per tal de determinar la patogenicitat d'algunes d'aquestes mutacions s'ha procedit a la seva expressió en cèl·lules d'insecte. Les mutacions P182L, R257X, Y313H, P391L i N392I presenten nivells d'activitat negligibles. Les mutacions N370S, I402T, D409, L444P i els dobles mutants [L444P;E326K] i [N188S;E326K], presenten nivells d'activitat entre el 6% i el 23% respecte la proteïna salvatge. Les N188S i E326K, presenten nivells d'activitat elevats del 42,7% i 66,6%, respectivament. Aquestes mutacions podrien considerar-se com a "variants modificadores", les quals al trobar-les soles en un al·lel no provocarien la malaltia o que provocarien uns efectes molt lleus. En canvi, al trobar-les un combinació amb una segona mutació tindrien un efecte additiu incrementant la patogenicitat de l'altre mutació.

RESEARCH ARTICLE

Functional Analysis of 13 *GBA* Mutant Alleles Identified in Gaucher Disease Patients: Pathogenic Changes and “Modifier” PolymorphismsMagda Montfort,¹ Amparo Chabás,² Lluïsa Vilageliu,¹ and Daniel Grinberg^{1*}¹Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; ²Institut de Bioquímica Clínica, Hospital Clínic, Corporació Sanitària Clínic, Barcelona, Spain

Communicated by Dvorah Abeliovich

Gaucher disease, the most prevalent sphingolipidosis, is caused by the deficient activity of acid β -glucosidase, mainly due to mutations in the *GBA* gene. Over 200 mutations have been identified worldwide, more than 25 of which were in Spanish patients. In order to demonstrate causality for Gaucher disease, some of them: c.662C>T (p.P182L), c.680A>G (p.N188S), c.886C>T (p.R257X), c.1054T>C (p.Y313H), c.1093G>A (p.E326K), c.1289C>T (p.P391L), c.1292A>T (p.N392I), c.1322T>C (p.I402T), and the double mutants [c.680A>G; c.1093G>A] ([p.N188S; p.E326K]) and [c.1448T>C; c.1093G>A] ([p.L444P; p.E326K]), were expressed in Sf9 cells using a baculovirus expression system. Other well-established Gaucher disease mutations, namely c.1226A>G (p.N370S), c.1342G>C (p.D409H), and c.1448T>C (p.L444P), were also expressed for comparison. The levels of residual acid β -glucosidase activity of the mutant enzymes produced by the cDNAs carrying alleles c.662C>T (p.P182L), c.886C>T (p.R257X), c.1054T>C (p.Y313H), c.1289C>T (p.P391L), and c.1292A>T (p.N392I) were negligible. The c.1226A>G (p.N370S), c.1322T>C (p.I402T), c.1342G>C (p.D409H), c.1448T>C (p.L444P), and [c.1448T>C; c.1093G>A] ([p.L444P; p.E326K]) alleles produced enzymes with levels ranging from 6 to 14% of the wild-type. The three remaining alleles, c.680A>G (p.N188S), c.1093G>A (p.E326K), and [c.680A>G; c.1093G>A] ([p.N188S; p.E326K]), showed higher activity (66.6, 42.7, and 23.2%, respectively). Expression studies revealed that the c.1093G>A (p.E326K) change, which was never found alone in a Gaucher disease-causing allele, when found in a double mutant such as [c.680A>G; c.1093G>A] ([p.N188S; p.E326K]) and [c.1448T>C; c.1093G>A] ([p.L444P; p.E326K]), decreases activity compared to the activity found for the other mutation alone. These results suggest that c.1093G>A (p.E326K) should be considered a “modifier variant” rather than a neutral polymorphism, as previously considered. Mutation c.680A>G (p.N188S), which produces a mutant enzyme with the highest level of activity, is probably a very mild mutation or another “modifier variant.” *Hum Mutat* 23:567–575, 2004. © 2004 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: Gaucher disease; GD; *GBA*; expression studies; baculovirus system

DATABASES:

GBA – OMIM: 606463, 230800 (GD I), 230900 (GD II), 231000 (GD III); GenBank: NM_000157.1

INTRODUCTION

The lysosomal enzyme glucocerebrosidase (D-glucosyl acylsphingosine glucohydrolase, EC 3.2.1.45) is a 497–amino acid long membrane glycoprotein of 65 kDa. It catalyzes the hydrolysis of glucosylceramide to ceramide and glucose, in the presence of an activator protein named saposin C (SAP-C). Deficient glucocerebrosidase (*GBA*, MIM# 606463) enzymatic activity causes Gaucher disease (GD, MIM# 230800, 230900, 231000), the most prevalent lysosomal storage disorder, which is inherited as an autosomal recessive trait. The disease has classically been divided into three types, on the basis of clinical symptoms and neurological involvement: type 1 (nonneuronopathic), type 2 (acute neuronopathic) and type 3 (subacute neuronopathic)

(for a review on Gaucher disease see Beutler and Grabowski [2001]).

Gaucher disease is mainly due to mutations in the *GBA* gene located on 1q21. More than 200 mutations

Received 31 October 2003; accepted revised manuscript 22 January 2004.

Grant sponsor: Genzyme; Grant sponsor: CICYT; Grant number: SAF 2000-0200; Grant sponsor: Fundació Marató de TV3; Grant number: 98-1220/1221; Grant sponsor: FIS (Redes Temáticas); Grant number: G03/054.

*Correspondence to: Daniel Grinberg, Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645, E-08028 Barcelona, Spain. E-mail: dgrinberg@ub.edu

DOI 10.1002/humu.20043

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

568 MONTFORT ET AL.

have been identified in this gene in Gaucher disease patients (www.hgmd.org) [Stenson et al., 2003]. According to the severity of their phenotypic effect, the mutations have been classified as mild, severe, or lethal [Beutler et al., 1994]. A mutation is considered to be mild when it is always found associated with type 1 disease (regardless of the other allele). Severe mutations are those associated with the neuronopathic forms of the disease, and lethal mutations are those never found in homozygosity or in heterozygosity with another lethal mutation.

Some genotype–phenotype correlations have been established, such as the presence of mutation c.1226A>G (p.N370S), either in homozygosity or heterozygosity, with type 1, nonneuronopathic disease, or that of the allele c.1448T>C (p.L444P), in the absence of a mild mutation, with the neuronopathic forms of the disease [Theophilus et al., 1989]. The [(c.1342G>C)+(c.1342G>C)] ([p.D409H]+[p.D409H]) genotype has been associated with a special type 3 phenotype, presenting severe cardiac involvement and oculomotor apraxia [Chabás et al., 1995; Abrahamov et al., 1995]. GD is characterized by great heterogeneity at the phenotypic level, which has been primarily attributed to the large number of GBA mutations. Since most mutations are rare, it is difficult to predict the severity of the disease from the patient genotype. Patients within the same clinical type also show high heterogeneity. In this regard, the great variety among Gaucher disease patients with the c.1226A>G (p.N370S) allele is well known. Although they carry an identical genotype, these patients present phenotypic variability, probably due to other genetic, epigenetic, and/or environmental factors (reviewed in Cox [2001] and Zhao and Grabowski [2002]).

In vitro expression analysis of mutations is a useful method to test whether a mutation impairs enzyme activity, to explore phenotype–genotype correlations and to gain further insight into the normal function of the enzyme. Various in vitro expression systems have been used to elucidate the biochemical effects of several glucocerebrosidase mutations and a variety of kinetic, stability, and/or processing abnormalities of the residual enzymes have been described. In particular, the baculovirus expression system has been reported to be a suitable system for expressing glycoproteins such as glucocerebrosidase and to achieve a very high level of expression [Grabowski et al., 1989; Grace et al., 1990, 1994, 1999; Choy et al., 1996; Kim et al., 1996; Amaral et al., 2000].

In this study, we used a baculovirus-derived expression system to express cDNAs bearing several mutations found in Spanish Gaucher disease patients. This method was improved by performing the recombination step in bacterial cells, by site-specific transposition, allowing selection of recombinant baculovirus shuttle vectors (bacmids) prior to infection of insect cells. The corresponding mutated proteins were biochemically characterized. In particular, cDNAs bearing the mutations c.662C>T (p.P182L), c.680A>G (p.N188S), c.886C>T (p.R257X), c.1054T>C (p.Y313H),

c.1093G>A (p.E326K), c.1289C>T (p.P391L), c.1292A>T (p.N392I), c.1322T>C (p.I402T), and the double mutants [c.680A>G; c.1093G>A] ([p.N188S; p.E326K]) and [c.1448T>C; c.1093G>A] ([p.L444P; p.E326K]), were expressed. Mutations c.1226A>G (p.N370S), c.1342G>C (p.D409H), and c.1448T>C (p.L444P) were also expressed, for comparison. We found decreased enzymatic activity for all the mutated enzymes, ranging from 0 to 67% of the wild-type protein. We also discuss and compare published data on mutations obtained using several expression approaches.

MATERIALS AND METHODS

Patients

We analyzed the mutations identified in eight Spanish Gaucher disease patients. A clinical evaluation was provided by the patients' physicians, including physical examination, routine hematological and laboratory tests, and radiological and neurological studies. In all cases, the GD diagnosis was confirmed by the low β -glucocerebrosidase activity in leukocytes or cultured fibroblasts. The genotypes and clinical types of these patients are listed in Table 1.

RNA Isolation and PCR Amplification

Total RNA was isolated from patient and control fibroblast cultures using the RNeasy Minikit (Qiagen, Hilden, Germany). Single-stranded cDNA was synthesized using an oligo-dT primer and M-MLV reverse transcriptase, RNase H Minus (Promega, Madison, WI). Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed using Expand High Fidelity Taq polymerase (Roche, Mannheim, Germany) and the primers detailed in Table 2.

Some cDNAs were obtained by RT-PCR of the complete GBA mRNA using primers in the 5' and 3' termini of the sequence (1bF-EcoRI and 11R-XbaI; 1bF and 11R), while others were made in two fragments using primers 1bF-EcoRI and RT1 for fragment 1, and RT2 and 11R-XbaI for fragment 2. These two fragments were digested with ScaI and then ligated to obtain the entire cDNA sequence. All cDNAs were then cloned into the SmaI- and/or EcoRI/XbaI-digested pUC18. The nucleotide sequence of the cDNAs was verified by DNA sequencing.

Sequence Numbering

Sequence numbering follows the recommendations indicated in the website: www.hgvs.org/mutnomen. GBA cDNA nucleotides are numbered throughout the study considering the A of the first ATG as nucleotide +1, as recommended. The accession number for the GenBank reference sequence used was NM_000157.1, in which the first ATG starts at nucleotide 123. A subtraction of 122 nucleotides is needed to find the actual cDNA position for each mutation.

Site-Directed Mutagenesis

GBA cDNA molecules bearing mutations c.886C>T (p.R257X), c.1226A>G (p.N370S), and c.1448T>C (p.L444P) were generated by site-directed mutagenesis using the QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA) following the manufacturer's instructions. All constructs were resequenced to ensure that no spurious mutation has been introduced.

Construction of a Donor Vector

The mutant cDNAs, as well as the wild-type and antisense GBA cDNAs, were subcloned into the EcoRI/XbaI sites of the pFastBac1 plasmid, the donor vector for the Bac-to-Bac

TABLE 1. Genotypes, Clinical Type and GBA Activity in Fibroblasts of Patients Bearing the Expressed Mutations

Patient	Genotype ^a	Protein mutations	Type	Activity ^b	Reference
I.6	[c.1054T>C]+[c.1226A>G]	[p.Y313H]+[p.N370S]	I	5%	Cormand et al., 1996
I.22	[c.1342G>C]+[c.680A>G; c.1093G>A]	[p.D409H]+[p.N188S; p.E326K]	I	11%	Cormand et al., 1998
I.24	[c.1226A>G]+[c.1289C>T]	[p.N370S]+[p.P391L]	I	5%	Cormand et al., 1998
I.41	[c.886C>T]+[c.1226A>G]	[p.R257X]+[p.N370S]	I	18%	Cormand et al., 1998
It.3	[c.1322T>C]+[c.1322T>C]	[p.I402T]+[p.I402T]	I	36%	Cormand et al., 1997
II.5	[c.1292A>T]+[c.1448T>C]	[p.N392I]+[p.L444P]	II	3%	Cormand et al., 1998
II.12	[c.662C>T]+[c.1448T>C; c.1093G>A]	[p.P182L]+[p.L444P; p.E326K]	II	0.7%	MS in preparation
III.2	[c.1342G>C]+[c.1342G>C]	[p.D409H]+[p.D409H]	III	4%	Chabás et al., 1995

^aFor cDNA numbering, +1 corresponds to the A of the first ATG in GenBank reference sequence NM-000157.

^bActivity expressed as percentage of control mean (320 nmol/h/mg protein).

TABLE 2. Oligonucleotide Primers Used for Synthesis of GBA Mutants

Primers	Sequence
1bF	5'-GCCGGAATTACTTGCAGGGC-3'
11R	5'-CTCTTTAGTCACAGACAGCG-3'
1bF-EcoRI	5'-GGAATTCGCCGGAATTACTTGCAGGGC-3'
11R-XbaI	5'-GCTCTAGACTCTTAGTCACAGACAGCG-3'
RT1	5'-CATGGTGTGGGGAACAGGC-3'
RT2	5'-GTCACTCAAGGGACAGCCCG-3'
R257X ^a	5'-CCCCTGAACATCAGTGAGACTTCATTGCCCG-3'
N370S ^a	5'-CCACAGCATCATCACGAGCCTCCTGTACC-3'
L444P ^a	5'-CAGAAGAACGCCGGACGACAGTGCC-3'

^aPrimers synthesized to generate the desired mutations by site-directed mutagenesis.

baculovirus expression system (Invitrogen Life Technologies, Paisley, Scotland, UK) (Fig. 1).

Cell Culture

Sf9 cells were grown as monolayer cultures at 27°C without CO₂ in tissue plaques. Sf900 II SFM (Gibco™ Invitrogen, Paisley, Scotland, UK) was used.

Generation of the Recombinant Baculovirus

Recombinant pFastBac1 plasmids were used to transform competent bacmid-containing DH10Bac *E. coli* cells (see Fig. 1). Colonies bearing recombinant bacmids, generated by site-specific transposition, were selected by antibiotic resistance and colony color, on a medium with antibiotic (kanamycin, tetracycline, and gentamycin), X-Gal, and IPTG. Bacmid DNA from selected colonies was prepared following the manufacturer's instructions and used to transfect Sf9 insect cells. Five µl of recombinant bacmid DNA was transfected into the cells using 6 µl of Cellfectin (Gibco Invitrogen, Paisley, Scotland, UK). Thereafter, cells were incubated at 27°C for 7 hr, and the medium was removed and replaced by 2 ml of fresh medium. Viral supernatant was collected at 72–96 hr post-transfection and the resulting baculoviruses were amplified one to three times to yield a viral titer of 10⁷–10⁸ plaque-forming units (pfu)/ml. Titering of the baculovirus stocks was determined by plaque assay in immobilized monolayer culture following the manufacturer's instructions.

Expression of Mutant Protein in Sf9 Cells

For protein expression, 5 × 10⁶ Sf9 cells were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 10. At 72 hr post-infection, cells were collected by centrifugation for 5 min at 300 g. Cellular pellets were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended in 1 ml of PBS. A total of 90% of the volume was used to perform enzyme assays and the remaining 10% was used to

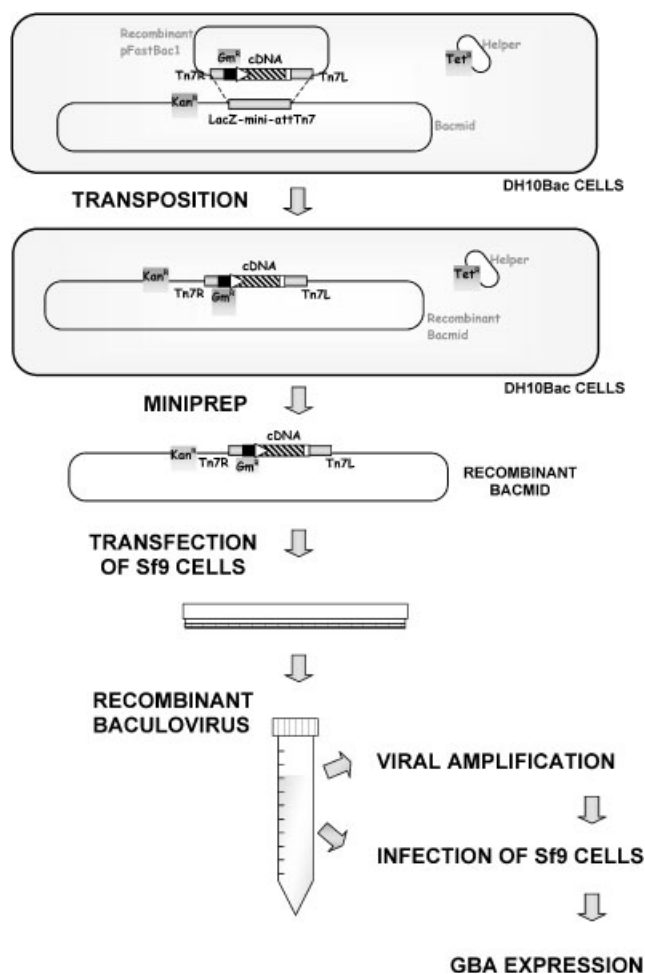


FIGURE 1. Generation of recombinant baculovirus with the Bac-to-Bac[®] baculovirus expression system.

analyze protein expression by Western blotting using monoclonal and polyclonal antibodies.

Enzymatic Analyses

β-glucosidase activity was measured with 4-methylumbelliferyl-β-glucopyranoside (4.5 mM) in the presence of sodium taurocholate (1.5% w/v) and Triton X-100 (0.2% v/v), as described in Chabás et al. [1995].

SDS-PAGE and Western Blotting Analysis

Proteins were subjected to SDS-PAGE (10% polyacrylamide) and electrophoretically transferred onto nitrocellulose membranes.

570 MONTFORT ET AL.

Each membrane was blocked with 5% nonfat milk in PBS, containing 0.1% Tween 20 (MTP). After incubation for 1 hr at room temperature with primary (monoclonal or polyclonal) antibody in MTP, it was washed three times with MTP. Monoclonal and polyclonal anti-human β -glucosidase antibodies were kindly provided by Dr. Aerts (Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands) and Dr. Grabowski (Cincinnati Children's Hospital Research Foundation, Cincinnati, OH), respectively. Membranes were then incubated with a secondary Ab-HRP conjugate (1:30,000 in MTP) for 1 hr at room temperature, followed by three washes with PBS. The immunoreactive bands were detected with the ECL Western blotting detection reagent (RPN 2109; Amersham Life Science, Aylesburg, UK). To calculate the relative amount of cross-reacting immunological material (CRIM), bands were quantified from three replicas using the UVIDocMw software, version 99.03 (UVITEC, UK).

Statistical Analysis

The U de Mann-Whitney test was used to analyze significant differences in glucocerebrosidase activity values between the pairs of mutant enzymes and between each mutant enzyme and the wild type.

RESULTS

Expression of Wild-Type and Mutant Glucocerebrosidase in Sf9 Insect Cells

Mutant cDNAs c.662C>T (p.P182L), c.680A>G (p.N188S), [c.680A>G; c.1093G>A] ([p.N188S; p.E326K]), c.886C>T (p.R257X), c.1054T>C (p.Y313H), c.1093G>A (p.E326K), c.1226A>G (p.N370S), c.1289C>T (p.P391L), c.1292A>T (p.N392I), c.1322T>C (p.I402T), c.1342G>C (p.D409H), c.1448T>C (p.L444P), and [c.1448T>C; c.1093G>A] ([p.L444P; p.E326K]), as well as sense and antisense β -glucosidase cDNAs, were expressed in the Bac-to-Bac baculovirus expression system and the

activity of the corresponding enzymes was measured (Fig. 2). The previously studied c.1226A>G (p.N370S), c.1342G>C (p.D409H), and c.1448T>C (p.L444P) alleles were expressed for comparative purposes. The average expressed activity of wild-type β -glucosidase in Sf9 cells was $2,186 \pm 485$ nmol/hr/mg. The average endogenous β -glucosidase activity of Sf9 cells was assessed through the infection of the Sf9 cells with a recombinant baculovirus that did not bear the glucocerebrosidase cDNA (pF). This recombinant baculovirus was generated following the protocol shown in Figure 1, but using a pFastBac1 plasmid without insert. pF activity (42.6 ± 13.9 nmol/hr/mg) was used to correct the results of the expressed alleles. The antisense cDNA produced negligible levels, similar to those of the pF control. Final results were expressed as the percentage of the wild-type allele activity (Fig. 2, gray bars). Five of the mutant glucocerebrosidases, c.662C>T (p.P182L), c.886C>T (p.R257X), c.1054T>C (p.Y313H), c.1289C>T (p.P391L), and c.1292A>T (p.N392I), had no significant activity. Alleles bearing the mutations c.1226A>G (p.N370S), c.1322T>C (p.I402T), c.1342G>C (p.D409H), c.1448T>C (p.L444P), and the double mutant [c.1448T>C; c.1093G>A] ([p.L444P; p.E326K]) produced enzymes with low levels of activity, ranging from 6 to 14% of the wild-type. The three mutant enzymes showing the highest values corresponded to alleles c.680A>G (p.N188S) (66.6%) and c.1093G>A (p.E326K) (42.7%), and to the construction bearing both mutations, [c.680A>G; c.1093G>A] ([p.N188S; p.E326K]) (23.2%).

Table 3 shows the statistical analysis between the activity values of the pairs of mutant enzymes with detectable levels of activity and between each of them

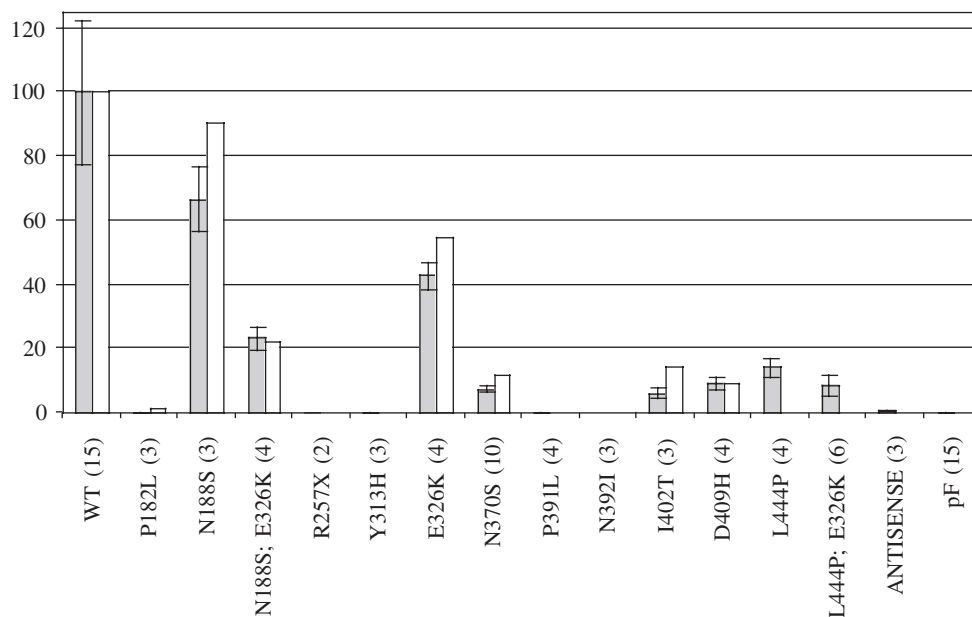


FIGURE 2. Glucocerebrosidase enzymatic activity of the proteins resulting from mutant alleles expressed as the percentage of the wild-type activity (gray bars). Number of replicas for activity measurements is indicated in brackets. Specific activity (calculated using CRIM data) is also shown (white bars).

TABLE 3. Enzymatic Activity of the Mutant Proteins and Significance of the Differences in Pair-Wise Comparisons

N188S	N188S; E236K	E326K	N370S	I402T	D409H	L444P	E326K; L444P	pF	Alleles	n ^a	Activity ^b
P = 0.015	P = 0.003 P = 0.034	P = 0.003 P = 0.034 P = 0.021	P = 0.003 P = 0.011 P = 0.005 P = 0.005	P = 0.008 P = 0.050 P = 0.034 P = 0.021 NS ^c	P = 0.003 P = 0.034 P = 0.021 P = 0.021 NS NS	P = 0.003 P = 0.034 P = 0.021 P = 0.021 NS NS	P = 0.000 P = 0.020 P = 0.011 P = 0.011 NS NS P = 0.033	P = 0.000 P = 0.008 P = 0.003 P = 0.003 P = 0.000 P = 0.008 P = 0.003 P = 0.003 P = 0.000	WT N188S N188S; E326K E326K N370S I402T D409H L444P L444P; E326K	15 3 4 4 10 3 4 4 6	2144.0 ± 485.7 1427.7 ± 222.9 496.9 ± 85.7 915.4 ± 89.3 159.8 ± 34.2 129.8 ± 49.9 196.6 ± 53.8 301.9 ± 75.8 182.4 ± 91.9

Alleles showing no activity were not included.

^aNumber of replicas.

^bnmol/h/mg protein.

^cNS, not significant.

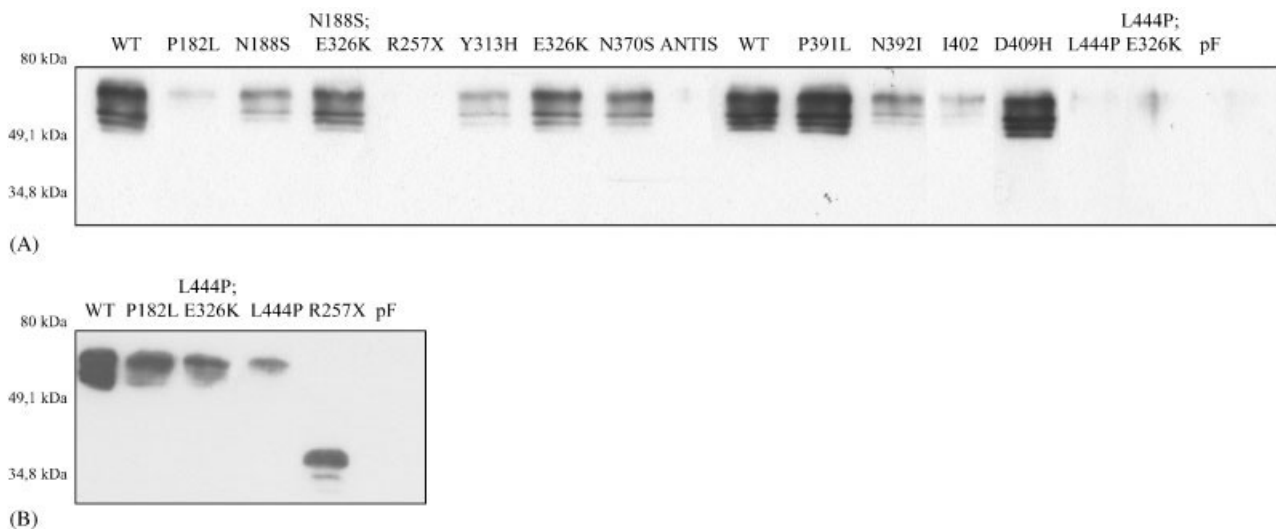


FIGURE 3. Western blotting of wild-type and mutant glucocerebrosidases expressed in the baculovirus system. **A:** Crude lysates containing 1 μ g of protein were analyzed by 10% SDS-PAGE, followed by immunoblotting using a polyclonal anti-glucocerebrosidase antibody. **B:** Crude lysates containing 10 μ g of protein, except for the wild-type (1 μ g), were analyzed as in (A).

and the wild-type and pF constructs. The activities of all mutant enzymes and the wild type differed significantly. The c.680A>G (p.N188S) mutant protein showed significantly higher residual activity than all other mutant glucocerebrosidases, followed by the allele bearing the c.1093G>A (p.E326K) change, which showed values significantly higher than all the rest. No significant differences were found between c.1226A>G (p.N370S), c.1322T>C (p.I402T), c.1342G>C (p.D409H), and [c.1448T>C; c.1093G>A] ([p.L444P; p.E326K]) mutants in all pair-wise comparisons. The c.1448T>C (p.L444P) allele significantly differed from the c.1226A>G (p.N370S) and c.1322T>C (p.I402T) mutant alleles, but not from the c.1342G>C (p.D409H) allele. The two double mutant alleles produced enzymes with significantly lower activities than each single allele.

Western Blot Analysis

To make sure that recombinant proteins were produced and to further characterize the mutant products, immunoblots of the normal and mutant proteins were performed. A multiband pattern was

detected using either monoclonal (data not shown) or polyclonal anti-human acid β -glucosidase (Fig. 3A). This pattern corresponds to the differently glycosylated forms of the enzyme. The amount of cross-reacting immunological material for the [c.680A>G; c.1093G>A] ([p.N188S; p.E326K]), c.1289C>T (p.P391L), and c.1342G>C (p.D409H) mutants was comparable to that found in cells expressing the wild-type cDNA, while c.680A>G (p.N188S), c.1054T>C (p.Y313H), c.1093G>A (p.E326K), c.1226A>G (p.N370S), c.1292A>T (p.N392I), and c.1322T>C (p.I402T) mutants showed reduced amounts of immunoreactive material. Very faint or no band pattern was visualized in Sf9 cells infected with c.662C>T (p.P182L), c.886C>T (p.R257X), c.1448T>C (p.L444P), and [c.1448T>C; c.1093G>A] ([p.L444P; p.E326K]) recombinant baculoviruses. However, detection was positive when higher amounts of proteins were loaded onto the gels (Fig. 3B). For the R257X protein, bands are consistent with the expected smaller size of the prematurely terminated polypeptide.

Activities for the different mutants were corrected using the relative CRIM values. These specific activities are shown in Figure 2 (white bars) and do not differ

significantly from uncorrected values (Fig. 2; gray bars). In particular, the values for the different mutant glucocerebrosidases with detectable activity, expressed as percentage of wild type, were: N188S, 90.5%; [N188S;E326K], 22.2%; E326K, 54.8%; N370S, 11.6%; I402T, 14.1%; and D409H, 9.3%. Mutants c.886C>T (p.R257X), c.1448T>C (p.L444P), and [c.1448T>C; c.1093G>A] ([p.L444P; p.E326K]), not detected in the Western blot of Figure 3A, were not included in this calculation.

DISCUSSION

The baculovirus expression system is a highly efficient method to produce high levels of recombinant enzyme [Grabowski et al., 1989; Grace et al., 1990, 1994, 1999; Choy et al., 1996; Amaral et al., 2000; Kim et al., 1996]. In particular, the Bac-to-Bac system used here, based on site-specific transposition in *E. coli* cells, allows the rapid selection of recombinant baculovirus. The wild-type allele expressed by this method showed seven-fold to 10-fold overexpression of fibroblast levels.

Several groups have expressed GBA mutant alleles using different systems. In Table 4, our results are compared with those of previous studies. It should be mentioned that enzymatic activity, not corrected by CRIM values, was used for these comparisons, because it has been reported that polyclonal antibodies do not recognize the different mutants equally well [Pasmanik-Chor et al., 1997]. However, in our study, no important differences were observed between corrected and uncorrected values for each mutant, except for c.680A>G (p.N188S), with a specific activity close to that of the wild type and for p.I402T (Fig. 2).

Mutations c.1226A>G (p.N370S) and c.1448T>C (p.L444P) were expressed by most of the groups and are useful for comparison studies. One surprising but repetitive result is that mutation c.1226A>G (p.N370S), always associated with a mild phenotype, shows low levels of activity when expressed in vitro. Previous expression data for this mutation can be grouped in three categories (Table 4): high levels of activity (18–24% of wild-type), intermediate levels (7–13%), and very low levels (below 5%). Our results (7.5% of wild-type levels) are close to those of Amaral et al. [2000] and Hodanova et al. [2003], within the intermediate group. The differences in results do not seem to be due to the method used, since a range of results were reported for the same method. It was suggested that the low activity of the N370S mutant enzyme may depend on the pH of the assay [Vanweely et al., 1993]. However, we tested the N370S enzyme activity at several pH values without finding significant differences in its maximal activity between pH 5.0 and 5.7. Activity of the N370S enzyme, measured in the absence of detergents, gave negligible results, similar to values found in insect cells transfected with the vector lacking any GBA cDNA. The wild-type protein had an optimal activity at pH 5.0. It should be noted that the

TABLE 4. Comparison of the Activity of Some Mutant Glucocerebrosidases Using Different Expression Systems

Alleles	This study	Amaral et al. [2000]	Grace et al. [1999]	Choy et al. [1996]	Kim et al. [1996]	Grace et al. [1994]	Grace et al. [1990]	Pasmanik-Chor et al. [1997]	Hodanova et al. [2003]	Torralba et al. [2001a]	Ohashi et al. [1991]
	Baculovirus/Sf9	Baculovirus/Sf9	Baculovirus/Sf9	Baculovirus/Sf9	Baculovirus/Sf9	Baculovirus/Sf9	Baculovirus/Sf9	Vaccinia virus/HeLa-CV1	Plasmid/fibroblasts	Plasmid/COS-1 cells	Plasmid/NIH 3T3 cells
P182L	0.2 ^a										
N188S	66.6										
N188S; E326K	23.2										
R257X	-0.4										
Y313H	-0.1										
E326K	42.7	60.9		23.4	13.0	11.4	4.9	12.3	9.3	26.0	4.5
N370S	7.5	23.4								17.8	
P391L	0.1									8.5	
N392I	-0.6										
I402T	6.1										
D409H	9.2							12.4	5.5		
L444P	14.1	2.7	3.9	3.3		2.0		18.1	5.4	3.0	
L444P; E326K	8.5	3.5									

^aActivities are expressed as percentage of that of wild type enzyme.

in vitro results are consistent with the activity (8.8% of wild-type) reported for the fibroblast levels of c.1226A>G (p.N370S) homozygous patients [Cormand et al., 1997]. The low activity of the N370S mutant enzyme does not seem to be explained by structural reasons, since it has recently been reported that the mutation is located at the interface of domains II and III of the protein, far from the active site [Dvir et al., 2003].

The other mutation expressed by most groups is c.1448T>C (p.L444P). Again, the results of L444P activity differ between the groups, ranging from 2.0 to 18.1% of wild-type activity (Table 4). We found 14.1% of wild-type, the second highest activity reported to date. Like Pasmanik-Chor et al. [1997], we found a lower activity for the mild phenotype-associated mutation c.1226A>G (p.N370S) than for mutation c.1448T>C (p.L444P), which is associated to neuronopathic cases when found in homozygosis. In spite of the low activity of both c.1226A>G (p.N370S) and c.1448T>C (p.L444P) mutations, other issues, such as stability, trafficking and in vivo intracellular activity, may explain the distinct pathogenic consequences of these two mutations [Grace et al., 1994; Pasmanik-Chor et al., 1997; Sawkar et al., 2002].

The third mutation relatively prevalent among Gaucher disease patients, particularly in our series, is c.1342G>C (p.D409H), which is linked to a particular phenotype involving cardiac calcifications, when presented in homozygosis [Abrahamov et al., 1995; Chabás et al., 1995]. It showed 9.2% activity of the wild-type, which is intermediate between the results obtained by Hodanova et al. [2003] and those of Pasmanik-Chor et al. [1997].

The rest of the single-mutation alleles (i.e., not including c.680A>G (p.N188S) and c.1093G>A (p.E326K), found in double mutant alleles, see below) correspond to six mutations described for the first time in our series of patients: c.662C>T (p.P182L), c.886C>T (p.R257X), c.1054T>C (p.Y313H), c.1289C>T (p.P391L), c.1292A>T (p.N392I), and c.1322T>C (p.I402T). Five of these mutant alleles—all but c.1322T>C (p.I402T)—showed no activity. The corresponding five proteins were detected by Western blotting, albeit with distinct intensities: P391L amounts were similar to those of the wild-type, while Y313H and N392I were less intense (Fig. 3A). On the other hand, P182L and R257X synthesis was very low, and the products were not detected (or only slightly) in the standard experiment conditions (when 1 µg of protein was loaded), but they were clearly observed at higher amounts of protein (Fig. 3B).

These five mutations were first described by our group and only c.1289C>T (p.P391L) was expressed by others [Torrallba et al., 2001a]. In that study, using a different expression system, relatively high levels of activity were obtained (see Table 4). The c.662C>T (p. P182L) mutation has recently been identified in a Spanish patient (unpublished results). The lack of activity of mutant R257X glucocerebrosidase was expected, since it produces a truncated protein of about 35 kDa, as

confirmed by Western blotting (Fig. 3B). Mutation c.1054T>C (p. Y313H) has been reported to disrupt a predicted β-sheet [Cormand et al., 1996]. The existence of this β-sheet was confirmed by the recent structural analysis of acid-β-glucosidase [Dvir et al., 2003] and was named β6. These authors suggest that the 313Y residue is specifically involved in substrate recognition. These findings are consistent with our results, which show a relatively high level of immunoreactive material but no activity for the Y313H mutated protein. Finally, the lack of activity of mutation c.1292A>T (p.N392I) is consistent with the phenotype of the only patient described with this mutation: this individual (II.5) was a type II patient, which implies that the two alleles bear a severe mutation. In this case, the other mutation was c.1448T>C (p. L444P) (see Table 1).

The sixth mutation, c.1322T>C (p. I402T), showed slight activity (Table 4). It causes type I disease when found in homozygosis. Although at first sight a mutation associated to a nonneuronopathic phenotype is expected to show higher activity, this case is similar to that of mutation c.1226A>G (p.N370S) discussed above: we found no significant differences between the activities of mutant N370S and I402T enzyme forms (Table 3). It should be mentioned, however, that the level of activity of the mutant enzyme tested by this in vitro analysis is lower than that found in the patient fibroblasts (see Table 1).

The two last genetic changes to be commented are c.680A>G (p. N188S) and c.1093G>A (p.E326K). The latter has never been found alone in a Gaucher disease-causing allele. We had described a patient with the genotype [c.1342G>C]+[c.1093G>A] ([p.D409H]+[p.E326K]) [Chabás et al., 1996], but further analyses showed that the genotype of this patient was [c.1342G>C]+[c.680A>G; c.1093G>A] ([p.D409H]+[p.N188S; p.E326K]) (Table 1). A similar mistake (and correction) was made by Torralba et al. [2001a,b]. Several authors have suggested that c.1093G>A (p.E326K) is a polymorphism [Grace et al., 1999; Park et al., 2002], based on the fact that it has never been found alone in patients and on its presence in chromosomes from control individuals. Moreover, Zhao et al. [2003] have recently shown that it is probably a nonpathogenic change, by reporting a healthy individual with the following genotype: [c.721G>A]+[c.1093G>A] ([p.G202R]+[p.E326K]). Consistently, the activity level of c.1093G>A (p.E326K) found in this study (42.7% of wild-type) and elsewhere (26.0 and 60.9%), using different in vitro expression systems, is quite high (Table 4). However, our results may question the hypothesis that c.1093G>A (p.E326K) is a neutral polymorphism. We found that enzymes resulting from two double mutants bearing c.1093G>A (p.E326K) showed significantly lower activity than those resulting from alleles carrying the other change alone (Table 3). In particular, the N188S enzyme showed an activity of 66.6% of the wild type (90.5% if specific activity is considered), which decreased to 23.2% in the [p.N188S; p.E326K] double mutant enzyme. Similarly, the activity

574 MONTFORT ET AL.

of the enzyme from the c.1448T>C (p.L444P) allele, which was 14.1%, decreased to 8.5% in the [p.L444P; p.E326K] double mutant enzyme (Fig. 2).

It is tempting to suggest that mutation c.680A>G (p.N188S) is similar to mutation c.1093G>A (p.E326K), as the double mutant [c.680A>G (p.N188S); c.1093G>A (p.E326K)] had a significant lower activity than c.1093G>A (p.E326K) alone (Table 3). We found the c.680A>G (p.N188S) change only as a double mutant allele (patient I.22, Table 1). Torralba et al. [2001a,b] also described two patients bearing the double mutant [c.680A>G (p.N188S); c.1093G>A (p.E326K)], which makes a total of three Spanish patients with this double mutant allele. However, some reports suggest that the c.680A>G (p.N188S) mutation is a disease-causing mutation associated with a mild phenotype [Kim et al., 1996; Choy et al., 1997]. It must be noted that one of these patients, homozygous for c.680A>G (p.N188S), was described as asymptomatic with mild hepatosplenomegaly [Kim et al., 1996].

In conclusion, the expression analysis presented here shows that six new changes, found in samples from Gaucher disease patients, are undoubtedly disease-causing mutations. Our data also suggest that the c.1093G>A (p.E326K) change, described as a neutral polymorphism, has some effect, since its presence, together with another change, decreases the activity of the latter. We suggest a new type of mutation with a very mild effect, which would include c.1093G>A (p.E326K) and, perhaps, c.680A>G (p.N188S). These changes may be regarded as "modifier variants," which may be nonpathogenic, or slightly pathogenic, on their own, but have an additive effect, making a pathogenic double mutant.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. H. Aerts and Dr. G. Grabowski for providing the antibodies, Drs. B. Cormand (Universitat de Barcelona) and L. Gort (Institut de Bioquímica Clínica) for assistance and helpful suggestions, H. Sellés (Institut de Bioquímica Clínica) for technical assistance and R. Rycroft (Universitat de Barcelona) for revising the English.

REFERENCES

- Abrahamov A, Elstein D, Grosstur V, Farber B, Glaser Y, Hadashalpern I, Ronen S, Tafakjdi M, Horowitz M, Zimran A. 1995. Gaucher's disease variant characterised by progressive calcification of heart valves and unique genotype. *Lancet* 346:1000-1003.
- Amaral O, Marcao A, Miranda M, Desnick RJ, Grace ME. 2000. Gaucher disease: expression and characterization of mild and severe acid beta-glucosidase mutations in Portuguese type 1 patients. *Eur J Hum Genet* 8:95-102.
- Beutler E, Demina A, Gelbart T. 1994. Glucocerebrosidase mutations in Gaucher disease. *Mol Med* 1:82-92.
- Beutler E, Grabowski GA. 2001. Gaucher disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill. p 3635-3668.
- Chabás A, Cormand B, Grinberg D, Burguera JM, Balcells S, Merino JL, Mate I, Sobrino JA, Gonzalez-Duarte R, Vilageliu L. 1995. Unusual expression of Gaucher's disease: cardiovascular calcifications in three sibs homozygous for the D409H mutation. *J Med Genet* 32:740-742.
- Chabás A, Cormand B, Balcells S, Gonzalez-Duarte R, Casanova C, Colomer J, Vilageliu L, Grinberg D. 1996. Neuronopathic and non-neuronopathic presentation of Gaucher disease in patients with the third most common mutation (D409H) in Spain. *J Inher Metab Dis* 19:798-800.
- Choy F, Humphries ML, Shi HP. 1997. Identification of two novel and four uncommon missense mutations among Chinese Gaucher disease patients. *Am J Med Genet* 71:172-178.
- Choy FYM, Wei C, Levin D. 1996. Gaucher disease: functional expression of the normal glucocerebrosidase and Gaucher T1366G and G1604A alleles in *Baculovirus*-transfected *Spodoptera frugiperda* cells. *Am J Med Genet* 65:184-189.
- Cormand B, Vilageliu L, Balcells S, Gonzalez-Duarte R, Chabás A, Grinberg D. 1996. Two novel (1098insA and Y313H) and one rare (R359Q) mutations detected in exon 8 of the beta-glucocerebrosidase gene in Gaucher's disease patients. *Hum Mutat* 7:272-274.
- Cormand B, Grinberg D, Gort L, Fiumara A, Barone R, Vilageliu L, Chabás A. 1997. Two new mild homozygous mutations in Gaucher disease patients: clinical signs and biochemical analyses. *Am J Med Genet* 70:437-443.
- Cormand B, Grinberg D, Gort L, Chabás A, Vilageliu L. 1998. Molecular analysis and clinical findings in the Spanish Gaucher disease population: putative haplotype of the N370S ancestral chromosome. *Hum Mutat* 11:295-305.
- Cox TM. 2001. Gaucher disease: understanding the molecular pathogenesis of sphingolipidoses. *J Inher Metab Dis* 24(suppl2):106-121.
- Dvir H, Harel M, McCarthy AA, Toker L, Silman I, Futerman AH, Sussman JL. 2003. X-ray structure of human acid-beta-glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. *EMBO Rep* 4:704-709.
- Grabowski GA, White WR, Grace ME. 1989. Expression of functional human acid beta-glucosidase in COS-1 and *Spodoptera frugiperda* cells. *Enzyme* 41:131-142.
- Grace ME, Graves PN, Smith FI, Grabowski GA. 1990. Analyses of catalytic activity and inhibitor binding of human acid beta-glucosidase by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 265:6827-6835.
- Grace ME, Newman KM, Scheinker V, Berg-Fussman A, Grabowski GA. 1994. Analysis of human acid beta-glucosidase by site-directed mutagenesis and heterologous expression. *J Biol Chem* 269:2283-2291.
- Grace ME, Ashton PP, Pastores GM, Soni A, Desnick RJ. 1999. Non-pseudogene-derived complex acid beta-glucosidase mutations causing mild type 1 and severe type 2 Gaucher disease. *J Clin Invest* 103:817-823.
- Hodanova K, Melkova Z, Horowitz M, Hrebicek M. 2003. Transient expression of wild-type and mutant glucocerebrosidases in hybrid vaccinia expression system. *Eur J Hum Genet* 11:369-374.
- Kim JW, Liou BB, Lai MY, Ponce E, Grabowski GA. 1996. Gaucher disease: identification of three new mutations in the Korean and Chinese (Taiwanese) populations. *Hum Mutat* 7:214-218.

- Ohashi T, Hong CM, Weiler S, Tomich JM, Aerts JM, Tager JM, Barranger JA. 1991. Characterization of human glucocerebrosidase from different mutant alleles. *J Biol Chem* 266: 3661–3667.
- Park JK, Tayebi N, Stubblefield BK, LaMarca ME, MacKenzie JJ, Stone DL, Sidransky E. 2002. The E326K mutation and Gaucher disease: mutation or polymorphism? *Clin Genet* 61:32–34.
- Pasmanik-Chor M, Madarshapiro L, Stein OE, Aerts H, Gatt S, Horowitz M. 1997. Expression of mutated glucocerebrosidase alleles in human cells. *Hum Mol Genet* 6:887–895.
- Sawkar AR, Cheng WC, Beutler E, Wong CH, Balch WE, Kelly JW. 2002. Chemical chaperones increase the cellular activity of N370S beta-glucosidase: a therapeutic strategy for Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:15428–15433.
- Stenson PD, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NST, Abeyasinghe S, Krawczak M, Cooper DN. 2003. Human gene mutation database (HGMD (R)): 2003 update. *Hum Mutat* 21:577–581.
- Theophilus B, Latham T, Grabowski GA, Smith FI. 1989. Gaucher disease: molecular heterogeneity and phenotype-genotype correlations. *Am J Hum Genet* 45:212–225.
- Torralba MA, Perez Calvo JI, Pastores GM, Cenarro A, Giraldo P, Pocovi M. 2001a. Identification and characterization of a novel mutation c.1090G>T (G325W) and nine common mutant alleles leading to Gaucher disease in Spanish. *Blood Cells Mol Dis* 27:489–495.
- Torralba MA, Perez Calvo JI, Pastores GM, Cenarro A, Giraldo P, Pocovi M. 2001b. Erratum. Identification and characterization of a novel mutation c.1090G>T (G325W) and nine common mutant alleles leading to Gaucher disease in Spanish. *Blood Cells Mol Dis* 27:713.
- Vanweely S, Vandenberg M, Barranger JA, Miranda MCS, Tager JM, Aerts JMFG. 1993. Role of pH in determining the cell-type-specific residual activity of glucocerebrosidase in type-1 Gaucher disease. *J Clin Invest* 91:1167–1175.
- Zhao H, Grabowski GA. 2002. Gaucher disease: perspectives on a prototype lysosomal disease. *Cell Mol Life Sci* 59: 694–707.
- Zhao H, Keddache M, Bailey L, Arnold GI, Grabowski G. 2003. Gaucher's disease: identification of novel mutant alleles and genotype-phenotype relationships. *Clin Genet* 64: 57–64.

CAPÍTOL 6:

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.

(Manuscrit en preparació)

Moltes de les mutacions descrites en el gen *GBA* com a responsables de la malaltia de Gaucher són mutacions de canvi d'aminoàcid. Malgrat això, altres alteracions, com mutacions sense sentit o de canvi de la pauta de lectura també han estat identificades. Aquestes, provoquen la creació de codons d'aturada prematurs (PTCs) que poden empènyer a la degradació del missatger mitjançant un mecanisme anomenat *nonsense mediated mRNA-decay* (NMD).

En el present treball s'ha avaluat l'existència d'aquest procés sobre quatre transcrits diferents portadors de les següents mutacions: W(-4)X, R257X, c.1098insA i c.1451delAC.

Amb l'ús de diferents tècniques (RT-PCR i digestió; PCR quantitativa; i, el test de la proteïna truncada) hem pogut demostrar i quantificar l'efecte del procés d'NMD sobre dues d'aquestes mutacions, la R257X i la c.1098insA.

Els transcrits que contenen la mutació W(-4)X s'ha comprovat que també són degradats, però no hi ha recuperació al tractar les mostres amb un inhibidor de la síntesi de proteïnes, la cicloheximida. Creiem, per tant, que el mecanisme implicat en la degradació d'aquest al·lel és diferent de l'NMD.

Per l'al·lel c.1451delAC, no existeix cap diferència entre els nivells del transcrit i els de la mostra control. Aquesta mutació provoca un canvi de la pauta de lectura i la creació d'un codó d'aturada en el darrer exó, el qual no és reconegut com a prematur pel mecanisme d'NMD.

Analysis of the decrease in the mRNA levels of mutant acid β -glucosidase transcripts carrying protein truncation codons.

Magda Montfort,¹ Amparo Chabás,² Lluisa Vilageliu¹ and Daniel Grinberg¹.

¹*Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Spain*

²*Institut de Bioquímica Clínica, Hospital Clínic, Corporació Sanitària Clínic, Barcelona, Spain*

Keywords: Gaucher disease, *GBA* mutations, nonsense-mediated decay, p.N370S, PTT, real-time quantitative PCR,

Abstract

Most of the mutations described in the *GBA* gene as responsible for Gaucher disease are missense mutations. Nevertheless, other alterations, including nonsense and frameshift mutations, have been reported. These mutations generate premature termination codons (PTCs) that could trigger the degradation of the mRNA by a mechanism known as nonsense mediated decay (NMD). It has been established that NMD requires the presence of at least one intron downstream of the PTC and that this PTC should be at a minimal distance of 50-55 nucleotides upstream of the 3'-most exon-exon junction. In this study, we analyze four *GBA* truncating mutations, p.W(-4)X, p.R257X, c.1098insA and c.1451delAC, in order to know whether they suffer mRNA decay and if the NMD pathway is responsible for this decay.

These mutations are present in four Spanish Gaucher disease patients in heterozygosis with the common p.N370S allele. Samples from a patient homozygous for this mutation, a healthy p.N370S carrier, and a wild-type individual were also studied for comparison.

RT-PCR and *Xho*I digestion analyses showed a clear reduction of RNA for three of the alleles, p.W(-4)X, p.R257X and c.1098insA, when compared with the p.N370S allele. After treatment with cycloheximide (CHX), a known inhibitor of protein synthesis and of NMD, two of the mutant alleles, p.R257X and c.1098insA, showed a partial

recovery of the amount of mRNA. The third mutation, p.W(-4)X, did not show any significant CHX-induced recovery, while allele c.1451delAC did not show mRNA decay at all. Real-time PCR confirmed these results and allowed the quantification of the decay and recovery. Finally, the protein truncation test was performed to detect the corresponding proteins. Expected products for alleles p.R257X, c.1451delAC and c.1098insA, but no for p.W(-4)X, were observed.

In summary, we were able to show the existence of NMD for two *GBA* truncated mutations. Another mutation, p.W(-4)X, presented mRNA decay but the lack of recovery with CHX suggests that a different mechanism might be acting. Finally, mutation c.1451delAC showed no decay. This is consistent with the fact that, although the mutation is in exon 10, the PTC generated by this frameshift lies in exon 11, the last exon of the *GBA* gene.

Introduction

Mutations in the acid β -glucosidase (*GBA*) gene are responsible for an autosomal recessive lysosomal disorder, named Gaucher disease (GD, MIM# 230800, 230900, 231000). Over 200 different changes have been found worldwide in the *GBA* gene (<http://www.hgmd.org>; (Stenson i col., 2003)), more than 25 of them were in Spanish patients (Cormand i col., 1998). The human acid β -glucosidase gene is located on chromosome 1q21, it spans approximately 7 kb and it is split

in 11 exons. Translation starts at two alternative ATGs to produce a final product of 536 aa (when the first ATG is used). The mature protein is 497-aa long, after proteolytic cleavage of a signal peptide of 39 aa (19 aa if the second ATG is used).

Three clinical types have been described based on the absence (type I) or the presence and progression (type II and III) of neurological involvement. Patients from all types may present moderate to extensive visceral involvement including hepatosplenomegaly, anemia, thrombocytopenia, and skeletal involvement, with significant clinical heterogeneity. There are few clear correlations between mutations in acid β -glucosidase gene and overall severity of GD (Theophilus et al., 1989; Beutler et al., 1992; Horowitz and Zimran, 1994). One of them is the well-known association between the most common mutation causing GD, p.N370S, and the clinical type 1.

Most of the mutations described in the *GBA* gene correspond to missense mutations. Nevertheless, other alterations, including nonsense and frameshift mutations, have been reported. These mutations generate premature termination codons (PTCs) that may cause the degradation of the mRNA by a post-transcriptional mechanism called nonsense-mediated mRNA decay (NMD).

NMD is considered as a quality control-based surveillance pathway that prevents the expansion of deleterious truncated polypeptides (Maquat, 2002). These polypeptides can be originated either from

normal genes that generate PTC-bearing mRNAs due to errors in RNA splicing or transcription or from mutated genes containing either nonsense or frameshift mutations. They can also be introduced in the generation of unproductive DNA rearrangements in immune system. It has been shown that the requirement for a PTC to trigger NMD is that it should lie at more than 50-55 nucleotides upstream of the 3'-most exon-exon junction (Cheng et al., 1994; Zhang et al., 1998; Nagy and Maquat, 1998; Maquat, 2002). The translation inhibitor cycloheximide (CHX) is known to suppress NMD (Carter et al., 1995) and, thus, it is used as a probe of the NMD pathway involvement.

It is estimated that one-third of inherited genetic disorders, including lysosomal diseases, and many forms of cancer are caused by the presence of PTCs that are eliminated by this mechanism (reviewed in (Frischmeyer and Dietz, 1999)). Reductions in the levels of mutant mRNA transcripts have been shown to be associated with PTC mutations in the *fibrillin* (Schrijver et al., 2002), β -*globin* (Neu-Yilik et al., 2001), *COL1A1* (Redford-Badwal et al., 1996), *HEXA* (Rajavel and Neufeld, 2001) and *BRCA1* genes (Perrin-Vidoz et al., 2002). This quality control resulted in the reduction in the steady-state mRNA levels and, in some cases, the completed degradation of the mutant mRNA. Interestingly, in the dominant Marfan syndrome, it was demonstrated that the elimination by NMD of a truncated transcript results in a mild phenotypic course (Frischmeyer and Dietz, 1999). However, in some cases, the NMD pathway eliminates any

chance of production even a small amount of functional product, and this can accentuate the severity of the clinical manifestations (Culbertson, 2001).

In order to determine whether the presence of PTCs may influence *GBA* mRNA stability and, indirectly, the phenotypic manifestations, we assayed some cDNAs bearing nonsense or frameshift mutations described in Spanish patients. Specifically, we have analyzed mutations p.W(-4)X, p.R257X, c.1098insA and c.1451delAC, using RT-and real-time PCR and the protein truncation test. Three of these mutant alleles showed diminished RNA levels and in two of them, p.R257X and c.1098insA, this decay seemed to occur through the NMD pathway.

Materials and Methods

Patients

Wild-type (WT/WT), heterozygous I.23p (p.N370S/WT) and GD fibroblasts from patients I.2 (p.N370S/p.N370S), I.5 (p.N370S/c.1451delAC), I.11 (p.N370S/c.1098insA), I.28 (p.N370S/p.W(-4)X) and I.41 (p.N370S/p.R257X) were analyzed. The mutations analysis of these patients was previously carried out, and their clinical signs were also described (see Table 1).

Cell culture

Fibroblasts from WT, heterozygous and patients were cultured in monolayer under 5% CO₂ in T75 flasks with DMEM medium (Invitrogen, Paisley, Scotland, UK) containing

10% fetal bovine serum and penicillin and streptomycin.

Inhibition of NMD

To determine whether any observed reductions for mutant transcript were due to NMD, cells were dividing into two cultures. One subculture was treated with cycloheximide (Sigma, Poole, U.K.) dissolved in medium at a concentration of 500 µg/ml. After the incubation, all culture fibroblasts were washed twice with phosphate-buffered saline and harvested by centrifugation at different times (2, 4, 6 and 8 hr) to set up optimal conditions for the cycloheximide recovery of NMD. The 8-hour treatment showed the highest levels of RNA (Fig.1A). Thus, this incubation time was used for fibroblast cultures from the different patients.

RNA extraction and cDNA amplification

Total RNA was isolated from all patient and control fibroblasts and single-stranded cDNAs was synthesized on 400 ng RNA using an oligo-dT primer, as described by Montfort et al., (2004).

p.N370S allele detection

The p.N370S mutation was detected by “mismatched PCR” using a 5'-primer mismatched at one nucleotide (see Table 2A) in order to create an *Xho*I restriction site when the mutation was present (Beutler i col., 1990). Digested PCR products have been subjected to electrophoresis on a 12% polyacrylamide gel electrophoresis.

Real-time Quantitative PCR

The sequence of the PCR primers and probe are listed in Table 2B. The assay includes unlabeled forward and reverse primers. Forward primer discriminates between allele 1 (carrying wild-type, nonsense or frameshift mutation) and allele 2 (carrying p.N370S mutation). It only allows amplification of allele 1 cDNA sequences because forward primer is complementary to the end of exon 8 and to the start of exon 9. Reverse primer and probe have gene-specific sequence, because they are complementary to a region that is deleted in the pseudogene. This region corresponds to the 55-pb deletion of the exon 9 on the pseudogene. Therefore, the reverse primer prevents its amplification.

Transcript levels were normalized to the reference standard GAPDH. The primers and probe to amplify and detect GAPDH are from TaqMan GAPDH Control Reagents Kit (Applied Biosystems).

The TaqMan probe complementary to the *GBA* cDNA were 5'-labelled with the reporter fluorescent dye FAM (6-carboxy-fluorescein) and it carries the quencher dye TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine), attached to a linker-arm modified nucleotide near the 3' end. A 3' phosphate blocked probe extension during PCR.

PCR amplification and detection were performed using the ABI Prism[®] 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) using a final volume of 20 μ l. All PCR reactions have run in five replicates, and contained 2 μ l of samples cDNA, 10 μ l of

TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) including the passive reference ROX, 100 nM specific forward primer(s), 100 nM specific reverse primer and 200 nM specific probe. Appropriated negative controls have also run. The PCR reactions was performed using the following conditions: 50°C for 5 minutes, 95°C for 10 minutes, and 40 cycles of amplification (95°C denaturation for 30 seconds, 65°C annealing/extension for 40 seconds). The annealing/extension temperature was empirically determinates to achieve specific discrimination between the amplification of allele 1 and 2.

The amplification of the GAPDH was made in separate tubs using the following conditions: 50°C for 5 minutes, 95°C for 10 minutes, and 40 cycles of amplification (95°C denaturalization for 15 seconds, 60°C annealing/extension for 1 minute).

Relative quantification of allele 1

Relative significance of difference in RNA abundance for the transcripts was assessed by evaluating threshold cycle (C_T) values, according to the "relative standard curve" method (ABI Prism 7700 Manual, available from <http://www.appliedbiosystems.com>). GAPDH amplification was used to normalize the reactions.

Statistical Analysis

The U de Mann-Whitney test was used to analyze significant differences between the pairs of mutant alleles with and without CHX

treatment. Statistical analysis was performed using the SPSS package (SSPS, Chicago, IL).

Protein truncation test

To amplify the total cDNA we used primers listed in Table 2C. Forward primer contains a T7 promoter (GCTAATACGACTCACTATAGGAACAGACCACC) and has gene-specific sequence. The PCR conditions were 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 63°C for 30 s and extension at 68°C for 2 min using Expand High Fidelity PCR System (Roche, Mannheim, Germany). PTT analysis was performed using the TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega, Madison, WI) and [³⁵S] methionine. Translation products were analyzed on 10% SDS-polyacrilamide gels. Each gel was fixed and then treated with Amplify (Amersham Pharmacia Biotech). The gels were dried and the radioactively labeled proteins were detected by autoradiography. Densitometric analysis was performed using the UVIDocMw software, version 99.03 (UVITEC, UK).

Plasmid construction

The wild-type cDNA was cloned as described (Montfort et al., 2004) and the nucleotide sequence was verified by DNA sequencing. p.R257X mutant cDNA were generated by site-directed mutagenesis using the QuickChange[™] Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA) according to the manufacturer instructions. All products were

sequenced to verify that no spurious mutations were incorporated.

Results and Discussion

Mutations p.W(-4)X, p.R257X, c.1098insA and c.1451delAC are rare mutations found in our series of Spanish patients. All four mRNAs bear PTCs as a consequence either of a nonsense or a frameshift mutation. To determine whether these mutations are subject to NMD, we analyzed the patients mRNA levels by RT-PCR.

The four patients were compound heterozygous for nonsense or a frameshift mutation and the common missense mutation p.N370S (Table 1). Clinical signs of these patients and of patient I.2, homozygous for the p.N370S mutation, are indicated. Figure 1B shows NMD analysis for patients I.5, I.11, I.28 and I.41. Control samples I.2 (homozygous for the p.N370S mutation), I.23p (p.N370S mutation carrier) and WT (healthy individual) were also processed for comparison. The p.N370S allele was identified by RT-PCR and *Xho*I digestion and used for comparisons. The PCR products from patients I.11, I.28 and I.41 (lanes -) showed a clear reduction in the intensity of the upper band, which corresponds to the mRNA transcripts bearing mutations p.W(-4)X, p.R257X and c.1098insA, respectively. No decay was observed for the c.1451delAC allele (patient I.5).

Cycloheximide treatment, a known inhibitor of nonsense mRNA-decay (NMD)

pathway, was used to evaluate NMD involvement in the RNA reduction (lanes +). After 8h of CHX treatment (optimal conditions, see Fig. 1A), RNA levels for two of these alleles, p.R257X (patient I.41) and c.1098insA (patient I.11), showed a considerable recovery while for p.W(-4)X (patient I.28), no recovery was observed.

We further quantified the amount allele 1 at the mRNA level from each patient by real-time PCR. Figure 2A shows relative C_T levels of non-N370S allele mRNA. The wild type sample (two non-N370S alleles) at 0h and 8h were set as the reference values (1.0). The sample from the healthy individual I.23p (carrier of the p.N370S mutation) without CHX treatment shows half of the wild type level as expected. A similar result was observed for that of patient I.5 (p.N370S/c.1451delAC). For these two samples CHX treatment had no effect on mRNA values (see 0h vs 8h). Samples from patients I.11, I.28 and I.41 showed a clear reduction of the mRNA levels. Results for these samples are shown in detail in Figure 2B. Allele p.1098insA from patient I.11 and allele p.R275X from patient I.41 showed very low RNA levels when untreated (0h) and a significant ($P=0.008$) recovery after 8h CHX treatment. On the contrary, the p.W(-4)X allele from patient I.28 which presented a slightly higher RNA level when untreated, showed no recovery after CHX treatment ($P=0.841$).

To confirm that the truncated proteins were actually produced and to study the NMD at the protein level we performed a protein

truncation test. The location of the mutations, the PTCs and the expected sizes of the products of the different mutant alleles are depicted in Figure 3. The mutant p.R257X protein is clearly detected only after CHX treatment when sample from patient I.41 is analyzed (Figure 4A). This shorter protein (295 aa) has the expected size as seen when compared with the product of the cloned mutant cDNA. The other sample showing NMD was that of patient I.11. The 454 aa protein, product of the c.1098insA allele is detected after CHX treatment (Fig. 4B) as a band of approximately 50 kDa. A band of a similar size, among other bands, is also observed in the non-CHX lane. However, the relative intensity (compared to wt) of the truncated proteins is clearly higher after CHX treatment (Figure 4C). Sample I.5 showed no decay (as it was observed at the RNA level), and the 503-aa product is equally detected with or without CHX. Finally, the product of the p.W(-4)X mutant allele (patient I.28) is not detected in any case. It should be noted that no band corresponding to the putative 34-aa or 15-aa truncated signal peptide (depending the ATG used) was detected in the gel.

In summary, we were able to detect RNA decay, when present, by RT-PCR. The NMD pathway was demonstrated by RNA level recovery under CHX treatment. The decay and recovery were quantified by real time PCR. These processes were confirm at the protein level by the protein truncation test.

Mutations c.1098insA (I. 11) and p.R257X (I.41) showed RNA decay due to

NMD as expected, since for c.1098insA, the mutation lies in exon 8 and generates a PTC in exon 9 and for p.R257X, the PTC lies in exon 7. These two PTCs fulfilled the requirements for NMD (i.e. they lie more than 50 nucleotides 5' to the last exon-exon junction). On the other hand, mutation c.1451del AC (I.5) showed no decay. This was also expected as, although the mutation lies in exon 10, the PTC generated is in the last exon (exon 11). Finally, mutation W(-4)X (I.28) showed RNA decay but not recovery by CHX. It was shown that PTCs that lie very close to the N-terminus of the protein escape NMD because there is a reinitiation of transcription from the following ATG [Kozak, Nucl Acid Res 29: 5226, 5232, 2001]; (Zhang i Maquat, 1997); (Perrin-Vidoz et al., 2002). However, for reinitiation, the next ATG should be relatively close to the PTC and in the present case, the next ATG is 52 codons downstream of the PTC what is supposed to be too far away. Moreover, we detect RNA decay although no CHX recovery. Thus, we should hypothesize that a PTC very close to the initiation codon trigger RNA decay by a mechanism different from NMD.

References

- Beutler E, Gelbart T, West C.** (1990) The facile detection of the nt 1226 mutation of glucocerebrosidase by "mismatched" PCR. *Clin Chim Acta* **194**: 161-166.
- Beutler E, Gelbart T, Kuhl W, Zimran A, West C.** (1992) Mutations in Jewish patients with Gaucher disease. *Blood* **79**: 1662-1666.
- Carter MS, Doskow J, Morris P, Li SL, Nhim RP, Sandstedt S, Wilkinson MF.** (1995) A Regulatory Mechanism That Detects Premature Nonsense Codons in T-Cell Receptor Transcripts in-Vivo Is Reversed by Protein-Synthesis Inhibitors in-Vitro. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 28995-29003.
- Cheng J, Belgrader P, Zhou XB, Maquat LE.** (1994) Introns Are Cis Effectors of the Nonsense-Codon-Mediated Reduction in Nuclear Messenger-Rna Abundance. *Molecular and Cellular Biology* **14**: 6317-6325.
- Cormand B, Vilageliu L, Burguera JM, Balcells S, Gonzalezduarte R, Grinberg D, Chabás A.** (1995) Gaucher disease in Spanish patients: Analysis of eight mutations. *Hum Mutat*, **5**: 303-309.
- Cormand B, Vilageliu L, Balcells S, Gonzalezduarte R, Chabás A, Grinberg D.** (1996) Two novel (1098insA and Y313H) and one rare (R359Q) mutations detected in exon 8 of the beta- glucocerebrosidase gene in Gaucher's disease patients. *Hum Mutat*, **7**: 272-274.
- Cormand B, Grinberg D, Gort L, Chabás A, Vilageliu L.** (1998) Molecular analysis and clinical findings in the Spanish Gaucher disease population: putative haplotype of the N370S ancestral chromosome. *Hum Mutat* **11**: 295-305.
- Culbertson MR.** (2001) Sense versus nonsense in DNA diagnostics. *Nature Biotechnology* **19**: 413-414.

- Frischmeyer PA, Dietz HC.** (1999) Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Human Molecular Genetics* **8**: 1893-1900.
- Horowitz M, Zimran A.** (1994) Mutations causing Gaucher disease. *Hum Mut* **3**: 1-11.
- Maquat LE.** (2002) Nonsense-mediated mRNA decay. *Current Biology* **12**: R196-R197.
- Montfort M, Chabás A, Vilageliu L, Grinberg D.** (2004) Functional Analysis of 13 GBA Mutant Alleles Identified in Gaucher Disease Patients: Pathogenic Changes and 'Modifier' Polymorphisms. *Human Mutation* **23**:567-575.
- Nagy E, Maquat LE.** (1998) A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends in Biochemical Sciences* **23**: 198-199.
- Neu-Yilik G, Gehring N, Thermann R, Frede U, Hentze MW, Kulozik AE.** (2001) Splicing and 3' end formation in the definition of nonsense-mediated decay-competent human beta-globin mRNPs. *Embo Journal* **20**: 532-540.
- Perrin-Vidoz L, Sinilnikova OM, Stoppa-Lyonnet D, Lenoir GM, Mazoyer S.** (2002) The nonsense-mediated mRNA decay pathway triggers degradation of most BRCA1 mRNAs bearing premature termination codons. *Human Molecular Genetics* **11**: 2805-2814.
- Rajavel KS, Neufeld EF.** (2001) Nonsense-mediated decay of human HEXA mRNA. *Molecular and Cellular Biology* **21**: 5512-5519.
- RedfordBadwal DA, Stover ML, Valli M, McKinstry MB, Rowe DW.** (1996) Nuclear retention of COL1A1 messenger RNA identifies null alleles causing mild osteogenesis imperfecta. *Journal of Clinical Investigation* **97**: 1035-1040.
- Schrijver I, Liu WG, Odom R, Brenn T, Oefner P, Furthmayr H, Francke U.** (2002) Premature termination mutations in FBN1: Distinct effects on differential allelic expression and on protein and clinical phenotypes. *American Journal of Human Genetics* **71**: 223-237.
- Stenson PD, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NST, Abeyasinghe S, et al.** (2003) Human gene mutation database (HGMD (R)): 2003 update. *Human Mutation* **21**: 577-581.
- Theophilus B, Latham T, Grabowski GA, Smith FI.** (1989) Gaucher disease: Molecular heterogeneity and phenotype-genotype correlations. *Am J Hum Genet* **45**: 212-225.
- Zhang J, Maquat LE.** (1997) Evidence that translation reinitiation abrogates nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells. *Embo Journal* **16**: 826-833.
- Zhang J, Sun XL, Qian YM, Maquat LE.** (1998) Intron function in the nonsense-mediated decay of beta-globin mRNA: Indications that pre-mRNA splicing in the nucleus can influence mRNA translation in the cytoplasm. *Rna-a Publication of the Rna Society* **4**: 801-815.

Tables

Table 1: Genotypes, clinical features of the patients

Patients	Genotype	Age ¹	ERT	Clinical signs	Reference
I.2	p.N370S/p.N370S	27/29		Splenomegaly, fatigue, easy bruising	Cormand et al 1995
I.5	p.N370S/c.1451delAC	15/16	Yes	Splenomegaly, thrombocytopenia, anemia, bone pain	Cormand et al 1995
I.11	p.N370S/c.1098insA	3/9		Splenomegaly, hepatomegaly, leucopenia, splenectomy at 9 years	Cormand et al 1995
I.28	p.N370S/p.W(-4)X	4		Splenomegaly, hepatomegaly, mild pancytopenia, epistaxis, bone crisis, femur deformity, skin pigmentation	Cormand et al 1998
I.41	p.N370S/p.R257X	6		Splenomegaly, pancytopenia	Cormand et al 1998

¹At presentation/at evaluation through enzymatic diagnosis (years)

Table 2: PCR primers used in this study

Primers	Reference
A. p.N370S mutation detection	
Mismatch primer	F: 5'-TACAGCCACAGCATCATCTC-3'
9aR*	R: 5'-GATGGGACTGTCGACAAAGT-3'
B. Real-time Quantitative PCR	
1-F (p.N370S)	F: 5'-ACAGCCACAGCATCATCACGTG-3'
9aR*	R: 5'-GATGGGACTGTCGACAAAGT-3'
Probe*	5'-CCTCCTTCGGGGTTCAGGGCAAG-3'
C. Protein truncation test	
T7-GBA*	5'-GCTAATACGACTCACTATAGGAACAGACCACCTCATCTAACGACCCTGAGAG-3'
11-R	5'-CTCTTTAGTCACAGACAGCG-3'

*gene-specific primers

Figures

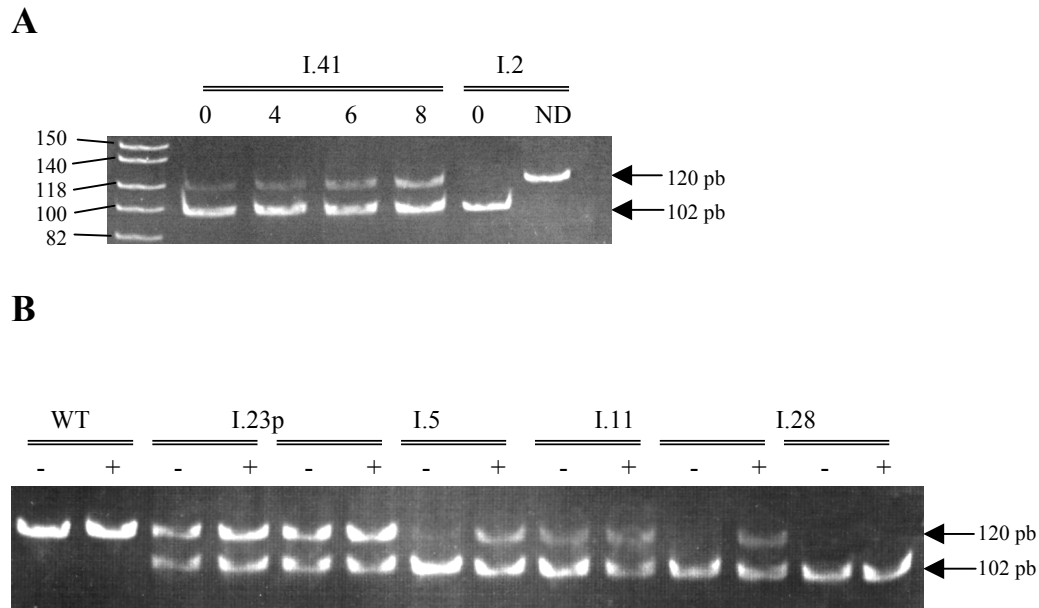


Figure 1: Prevention of NMD by translation inhibition in fibroblast cells of Gaucher disease patients bearing p.N370S mutation in one allele and a nonsense or frameshift mutation in the other allele. **(A)** *XhoI* digestion of PCR products amplified from fibroblasts of patient I.41 and homozygous control for allele 2. The hours of treatment with cycloheximide have been indicated (0, 4, 6 and 8). ND, non-digested product. Bands of 120 and 102 pb correspond to allele 1 and 2, respectively. **(B)** Fibroblast cultures treated during 8 hours (+), and non-treated (-) with medium containing cycloheximide were harvested, RNA extracted and cDNA amplified. *XhoI* digestions of heterozygous patients for allele 2 may produce three bands of 120, 102 and 18 pb. Only the two major bands are visible in the polyacrilamide gel. Digestions of patients I.11 and I.41 show one unique band (102 pb) or very light upper band. These results may correlate with the presence of homozygous patients for p.N370S mutation. However, treated samples demonstrate the existence of the two expected bands.

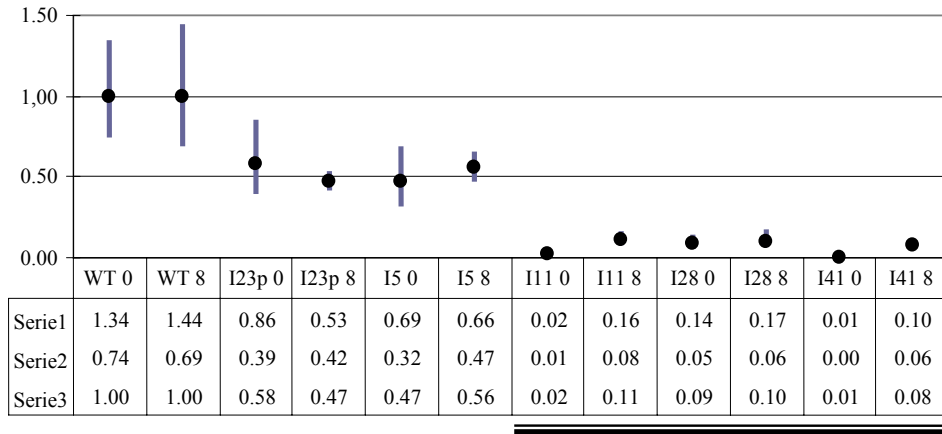
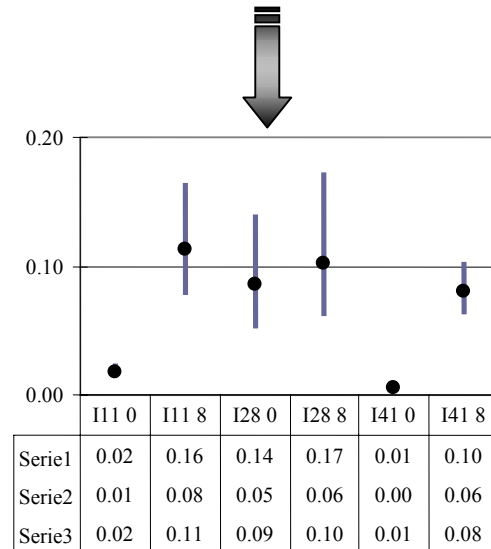
A**B**

Figure 2: Expression analysis of allele 1 transcripts under condition of enabled (0h) and disabled NMD (8h). Levels of transcripts were standardized to the GAPDH. **(A)** The comparative C_T method was used to evaluate the levels of allele 1 in each patient **(B)** Detail of the results obtained for samples subjected to mRNA degradation and effect of CHX in the level of the transcripts.

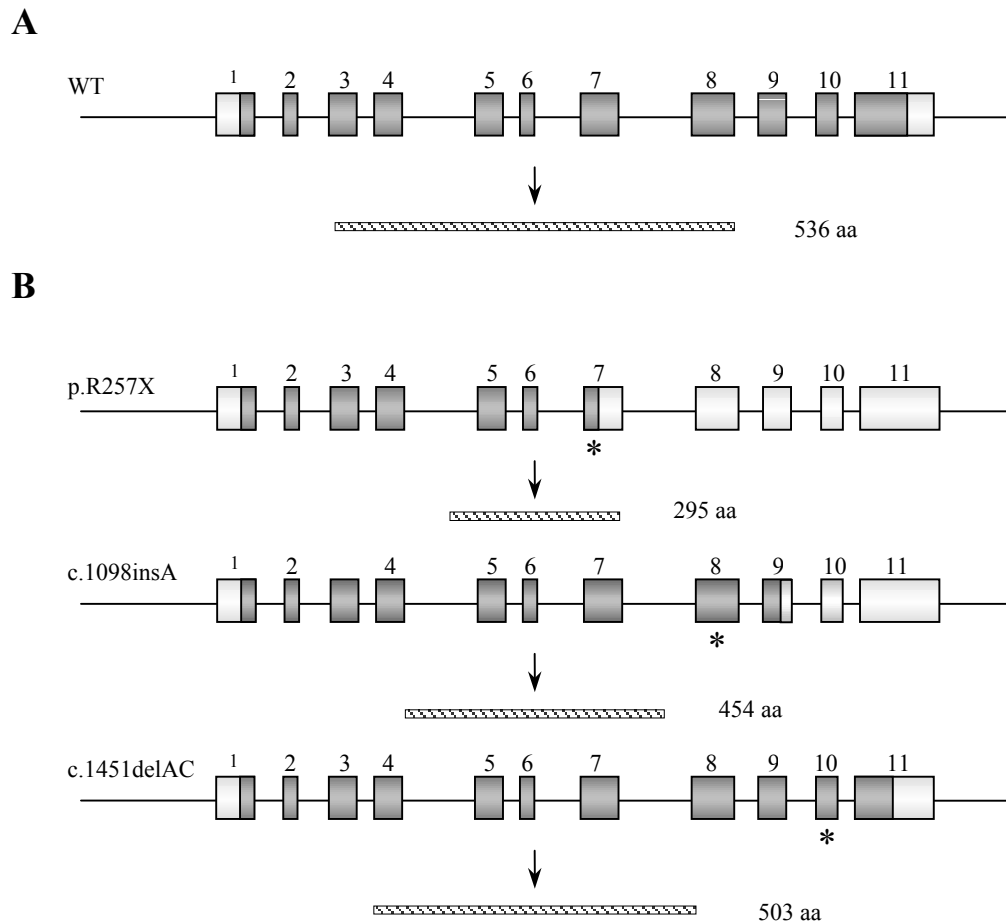


Figure 3: The first and second initiation codons are localized at the first and second exons of *GBA* gene, respectively. The figure shows the expected processing and protein sizes that we will obtain by the protein truncation test (PTT) when translation starting at the first ATG. **(A)** In the case of a wild-type allele, the protein expected size using the PTT is 536 aa. **(B)** Mutation p.R257X is located in exon 7 and it is expected to produce a truncated protein of 295 aminoacids. Mutations c.1098insA and c.1451delAC are situated in exons 8 and 10, respectively. They produce a frameshift and the origin of a premature stop codon in exons 9 and 11, respectively. Mutation W(-4)X is located in the second exon of *GBA* gen and we don not expect to produce any detectable product due to its low proportion of methionines in the product synthesized.

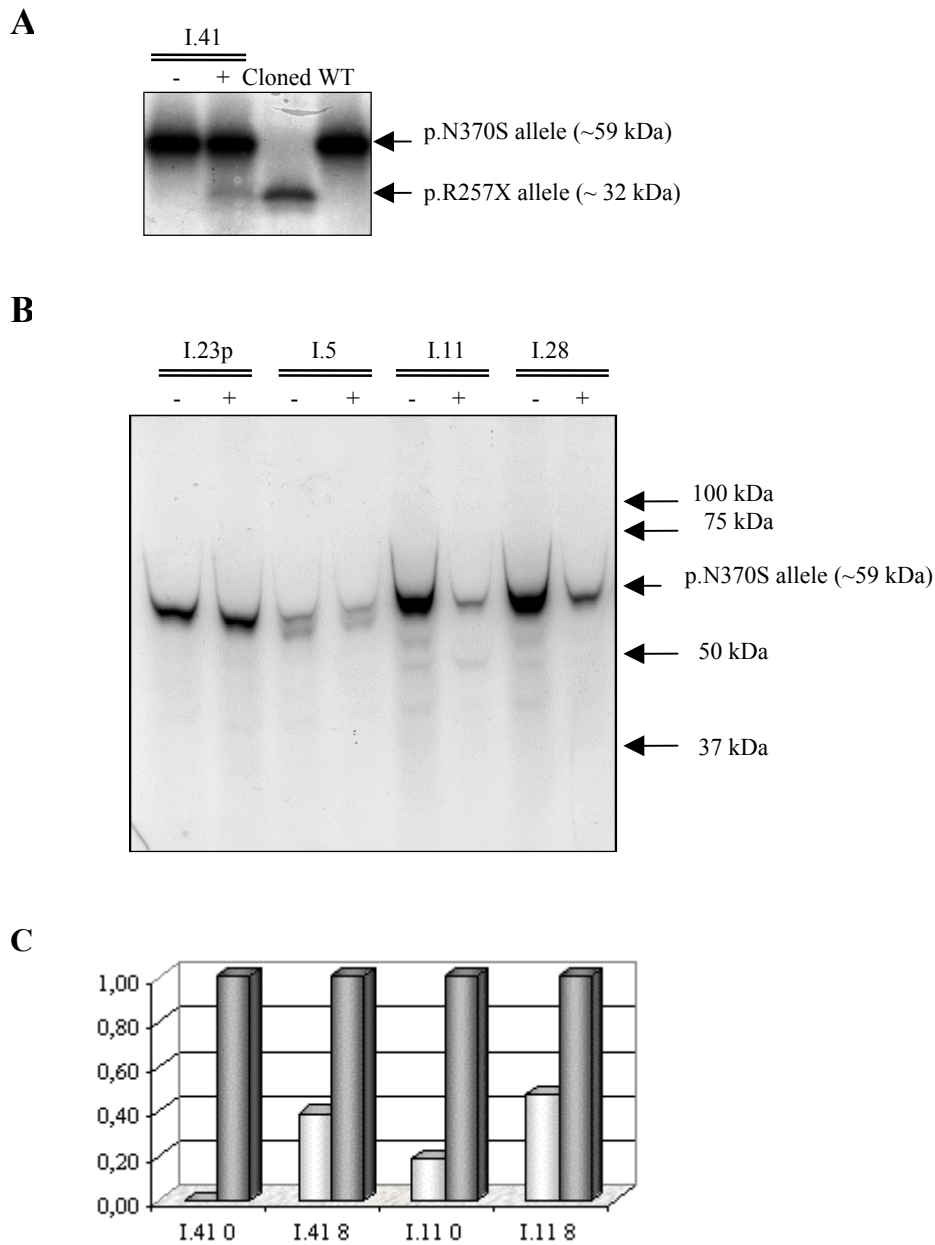


Figure 4: PTT analysis of full-length cDNA cycloheximide-stabilized mRNA. *In vitro* translation of acid β -glucosidase from controls and patients shows the presence of GBA protein of ~59 kDa in all of them, which corresponds to the normal expected product. **(A)** Truncated GBA protein bearing p.R257X allele was detected from I.41 patient after the treatment with CHX. The band has the expected size, as show when compare with protein obtained from plasmid construction. **(B)** A band corresponding to the p.N370S allele (~59 kDa) was observed in all samples. Sample I.5 showed two bands with or without CHX. Sample I.11, has an expected band of 50 kDa that is not possible to distinguish it from an unspecific band of the same size. Sample I.28 showed only one band that corresponds to the p.N370S allele. **(C)** Quantification of protein bands from patient I.41 and I.11 with and without treatment. The dark bars correspond to the p.N370S allele, while the lights correspond to the p.R257X (I.41) and p.1098insA (I.11).

DISCUSSIÓ

***MALALTIES
D'ACUMULACIÓ
LISOSÒMICA***

IMPORTÀNCIA DE L'ESTUDI DE LES MALALTIES D'ACUMULACIÓ LISOSÒMICA

La malaltia de Gaucher i la mucopolisacaridosi IIIA són malalties d'acumulació lisosòmica. Actualment, estan classificades com a tal més de 40 malalties diferents, les quals presenten una progressió generalment severa i freqüentment associada a problemes neurològics.

Les malalties d'acumulació lisosòmica presenten una prevalença combinada d'aproximadament 1 de cada 7000 naixement (Meikle i col., 1999). Degut a la baixa incidència de cadascuna d'elles per separat, estan classificades dintre de les anomenades **malalties rares o poc freqüents**. A Europa, es consideren com a tal totes aquelles malalties que presenten una incidència inferior a 5 de cada 10.000 naixements vius. Actualment, estan catalogades unes 5.000 malalties d'aquest tipus i es calcula que a Europa hi ha uns 30 milions de persones afectades per alguna d'aquestes malalties. Moltes d'elles, representen encara un misteri pel metges i científics, degut al desconeixement sobre la seva causa, com en el cas de la síndrome Cornelia de Lange (durant la finalització del present treball ha estat identificat el gen responsable d'aquesta síndrome: Krantz i col., 2004; Tonkin i col., 2004). Aquest desconeixement, així com la seva baixa incidència, provoca grans dificultats en el

diagnòstic d'algunes de les malalties rares, que en alguns casos pot arribar a trigar anys en realitzar-se.

La baixa incidència de cadascuna d'aquestes malalties representa un altre inconvenient important: el desenvolupament de teràpies destinades a uns pocs centenars o milers de persones a tot el món. Tot i resultar poc atractiu per la indústria farmacèutica, actualment existeixen diferents empreses implicades en el desenvolupament de teràpies destinades a aquests pacients, que generalment passen per l'obtenció de l'enzim necessari per recuperar la via metabòlica que ha quedat truncada. Algunes d'elles són Genzyme i TKT. La primera d'elles comercialitza l'enzim que es subministra als pacients afectats per la malaltia de Gaucher (Cerezyme[®]), la de Fabry (Fabrazyme[®]) i la MPS I (Aldurazyme[®]), i, alhora, treballa per al desenvolupament de teràpies de reemplaçament enzimàtic per altres malalties lisosomals, entre les quals trobem la malaltia de Pompe i la de la Niemann-Pick. La segona, comercialitza l'enzim necessari per la teràpia de reemplaçament enzimàtic pels afectats per la malaltia de Fabry (Replagal[™]) i, després dels resultats positius obtinguts en les Fases I/II amb l'enzim I2S (α -Iduronat-2-sulfatasa) per la síndrome de Hunter, inicien les proves clíniques de Fase III.

La gran majoria dels estudis sobre les malalties considerades rares i, per tant, sobre les malalties d'acumulació lisosòmica, es realitzen en universitats, hospitals i centres de recerca. Moltes vegades, aquestes investigacions es produeixen gràcies a l'interès de les associacions de malalts creades amb la finalitat d'ampliar el coneixement que es disposa sobre les malalties que pateixen els seus fills o filles o, fins i tot, ells mateixos (www.enfermedades-raras.org/es/asociaciones.html).

La descripció dels gens responsables de la mucopolisacaridosi IIIA (Scott i col., 1995) i de la malaltia de Gaucher (Ginns i col., 1984; Sorge i col., 1985) ha permès aprofundir en el coneixement molecular d'aquestes malalties. La primera d'elles és una mucopolisacaridosi causada per la deficiència en l'enzim N-sulfoglucosamina sulfohidrolasa (SGSH) o heparà N-sulfatasa (NS) o també anomenat sulfamidasa. La seva deficiència provoca que la degradació d'un glicosaminoglicà, l'heparà sulfat, quedi aturada provocant la seva acumulació als lisosomes. La segona, en canvi,

és un lipidosi causada per la deficiència en l'enzim β -D-glucosidasa àcida (anomenat també glucocerebrosidasa, ceramidasa β -glucosidasa o glucosilceramidasa) o, molt rarament en el seu activador, la saposina C, i que provoca l'acumulació d'un substrat, el N-acilesfingosil-1-O- β -glucòsid (glucosilceramida, ceramida β -glucòsid o glucocerebròsid) també a l'interior dels lisosomes.

Les dades estructurals i funcionals obtingudes en estudis d'al·lels mutats realitzats en diferents treballs sobre aquests enzims ens ajuden a entendre el mecanisme enzimàtic dels membres de la família de les sulfatases i glucosidases en general i, les especificitats de la sulfamidasa i de la β -glucosidasa àcida en particular. Aquest ha estat l'objectiu principal del present treball, aprofundir en el coneixement dels gens l'expressió dels quals es troba alterada en la síndrome de Sanfilippo i en la malaltia de Gaucher.

MUCOPOLISACARIDOSI
IIIA

1- ANÀLISI MUTACIONAL

A l'inici del present treball es disposaven de poques dades sobre la mucopolisacaridosi IIIA. Tot just es disposava de la seqüència del gen i d'alguna de les mutacions causant de la malaltia. Raó per la qual, es procedí a iniciar el present estudi amb la realització de l'anàlisi de les mutacions causants de la MPS IIIA en la població de pacients espanyols, per passar després a l'estudi funcional d'algunes de les mateixes.

A l'inici del present treball, la tècnica més emprada per a la cerca de mutacions era el SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), tècnica que consisteix en l'anàlisi de la migració de cadenes senzilles en gels de poliacrilamida (figura 1). Les diferències existents en la seqüència nucleotídica provoquen diferències en la mobilitat de les cadenes senzilles degut a que adopten diferents conformacions. Les cadenes senzilles s'obtenen amb l'amplificació per PCR de les zones codificants dels gens (així com de les zones acceptores i donadores d'*splicing*), per procedir posteriorment a la seva desnaturalització i anàlisi en els gels de poliacrilamida.

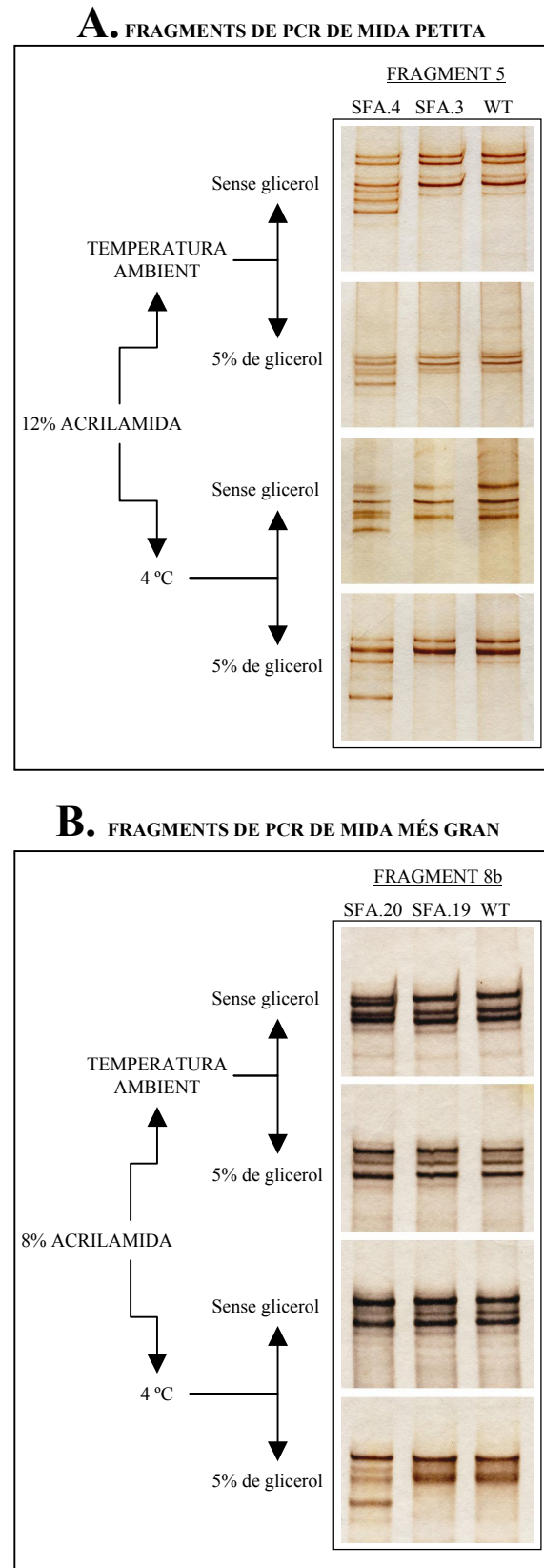


Figura 1: Condicions emprades per a l'anàlisi de les cadenes senzilles en gels de poliacrilamida. **A.** anàlisi per SSCP de fragments de PCR de mida petita (detecció del canvi de migració provocat per la presència de la mutació R206P en heterozigosi, a l'exó 5). **B.** anàlisi per SSCP de fragments de mida més gran (detecció del canvi de migració provocat per la presència de la mutació R433Q en heterozigosi, a l'exó 8).

Aquesta anàlisi pot ser realitzada sota diferents condicions en funció de la mida dels fragments de PCR. Es coneix que la limitació principal de la tècnica d'anàlisi d'SSCPs rau en la longitud dels fragments. L'eficiència en la detecció de les mutacions es va reduint a mesura que s'incrementa la mida de les fragments de PCR. Estudis anteriors sobre aquesta tècnica, estimen que amb fragments de PCR inferiors a 200 pb es possible detectar fins a un 90% de les mutacions presents en els gens, mentre que aquesta eficiència es redueix fins al 70-80% en fragments de fins a 400 pb (Prosser, 1993).

Per al gen de la sulfamidasa, s'ha procedit a la seva amplificació dividint-lo en 10 fragments de PCR diferents. Cadascun es correspon a un exó, amb l'excepció de l'exó 8, que degut a la seva major longitud s'ha amplificat en tres fragments diferents. D'aquesta manera, s'ha intentat optimitzar al màxim la sensibilitat del mètode, obtenint fragments al voltant dels 300 pb (entre 230 i 332 pb). Cada fragment s'ha analitzat en un mínim de quatre condicions diferents seguint els criteris que mostren a la figura 1.

Els resultats confirmen la importància de la variació de les condicions experimentals. Així, mentre que alguns canvis provoquen variacions en la migració de les cadenes senzilles en totes les condicions (figura 1A), altres només són evidents en alguna o algunes d'elles (figura 1B).

Alguns dels canvis trobats són també evidents en l'anàlisi de les cadenes dobles, per la visualització d'heterodúplexs. D'un total de 14 mutacions trobades en la població espanyola, 3

(S66W, R206P i 1027insC) són observables tant en l'anàlisi de les cadenes senzilles com en l'anàlisi dels heterodúplexs obtinguts en els SSCPs (figura 2).

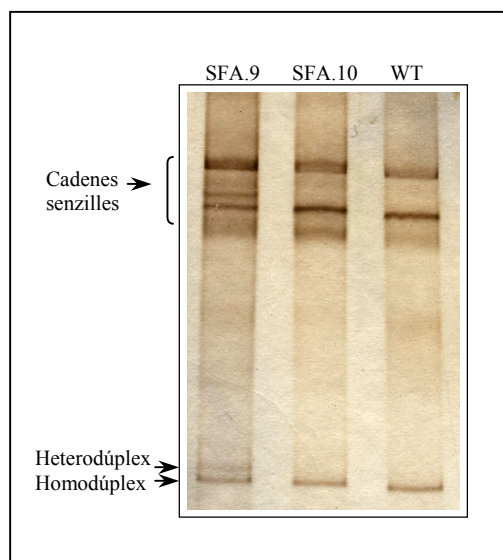


Figura 2: Patrons d'SSCP de l'exó 2 dels pacients SFA-10 i SFA-9. En el darrer, es fa evident el canvi de migració de les cadenes senzilles així com la presència d'heterodúplexs a causa d'una mutació en heterozigosi, la S66W.

Els polimorfismes presents al llarg del gen *SGSH* també modifiquen el plegament de les cadenes senzilles en la seva migració en els gels poliacrilamida, fent modificar els patrons d'SSCP. En ocasions, aquestes modificacions poden emascarar l'observació de les mutacions causants de la malaltia. En canvi, en altres ocasions, la coincidència dels dos canvis en el mateix fragment de PCR pot facilitar la detecció de la mutació.

A la visualització dels diferents patrons d'SSCPs, li segueix la purificació i seqüenciació de les bandes que presenten una migració diferent de les que tenen els corresponents al·lels salvatges.

Actualment, existeixen diferents alternatives a la tècnica d'SSCP, més ràpides i probablement més eficients, com és la seqüenciació directa. Aquesta alternativa fou descartada a l'inici del present treball degut al seu elevat cost econòmic. L'anàlisi d'SSCPs era emprada pel nostre grup anteriorment i, la seva elevada eficiència havia estat ja demostrada per a la cerca de mutacions (95%) (Cormand i col., 1998), raó per la qual fou escollida per l'anàlisi mutacional del gen de la sulfamidasa.

L'anàlisi mutacional del gen de la sulfamidasa realitzat en pacients espanyols ens ha permès caracteritzar l'espectre de mutacions responsable de la MPS IIIA en la població espanyola.

D'un total de 26 pacients espanyols diagnosticats amb MPS IIIA s'han identificat les mutacions responsables de la malaltia en un total de 47 al·lels, el que representa un 90,4%. S'han identificat 14 mutacions diferents, de les quals 12 són mutacions de canvi d'aminoàcid (S66W, R74H, Q85R, R150Q, R150W, R206P, A354P, R377H, L386R, R433Q, R433W i E447K), una és una deleció (c.1079delC, abans c.1091delC) i, la restant, una inserció (c.1027insC, abans c.1039insC). Cap d'aquests canvis ha estat detectat en la població control (100 cromosomes) i tots ells es troben a la zona codificant de la sulfamidasa. Per tot això, i previ a l'anàlisi funcional de l'enzim, es creu que aquestes mutacions són causants de la síndrome de Sanfilippo A.

Alguns dels canvis identificats s'han trobat en homozigosi en un únic pacient sense que s'hagi demostrat l'existència de consanguinitat. És el cas de les mutacions L386R, Q85R i R433W. D'aquestes, les dues primers només han estat trobades, fins el moment, en la població espanyola, mentre que la tercera s'ha localitzat en heterozigosi en un estudi americà (Wood i Thompson, 2000).

De les mutacions estudiades, moltes són canvis únics d'una determinada família o d'unes poques, fet que posa de manifest l'elevada heterogeneïtat al·lèlica de la síndrome de Sanfilippo A a nivell genètic. Aquesta heterogeneïtat al·lèlica fa referència al nombre d'al·lels que la causen, tot i que el fenotip sigui similar.

Actualment, queden 4 al·lels per identificar del total dels 26 pacients espanyols. Un dels al·lels pertany al pacient SFA-5, en el qual ja s'ha caracteritzat una de les mutacions, la c.1079delC. Un altre, pertany al pacient SFA-19, en el qual s'ha detectat la R150W en heterozigosi. Els dos restants pertanyen al mateix pacient, l'SFA-26. El fet que no s'hagi detectat cap de les dues mutacions en aquest darrer pacient ens fa pensar que: (i) caldria procedir a la seqüenciació de tot cDNA (també per l'SFA-5 i SFA-19), (ii) a la realització de *northens blots* o (iii) a la revisió del diagnòstic. Caldria seguir el mateix protocol per al cas d'un pacient d'origen no espanyol (SFA-8, no inclòs en les publicacions) en el qual tampoc s'han identificat cap de les mutacions responsables de la malaltia. A partir de l'anàlisi de mutacions realitzat a partir de DNA

d'aquest pacient, únicament s'identificà el canvi d'una A per una G en la posició IVS6-4 del lloc acceptor d'*splicing* de l'exó 7. Recordem, però, que en aquesta posició de la seqüència consens d'*splicing* hi podem trobar qualsevol de les quatre bases nitrogenades, sense que un canvi en aquesta posició impliqui la modificació de la regió acceptora d'*splicing*. Raó per la qual, aquest canvi fou descartat com a la mutació causant de la MPS IIIA en aquest pacient.

La majoria de les mutacions identificades presenten una freqüència molt baixa, detectant-se d'una a quatre vegades entre els pacients analitzats (veure resultats, capítol 2), i només una es presenta amb una major freqüència. Es tracta de la deleció d'una citosina en la posició c.1079, i representa prop del 37% del total d'al·lels mutants de la població espanyola (19 de 52). La numeració actual del cDNA de la sulfamidasa es correspon amb la de Yogalingam i Hopwood (2001), en la qual l'A de l'ATG es correspon amb el nucleòtid número +1 (en l'anterior, corresponia al 12, raó per la qual en els primers articles la c.1079delC era anomenada c.1091delC).

Generalment, l'existència d'una mutació prevalent facilita en gran part el diagnòstic de la malaltia, de tal manera que es pot procedir a una primera anàlisi mutacional rutinària per saber si els pacients presenten aquesta mutació. Cal tenir en compte, però, que en la població espanyola la probabilitat de que un pacient amb MPS IIIA sigui homozigot per la c.1079delC és només del 14%, fet que fa

necessari ampliar la cerca de mutacions en la gran majoria dels casos.

La mutació c.1079delC s'ha detectat també en altres països (Regne Unit, Austràlia, Estats Units, Holanda, Polònia i Itàlia) però la seva freqüència no supera en cap cas el 10% (Weber i col., 1997; Bunge i col., 1997; Esposito i col., 2000; Beesley i col., 2000).

En un estudi de la població anglesa, es descriu un pacient de l'illa de Malta amb el genotip c.1079delC/c.1079delC, però fins el moment es desconeix la prevalença de la mutació en aquesta població degut a la manca d'una anàlisi mutacional exhaustiva (Beesley i col., 2000).

En els estudis realitzats en altres poblacions s'ha detectat algun pacient amb MPS IIIA d'origen espanyol que presenta també aquesta deleció (Beesley i col., 2000). Aquest fet confirma la prevalença de la mutació c.1079delC entre els pacients espanyols. La mutació R74H, trobada en el nostre estudi en tres cromosomes independents, també ha estat identificada en dos pacients d'origen espanyol i en un de portuguès en un estudi realitzat en la població alemanya (Bunge i col., 1997).

A la taula 1 es mostra la freqüència de les mutacions més prevalents trobades en diferents països.

La mutació més prevalent en la majoria de les poblacions analitzades fins el moment és la R245H. Aquesta mutació no ha estat detectada en cap pacient de la població espanyola.

Taula 1: Freqüència de les mutacions S66W, R74C, R245H i 1079delC entre els pacients amb MPS IIIA en diferents àrees geogràfiques. El valor de freqüència de la mutació majoritària en cada població es troba subratllat. Les mostres dels Estats Units pertanyen al NIGMS cell repository. n.d., mutació no detectada. ?, cerca no realitzada.

	S66W	R74C	R245H	c.1079delC	Referència
Alemanya	?	20,8% (10/48)	<u>35,4% (17/48)</u>	n.d. (0/48)	Bunge i col., 1997
Àustria	15,9% (7/44)	<u>18,2% (8/44)</u>	11,4% (5/44)	?	Kroepfl i col., 2001
Holanda	1,1%(1/90)	n.d. (0/56)	<u>57,8% (52/90)</u>	2,2% (2/90)	Weber i col., 1997
Polònia	?	<u>56,3% (18/32)</u>	3,1% (1/32)	3,1 (1/32)	Bunge i col., 1997
Regne Unit	1,9% (1/52) 6,7% (2/30)	2,9% (1/34) 13,3% (4/30)	<u>19,2% (10/52)</u> <u>20% (6/30)</u>	3,8% (2/52) 13,3% (4/30)	Weber i col., 1997; Beesley i col., 2000
Austràlia	6,9%(4/58)	n.d.(0/34)	<u>31% (18/58)</u>	3,8% (2/58)	Weber i col., 1997
Estats Units	11,1 (2/18)	?	11,1 (2/18)	5,6 (1/18)	Weber i col., 1997
Itàlia	<u>28,6% (16/56)</u>	1,8% (1/56)	n.d. (0/56)	7,1% (4/56)	Di Natale i col., 1998; Esposito i col., 2000
Espanya	7,7% (4/52)	n.d. (0/52)	n.d. (0/52)	<u>36,5% (19/52)</u>	Montfort i col., 1998; Chabás i col., 2001

En altres poblacions, la mutació majoritària no és ni la R245H ni la c.1079delC. És el cas de les poblacions austríaca, polonesa i italiana, que presenten com a mutacions majoritàries la R74C (per les dues primeres) i la S66W (per la darrera). D'aquestes, la primera mutació, a l'igual que la R245H, no ha estat detectada en cap pacient espanyol. En canvi, la S66W sí ho ha estat i és la segona mutació en importància en la població espanyola, tot i que representa només el 8% del total d'al·lels mutats.

Les dades actualment disponibles són poques, de tal manera que és difícil arribar conèixer les causes de la distribució desigual de les diferents mutacions identificades. Tanmateix, a continuació es presenten algunes hipòtesis sobre aquesta distribució que hauran de ser avaluades a partir de les dades obtingudes amb la realització de nous treballs. L'anàlisi de marcadors del tipus microsatèl·lit que es trobin flanquejant la regió podrien ser útils per a confirmar o rebutjar aquestes hipòtesis.

R74C. És interessant comprovar que la mutació R74C és la majoritària a Polònia i Àustria, i la segona a Alemanya. També s'ha trobat a Itàlia i al Regne Unit, però amb una menor freqüència i, en canvi, no ha estat detectada fins el moment en les poblacions holandesa (molt propera a les anteriors), espanyola i australiana (figura 3). S'ha detectat també en alguns pacients de Finlàndia (4/8), Estònia (1/2) i Turquia (2/10) (Bunge i col., 1997; Emre i col., 2002), però es desconeix la freqüència que té la mutació en aquestes poblacions.

Observant la distribució de la mutació R74C, podríem hipotetitzar sobre l'existència d'una genoclina descendent de la freqüència de la mutació des del nord-est d'Europa cap a l'oest. Aquesta hipòtesi, però, no explica perquè no s'ha trobat fins el moment cap al·lel R74C a Holanda.

Amb les dades actualment disponibles, no podem saber on s'originà aquesta mutació.

Cabria pensar, però, que el més plausible és que la mutació R74C tingués el seu origen al nord-est d'Europa. Per a comprovar aquesta hipòtesi, el primer que caldria realitzar és una anàlisi dels polimorfismes del gen de la sulfamidasa presents en els cromosomes portadors de la mutació R74C. Només en el cas en què molts d'ells comparteixin el mateix haplotip podrem tenir una base per a recolzar l'existència d'un possible origen únic per a aquesta mutació.

Fins el moment, sabem que tots els pacients analitzats per Bunge i col. (1997) homozigots per aquesta mutació, tenen el mateix al·lel (T) pel polimorfisme IVS5+17C>T, malgrat que la mutació R74C afecta un dinucleòtid CpG altament mutable. Aquests pacients pertanyen a diferents poblacions europees: polonesos, alemanys, estonians i finlandesos. Caldrà, però, esperar a disposar de més informació en aquest sentit per arribar a saber si l'origen de la mutació és únic.

R245H. La mutació R245H és la més freqüent a Holanda, Alemanya, Austràlia, Àustria i Regne Unit, mentre que a Polònia s'ha trobat en un únic cromosoma de 32 i, a Espanya i a Itàlia en cap. Amb les dades actualment disponibles, no semblaria existir una genoclina clara de la freqüència de la mutació R245H en la població europea (figura 3).

A Holanda, la mutació no es troba igualment distribuïda per tot el país, sinó que és preponderant a l'oest. Es creu que aquest fet podria ser el reflex d'un efecte fundador per

aquest al·lel en aquesta regió (Weber i col., 1998).

Com hem vist anteriorment, podria haver existit un pas de la mutació R74C probablement des de Polònia cap a Alemanya. En canvi, el pas de la mutació R245H des d'Alemanya cap a Polònia hauria estat molt menor. Desconeixem, fins el moment, la causa la baixa freqüència de la mutació R245H a Polònia, però podríem pensar en que històricament el moviment de població en aquest sentit hauria estat menor.

La presència de la mutació R245H a Austràlia podria deure's al fet de que la població australiana actual, en gran part, prové de la colonització d'aquelles terres per part dels anglesos després del seu descobriment.

Podríem extreure'n les mateixes conclusions en quant a la presència de l'al·lel R245H a les Illes Caiman. La freqüència de portadors a l'illa Gran Caiman s'eleva fins a 1/7 - 1/10, i s'especula sobre l'existència d'un possible efecte fundador (Rady i col., 2002), probablement provocat per l'arribada de colons britànics a aquestes terres després de la signatura del tractat de Madrid (1670), en el qual Espanya va donar aquests territoris a la Gran Bretanya.

L'existència d'aquesta mutació als Estats Units també es podria explicar per la presència dels britànics en aquelles terres després del descobriment del continent americà.

Fins el moment, però, es disposa de molt poques dades que ens aportin pistes en qualsevol d'aquests sentits. La manca d'estudis

d'haplotips fa que siguin únicament hipòtesis sense confirmació.

En un estudi realitzat sobre 26 pacients de la població australiana i americana (Blanch i col., 1997), es va comprovar que els 14 al·lels portadors de la R245H compartien la mateixa variant (His) pel polimorfisme R456H. Fet que suggeria un possible origen únic de la mutació, sense arribar a demostrar-ho degut a la major freqüència de la variant His d'aquest polimorfisme en la població control (Blanch i

col., 1997). Més tard, a l'any 2001, en un nou estudi sobre pacients de les mateixes poblacions, es va descriure l'existència de 7 pacients homozigots per la mutació R245H, dels quals 4 són homozigots per una variant del polimorfisme (la mateixa que els anteriors), mentre que els 3 restants ho són per l'altre variant (Perkins i col., 2001). Aquest fet es contradiu, per tant, amb l'existència d'un possible origen únic per a la mutació R245H.

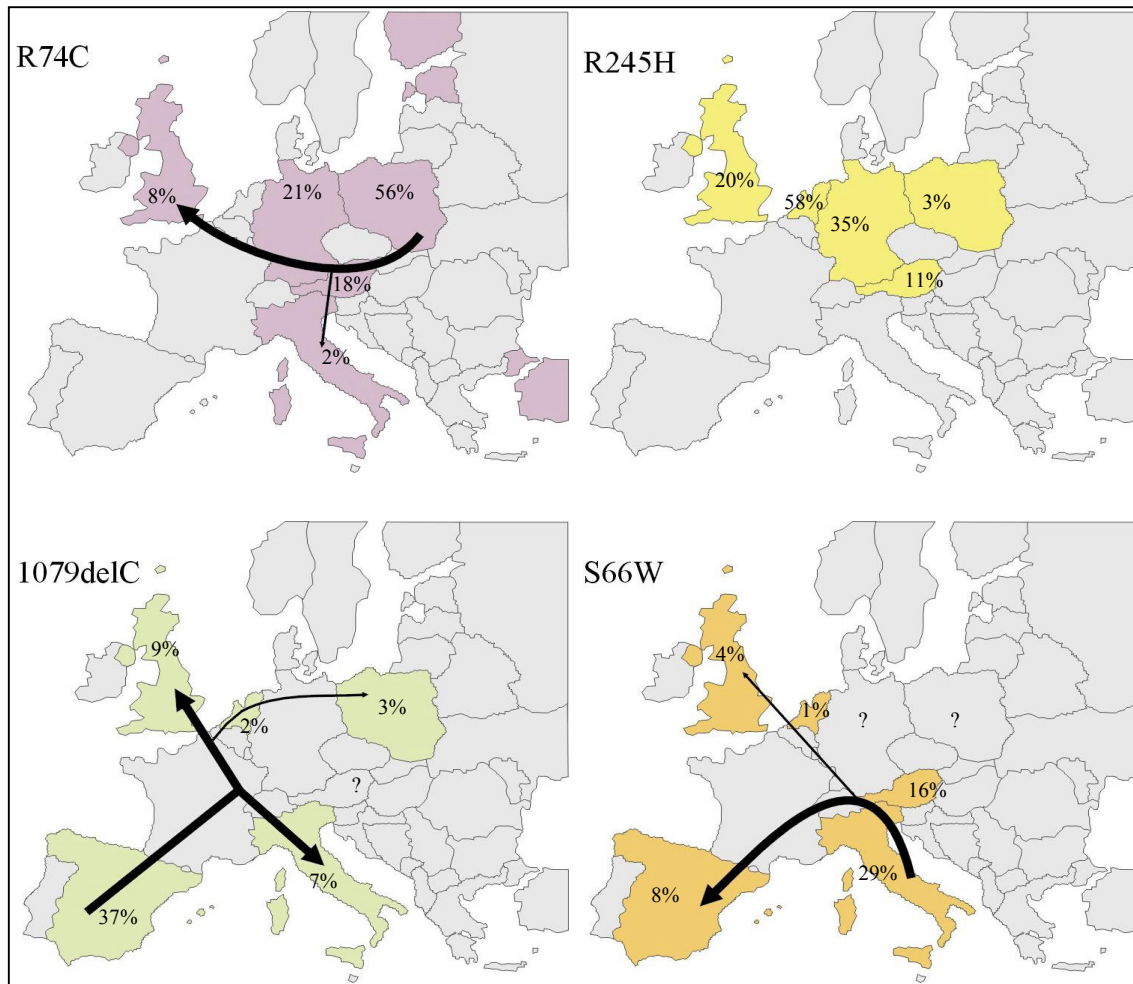


Figura 3: Situació geogràfica de les mutacions més freqüents causants de la síndrome de Sanfilippo A en les diferents poblacions europees analitzades. Les fletxes negres indiquen la possible línia de tendència de la migració de les mutacions més freqüents al llarg d'Europa. Es tracta, però, únicament d'hipòtesis no validades, degut a la manca d'estudis d'haplotips disponibles i del baix nombre de poblacions analitzades

c.1079delC. La mutació c.1079delC és, com ja hem comentat, la més freqüent entre la població espanyola afectada per la síndrome de Sanfilippo A.

Aquest al·lel ha estat també detectat en altres poblacions estudiades, però només a Itàlia, al Regne Unit i als Estats Units es detecten freqüències superiors al 5%. La seva propagació per Europa s'hauria produït, per tant, cap als països més propers del Mediterrani i de l'Atlàntic, mentre que als països del nord-est d'Europa aquesta mutació no hauria arribat o ho hauria fet en menor mesura.

L'estudi dels polimorfismes presents en els cromosomes portadors d'aquesta mutació en la població espanyola ens ha permès determinar l'existència d'un origen únic per a aquesta mutació (veure resultats, capítol 2), però desconeixem, fins el moment, si els al·lells trobats en la resta de poblacions estudiades comparteixen el mateix haplotip trobat en la població espanyola.

S66W. En la població italiana, la mutació S66W és la més freqüent, sobre tot a l'illa de Sardenya on dels 6 pacients analitzats, 5 són homozigots per aquesta mutació i 1 és heterozigot. Es creu, per tant, que s'hauria pogut produir un efecte fundador de la mutació S66W en aquesta illa italiana (Di Natale i col., 1998). En aquest sentit, s'ha comprovat que tots els pacients portadors de la mutació S66W (7 homozigots i 1 heterozigot) en la població italiana presenten el mateix al·lel per al polimorfisme R456H, que és el que codifica per l'arginina.

La mutació S66W ha estat també analitzada i detectada a Holanda, Regne Unit, Austràlia, Estats Units i Espanya (figura 3). En aquestes poblacions, la mutació S66W presenta una baixa incidència, excepte a Àustria on representa un 16% dels al·lells analitzats.

Per al cas de la població espanyola analitzada, la S66W ha estat detectada en heterozigosi en quatre pacients. Tres dels quals, comparteix en mateix al·lel per polimorfisme R456H que els pacients italians, mentre que en el quart no s'ha pogut determinar la fase.

En algunes poblacions europees aquesta mutació no ha estat analitzada fins el moment. És el cas d'Alemanya i Polònia, de tal manera que desconeixem la presència de la mutació S66W i la seva freqüència en aquestes poblacions.

Fins que no es disposi de més dades sobre la distribució de la mutació S66W en les diferents poblacions europees serà difícil extreure conclusions sobre el seu origen i migració, tot i que, fins el moment amb les dades disponibles, el que sembla més probable és que la mutació es produí a Itàlia.

Després de totes aquestes observacions realitzades sobre les mutacions R74C, R245H, 1079delC i S66W, responsables de la MPS IIIA a Europa, podem extreure'n algunes conclusions. Hem pogut veure, per exemple, que les poblacions italiana i espanyola presenten pràcticament les mateixes mutacions però amb freqüències diferents. Conclusions similars poden establir-se amb la freqüència

d'aquestes quatre mutacions entre les poblacions del Nord d'Europa. Aquestes diferències entre les poblacions del Nord i del Sud, suggereixen que al llarg de la història i des de l'origen d'aquestes mutacions, les poblacions del Sud han mantingut un contacte més estret entre elles i, les Nord també entre elles. Una de les causes que pot haver contribuït a aquest fet, podria ser l'existència de barreres geogràfiques (Pirineus i Alps) que limiten les penínsules Ibèrica i Italiana en la seva comunicació amb la resta d'Europa.

Totes aquestes dades poblacionals suggereixen, alhora, que moltes de les mutacions causants de la síndrome de Sanfilippo A podrien tenir un **origen únic i recent**. Arribem a aquesta conclusió després d'analitzar diferents factors. Per una banda, sabem que les mutacions que tenen un origen recurrent es troben freqüentment en pacients de totes les poblacions i, presenten haplotips diferents pels diferents polimorfismes intragènics. Segons això, de les quatre mutacions més freqüents, únicament, la R245H, s'hauria demostrat que és una mutació recurrent, pel fet de trobar-se associada als dos al·lels del polimorfisme R456H.

Per altra banda, es considera que una mutació és antiga quan es troba en diferents àrees geogràfiques, degut a la mobilitat de les diferents poblacions. Gran part de les mutacions responsables de la MPS IIIA són particulars de determinades famílies i només algunes es troben en varies o en gran part de les poblacions estudiades, però cap d'elles, ni

les més freqüents, es troben en totes les poblacions analitzades.

En el gen de la sulfamidasa han estat descrits diferents polimorfismes, tal com hem vist anteriorment. Al parlar de polimorfismes, en aquest cas, fem referència a aquells canvis que s'ha demostrat que per sí sols no són causants de la malaltia. La demostració d'aquest fet implica, a manca d'un estudi funcional, la seva presència en població control.

Aquests polimorfismes poden estar situats en zones no codificants del gen, però també poden estar presents en la zona codificant introduint, en ocasions, un canvi d'aminoàcid.

En els estudis realitzats sobre els pacients de la població espanyola s'han analitzat quatre dels polimorfismes descrits en el gen de la sulfamidasa. Tres són intrònics i un és exònic: IVS2-26T>C, IVS5+17C>T, IVS5-37GC>CTGT (els al·lels són anomenats “-ins” i “+ins” en funció de la presència de GC o CTGT, respectivament) i R456H G>A. S'ha procedit també a determinar la freqüència de cadascun dels al·lels d'aquests polimorfismes en població espanyola control.

Tots els pacients han estat analitzats per a aquests polimorfismes (veure resultats, capítols 1 i 2), però els que han tingut un especial interès són aquells cromosomes portadors de la mutació c.1079delC (abans c.1091delC), tant en homozigosi com en heterozigosi. L'estudi ha permès demostrar l'existència d'un haplotip conservat [T, T, +ins, G] pels cromosomes portadors d'aquesta mutació en tots aquells

casos en els quals s'ha pogut determinar la fase. En total, es disposa de l'haplotip complet en 13 dels 19 cromosomes portadors de la c.1079delC. En els 6 casos restants, els al·lels per cadascun dels polimorfismes són coherents amb l'haplotip descrit.

L'existència d'aquest haplotip associat a la mutació c.1079delC recolza la hipòtesi de l'existència d'un origen únic per aquest canvi. Cal, però, ressaltar el fet de que la resta de mutacions presents en el gen de la sulfamidasa en la població espanyola, semblen trobar-se també associades a un únic haplotip (taula 2).

Aquests resultats confirmarien la hipòtesi de que la majoria de les mutacions responsables de la MPS IIIA tenen un origen únic. Cal tenir en compte, però, que gran part d'aquests canvis han estat detectats només en un petit nombre d'al·lels i caldrà, per tant, esperar a disposar de més dades a partir dels anàlisis que puguin realitzar-se amb la detecció de nous pacients o amb l'anàlisi d'aquests al·lels presents en altres poblacions.

Taula 2: Associació entre mutacions i haplotips trobats en les mostres analitzades de la població espanyola. Per alguns dels al·lels no es disposa de la fase, però els resultats són coherents amb l'associació: 1079delC, 6; S66W, 2; R433Q, 1; R206P, 2; A345P, 2.

MUTACIONS	n al·lels	HAPLOTIP ASSOCIAT
1079delC	19	[T, T, +ins, G]
S66W	4	
R74H	3	
R433Q	2	
1027insC	2	
R206	2	[C, C, -ins, A]
L386R	2	
E477K	4	
A345P	2	[C, T, +ins, G]
Q85R	2	[C, C, -ins, G]
R433W	2	

Les freqüències al·lèliques per alguns dels polimorfismes mencionats també han estat estudiades en altres poblacions (taula 3).

Taula 3: Freqüències al·lèliques dels polimorfismes IVS2-26T>C, IVS5+17C>T, IVS5-37GC>CTGT (al·lels anomenats "-ins" i "+ins" en funció de la presència de GC o CTGT, respectivament) i R456H G>A trobades en diferents estudis sobre diferents poblacions.

PACIENTS				CONTROLS				
IVS2-26 T>C	IVS5+17 C>T	IVS5-37 GC>CTGT	R456H G>A	IVS2-26 T>C	IVS5+17 C>T	IVS5-37 GC>CTGT	R456H G>A	Referència
T= 0,63 C= 0,38	C= 0,28 T= 0,72	-ins= 0,29 +ins= 0,71	G= 0,80 A= 0,20	T= 0,57 C= 0,43	C= 0,32 T= 0,68	-ins= 0,32 +ins= 0,68	G= 0,69 A= 0,31	Montfort i col., 1998; Chabás i col., 2001
				T= 0,56 C= 0,44	C= 0,46 T= 0,54	-ins= 0,46 +ins= 0,54	G= 0,51 A= 0,49	Lee Chen i col., 2002
	C=0,31 T=0,69				C= 0,45 T= 0,55			Bunge i col., 1997
			G= 0,86 A= 0,14				G= 0,70 A= 0,30	Di Natale i col., 1998; Esposito i col., 2000
			G= 0,62 A= 0,38				G= 0,44 A= 0,55	Blanch i col., 1997

Les diferències en les freqüències al·lèliques observades en els diferents estudis poden ser degudes a diferències en el nombre de cromosomes analitzats, a diferències individuals de les mostres emprades i/o a diferències poblacionals.

Les diferències en les freqüències al·lèliques entre pacients i controls són degudes, en la majoria dels casos, a la presència d'un al·lel per un polimorfisme associat a la mutació majoritària. Per exemple, en la població italiana, la mutació més freqüent és la S66W. Tots els pacients homozigots per aquesta mutació presenten una arginina pel polimorfisme R456H (Di Natale i col., 1998; Esposito i col., 2000), fet que la freqüència d'aquest al·lel s'elevi en els pacients respecte als controls (taula 3). Aquestes diferències entre les freqüències al·lèliques dels pacients i la població control es fa també evident amb l'estudi del polimorfisme IVS5+17 C>T en la població polonesa (Bunge i col., 1997). Tots els pacients amb la mutació R74C presenten el mateix al·lel (T) per a aquest polimorfisme, fet que provoca que la freqüència d'aquest al·lel sigui superior entre els pacients.

Malgrat l'existència de tots aquests estudis i l'evidència del possible origen únic d'algunes d'aquestes mutacions, no existeix, fins el moment, cap més estudi d'haplotips encaminat a la demostració o no d'un origen únic per a la resta de les mutacions responsables de la síndrome de Sanfilippo A.

L'anàlisi de les mutacions responsables de la MPS IIIA ens ha permès analitzar la seva **distribució al llarg del gen *SGSH***.

Les mutacions trobades en la població espanyola es troben distribuïdes al llarg del gen sense que s'hagi trobat cap mutació als exons 1, 5 i 6 (figura 4). Segons això, podríem pensar que aquests exons són vitals per l'activitat i/o l'estabilitat de la sulfamidasa. Si sumem els nostres resultats als obtinguts per altres autors (veure introducció, taula 4), observem mutacions distribuïdes al llarg de tot el gen, a excepció de l'exó 1, en el qual no ha estat trobada, fins el moment, cap mutació causant de la MPS IIIA.

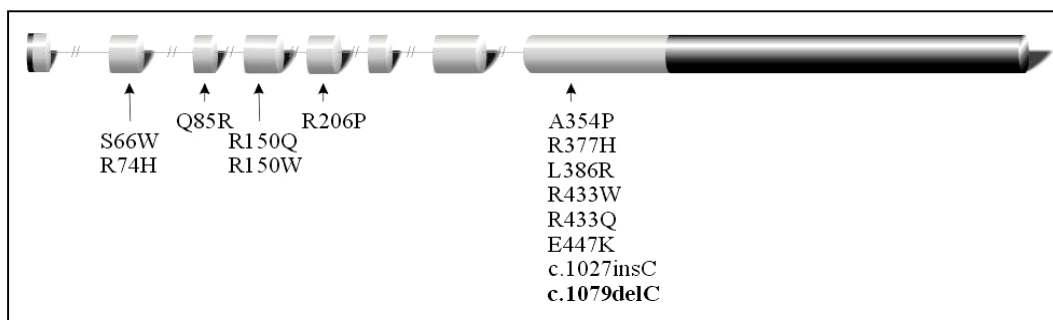


Figura 4: Distribució de les mutacions causants de la MPS IIIA en la població espanyola. L'exó 8 és el que presenta un major nombre de mutacions. Cada cilindre correspon a un exó i les zones més fosques corresponen a les regions no traduïdes.

Podríem pensar que la manca de mutacions presents a l'exó 1 es deu a la seva curta mida (88pb). Aquesta suposició, però, es contradiu amb l'observat a l'exó 6, el qual tot i tenir una mida similar a l'exó 1 (82pb) presenta 6 mutacions diferents, una de les quals és la R245H. Cabria esperar, per tant, que l'exó 1 jugués un paper molt important en la funcionalitat de l'enzim, paper que fins el moment desconeixem.

En els resultats obtinguts a partir de l'estudi de la distribució de les mutacions espanyoles al llarg del gen, observem un predomini de la presència de mutacions a la zona codificant de l'exó 8. De les 14 mutacions identificades, 8 es troben al darrer exó, el que representa el 57%. Si estenem aquest estudi als resultats obtinguts en el conjunt de totes les poblacions analitzades, veiem que la tendència disminueix lleugerament. Del total de mutacions descrites en les diferents poblacions, fins el moment unes 70, 32 es troben a l'exó 8, el que representa que prop de la meitat de les mutacions (el 46%) es troben en aquest exó. Podríem atribuir aquest fet a la major longitud de la zona codificant de l'exó 8, el qual consta de 560 pb. La totalitat de regions codificants del gen de la sulfamidasa sumen 1509 pb. Representa, per tant, que en el darrer exó tenim 5,7 mutacions per cada 100 nucleòtids (figura 5), mentre que en tot el gen trobem de mitjana 4,6 mutacions per cada 100 nucleòtids. Si fem els mateixos càlculs tenint en compte únicament les mutacions de canvi de sentit (exó 8 = 3,8; i de mitjana en al gen = 3,4) observem que les proporcions són semblants.

La presència d'un major nombre de mutacions a l'exó 8 es deu, per tant, a la major presència de mutacions sense sentit i de canvi de la pauta de lectura en el mateix. El 70% d'aquest tipus de canvis es troben al darrer exó.

En el cas dels exons 3, 5 i 7, la relació entre el nombre de mutacions per cada 100 nt és substancialment inferior (2,8 mutacions cada 100 nt; 3,2 mutacions cada 100 nt; 2,5 mutacions cada 100 nt; respectivament) (figura 5).

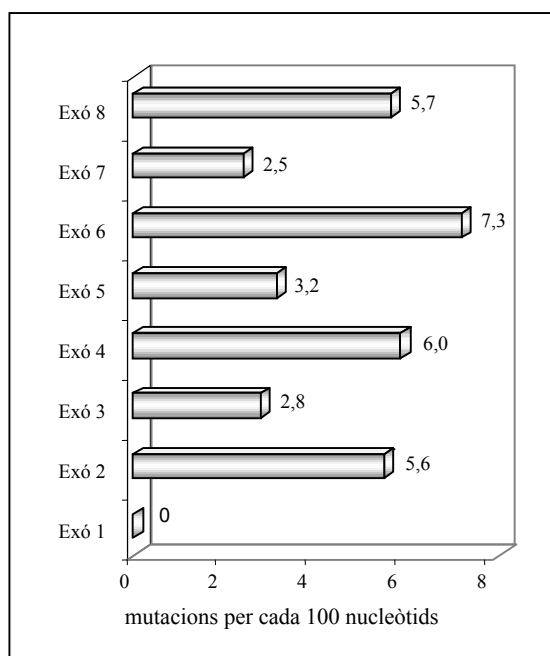


Figura 5: Número total de mutacions present en cadascun dels exons del gen de la sulfamidasa expressat per cada 100 nucleòtids.

Aquesta distribució no homogènia dels canvis al llarg de la seqüència del gen sembla tenir una certa correlació amb la presència dels aminoàcids que, per comparació de seqüència, es postula que es trobarien presents en el centre

actiu de la sulfamidasa (veure introducció, taula 3).

Els residus D31, D32, C70, P72, S73 i R74 es troben a l'exó 2, mentre que els K123 i H125 es troben en el 4. Tots ells es postula que formarien part del centre actiu, a l'igual que els aminoàcids D273, N274 i K303 (Bhattacharyya i col., 2001) presents a l'exó 7. Sabem també que part dels aminoàcids dels exons 6 i 7 formen una hèlix α que podria ser important per l'estructura de l'enzim (Aronovich i col., 2000).

Sabem també de la importància d'altres residus presents en el gen de la sulfamidasa. Es tracta de les regions consens de les sulfatases, que recordem es situen entre els residus 70-74 (exó 2) i 115-124 (exó 3 i 4).

Així, doncs, aquells canvis que afecten aminoàcids essencials per al mecanisme catalític de l'enzim es tradueixen en un fenotip patològic, mentre que els canvis que es produeixen en zones menys importants de la proteïna podrien passar més inadvertits a nivell clínic. Aquest fet, però, no explica el menor nombre de mutacions per cada 100 nt presents en l'exó 7. Caldrà, per tant, esperar a disposar de més coneixements sobre els dominis funcionals de la proteïna per entendre la distribució de mutacions observades en el gen de la sulfamidasa.

2- DIAGNÒSTIC MOLECULAR

La síndrome de Sanfilippo A es diagnostica habitualment mitjançant un assaig bioquímic. Aquest, però, no proporciona informació d'interès pronòstic ni permet identificar clarament els individus portadors. A l'inici del present treball, ens vam plantejar que l'estudi de l'espectre mutacional de la MPS IIIA existent en la població espanyola, ens podria ser de gran utilitat per a la posada a punt d'un diagnòstic molecular rutinari.

Amb l'anàlisi de les mostres dels pacients que van anar rebent, vam determinar quin és l'espectre mutacional de la població espanyola (veure resultats, capítols 1 i 2). Amb ell van constatar l'existència d'una mutació majoritària, la c.1079delC. Els resultats obtinguts sobre la freqüència d'aquest al·lel en la població espanyola afectada per la MPS IIIA, no dona molt bones perspectives en quan al diagnòstic molecular de la malaltia. Com ja hem comentat, aquesta mutació cobreix un 36,5% del total d'al·lels mutats i un 20% (observat; o un 13% teòric) dels genotips. Això representa que prop del 80% dels genotips s'escapen a l'estudi de la mutació majoritària. Moltes de les mutacions trobades són úniques de determinades famílies, fet que reflexa l'elevada heterogeneïtat al·lèlica de la síndrome de Sanfilippo A (en quant al nombre d'al·lels).

El diagnòstic molecular resulta pràctic en aquells casos en què un nombre relativament petit de mutacions cobreix la major part dels al·lells. En la població europea, l'estudi de les quatre mutacions més freqüents (S66W, R74C, R254H i c.1079delC) permet la identificació d'un percentatge no molt elevat d'al·lells, que oscil·la del 37,5% a Itàlia fins al 62,5% a Polònia. En la població espanyola, aquest valor es queda en un 44,2%. Aquestes diferències són degudes a la variabilitat en l'espectre mutacional de les diferents poblacions estudiades i, fa que no sigui extremadament pràctic el desenvolupament d'un programa comú d'anàlisi de mutacions. En aquest sentit, seria millor un programa de detecció específic de cada regió que inclogués aquells canvis que han estat detectats amb una major freqüència. En la població espanyola, la detecció de les mutacions c.1079delC, S66W, E447K i R74H, cobriria prop del 60% dels al·lells responsables de la síndrome de Sanfilippo A.

Malgrat aquesta elevada heterogeneïtat al·lèlica, l'estudi de l'espectre mutacional serà i, de fet, ja ha estat útil per oferir el diagnòstic prenatal i de portadors a familiars d'alguns pacients afectats per la MPS IIIA. Hem analitzat tres famílies diferents, realitzant l'anàlisi de portadors en 4 individus i confirmant el diagnòstic prenatal en 2 fetus (veure resultats, capítol 3).

L'estudi de cosegregació dels polimorfismes presents o propers al gen de la sulfamidasa pot arribar també a ser de gran utilitat per oferir un alt índex de fiabilitat en el diagnòstic indirecte de portadors i prenatal en les famílies en les

quals no s'hagin identificat les mutacions més prevalents. Fins el moment, no ha estat necessari recorre a aquesta metodologia, però actualment es disposa de les dades (<http://snp.cshl.org/>) i dels coneixements necessaris en aquest sentit.

3- EXPRESSIÓ D'AL·LELS MUTATS

Gran part dels pacients afectes per la síndrome de Sanfilippo tipus A són heterozigots compostos. Determinar l'efecte d'una mutació sobre les propietats enzimàtiques a partir de mostres d'aquests pacients resulta una feina difícil i poc conclouent degut a l'emascament provocat per la mutació present en l'altre al·lel. L'expressió heteròloga de la sulfamidasa humana i dels seus mutants en cèl·lules eucariotes és un sistema idoni per resoldre aquest problema.

En l'actualitat existeixen diferents mètodes per a l'expressió heteròloga de proteïnes. Escollir quin d'ells pot ser el més adient, passa per la valoració de diferents criteris o necessitats que poden requerir les proteïnes que volem expressar. Entre aquests criteris es troben els següents:

- expressió constitutiva o induïble,
- obtenció de pèptids de fusió o lliures,

- condicions del cultiu cel·lular i escala,
- temps de duració de l'expressió,
- requeriment de processament de les proteïnes,
- presència de proteases a les cèl·lules hoste,
- toxicitat pel sistema d'expressió,
- localització cel·lular de les proteïnes recombinants,
- obtenció de les proteïnes del sobrenadant,
- lisi cel·lular i homogenització,
- solubilització i
- purificació de proteïnes.

L'expressió heteròloga de proteïnes es pot realitzar en cèl·lules de mamífers, de llevat, de bacteris o d'insecte. Aquestes últimes estan sent cada vegada més emprades, degut a les seves nombroses avantatges, entre les quals es troben les següents:

- La **bioseguretat**. Les cèl·lules de mamífer i de plantes no permeten la replicació dels baculovirus (vectors vírics), i pel contrari, les cèl·lules d'insecte no permeten la replicació d'altres virus. Per tant, aquest sistema és relativament segur.
- L'elevada **producció** de la proteïna recombinant. Els sistemes d'expressió basats en l'ús de baculovirus permeten obtenir elevats nivells de síntesi de les proteïnes recombinants sota el promotor de la polihedrina.
- L'**elevat creixement** cel·lular. El temps de duplicació de les cèl·lules d'insecte (12-15 h) és un 50% inferior al de moltes cèl·lules de mamífers (24h). Les cèl·lules d'insecte, alhora, poden créixer fins a majors densitats cel·lulars ($5\cdot 9\cdot 10^6$ cèl·lules/ml) degut a que

no són susceptible a la inhibició per contacte. No requereixen CO₂ pel seu cultiu i es poden adaptar tant al creixement en monocapa com en suspensió.

- El medi pot ser **lliure de sèrum**. En cas contrari, en ocasions podria interferir en les anàlisis bioquímiques posteriors.
- Permet **modificacions post-traduccionals**. Aquestes modificacions poden afectar a la activitat específica de la proteïna, així com a la seva solubilitat, estabilitat, recanvi i immunogenicitat.

El requeriment per part de molts enzims, de modificacions post-traduccionals fan necessària la seva expressió en cèl·lules eucariotes, per tal d'obtenir una proteïna conformacionalment activa. Actualment, existeixen diversos sistemes d'expressió que resolen aquest conflicte. Entre ells es troba l'emprat en el present treball, el qual es basa en l'expressió de la sulfamidasa salvatge i de diversos mutants en cèl·lules Sf9.

Històricament, l'únic mètode per a la generació de baculovirus recombinants necessaris per a l'infecció de les cèl·lules Sf9 i, en conseqüència, per a la producció de les proteïnes recombinants, requeria una recombinació homòloga entre el vector portador del cDNA i el genoma del virus. Des de fa alguns anys, han estat desenvolupades noves estratègies que permeten l'obtenció de bàcmids recombinants mitjançant recombinació de lloc específic i l'ús de vectors bacterians. D'aquesta manera el DNA del virus recombinant (bàcmid) pot ser aïllat directament

a partir de colònies bacterianes (anomenades DH10Bac) abans de procedir a la infecció de les cèl·lules d'insecte. Per tant, la progènie de virus que es genera és pura (veure resultats, capítol 4). Per contra, en el cas de la recombinació homòloga, durant l'infecció de les cèl·lules d'insecte s'obté una barreja de virus salvatges i recombinants. Aquest fet provoca que sovint siguin necessàries diverses rondes de purificació per a l'aïllament dels virus recombinants.

El sistema d'expressió "*Bac-to-Bac baculovirus expression system*" emprat en el present treball és, per tant, un sistema innocu pel manipulador, repetible i potent, que permet l'obtenció de grans quantitats de la proteïna expressada. Existeix, a més a més, la possibilitat de purificar la proteïna de treball en funció del vector emprat (pFastBac).

La caracterització de les mutacions causants de la MPS IIIA ens pot aportar informació sobre la localització dels residus i regions més importants per a l'activitat de la sulfamidasa, previ de la caracterització de l'estructura de l'enzim per raigs X.

Entre els pacients d'origen espanyol analitzats pel nostre grup s'han identificat, com a mutacions responsables de la MPS IIIA, 14 canvis diferents. D'aquests, vuit han estat expressats en el present treball (veure resultats, capítol 4). Aquests canvis són els següents: S66W, R74H, Q85R, R206P, L386R, R433Q, R433W i c.1079delC. També han estat expressades les dues variants del polimorfisme

R456H i els controls negatius pertinents. El fet d'escollir unes mutacions i no altres, bé condicionat per la seva importància relativa dintre del nostre estudi. La S66W és la més freqüent entre els pacients d'origen italià i la segona entre els espanyols (7,7%). La c.1079delC (abans c.1091delC) és la majoritària entre els pacients d'origen espanyol (36,5%). La R74C és la més freqüent a Polònia i, tot i no trobar-se entre els pacients analitzats per nosaltres, sí s'ha localitzat un canvi diferent que afecta aquest mateix residu, és el R74H. Les restants, en canvi, han estat escollides pel fet d'haver estat descrites per primera vegada entre els pacients espanyols.

El sistema escollit per a l'expressió heteròloga de la sulfamidasa, com ja hem comentat, és el "*Bac-to-Bac baculovirus expression system*". Actualment existeixen alguns estudis sobre l'efecte de diverses mutacions responsables de la MPS IIIA sobre l'activitat i estabilitat de la sulfamidasa humana. Aquests estudis han estat realitzats emprant cèl·lules CHO (Bielicki i col., 1996; Perkins i col., 1999) o COS (Esposito i col., 2000), mentre que el present treball, és el primer en realitzar estudis d'expressió de la sulfamidasa humana emprant cèl·lules d'insecte, concretament les Sf9.

Les diferents mutacions analitzades s'han obtingut per mutagènesi dirigida sobre el cDNA de la sulfamidasa portador de la variant adenina pel polimorfisme c.1367G>A (R456H), assumint que ambdues variants presenten característiques bioquímiques i nivells d'activitat específica equivalents. L'altra variant del polimorfisme també s'ha

analitzat per a comprovar-ho, degut a que a l'inici del present treball aquest fet no havia estat demostrat.

Els nostres resultats posen de manifest que les diferents mutacions estudiades presenten molt poca o nul·la d'activitat, demostrant clarament la seva patogenicitat. Aquests resultats són coherents amb els baixos nivells d'activitat detectats en els fibroblasts dels pacients portadors d'aquestes mutacions.

S66W (c.197C>G). La mutació S66W, com ja hem comentat, és la més freqüents entre els pacients italians i la segona entre els espanyols. Ha estat expressada prèviament per Perkins i col. (1999) en cèl·lules CHO, comprovant que manté un cert nivell d'activitat específica, d'un 15% respecte la proteïna salvatge.

Aquest canvi d'aminoàcid d'una serina per un triptòfan, suposa passar d'un aminoàcid hidrofílic a un d'hidrofòbic. Com ja hem comentat anteriorment, per comparació de seqüència amb altres sulfatases, es coneix la situació de dues regions consens que estarien implicades en l'activitat de les proteïnes. El codó 66, no es troba a cap d'aquestes dues regions consens. Per comparació de seqüència amb l'ARSB (Bhattacharyya i col., 2001), aquest aminoàcid no es creu que pugui formar part del centre actiu de la sulfamidasa. Tot això, explicaria el fet que la proteïna mutada portadora de l'al·lel S66W expressada en cèl·lules Sf9 en el present treball mantingui certs nivells d'activitat, d'un 10% respecte la proteïna salvatge (un 13% si corregim amb el CRIM). Aquests resultats són coherent amb el

fet de que alguns pacients homozigots per aquesta mutació presentin un fenotip intermedi per la malaltia.

R74H (c.223G>A). La mutació R74H no ha estat expressada per cap altre grup fins el moment. Recordem que es tracta d'un residu altament conservat i es troba a la primera regió consens de les sulfatases. Es creu que estaria implicat en la formació i estabilització del centre actiu (Bond i col., 1997). L'expressió d'aquest al·lel mutat en cèl·lules Sf9, ens demostra que la proteïna mutada és sintetitzada i processada però que no presenta una activitat sulfatasa detectable.

Perkins i col. (1999) han expressat l'al·lel R74C, obtenint un 12% d'activitat específica. Els nostres resultats, en canvi, revelen una manca total d'activitat de l'enzim portador d'una histidina en aquesta posició. Aquest fet ens fan pensar que la substitució d'una arginina per una histidina, en aquest residu, resulta més dràstica sobre l'activitat de la sulfamidasa que el canvi d'una arginina per una cisteïna. El fet que l'arginina i la histidina siguin aminoàcids bàsics (hidrofílics) i, per contra, la cisteïna sigui un aminoàcid no polar (hidrofòbic), no explica aquesta diferència en l'activitat de la proteïna mutada. Podríem pensar, però, que l'existència de l'anell *imidazol* en la cadena lateral de la histidina seria d'alguna manera la responsable d'aquesta diferència en l'activitat de l'enzim.

Q85R (c.254a>G). La mutació Q85R ha estat trobada en homozigosi en un únic pacient

espanyol, l'SFA-11, el qual presentava uns nivells d'activitat sulfamidasa no detectables.

Amb la seva expressió *in vitro*, els resultats obtinguts de l'anàlisi dels *westerns blots*, ens demostren que la proteïna tot i ser processada (veure resultats, capítol 4), no presenta activitat enzimàtica.

La mutació Q85R suposa el canvi d'un aminoàcid neutre, la glutamina, per un de bàsic, l'arginina; ambdós hidrofílics. Aquesta diferència de càrrega juntament a la seva elevada proximitat a la primera regió consens de les sulfatases, així com, a algun dels aminoàcids del centre actiu, és el que d'alguna manera provocaria la pèrdua d'activitat de l'enzim.

R206P (c.617G>C). L'anàlisi de mutacions realitzada en el present treball, ens revela l'existència de la mutació R206P en dos pacients heterozigots compostos (SFA-4 i SFA-12). La segona mutació en ambdós pacients és la mateixa, la c.1079delC. El canvi R206P ha estat també detectat en un altre estudi realitzat sobre pacients d'origen italià (Esposito i col., 2000). Els autors d'aquest treball han diagnosticat un pacient homozigot per la mutació i amb un fenotip intermedi. L'expressió de la mutació en cèl·lules COS realitzat per aquest grup, demostra que la mutació té nivells d'activitat propers a zero; mentre que l'expressió de la mutació realitzada pel nostre grup amb cèl·lules Sf9 ens demostra que la proteïna presenta uns nivells d'activitat del $18\% \pm 9\%$ respecta als nivells de la proteïna salvatge. Aquestes diferències podrien

ser degudes a diferències en els sistemes d'expressió cel·lulars. Malgrat això, degut al baix nombre d'estudis d'expressió realitzats fins el moment sobre la sulfamidasa, desconeixem realment si la causa podria ser aquesta.

La baixa, però detectable, activitat sulfamidasa trobada en el nostre estudi podria explicar que el pacient italià homozigot per la mutació R206P presenti un fenotip intermedi de la MPS IIIA. Val a dir, però, que amb l'estudi d'un únic pacient homozigot per la mutació no podem establir correlacions genotip-fenotip, i que caldrà, per tant, esperar a l'existència de nous estudis sobre pacients amb la MPS IIIA per arribar a saber si la R206P és realment una mutació causant d'un fenotip intermedi.

Per tal d'entendre com aquesta mutació afecta l'activitat de la sulfamidasa cal tenir en compte que: (i) per una banda, la mutació R206P presenta un canvi no conservatiu que provoca la substitució d'un aminoàcid bàsic per un de no polar, passant així d'un aminoàcid hidrofílic a un d'hidrofòbic; (ii) i, per un altra, que és l'únic residu dels analitzats en el present treball que no es troba conservat respecta la seqüència de ratolí (veure introducció, figura 4). Tenint en compte aquest darrer punt, i el fet de que el residu Arg206 no es trobaria proper al centre actiu, esperaríem que la mutació tingués un efecte menys dràstic sobre l'activitat N-sulfatasa que la resta de les mutacions analitzades.

L386R (c.1157T>G). La mutació L386R ha estat detectada en homozigosi en un únic pacient d'origen espanyol (SFA-6).

Els valors d'activitat enzimàtica obtinguts *in vitro* amb l'expressió de la proteïna mutada en cèl·lules Sf9 (0,9% ± 3,7% respecte a la proteïna salvatge; i 2,3% ± 3,2% amb la correcció del CRIM) es correlacionen bé amb els valors obtinguts en el diagnòstic bioquímic del pacient a partir de fibroblasts (3,4% del valor control).

Per explicar com la present mutació compromet tant dràsticament l'activitat de la sulfamidasa, cal dir que es tracta d'un canvi no conservatiu, que provoca la substitució d'un aminoàcid no polar (hidrofòbic) per un de bàsic (hidrofilic). A més a més, val a dir que aquest residu tot i trobar-se en una regió poc conservada entre les tres sulfamidases descrites fins el moment (humana, canina i murina) (veure introducció, figura 4) es troba conservat.

R433W (c.1297C>T) i R433Q (c.1298G>A).

Dues substitucions diferents afecten el residu Arg433 entre el grup de pacients espanyols estudiat. La primera d'elles implica la substitució de l'Arg433 per un triptòfan (SFA-14), i la segona, per una glutamina (SFA-20 i SFA-28). Tant *in vivo* com *in vitro* els nivells d'activitat trobats per ambdues mutacions són pràcticament nuls.

Els dos pacients heterozigots per aquesta darrera substitució, presenten la mateixa mutació en l'altre al·lel, la c.1079delC. Es tracta de dos canvis no conservatius. En el cas de la mutació R433W, suposa la substitució

d'un aminoàcid bàsic (hidrofilic) per un no polar (hidrofòbic); mentre que la mutació R433Q comporta un canvi cap a un aminoàcid també polar però neutre. El residu està situat en una posició conservada entre les sulfamidases estudiades, tot i que es troba prop de l'extrem carboxi-terminal de la proteïna, on es localitza la zona menys conservada entre les sulfatases.

D'elles únicament el canvi R433W ha estat analitzat recentment per un altre grup, demostrant mitjançant marcatge metabòlic una ràpida degradació de la proteïna mutant a nivell del reticle endoplasmàtic (Muschol i col., 2004).

c.1079delC. Com ja hem comentat anteriorment, la c.1079delC (abans anomenada c.1091delC) és la mutació més freqüent entre els pacients espanyols i creiem que tindria un origen únic degut a que tots els al·lells portadors de la mutació es troben en el mateix context haplotípic [T, T, +ins, G].

Aquesta deleció comporta el canvi de la pauta de lectura i, com a conseqüència, la creació d'un codó d'aturada prematura en posició 411. Fet que provoca la pèrdua dels darrers 91 aminoàcids de la proteïna.

Mitjançant la seva expressió en cèl·lules Sf9, observem que la proteïna és sintetitzada i processada, obtenint-se dues bandes en els *westerns blots* que creiem es corresponen amb la proteïna precursora (superior) i la madura (inferior). La intensitat de dites bandes és inferior a la de la resta de les proteïnes expressades, fet que ens fa pensar que la pèrdua de part de l'extrem carboxi-terminal de

l'enzim estaria afectant a la seva l'estabilitat. Aquesta menor intensitat de les bandes també podria ser deguda a un menor reconeixement de la proteïna per part de l'anticòs. Val a dir però, que no s'ha descrit que l'anticòs policlonal usat per a la detecció de la sulfamidasa reconegui de manera diferencial els diferents mutants.

En les anàlisis de *western blot*, també hem observat que la quantitat relativa de proteïna madura és inferior (21%) a la detectada per la resta de mutants (38% de mitjana). Indicant un menor processament de la proteïna.

Al corregir els valors de l'activitat enzimàtica obtinguda per la proteïna portadora de la mutació c.1079delC amb el valor de CRIM, observem un increment en el valor de l'activitat específica. Aquest increment, però, no seria degut a una menor producció del clon emprat per a l'expressió sinó degut o bé a un menor reconeixement o bé a una major inestabilitat de l'enzim. Creiem, per tant, que la correcció pel valor del CRIM no seria aplicable en aquest cas.

4- CORRELACIÓ GENOTIP-FENOTIP

Les anàlisis moleculars i els estudis d'expressió són generalment útils per a establir correlacions entre la naturalesa de les mutacions i les característiques clíniques de les malalties, és a dir, per establir correlacions

genotip-fenotip. Aquestes correlacions només és possible establir-les de manera consistent quan es disposa d'un elevat nombre de pacients amb el mateix genotip.

Per el cas de la MPS IIIA, els genotips més freqüents són diferents en funció de les zones geogràfiques estudiades. Aquest fet pot dificultar aquestes correlacions degut a que el nombre de pacients amb el mateix genotip serà, per tant, relativament petit.

En les mostres analitzades pel nostre grup, tots els pacients presenten un transcurs de la malaltia sever, caracteritzat per una degeneració severa del sistema nerviós central que dona com a resultat un retard mental progressiu.

Els nivells d'activitat obtinguts de l'expressió de les mutacions S66W, R74H, Q85R, R206P, L386R, c.1079delC, R433W i R433Q, es correlacionen amb els nivells d'activitat sulfamidasa obtinguts *in vivo* per cadascun dels pacients que presenten aquests canvis. Tots ells tenen nivells d'activitat baixos, entre el 7,5% i 0,0% (veure resultats, capítol 4).

Dos pacients presenten els valors més elevats. Un és l'SFA-15 (7,0%), que presenta el genotip S66W/R74H, i el segon és l'SFA-2 (7,5%), que presenta la mutació c.1079delC en homozigosi.

El fet de que el pacient SFA-15 presenti un cert nivell d'activitat sulfamidasa podria deure's a la presència de la mutació S66W en heterozigosi, la qual com ja hem comentat presenta nivells d'activitat sulfamidasa detectables en la seva expressió *in vitro*. L'existència de pacients italians homozigots

per aquesta mutació amb un fenotip intermedi per la MPS IIIA és concordant amb aquests resultats.

El pacient SFA-2, és el que presenta un nivell d'activitat més elevat dintre de la sèrie de pacients dels quals es disposa de l'activitat sulfamidasa. Existeixen altres pacients amb el mateix genotip, amb valors d'activitat similars o inferiors (6,0/3,2/1,2). Aquestes diferències creiem que podrien ser degudes a petites diferències en la mesura de l'activitat sulfamidasa, tot i que també podrien respondre a diferències en el fons genètic de cada pacient. Analitzant tots els pacients descrits fins el moment en els diferents estudis realitzats, resulta fàcil comprovar que la majoria d'ells presenten un fenotip sever (revisat per Yogalingam i Hopwood, 2001). Només un reduït nombre de pacients presenten un fenotip associat a un curs intermedi de la malaltia. I únicament 5, a un curs lleu. Els genotips d'aquests pacients s'indiquen a la taula 4. El baix nombre de pacients amb un fenotip lleu podria estar en relació amb el fet de que la clínica d'aquests pacients podria passar desapercibuda o no associar-se amb la MPS IIIA.

Analitzant aquesta taula i, malgrat el reduït nombre de pacients que trobem en ella, es possible establir algunes correlacions. Les mutacions S66W, R206P i G122R estarien associades a un fenotip intermedi de la MPS IIIA, i la I322S a un fenotip lleu. Tanmateix, per a que aquestes correlacions genotip-fenotip puguin ser confirmades caldrà veure si es mantenen amb la descripció de nous pacients

amb aquests genotips o pel contrari el fenotip observat per aquestes pacients és el resultat d'altres factors, com els ambientals. En aquest sentit, cal tenir en compte que la S66W ha estat detectada en homozigosi en pacients que presenten un fenotip sever. Aquestes diferències fenotípiques podrien ser degudes a diferents factors: ambientals (com ja avançàvem), diferències en el fons genètic o, fins i tot, diferències en els criteris de classificació, entre altres.

Taula 4: Genotips dels pacients amb fenotips intermedi i lleu. Cadascun d'aquests genotips han estat detectats en un únic pacient, excepte la S66W en homozigosi (associada a un fenotip intermedi en 3 de 6 pacients) i la combinació P128L/E369K (detectada en dos pacients).

GENOTIP	FENOTIP	REFERÈNCIA
Y40N/?	Intermedi	Di Natale i col., 1998
S66W/S66W	Intermedi (3/6)	Di Natale i col., 1998
R74C/E369K	Intermedi	Esposito i col., 2000
G122R/G122R	Intermedi	Di Natale i col., 1998
D235V/G122R	Intermedi	Di Natale i col., 1998
Q380R/?	Intermedi	Weber i col., 1997b
R182C/?	Intermedi	Di Natale i col., 1998
R206P/R206P	Intermedi	Esposito i col., 2000
P128L/E369K	Lleu	Di Natale i col., 1998
P128L/E369K	Lleu	Di Natale i col., 2003
R254R/S298P	Lleu	Bunge i col., 1997
I322S/I322S	Lleu	Beesley i col., 2000
S347F/D444G	Lleu	Miyazaki i col., 2002

Recentment, ha estat diagnosticat l'únic pacient afecta per la MPS IIIA sense manifestacions neurològiques (Van Hove i col., 2003). En aquest darrer pacient, però, no han estat identificades les mutacions responsables de la MPS IIIA i s'especula que la causa de la malaltia podria trobar-se en l'existència d'algun error en la modificació post-traducional de la proteïna o en el seu processament o, fins i tot, en la presència d'un inhibidor intracel·lular (Van Hove i col., 2003). En alguns casos les diferències fenotípiques trobades en els pacients no semblen estar en concordança amb les diferències observades en l'activitat enzimàtica. És el cas de dos pacients analitzats per Beesley i col. (2000) amb els genotips següents: (i) I322S en homozigosi (fenotip lleu) i, (ii) V486F també en homozigosi (fenotip sever). El primer pacient no presenta una activitat N-sulfatasa detectable mentre que en el segon es detecten baixos nivells d'activitat. Es desconeix fins el moment les causes d'aquestes incongruències.

Cal destacar que les correlacions que puguem fer actualment, poden estar subjectes a canvis

en funció dels criteris que es facin servir per a definir quan un pacient presenta un fenotip sever, intermedi o lleu. També és important saber com les teràpies pal·liatives existents fins el moment poden alterar el fenotip final dels pacients.

En els propers anys, caldrà aprofundir en el coneixent de les mutacions causants de la MPS IIIA, en la seva patogenicitat i en el seu efecte sobre la funció enzimàtica per tal d'arribar a entendre la patofisiologia de la malaltia i arribar a establir bones correlacions genotip-fenotip. Aquestes correlacions són importants pel consell genètic i també poden ser-ho per a l'avaluació de teràpies encaminades a curar o pal·liar les conseqüències de la manca d'activitat de l'enzim N-sulfoglucosamina sulfohidrolasa (SGSH).

MALALTIA DE GAUCHER

1- EXPRESSIÓ D'AL·LELS MUTATS

La malaltia de Gaucher és un trastorn hereditari d'acumulació lisosòmica, produït de forma majoritària per un defecte en el gen que codifica per l'enzim β -glucosidasa àcida o glucocerebrosidasa (GBA). Com a conseqüència d'aquest defecte es produeix la impossibilitat de trencar els enllaços glucosilceramida i l'acumulació dels glucocerebròsids a l'interior dels macròfags.

La classificació de la malaltia de Gaucher en els tipus I, II i III, respon a criteris estrictament clínics, basats en la presència (tipus II i III) o absència (tipus I) d'afectació del sistema nerviós central dels pacients. El motiu d'aquestes diferències no està clar fins el moment. Requereix un millor coneixement sobre els mecanismes que intervenen en l'expressió gènica i en la fisiopatologia de la malaltia. L'expressió de les mutacions causants de la malaltia de Gaucher ens pot ajudar a augmentar els coneixements que tenim sobre algun d'aquests aspectes.

L'estudi de l'espectre mutacional de la malaltia de Gaucher en la població de pacients espanyols fou caracteritzat en treballs anteriors realitzats pel nostre grup i pel grup dels doctors Pilar Giraldo i Miguel Pocoví de Saragossa. Les dades d'ambdós grups han servit per a crear el "Registro Español de Enfermedad de

Gaucher" (REEG). Aquest registre recull les dades demogràfiques, enzimàtiques i genètiques, clíniques, analítiques i d'imatge dels pacients diagnosticats anualment a Espanya (Giraldo i col., 2000).

Algunes de les mutacions que formen part d'aquest registre es trobaven ja ben caracteritzades a l'inici del present treball, mentre que altres han estat caracteritzades en el mateix.

És possible que determinades mutacions condicionin la presència d'una activitat enzimàtica residual suficient per la hidròlisi dels gangliòsids cerebrals, quedant llavors el sistema nerviós lliure de símptomes, i donant lloc a les formes no neuronopàtiques de la malaltia. Pel contrari, la manca quasi total d'activitat enzimàtica seria la responsable de l'acumulació de glicosilceramida als macròfags i a les neurones del cervell i, per tant, de l'aparició de les formes neuronopàtiques de la malaltia (Kaminsky i col., 1996).

Determinar l'efecte precís d'una mutació en les propietats d'un enzim resulta impossible a partir de teixits de molts pacients. És sobretot en aquest context quan es fa necessari l'ús de sistemes d'expressió que ens permetin obtenir informació sobre cadascun dels al·lels responsables de la malaltia en un pacient determinat. Concretament, hem expressat tretze mutacions diferents, un control salvatge i dos controls negatius (veure resultats, capítol 1). Les mutacions expressades són les següents: P182L, N188S, R257X, Y313H, E326K, N370S, P391L, N392I, I402T, D409H, L444P

i els dobles mutants [N188S;E326K] i [L444P;E326K].

A l'inici del present treball ja coneixíem que l'expressió de la β -glucosidasa àcida en cèl·lules d'insecte era no només possible sinó que donava bons resultats. Coneixíem que s'obtenia una elevada producció de l'enzim recombinant, el qual també sabíem que mantenia les seves propietats cinètiques, catalítiques i immunològiques (Grabowski i col., 1989; Beutler, 1995; Amaral i col., 2000). Tenint en compte aquests factors, van escollir expressar l'enzim GBA en cèl·lules d'insecte emprant el mateix sistema d'expressió que per a l'obtenció de la sulfamidasa recombinant, el "Bac-to-Bac baculovirus expression system".

Les mutacions expressades han estat escollides seguint diferents criteris. Per una banda, les mutacions N370S i L444P, són les més prevalents en la població general i han estat expressades per molts grups. Per aquest fet resulten útils per a finalitats comparatives (veure resultats, capítol 5). Les mutacions dobles han estat escollides per a comprovar l'efecte que podia tenir el canvi E326K sobre l'activitat de la proteïna GBA portadora d'una altra mutació. La D409H ha estat també expressada en el present treball per l'interès que presenta el fenotip que porta associat en homozigosi. La resta són mutacions identificades en la sèrie de pacients espanyols analitzats prèviament (a excepció de la I402T trobada en un pacient italià) però no caracteritzades.

Recentment Dvir i col. (2003) han determinat l'estructura de la GBA. El domini catalític el

formen 8 làmines β i 8 hèlix α , estructurades en forma de *TIM barrel* tal com s'havia predit (Theophilus i col., 1989). L'Asn370 es troba localitzada en una hèlix α situada en la interfase entre el *TIM barrel* i un domini *immunoglobulin-like*, en el qual es troba l'aminoàcid Leu444. La localització de les mutacions expressades en el present treball es troba indicada a la figura 6.

A diferència de l'estudi anterior sobre mutacions responsables de la MPS IIIA, on la majoria de les proteïnes mutades presentaven una activitat sulfamidasa pràcticament nul·la, en l'anàlisi dels mutants de la GBA trobem una major diversitat en els resultats. Els nivells d'activitat enzimàtica dels diferents mutants es poden classificar entre nuls, intermedis i moderats.

P182L (c.662C>T). La mutació P182L ha estat recentment identificada en un pacient espanyol de tipus II. Els resultats de l'expressió en cèl·lules Sf9 de la GBA portadora d'aquest canvi, ens demostren que l'enzim no presenta activitat enzimàtica. A més a més, sota les nostres condicions de treball, en les anàlisis dels *westerns blots*, es detecta una menor quantitat d'enzim respecte a la proteïna salvatge. Aquesta menor detecció observada per aquest al·lel així com per altres, podria ser deguda a: (i) una menor producció del clon emprat per a fer les expressions, (ii) a un menor reconeixement de l'enzim mutat per part de l'anticòs, o (iii) a una major inestabilitat de la proteïna mutada amb aquest canvi.

La primera hipòtesi podríem analitzar-la fàcilment realitzat noves expressions amb diferents clons del bàcmid recombinant amb el gen GBA mutat en aquesta posició. Les diferències ocasionades per les diferències en la producció dels clons poden, però, ser corregides amb els valors de CRIM que s'obtenen de l'anàlisi dels *westerns blots*.

Per altre banda, sabem que l'anticòs policlonal emprat en el nostre estudi reconeix de manera desigual els diferents mutants (Pasmanik-Chor i col., 1997). Tenint en compte aquest fet, la segona hipòtesi també podria ser correcta.

Sabem que l'aminoàcid prolina és responsable, en general, de la formació de colzes en l'estructura de les proteïnes. Podria ser, per tant, que la seva substitució per una leucina en la GBA provoqués canvis en l'estructura de la proteïna i, en conseqüència, disminuís l'estabilitat de l'enzim. Aquest seria, també, coherent amb les dades obtingudes a partir de les anàlisis de *western blots*. La menor estabilitat de l'enzim podria ser la causant de la davallada en l'activitat glucocerebrosidasa, però faran falta més estudis per a determinar aquest fet.

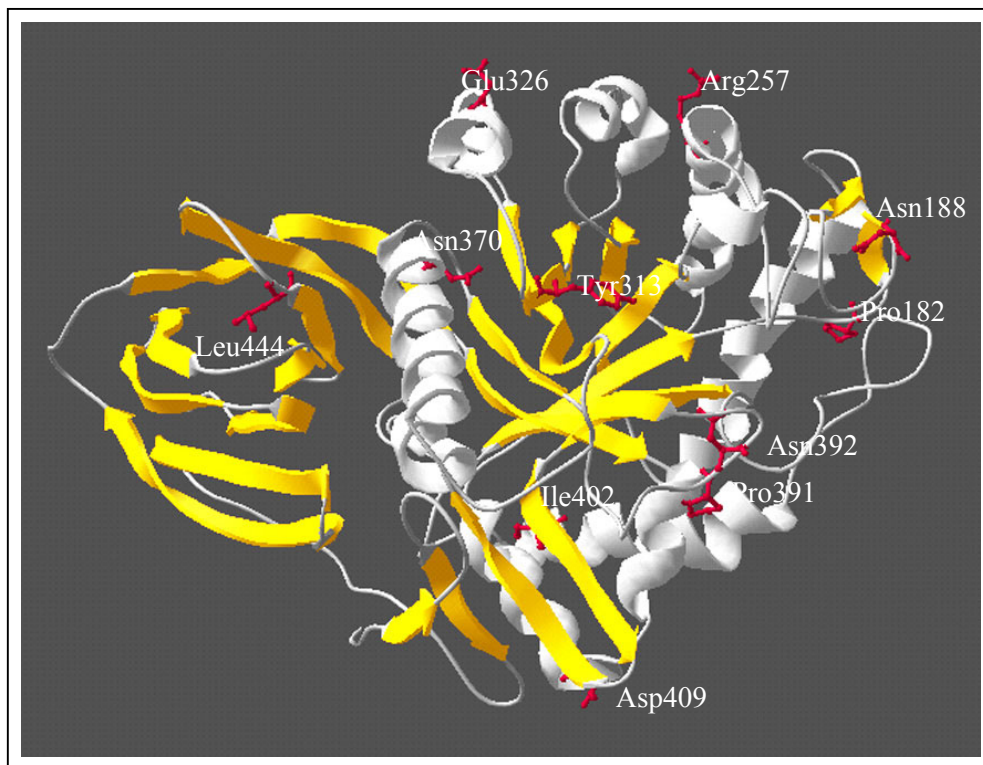


Figura 6: Estructura tridimensional de la β -glucosidasa àcida. Localització dels residus mutats analitzats en el present treball

R257X (c.886C>T). Amb la presència de la mutació R257X, la qual provoca la generació d'un codó d'aturada a l'exó 7, esperàvem l'obtenció d'una proteïna truncada d'uns 35 kDa i, com a conseqüència, la pèrdua dràstica de l'activitat de l'enzim.

La síntesi de la proteïna portadora d'aquesta mutació ha estat detectada per *western blot*, (carregant una major quantitat de proteïna total) amb l'obtenció d'una banda de la mida esperada. En ocasions, per sota d'aquesta banda se n'observen altres de mida inferior que correspondrien a la degradació de la proteïna truncada.

La seva activitat ha estat mesurada amb l'ús del substrat artificial 4-MU-Glu, com la resta dels mutants, sense que s'hagin obtingut nivells detectables d'activitat, tal com era d'esperar.

Y313H (c.1054T>C). La substitució d'una tirosina per una histidina en el residu 313, s'havia predit que provocava la disrupció d'una làmina β (Cormand i col., 1996). L'existència d'aquesta làmina ha estat recentment confirmada amb l'anàlisi estructural de l'enzim (Dvir i col., 2003). És la β_6 , una de les que constitueixen el centre actiu de la GBA. Segons Dvir i col·laboradors, aquest residu estaria implicat en el reconeixement del substrat.

Els nostres resultats en demostren que la proteïna és sintetitzada i processada, però que la seva activitat és nul·la. Resultats que són coherents amb la possible manca de reconeixement del substrat.

Amb tot això esperem que aquest canvi estigui associat a un fenotip sever per la malaltia. Val a dir, però que el fenotip final dependrà de l'activitat i el tipus de mutació present en l'altre al·lel.

N370S (c.1226A>G). L'expressió de la β -glucosidasa àcida portadora de la mutació N370S ha estat realitzada per bastants grups, degut a la importància que representa pel conjunt de pacients afectes per la malaltia de Gaucher.

En les nostres condicions de treball, l'al·lel N370S presenta una activitat enzimàtica moderada (7,5% respecta a la salvatge; 11,6% si corregim amb el valor del CRIM), observada també per altres autors (veure resultats, capítol 5). Aquest valor d'activitat enzimàtica és semblant a la que s'obté en l'expressió dels mutants amb la D409H o la L444P, els quals s'associen preferentment amb les formes neuronopàtiques, quan es troben en homozigosi.

S'ha suggerit que la baixa activitat enzimàtica de l'al·lel N370S és dependent de les condicions de pH en que es faci la mesura de l'activitat (Vanweely i col., 1993). Després d'avaluar l'activitat de l'enzim mutat sota diferents condicions de pH vam observar que no existeixen diferències significatives entre els valors de pH compresos entre 5,0 a 5,7.

Amb la determinació de l'estructura tridimensional de la β -glucosidasa àcida, s'ha determinat que el residu Asn370 es troba en una hèlix α situada a la interfase entre el domini II i el domini III. La seva substitució

per una serina, comporta un canvi conservatiu d'aminoàcid. La detecció de certs nivells d'activitat enzimàtica és coherent amb aquests dos aspectes.

Les diferències en l'estabilitat dels diferents al·lels mutats amb valors d'activitat semblants, com l'N370S, la D409H o la L444P, podria explicar el fet de que la mutació N370S no s'associï amb les formes neuronopàtiques de la malaltia, mentre que els altres dos al·lels sí.

P391L (c.1289C>T). El residu Pro391 es troba situat al primer domini, en un *loop* format per 16 aminoàcids (de Trp381 a Asn396). La seva substitució per una leucina, ambdós hidrofòbics, no explica la dràstica disminució en l'activitat enzimàtica detectada en la seva expressió. Cal tenir en compte, però, que la prolina és un aminoàcid important per a la formació de colzes i que, en conseqüència, la seva substitució per una leucina podria ser important per a l'estructura de la GBA. Tanmateix, el fet d'expressar-se en quantitats equivalents a la de l'al·lel salvatge ens indica que l'estabilitat de l'enzim no es veu afectada en les nostres condicions de treball (veure resultats, capítol 5). Per tant, tot i creure que l'estructura de l'enzim es podria veure afectada i, en conseqüència, l'estabilitat compromesa, aquest fet no queda reflectit en les anàlisis de *western blots*.

N392I (c.1292A>T). La mutació N392I es troba en el mateix *loop* que comentàvem anteriorment i provoca un canvi no conservatiu d'aminoàcid. L'efecte sobre l'activitat de

l'enzim GBA és tant dràstic com en el cas anterior. S'observa, altrament, una disminució en la intensitat de les bandes corresponents a aquest mutant en l'anàlisi de *western blot* igual que per al cas la P182L.

El fet que les mutacions P391L i N392I es trobin en residus consecutius i ambdós anul·lin totalment l'activitat glucocerebrosidasa pot ser que no tingui cap relació però també podria ser que aquest *loop* jugui algun paper important per a l'activitat de l'enzim que fins el moment desconeixem (reconeixement d'activadors, per exemple).

I402T (c.1322T>C). La mutació I402T fou detectada per primera vegada pel nostre grup en un pacient italià de tipus I (Cormand i col., 1997). Pel fet de trobar-se en homozigosi en un pacient de tipus I, pressuposem que es tracta d'una mutació associada a un fenotip suau i que els nivells d'activitat de l'enzim seran relativament elevats.

El residu Ile402 es troba en una làmina β del domini I, per tant, allunyat del centre actiu de la GBA. La seva substitució per una treonina comporta el pas d'un aminoàcid hidrofòbic a un d'hidrofílic.

Els resultats de l'expressió demostren que l'enzim GBA portador d'aquest canvi presenta uns nivells d'activitat intermedis, semblants als que presenta la mutació N370S.

La detecció de la proteïna mutada amb l'anticòs policlonal, ens revela l'existència d'un patró de bandes de menor intensitat respecte el control normal. Podria ser, per tant, que el canvi d'aminoàcid desestabilitzés la

proteïna tot i que aquesta conservaria certs nivells d'activitat glucocerebrosidasa en les nostres condicions de treball. Caldria, però, esperar a disposar de més dades sobre l'estabilitat de la proteïna mutada, el seu transport o el seu plegament per a conèixer exactament les causes de la disminució de l'activitat i de la menor detecció del patró de bandes la proteïna.

D409H (c.1342G>C). La tercera mutació amb una prevalença relativament elevada en les mostres analitzades pel nostre grup és la D409H. Com ja hem comentat anteriorment (veure introducció, malaltia de Gaucher, correlacions genotip-fenotip), en homozigosi, es presenta associada a un fenotip particular caracteritzat per calcificacions vasculares (Abrahamov i col., 1995; Chabás i col., 1995). Presenta una activitat enzimàtica *in vitro* del 9,2% respecta a la proteïna normal, valor que és intermedi entre els obtinguts per Hodanova i col., (2003) i Pasmanik-Chor i col., (1997) (veure resultats, capítol 5).

Implica la substitució d'un aminoàcid àcid per un de bàsic (ambdós hidrofílics) en un residu situat en l'extrem d'una de les làmines β (Asp409-Gln414) del domini I i, per tant, allunyat del centre actiu de la GBA. Es creu que aquest canvi pot afectar a l'estabilitat de la proteïna així com a l'estabilitat de l'RNA (Pacmanik-Chor i col., 1997) i, en conseqüència, aquestes serien les causes de disminució de l'activitat GBA.

E326K (c.1093G>A), N188S (c.680A>G), L444P (c.1448T>C). Les mutacions N188S, E326K i L444P, han estat expressades individualment així com de forma conjunta en els dobles mutants [N188S;E326K] i [L444P;E326K] presents en els pacients I.22 i II.12, respectivament.

Els resultats obtingut en l'expressió de la mutació **L444P** (14.1%) ens mostren que l'enzim manté uns nivells d'activitat moderats. Els resultats obtinguts per altres autors van del 2,0 al 18,1% de l'activitat de l'enzim salvatge. Els nostres, són comparables als obtinguts per Pasmanik-Chor i col. (1997), segons els quals el nivell d'activitat de l'enzim associat a la mutació L444P és lleugerament superior a la de la N370S. En qualsevol cas, l'expressió *in vitro* d'aquests mutants ens demostra que no és possible explicar les diferències fenotípiques associades a ambdós al·lels a partir dels valors de l'activitat enzimàtica obtinguda. Cal, per tant, avaluar altres factors, com l'estabilitat, el transport i la seva activitat intracel·lular.

La mutació L444P juntament amb la V394L i la R463C, s'ha comprovat que tenen una baixa resposta als lípids carregats negativament, fet que suggereix que es trobarien en una regió de l'enzim important per a l'interacció amb aquests lípids (Grace i col., 1994). Dos d'aquests residus, un d'ells la Leu444, es troben situats al domini II de la GBA, i estructuralment molt propers (figura 7).

Per altra banda, l'enzim portador de la mutació L444P, s'ha comprovat que té una menor estabilitat que la proteïna normal (Pacmanik-Chor i col., 1997). També s'ha especulat que el

residu Leu444 tindria un paper important en la regulació i l'estructuració del domini en el qual es troba (Dvir i col., 2003).

Tots aquests punts ens permeten entendre parcialment la importància que té aquest residu sobre l'activitat de la proteïna GBA. Encara ens falta, però, saber: com la seva substitució per una prolina afecta el domini II?, on es degradada la proteïna?, interacciona no només amb lípids carregats negativament, sinó també amb la SAP-C?, entre altres qüestions.

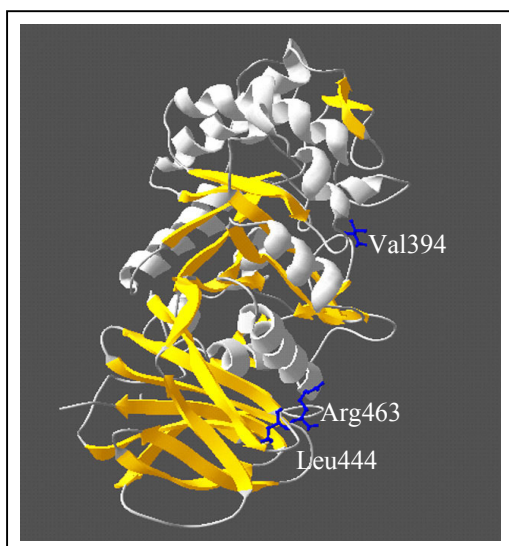


Figura 7: Localització dels residus Val394, Leu444 i Arg463.

La mutació L444P ha estat analitzada també amb combinació amb la mutació E326K, degut a que recentment hem comprovat que la L444P pot trobar-se en combinació amb aquest segon canvi. El doble mutant presenta una menor activitat que qualsevol de les dues mutacions per separat (8,5%).

Les mutacions **E326K** i **N188S** expressades per separat presenten els valors d'activitat enzimàtica més elevats.

Els residus Asn188 i Glu326, són hidrofílics i es troben exposats en zones exteriors de la GBA.

L'Asn188 es troba propera a una petita làmina β situada al domini III de l'enzim, però allunyada del centre actiu. La substitució de l'asparagina per una serina en aquesta posició esperàvem que no tingués unes dràstiques conseqüències sobre l'activitat de la proteïna, degut a que ambdós aminoàcids tenen les mateixes característiques (hidrofílics i neutres).

La Glu326 forma part d'una de les làmines α que constitueixen el domini III (de la posició Lys321 a la Leu330). Es troba exposat cap a l'exterior de la proteïna, lluny també del centre actiu. El seu canvi per una lisina comporta el pas d'un aminoàcid carregat negativament per un de carregat positivament. Com en el cas anterior, es tracta de dos aminoàcids hidrofílics. No esperàvem, per tant, que la mutació provoqués una desestructuració de la GBA ni que pugui afectar dràsticament a la l'activitat glucocerebrosidasa, com així ha estat.

L'enzim portador de la N188S presenta una activitat del 66,6% respecte a la del salvatge (90,5% si considerem l'activitat específica). Hem comprovat que els seus nivells d'activitat davallen fins al 23,2% quan es troba formant el doble mutant [N188S;E326K]. L'al·lel c.1093G>A (E326K), per sí sol, provoca una baixada de l'activitat GBA fins al 42,7% de la respecte a la proteïna salvatge. Aquesta mutació expressada per altres autors, presenta també elevats nivells d'activitat (26,0% i 60,9%). Degut a la presència d'aquests elevats

nivells d'activitat esperem que aquestes dues mutacions, lliures o formant el doble mutant, es trobin sempre associades a les formes no neuronopàtiques de la malaltia de Gaucher. Els nivells d'activitat observats serien suficients per a prevenir l'aparició de manifestacions neurològiques.

Aquestes mutacions, tot i haver-les estudiat per separat també les hem analitzat combinades en un al·lel doble ([N188S; E326K]). El valor d'activitat enzimàtica del doble mutant és inferior (23,2%) a l'observada per cadascuna d'elles per separat. Aquests resultats qüestionen el fet de que la E326K sigui un polimorfisme neutre, tal com s'havia proposat anteriorment (Grace i col., 1999). Nosaltres, considerem que es tractaria d'un nou tipus de mutació amb un efecte molt lleu. Aquest tipus de canvis podrien ser considerats com a **“variants modificadores”**. Aquestes variants per si soles no serien patogèniques, o ho serien en molt poca mesura, però tindrien un efecte additiu fent que el doble mutant sí fos patogènic. De fet, cal destacar que la E326K no ha estat trobada mai sola com a mutació causant de la malaltia de Gaucher, sinó sempre en combinació amb una segona mutació.

Aquestes consideracions podríem fer-les també per la N188S, la qual ha estat descrita com una mutació causant d'un fenotip molt lleu de tipus I (Laubscher i col., 1994; Kim i col., 1996; Choy i col., 1999). Kim i col (1996) descriuen un pacient homozigot per aquest al·lel, diagnosticat als 17 anys, asimptomàtic, amb una lleu hepatoesplenomegàlia. Descriuen també un pacient amb el genotip

N188S/L444P, diagnosticat cap als 40 anys, amb hepatoesplenomegàlia, lleu pancitopènia i manifestacions òssies. La presència de la mutació N188S en combinació amb la E326K, redueix l'activitat d'aquesta segona. Tot això ens fa pensar, com ja hem comentat, en que també hauria de ser considerada com una **“variant modificadora”**.

3- NMD

El procés d'NMD (*nonsense mediated mRNA-decay*) és un mecanisme de control que contribueix a l'eliminació de trànscrips que contenen codons de terminació prematurs (PTCs) (Hentze i Kulozik, 1999; Culbertson, 1999; Maquat i Carmichael, 2001). L'origen dels PTCs pot ser molt divers: (i) errors en la RNA polimerasa, (ii) processos d'*splicings* inefficients o defectius, (iii) també poden ser introduïts en la generació dels reordenacions improductives del DNA del sistema immunitari (iv) i, recentment, es creu també que alguns trànscrips que contenen PTCs són sintetitzats per a regular l'expressió d'algunes proteïnes (Hillman i col., 2004). A part de tots aquests orígens n'existeix un darrer, que és el resultat de l'existència de mutacions sense sentit o de trencament de la pauta de lectura causants de moltes malalties genètiques així com de nombroses formes de càncer. Són moltes les mutacions que provoquen la creació d'un PTC

i molts els transcrits que a causa de la seva presència són degradats per l'NMD.

En la població espanyola, analitzada en treballs anterior del nostre grup, s'havien estat descrits diferents al·lels portadors de mutacions d'aturada prematura, insercions, delecions i canvis d'*splicing* en el gen de la β -glucosidasa àcida. Algunes d'aquestes mutacions podrien estar subjectes al procés de NMD. La taula 5 es mostra el genotip de 6 pacients afectes per la malaltia de Gaucher portadors d'algun d'aquests tipus al·lels.

Taula 5: Mostres, genotips, edat de diagnòstic i alguns trets clínics de pacients afectats de la malaltia de Gaucher.¹ de presentació/d'avaluació amb diagnòstic enzimàtic (anys).

MOSTRA	GENOTIP	EDAT ¹	FENOTIP
I.5	N370S; c.1451delAC	15	Esplenomegàlia Trombocitopènia Anèmia Dolors ossis
I.11	N370S; c.1098insA	3/9	Hepatoesplenomegàlia Leucopènia Esplenectomia als 9 anys
I.26	N370S; c.500insT	47	No hepatoesplenomegàlia Parkinson atípic
I.28	N370S; W(-4)X	4	Hepatoesplenomegàlia Pancitopènia suau Epistaxis Crisis òssies Deformitat del fèmur Pigmentació cutània
I.35	N370S; IVS5+1	?/24	Dades desconegudes
I.41	N370S; R257X	6	Hepatoesplenomegàlia Pancitopènia

Per a determinar l'efecte del procés d'NMD sobre el gen de la β -glucosidasa àcida, van analitzar l'expressió dels dos transcrits del gen *GBA* present en els fibroblasts d'alguns d'aquests pacients. Disposem de fibroblasts de 4 dels 6 pacients: I.5, I.11, I.28 i I.41. Tots ells havien desenvolupat la malaltia de Gaucher de tipus I, degut a la presència de la mutació p.N370S en l'altre al·lel.

De les quatre mutacions que podíem analitzar, la p.R257X, com ja hem comentat, l'havíem expressat en cèl·lules d'insecte emprant el "*Bac-to-Bac baculovirus expression system*" (veure resultats, capítol 5). El cDNA portador d'aquesta mutació havíem intentat obtenir-lo per RT-PCR a partir de l'RNA del pacient (I.41). D'un total de 19 clons analitzats, únicament dos d'ells presentaven la mutació p.R257X. Aquest fet ens va proporcionar la pista per a saber que la quantitat de transcrits que contenien aquesta mutació era menor que la dels que presentaven la p.N370S.

Per a comprovar-ho van analitzar per RT-PCR i digestió *XhoI* l'existència dels dos al·lels d'aquest pacient i dels altres pacients que formaven part d'aquest treball (veure resultats, capítol 6). Van comprovar que la quantitat dels transcrits portadors de les mutacions c.1098insA (I.11), W(-4)X (I.28) i R257X (I.41) era menor respecte a la quantitat de l'altre l'al·lel.

Per saber si la causa d'aquesta disminució era deguda al procés de NMD havien tractat els fibroblasts amb un inhibidor del procés de NMD que actua a nivell de la síntesi de proteïnes, la cicloheximida (CHX).

Amb el tractament amb cicloheximida hem pogut constatar l'existència d'una recuperació en els nivells dels transcrits portadors de les mutacions c.1098inA (I.11) i R257X (I.41). Podem afirmar, per tant, que dels quatre al·lels que analitzaven únicament dos estan subjectes al procés de NMD.

Aquests resultats, però, no ens permetien saber quina és la quantitat de cadascun dels al·lels presents en els pacients, degut a que la PCR no era quantitativa. Per resoldre-ho, vam dissenyar un protocol de PCR a temps real.

Abans, però, havíem de resoldre alguns inconvenients ocasionats per l'elevada identitat nucleotídica del pseudogèn de la β -glucosidasa àcida respecte al gen *GBA*.

Es van dissenyar els primers de tal manera que només permetessin l'amplificació del gen. Per fer-ho, s'utilitzà el primer 9aR (Cormand i col., 1998a) el qual s'uneix a una regió que es troba delecionada en el pseudogèn (deleció de 55pb). A la figura 8 s'exemplifica el procés de PCR del gen i el pseudogèn en aquestes condicions.

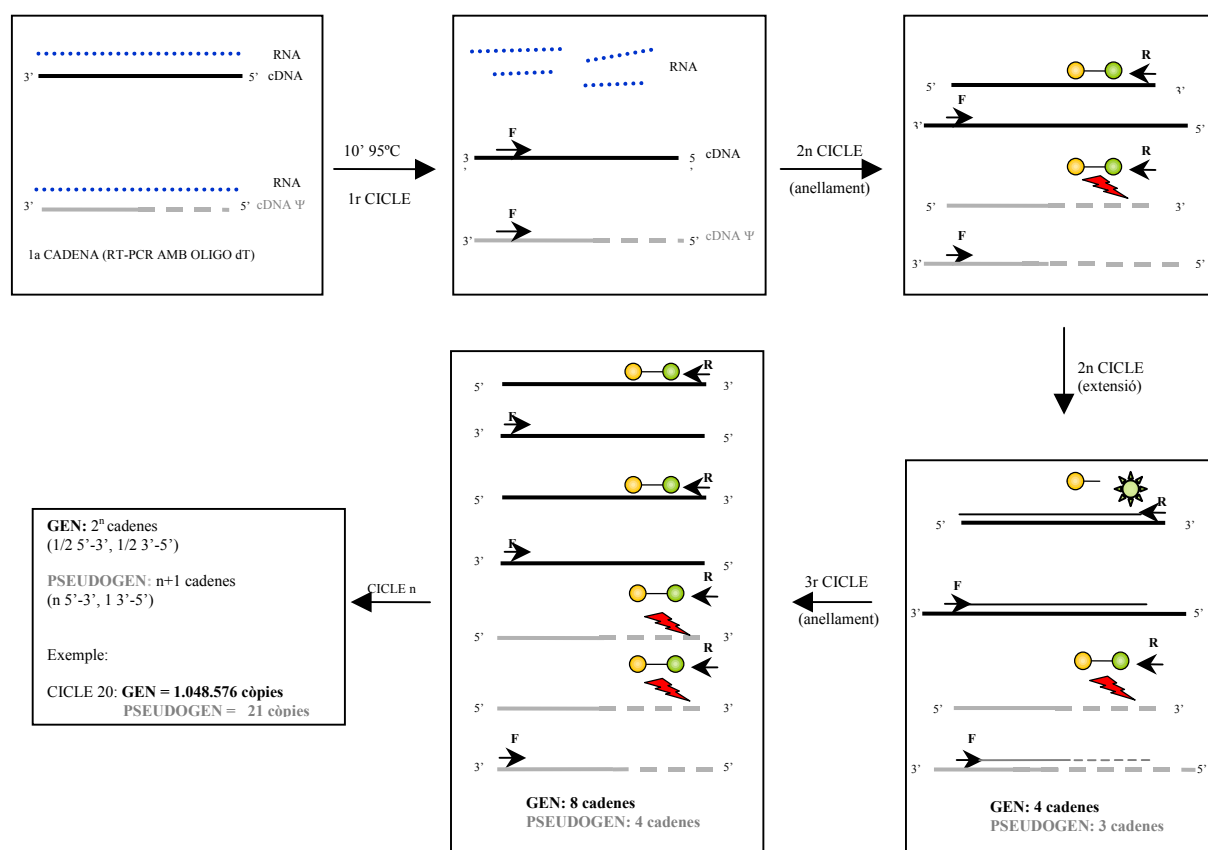


Figura 8: Esquema de la PCR a temps real. L'anellament de l'encebador *antisense* i de la sonda TaqMan es produeix únicament en el gen, degut a l'existència d'una deleció de 55 pb en aquesta regió de l'exó 9 del pseudogèn (ψ).

La sonda emprada per a la detecció dels productes amplificats havíem de situar-la també en aquesta regió per a no detectar qualsevol amplifcació inespecífica del pseudogèn. Aquest fet no ens va permetre emprar sondes MGB per a la detecció i discriminació dels dos al·lels de cada pacient. La detecció, per tant, la vam realitzar amb una sonda TaqMan, mentre que la discriminació entre els dos al·lels es va realitzar amb l'ús de dos primer *sense* diferents, un que permetés únicament l'amplificació de l'al·lel N370S (al·lel 2) i l'altre que només permetés l'amplificació de l'al·lel associat a la mutació sense sentit o de canvi de la pauta de lectura (al·lel 1).

La PCR de l'al·lel 2 va resultar ser poc eficient, de tal manera que els resultats obtinguts es van descartar per l'anàlisi final. Aquest fet ens obligà a expressar els nostres resultats respecta a un altre gen. Escollirem el GAPDH.

Els resultats obtinguts de la PCR a temps real, foren equivalents als obtingut en la RT-PCR i posterior digestió amb *XhoI* (veure resultats, capítol 6).

Hem intentar esbrinar el motiu pel qual el procés de MND actua únicament sobre 2 dels 4 al·lels analitzats.

En el cas de la mutació c.1451delAC, només cal analitzar quina és la repercussió de la pèrdua d'una adenina en aquesta posició de l'exó 10, per entendre per què escapa de la degradació per NMD. La deleció provoca un canvi de la pauta de lectura i la creació d'un codó d'aturada prematur al darrer exó, l'11.

Segons els models actuals (veure introducció) pel reconeixement d'un codó d'aturada prematur, és necessari que aquest es trobi situat uns 50-55 pb abans de la darrera unió exó-exó. Per tant, és d'esperar que el PTC creat amb la presència de la mutació c.1451delAC no sigui reconegut com a prematur i, en conseqüència, els tràncscits que el contenen no siguin degradats per l'NMD.

En canvi les mutacions **R257X** i **c.1098insA**, sí compleixen aquesta premissa i són, per tant, sensibles a l'NMD. La primera d'elles provoca l'atura de la traducció a l'exó 7 i la segona al 9. En ambdós casos existeix un intró (de fet diversos) després del PTC.

La mutació **W(-4)X** es troba, a l'altre extrem de la proteïna, després dels dos inicis de traducció. Degut a la naturalesa de la mutació i a la posició en la qual es troba esperariem que els tràncscrits que contenen aquesta mutació fossin sensibles a l'NMD.

Tant amb l'anàlisi de restricció com amb la PCR a temps real, observem que aquest al·lel és degradat en menor mesura que els al·lels R257X i c.1098insA però, en canvi, veiem que amb el tractament amb cicloheximida no provoca cap increment en el nivells del missatger. Tot això, ens fa pensar en que aquest al·lel no és sensible a l'NMD i que la seva disminució podria ser deguda a algun altre mecanisme de degradació diferent de l'NMD.

S'han descrit alguns missatges que contenen mutacions situades molt properes a l'inici de la traducció (posicions 1, 2 i 10) que pràcticament escapen de la degradació per NMD (nivell del transcrit del 84%) (Zhang i Maquat, 1997). En

un d'aquests casos s'ha comprovat que el missatger conté una seqüència Kozak, molt propera a l'anterior (posició 14), que estaria actuant com a reinici de la traducció. Aquest reinici provocaria, per tant, que el missatger escapés de la degradació per NMD (Zhang i Maquat, 1997).

S'han descrit uns altres dos casos en els quals mutacions situades a l'inici de la seqüència escapen també del procés de NMD (Danckwardt i col., 2002; Denecke i col., 2004). Ambdós casos tenen en comú que són mutacions que canvien el lloc d'*splicing* i, en conseqüència, la pauta de lectura. Però és desconegut fins el moment la raó per la qual escapen de la degradació mediada per la presència de PTCs.

En el nostre cas no es produeix un canvi de la pauta de lectura ni sembla que es pugui produir un reinici de la traducció en un altre punt del missatger. Per a que aquest es produeixi, s'ha descrit que l'ATG de reinici ha d'estar situat molt proper al PTC. Després de la mutació W(-4)X, el primer ATG el trobem a 52 codons més enllà, cap a 3'. Per tant, massa llunyà.

Tots aquests missatgers els quals o bé no són degradats o la CHX no hi té cap efecte, contenen PTCs bastant a l'inici de la traducció. Una altra hipòtesi, podria ser que en aquests casos la CHX per alguna raó que desconeguem no pogués actuar inhibint la degradació d'aquests missatgers. No es coneix com actua aquesta molècula per aturar el procés de NMD. El que sí sabem és que inhibeix la síntesi de proteïnes i es creu que ho fa actuant sobre la

subunitat 60S del ribosoma (Carter i col., 1995).

Existiria una darrera hipòtesi que té a veure amb la metodologia emprada. En la PCR a temps real, hem expressat les mostres no tractades respecte a la mostra WT sense tractament, mentre que les mostres tractades s'han referit respecte a la mostra WT tractada. Les mostres WT poden presentar diferències en quant a l'expressió de l'al·lel salvatge, tal com s'ha descrit per altres gens (Noensie i Dietz, 2001). És a dir, el tractament amb CHX pot provocar un increment dels nivells d'expressió de l'al·lel salvatge. La manera de calcular i mostrar els nostres resultats elimina aquest increment artefactual, però podria ser que també estigués eliminant el possible efecte de la CHX sobre els nivells d'expressió de l'al·lel W(-4)X.

Les mostres de RNA dels pacients I.5, I.11, I.28 i I.41 foren també amplificades per RT-PCR i posteriorment analitzades amb el test de la proteïna truncada (PTT) (veure resultats, capítol 6).

Els resultats ens demostren que l'al·lel **c.1451delAC** es processa correctament obtenint-se una proteïna de 503 aa, 33 menys que la salvatge. La quantitat de proteïna obtinguda amb l'al·lel c.1451delAC és la mateixa respecte a la de l'al·lel N370S, amb o sense tractament, confirmant-se que el missatger no ha estat degradat en el procés de transcripció/traducció.

Es confirma també que els al·lells **R257X** (I.41) i **c.1098insA** (I.11) pateixen NMD. La

quantitat de proteïna que s'obté sense tractament és pràcticament nul·la per al primer al·lel i baixa per segon. Amb el tractament amb CHX, la proteïna portadora de la mutació R257X passa a ser detectable i l'altre es veu incrementada. Val a dir que la proteïna trucada corresponent a l'al·lel c.1098insA, presenta una mida esperada d'uns 50 kDa que casualment coincideix amb la mida d'una banda inespecífica que apareix en els carrils on les bandes són totes elles més intenses. Per tant, la banda de 50 kDa del carril corresponent a l'al·lel c.1098insA (I.11) sense tractament, podria correspondre a aquesta inespecificitat.

En quant al pacient I.28, no es detectà cap banda corresponent a l'al·lel **W(-4)X** ni amb el tractament ni sense ell, a excepció de les mateixes inespecificitats que apareixen també en el carril I.11 (+). Al no obtenir cap proteïna corresponent a aquest al·lel, podem afirmar que amb el PTT no és possible determinar l'efecte de la CHX per aquest al·lel. I, també, que no sembla que es produeixi un reinici de la traducció en una altre punt de la proteïna proper al PTC per aquest al·lel. En cas contrari hauria estat detectat en aquest estudi.

Amb tots aquests resultats es confirma que els al·lels c.1098insA i R257X (trobat en els pacient I.11 i I.41, respectivament) són degradats pel mecanisme de vigilància anomenat NMD. En canvi, l'al·lel c.1451delAC (detectat en el pacient I.5) no és degradat i presenta el mateixos nivells d'expressió que l'altre al·lel del mateix pacient, el N370S. I per últim, podem afirmar que l'al·lel **W(-4)X** (detectat en el pacient I.28) tot i

ser degradat no presenta recuperació dels seus nivells d'expressió després de tractar les mostres amb CHX. Per tant, el mecanisme de degradació podria ser diferents de l'NMD.

3- CORRELACIÓ GENOTIP-FENOTIP

L'expressió de les mutacions presents en el gen *GBA* és un mètode útil no només per a l'estudi de la relació entre l'estructura i la funció de la proteïna sinó també per l'establiment de correlacions genotip-fenotip.

El nostre objectiu no és el d'analitzar l'existència de correlacions genotip-fenotip en el conjunt de pacients espanyols. Aquesta tasca fou realitzada pel nostre grup en treballs anteriors (Cormand i col., 1998a). El nostre objectiu és el d'analitzar específicament l'efecte de les mutacions expressades en el present treball sobre el fenotip dels pacients portadors d'aquestes mutacions. Per això ens fem la següent qüestió: la presència d'una mutació en el gen *GBA* és l'únic factor determinant de l'expressió clínica de la malaltia de Gaucher?

Esperaríem que aquells pacients portadors de mutacions amb una activitat enzimàtica similar o superior a l'observada per la mutació N370S, poguessin tenir un curs de la malaltia moderat. Aquesta hipòtesi es compleix en alguns casos, tal com veurem a continuació.

En el cas de les mutacions P182L, R257X, Y313H, P391L i N392I, totes elles presenten nivells d'activitat *in vitro* i *in vivo* pràcticament nuls o molt baixos.

La primera d'elles, la **P182L**, ha estat trobada en un pacient de tipus II (II.12) en combinació amb l'al·lel doble mutant [**L444P**; **E326K**], el qual ha estat també expressat pel nostre grup presentant una activitat del 8,5% respecta a la proteïna salvatge. La mutació L444P, en homozigosi, ha estat tradicionalment associada amb la presència d'afectació neurològica i a una menor estabilitat de la proteïna (Pasmanik-Chor i col., 1997). Degut a (i) la manca d'activitat de l'al·lel P182L, (ii) l'associació de la mutació L444P amb les formes neurològiques de la malaltia, i (iii) al fet de que el doble mutant presenti una menor activitat enzimàtica que el mutant per la L444P; seria d'esperar que un pacient amb el genotip [P182L]+[L444P;E326K], presentés un fenotip sever amb una greu afectació neurològica, tal com s'ha produït en el cas del pacient II.12.

La mutació **R257X** provoca l'aparició d'un codó d'aturada prematur a l'exó 7. La presència aquesta mutació en un transcrit esperem que provoqui la seva eliminació pel sistema de vigilància cel·lular que evita la síntesi i propagació de proteïnes truncades a l'interior cel·lular, anomenat NMD. Tal com es demostra en el capítol 6 (veure resultats), els nivells del transcrit portador de la mutació R257X són pràcticament nuls, i només es possible detectar-ne la proteïna inhibint el procés de NMD. Pel fet de patir una reducció pràcticament total dels nivells del transcrit

portador de la mutació R257X, el fenotip resultant del pacient (I.41) vindrà donat per la presència de la mutació situada en el segon al·lel. En aquest cas, es tracta de la N370S, raó per la qual el pacient desenvoluparà el tipus I de la malaltia, tal com ha estat. Veiem també que els nivells d'activitat en aquest pacient són superiors els obtinguts amb l'expressió de la proteïna R257X *in vitro*, fet que es correlaciona amb la presència de la segona mutació.

Les mutacions **Y313H**, **P391L** i **N392I**, presenten nivells d'activitat *in vitro* propers a zero. *In vivo*, l'activitat de la proteïna en els pacients portadors d'aquestes mutacions és detectable, tot i presentar nivells d'activitat molt baixos (del 5% al 3%). La presència d'un cert nivell d'activitat assumim que és deguda a l'activitat associada a l'enzim GBA portador de la segona mutació present en cada pacient. En els dos primers (I.6 i I.24), aquesta segona mutació és la N370S, la qual com ja sabem es troba associada a la forma no neuronopàtica de la malaltia. En canvi, en el cas del pacient portador de la N392I (II.5), la segona mutació és la L444P, la qual sabem que no protegeix de l'afectació en el sistema nerviós.

La mutació **I402T** presenta, *in vivo*, un nivell d'activitat elevat, superior al de la proteïna portadora de la mutació N370S. Aquest fet es correlaciona molt bé amb la manca d'afectació neurològica que presenta el pacient portador d'aquest canvi en homozigosi (It.3). *In vitro*, el valor d'activitat és intermedi (6,1% respecta a la proteïna salvatge i 14,1% corregim amb el valor del CRIM) i no presenta diferències

significatives respecta a l'al·lel portador de la mutació N370S.

L'al·lel doble mutant [N188S;E326K], presenta un dels valors d'activitat enzimàtica més elevats observats en el present treball (23,2%). Esperàriem, per tant, que el fenotip associat aquest canvi no comporti la presència d'afectació neuronopàtica sigui quina sigui la mutació present en l'altre al·lel. Aquest supòsit és totalment concordant amb el fenotip del pacient I.22, el qual presenta la mutació D409H en l'altre al·lel. L'activitat GBA d'aquest pacient *in vivo* (11%) també sembla estar en correlació amb l'activitat detectada *in vitro*.

El valor d'activitat enzimàtica d'aquest al·lel només és superat per l'expressió de cadascuna d'aquestes mutacions per separat. Aquests resultats qüestionen el fet de que la E326K sigui un polimorfisme neutre, tal com s'havia proposat anteriorment (Grace i col., 1999). Nosaltres, considerem que es tractaria d'un nou tipus de mutació amb un efecte molt lleu. De fet cal destacar que no ha estat trobada mai sola en un al·lel mutat, com a causant de la malaltia de Gaucher, sinó sempre en combinació amb una segona mutació.

Les mutacions N370S, D409H i L444P, com ja hem comentat anteriorment, han estat expressades amb finalitats comparatives. Les correlacions genotip-fenotip per a aquestes mutacions són ben conegudes (veure introducció, malaltia de Gaucher, correlacions genotip-fenotip). La primera, la N370S, és la mutació més prevalent responsable de la malaltia de Gaucher. La seva presència està

sempre associada amb la forma no neuronopàtica de la malaltia. En canvi, les altres dues, han estat associades clàssicament a les formes neuronopàtiques, al presentar-se en homozigosi. S'ha arribat a aquestes correlacions amb l'estudi dels pacients, degut a que els nivells d'activitat per aquestes mutacions no sembla que es puguin correlacionar amb la presència o no d'afectació neuronopàtica. Els nivells d'activitat resultants de l'expressió d'aquestes mutacions *in vitro* (7,5%, 9,2% i 14,1%, respectivament) i els valors obtinguts a partir de fibroblasts de pacients homozigots per aquestes mutacions així ens ho demostren: 8,8% (n=5), 4% (n=1) i 2,7% (n=1), respectivament.

Arribats a aquest punt, comprovem que les correlacions entre els valors d'activitat GBA *in vitro* i *in vivo* en els pacients portadors d'aquestes mutacions són bastant bones. Malgrat això, cal ressaltar també, el fet de que el desenvolupament de l'afectació neurològica present en els pacients de tipus II i III no sembla estar directament relacionada amb el valor d'activitat enzimàtica. És el cas, per exemple, dels pacients II.5 i III.2, els quals presenten afectació neurològica amb uns nivells d'activitat enzimàtica *in vivo* (3% i 4%, respectivament) comparable a la que presenten els pacients I.6 i I.24 (5%), ambdós de tipus I (veure resultats, capítol 5). Degut a aquesta manca de correlació entre la severitat del fenotip i els nivells d'activitat enzimàtica dels pacients afectes per la malaltia de Gaucher, l'anàlisi de mutacions es fa imprescindible com

a criteri per a conèixer el pronòstic i, en un cert grau, predir el tipus de la malaltia i, en particular, si l'afectació neurològica serà o no present.

La heterogeneïtat fenotípica és observable no només entre els pacients que presenten diferent tipus de la malaltia de Gaucher sinó dintre de cada tipus. Per aquesta raó, alguns autors parlen de l'existència d'un fenotip continu entre el tipus II i III (Goker-Alpan i col., 2003). Alguns dels factors que es creu que poden intervenir en augmentar la heterogeneïtat fenotípica són el següents:

- La presència de **mutacions puntuals** o **al·lels complexos**, tindran un efecte diferent no només sobre l'activitat de l'enzim sinó també sobre la seva estabilitat o la seva migració.
- **Gens contigus.** La regió 1q21, és particularment rica en gens, amb 7 gens i 2 pseudogens en una regió d'aproximadament unes 75 Kb (Winfield i col., 1997). La possible contribució dels gens contigus en la malaltia de Gaucher en certs pacients és particularment intrigant (Koprivica i col., 2000).
- **Substrats alternatius.** La glucosilesfingosina és un segon substrat també degradat per la β -glucosidasa àcida. La taxa d'acumulació i degradació de la glucosilesfingosina o la quantitat acumulada podria ser la responsable de certes manifestacions patològiques en els pacients. S'ha comprovat que els pacients de tipus II i III analitzats presenten una acumulació més elevada d'aquest substrat

a nivell del cervell (22-51 i 38-694 vegades, respectivament), fet que es correlaciona amb l'aparició de les manifestacions neurològiques (Orvisky i col., 2000).

Podria ser que els pacients amb afectació neuronopàtica i els que no la pateixen, tinguessin diferents formes de l'enzim GBA amb diferents especificitats de substrat cap a la glucosilesfingosina o diferents cinètiques de degradació. Així els pacients amb el tipus I podrien degradar la glucosilesfingosina més fàcilment o la seva activitat no es trobaria inhibida per poder degradar petites quantitats de glucosilesfingosina (Orvisky i col., 2000).

- **Gens modificadors.** Són diversos els gens modificadors que podrien tenir alguna influència sobre la variabilitat fenotípica. Entre ells es troba la SAP-C, les LAMPs o la IL-6, entre altres. La SAP-C, com ja hem comentat amb anterioritat és una glicoproteïna necessària per la degradació del glucocerebròsid. Pacients amb mutacions en el gen que codifica per la SAP-C pateixen acumulació de glucocerebròsid amb hepatoesplenomegàlia i cèl·lules de Gaucher al moll de l'os, juntament amb manifestacions oculomotores i neurològiques (Pampols i col., 1999). Les LAMPs (LAMP-1 i LAMP-2) són proteïnes de membrana associades al lisosoma. Poden participar en el transport de la β -glucosidasa àcida del reticle endoplasmàtic cap als lisosomes, i aquest transport pot ser defectiu en

pacients Gaucher (Zimmer i col., 1999). Les LAMPs es creu que es troben implicades en l'acumulació del substrat o en la seva eliminació (Zimmer i col., 1999). Una eficient eliminació del substrat acumulat podria contribuir en l'heterogeneïtat de la malaltia a l'igual que la privació de substrat actualment usat com a teràpia (Platt i col., 1997).

Els macròfags activats secreten diferents substàncies, entre les quals es troben les interleuquines (IL) IL-6, IL-1, TNF- α i IL-10. La IL-6 s'ha comprovat que es troba especialment incrementada entre els pacients Gaucher, així com la IL-10. S'ha trobat que un dels genotips (C/C) d'un polimorfisme present en el promotor de IL-6 es correlaciona amb manifestacions menys severes de la malaltia de Gaucher, i que podria, per tant, ser un gen modificador de la malaltia.

- **Factors ambientals i epigenètics.** Es dona el cas de pacients que tot i presentar el mateix genotip, poden mostrar manifestacions clíniques discordants, fins i

tot tractant-se de bessons monozigòtics (Cox i Schofield, 1997). Aquest fet fa pensar en que les variacions en l'activitat o en el processament de factors importants per l'activitat de l'enzim *in vivo*, com la saposina C (SAP-C), no serien els responsables d'aquesta variació en aquests pacients. Caldrà, per tant, disposar de més informació sobre els factors epigenètics i ambientals que poden influir en la patogènesi de la malaltia. Quant més s'estudia la malaltia de Gaucher tipus I, es fa més evident que els factors epigenètics juguen un paper important en el desenvolupament de les manifestacions clíniques [Cox, 2001 #42]. Factors com les infeccions víriques que hagin patit els pacients, les intervencions quirúrgiques, el part o traumes patits poden precipitar el desenvolupament o la progressió dels símptomes.

CONCLUSIONS

MUCOPOLISACARIDOSI IIIA

- S'ha realitzat la cerca de les mutacions responsables de la síndrome de Sanfilippo tipus A o mucopolisacarisosi IIIA en un total de 27 pacients (26 espanyols i 1 africà), emprant les tècniques d'anàlisis d'SSCPs, anàlisis de restricció i seqüenciació. S'han identificat el 87% dels al·lels responsables de la malaltia (el 90,4% si considerem només els espanyols).
- S'ha determinat la freqüència i l'espectre mutacional en la mostra de pacients espanyols analitzada. S'han identificat 14 mutacions diferents, 12 de les quals corresponen a mutacions de canvi d'aminoàcid, una és una inserció i la darrera una deleció, la c.1079delC (anomenada anteriorment c.1091delC). Aquesta darrera mutació és la més prevalent en els pacients espanyols amb un 36,5% (19/52) del total d'al·lels mutats.
- S'han emprat quatre polimorfismes diferents, tres intrònics (IVS2-26T>C, IVS5+17C>T, IVS5-37GC>CTGT) i un exònic (R456H), per construir els haplotips associats a cada mutació. Per la c.1079delC, del total de 19 cromosomes analitzats, 13 presenten associat el mateix haplotip [T, T, +ins, G]. En els 6 restants, els al·lels per cadascun d'aquests polimorfismes són coherents amb l'haplotip descrit, recolzant la hipòtesi de l'existència d'un origen únic per aquesta mutació.
- L'espectre de mutacions en diferents àrees geogràfiques és diferent. La c.1079delC ha estat detectada en altres països però sempre amb freqüències inferiors al 8%. En canvi, les mutacions R74C i R254H, majoritàries en altres països, no han estat detectades en cap pacient d'origen espanyol.
- Amb les dades obtingudes de l'espectre de mutacions de la població espanyola, podem afirmar que alhora de realitzar el diagnòstic molecular rutinari de la MPS IIIA, amb la detecció de les mutacions S66W (7,7%), R74H (5,8%), E447K (7,7%) i c.1079delC (36,5%), es cobriria prop del 60% dels al·lels responsables de la malaltia.
- El "*Bac-to-Bac baculovirus expression system*" ha estat emprat per l'estudi funcional de la sulfamidasa, obtenint uns nivells d'activitat equivalents als obtinguts amb altres sistemes d'expressió (basats en l'ús de cèl·lules COS o CHO). És, per tant, un sistema eficient per a l'expressió heteròloga de la sulfamidasa.
- L'estudi funcional d'algunes de les mutacions detectades en la població de pacients espanyols revela que l'activitat sulfamidasa es troba altament compromesa en la majoria dels casos analitzats. Els nivells d'activitat de les proteïnes

portadores de les mutacions R74H, Q85R, L386R, R433W, R433Q i c.1079delC són pràcticament nuls.

- La mutació S66W presenta un nivell d'activitat sulfamidasa detectable ($10\pm 6\%$) fet que es pot correlacionar amb l'existència de pacients italians homozigots per aquesta mutació amb fenotip intermedi.
- El residu Arg206 no es troba conservat respecta a la seqüència de ratolí, fet que podria explicar perquè la mutació R206P presenta una activitat sulfamidasa detectable ($18\pm 9\%$). Aquest fet és coherent amb l'existència d'un pacient italià homozigot per aquesta mutació amb fenotip intermedi.
- Les anàlisis de *western blots* de les mutacions expressades senyalen que únicament es veu compromès el processament de la proteïna associada a la mutació c.1079delC, fet que la quantitat de proteïna madura respecta a la total (21%) sigui inferior que en la resta de mostres analitzades (com a promig 38%).

MALALTIA DE GAUCHER

- S'ha realitzat un estudi funcional de 13 mutacions detectades en el gen de β -glucosidasa àcida. Els nivells d'activitat dels enzims portadors de les mutacions P182L, R257X, Y313H, P391L i N392I, són negligibles.
- Les proteïnes portadores de les mutacions N370S, I402T, D409H, L444P, [N188S;E326K] i [L444P;E326K] presenten nivells d'activitat residual que van del 6% al 23%.
- Únicament dos al·lels codifiquen per proteïnes que presenten nivells d'activitat relativament elevats. Són els següents: c.680A>G (N188S) i c.1093G>A (E326K).
- S'ha determinat l'existència de "variants modificadores". Són aquelles mutacions no patogèniques o que ho són en molt poca mesura, però que presenten un efecte additiu, fet que un al·lel doble mutant sí sigui patogènic. És el cas dels al·lels N188S i E326K.
- S'ha demostrat que el procés de NMD (*nonsense mediated mRNA-decay*) actua disminuint els nivells dels transcrits portadors de les mutacions R257X i c.1098insA en el gen de la β -glucosidasa àcida.

- En canvi, el transcrit associat a l'al·lel c.1451delAC no és sensible a l'NMD, degut a que la mutació provoca un canvi de la pauta de lectura i la creació d'un codó d'aturada al darrer exó del cDNA, que tot i ser prematur no és reconegut com a tal.

- Els transcrits associat a l'al·lel W(-4)X són parcialment degradats però no són sensibles al tractament amb cicloheximida.

BIBLIOGRAFIA

A

Abrahamov A, Elstein D, Grosstur V, Farber B, Glaser Y, Hadashalpern I, Ronen S, i col. (1995) Gaucher's disease variant characterised by progressive calcification of heart valves and unique genotype. *Lancet* **346**: 1000-1003.

Amaral O, Marcao A, Pinto E, Zimran A, Sa Miranda MC. (1997) Distinct Haplotype in Non-Ashkenazi Gaucher Patients with N370S Mutation. *Blood Cells Mol Dis* **23**: 415-416.

Amaral O, Lacerda L, Marcao A, Pinto E, Tamagnini G, Miranda M. (1999) Homozygosity for two mild glucocerebrosidase mutations of probable Iberian origin. *Clin Genet.* **56**: 100-102.

Amaral O, Marcao A, Miranda M, Desnick RJ, Grace ME. (2000) Gaucher disease: expression and characterization of mild and severe acid beta-glucosidase mutations in Portuguese type 1 patients. *Eur J Hum Genet.* **8**: 95-102.

Aronovich EL, Carmichael KP, Morizono H, Koutlas IG, Deanching M, Hoganson G, Fischer A, et al (2000) Canine heparan sulfate sulfamidase and the molecular pathology underlying Sanfilippo syndrome type A in Dachshunds. *Genomics.* **68**: 80-84.

B

Baldellou A. (1999) Enfermedad de Gaucher Tipos 2 y 3. *Enfermedad de Gaucher.* Giraldo P., Giralto M, Pocovi M, Pérez Calvo JI (eds.), 81-90.

Banjar H, Tulbah A, Ozand P. (1998) Pediatric pulmonary Gaucher disease: two patterns of lung involvement. *Annals Of Saudi Medicine* **17**: 464-467.

Barranger JA, Ginns EI (1989) Glucosylceramide lipidoses: Gaucher disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The Metabolic Bases of Inherited Disease.* Vol. II, New York, pp 1677-1697

Barranger JA, Rice EO, Swaney WP. (1999) Gene transfer approaches to the lysosomal storage disorders. *Neurochem Res. Apr* **24**: 601-615.

Bateman KL, Delehedde M, Sergeant N, Wartelle I, Vidyasagar R, Fernig DG. (2000) Heparan sulphate. Regulation of growth factors in the mammary gland. *Adv Exp Med Biol.* **480**: 65-69.

Batzer MA, Deininger PL. (2002) Alu repeats and human genomic diversity. *Nat Rev Genet* **3**:370-379

Bax MC, Colville GA. (1995) Behavior in mucopolysaccharidosis disorders *Arch Dis Child.* **73**: 77-81.

Beck M. (1996) Incidence and clinical variability of sanfilippo disease in Germany. *4th MPS Symposium. Wollongong, Australia.*

Beesley CE, Young EP, Vellodi A, Winchester BG. (2000) Mutational analysis of Sanfilippo syndrome type A (MPS IIIA): identification of 13 novel mutations. *J Med Genet.* **37**: 704-7.

Bembi B, Agosti E, Bohem P, Nassimbeni G, Zanatta M, Vidoni L. (1994) Aminohydroxypropylidene-bisphosphonate in the treatment of bone lesions in the case of Gaucher's disease type 3. *Acta Paediatr.* **83**: 122-124.

Berg-Fussman A, Grace ME, Ioannou Y, Grabowski GA. (1993) Human Acid beta-Glucosidase - N-Glycosylation Site Occupancy and the Effect of Glycosylation on Enzymatic Activity. *J Biol Chem* **268**: 14861-14866.

Berry HK. (1987) Screening for mucopolysaccharide disorders with the Berry spot test. *Clin Biochem.* **20**: 365.

Beutler E, Kuhl W (1979) Detection of Gaucher's disease and its carrier state in peripheral blood leukocytes. *Lancet.* **1**: 612-623.

Beutler E, Kuhl W (1990) Beta-glucosidase, in: W.J. Williams, E. Beutler, A.J. Erslev, M. Lichtman (Eds.), *Hematology*, fourth ed., McGraw-Hill, New York. 1762-1763.

Beutler E (1992a) Gaucher disease: New molecular approaches to diagnosis and treatment. *Science* **256**: 794-799.

Beutler E, West C, Gelbart T (1992b) Polymorphisms in the human glucocerebrosidase gene. *Genomics* **12**: 795-800.

Beutler E, Nguyen NJ, Henneberger MW, Smolec JM, Mcpherson RA, West C, Gelbart T (1993a) Gaucher Disease -Gene Frequencies in the Ashkenazi Jewish Population. *Am. J. Hum. Genet.* **52**: 85-88.

Beutler E, Gelbart T. (1993b) Gaucher Disease Mutations in Non-Jewish Patients. *Br J Haematol* **85**: 401-405.

Beutler E. (1995a) Gaucher Disease. *Adv Genet* **32**: 17-49.

- Beutler E, Grabowski GA.** (1995b) Gaucher disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 7th Ed., New York, pp 2641-2669.
- Beutler E, Gelbart T, Balicki D, Demina A, Adusumalli J, Elsas L 2nd, Grinzaid KA, Gitzelman R, Superti-Furga A, Kattamis C and Liou BB.** (1996) Gaucher disease: Four families with previously undescribed mutations. *Proc Assoc Am Phys*, **108**: 179-184.
- Beutler E, Grabowski GA.** (2001) Gaucher disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Vol. III. McGraw-Hill, New York, pp 3635-3668.
- Bhattacharyya R, Gliddon B, Beccari T, Hopwood JJ, Standley P** (2001) A novel missense mutation in lysosomal sulfamidase is the basis of MPSIII in a spontaneous mouse mutant. *Glycobiology*. **11**: 99-103
- Bielicki J, Hopwood JJ, Anson DS.** (1996) Correction of Sanfilippo A skin fibroblasts by retroviral vector-mediated gene transfer. *Hum Gene Ther* **7**: 1965-70.
- Bielicki J, Hopwood JJ, Melville EL, Anson DS** (1998) Recombinant human sulphamidase: Expression, amplification, purification and characterization. *Biochem J*. **1**: 145-150.
- Blanch L, Weber B, Guo XH, Scott HS, Hopwood JRA.** (1997) Molecular defects in sanfilippo syndrome type A. *Hum Mol Genet*. **6**: 787-791.
- Bodennec J, Pelled D, Riebeling C, Trajkovic S, Futerman AH** (2002) Phosphatidylcholine synthesis is elevated in neuronal models of Gaucher disease due to direct activation of CTP: phosphocholine cytidylyltransferase by glucosylceramide. *FASEB J*, **16**: 1814-1816
- Bohlega S, Kambouris M, Shahid M, Al HM, Al SW** (2000) Gaucher disease with oculomotor apraxia and cardiovascular calcification (Gaucher type IIIC). *Neurology*. **54**: 261-263.
- Bond CS, Clements PR, Ashby SJ, Collyer CA, Harrop SJ, Hopwood JJ, Guss JM** (1997) Structure of a human lysosomal sulfatase. *Structure* **5**: 277-89.
- Brady RO, Penthev PG, Gal AE, Hibbert SR, Dekaban AS.** (1974) Replacement therapy for inherited enzyme deficiency. Use of purified glucocerebrosidase in Gaucher's disease. *N. Eng. J. Med.* **291**: 989-993.
- Brady RO, Barton NW, Grabowski GA.** (1993) The Role of Neurogenetics in Gaucher's Disease. *Arch Neurol* **50**: 1212-1224.
- Bresciani R, Von Figura K.** (1996) Dephosphorylation of the mannose-6-phosphate recognition marker is localized in later compartments of the endocytic route: identification of purple acid phosphatase (uteroferrin) as the candidate phosphatase. *Eur. J. Biochem*, **238**: 669-674.
- Brill NE, Mandelbaum FS, Libman E.** (1905) Primary splenomegaly-Gaucher type. Report on one of few cases occurring in a single generation of one family. *Am J Med Sci*, **129**: 491.
- Brooks DA, Robertson DA, Bindloss C, Litjens T, Anson DS, Peters C, Morris CP, and Hopwood JJ.** (1995) Two site-directed mutations abrogate enzyme activity but have different effects on the conformation and cellular content of the N-acetylgalactosamine-4-sulphatase protein. *Biochem J*, **307**: 457-463.
- Brooks EM, Branda RF, Nicklas JA, O'Neill JP.** (2001) Molecular description of three macro-deletions and an *Alu-Alu* recombination-mediated duplication in the *HPRT* gene in four patients with Lesch-Nyhan disease. *Mutat Res*, **476**: 43-54
- Bunge S, Ince H, Steglich C, Kleijer WJ, Beck M, Zaremba J, van Diggelen OP, i col.** (1997) Identification of 16 sulfamidase gene mutations including the common R74C in patients with mucopolysaccharidosis type IIIA (Sanfilippo A). *Hum Mutat*, **10**: 479-485.
- C**
- Carter MS, Doskow J, Morris P, Li SL, Nhim RP, Sandstedt S, Wilkinson MF.** (1995) A Regulatory Mechanism That Detects Premature Nonsense Codons in T-Cell Receptor Transcripts in-Vivo Is Reversed by Protein-Synthesis Inhibitors in-Vitro. *J Biol Chem*, **270**: 28995-29003.
- Chabás A, Cormand B, Grinberg D, Burguera JM, Balcells S, Merino JL, Mate I, i col.** (1995) Unusual expression of Gaucher's disease: Cardiovascular calcifications in three sibs homozygous for the D409H mutation. *J Med Genet*, **32**: 740-742.
- Chabás A, Montfort M, Martinez Campos M, Diaz A, Coll MJ, Grinberg D, Vilageliu L.** (2001) Mutation and haplotype analyses in 26 Spanish Sanfilippo syndrome type A patients: Possible single origin for 1091delC mutation. *Am J Med Genet*, **100**: 223-228.
- Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D, Casentini C.** (2002) Gaucher and Niemann-Pick diseases - enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper: retrospective diagnoses in newborn-screening cards. *Clin Chim Acta*, **317**: 191-197.

- Chander PN, Nurse HM, Pirani CL.** (1979) Renal involvement in adult Gaucher's disease after splenectomy. *Arch Pathol Lab Med*, **103** (9): 440-445.
- Charrow J, Esplin JA, Gribble TJ, Kaplan P, Kolodny EH, Pastores GM, Scot CR, i col.** (1998) Gaucher disease: Recommendations on diagnosis, evaluation, and monitoring. *Arch Intern Med*, **158**: 1754-1760.
- Cheng J, Belgrader P, Zhou XB, Maquat LE.** (1994) Introns Are Cis Effectors of the Nonsense-Codon-Mediated Reduction in Nuclear Messenger-Rna Abundance. *Mol Cell Biol*, **14**: 6317-6325.
- Choy FYM, Wei C, Levin D.** (1996) Gaucher Disease: Functional expression of the normal glucocerebrosidase and Gaucher T1366G and G1604A alleles in *Baculovirus*-transfected *Spodoptera frugiperda* cells. *Am J Med Genet*, **65**: 184-189.
- Choy FY, Humphries ML, Ben-Yoseph Y.** (1998) A novel mutation (V191G) in a German-British type 1 Gaucher disease patient. Mutations in brief no. 131. *Hum Mut*, **11** (5), 411-412.
- Choy F, Wong K, Shi HP.** (1999) Glucocerebrosidase mutations among Chinese neuronopathic and non-neuronopathic gaucher disease patients. *Am J Med Genet*, **84**: 484-486.
- Christomanou H, Aignesberger A, Linke RP.** (1986) Immunochemical characterization of two activator proteins stimulating enzymatic sphingomyelin degradation in vitro. Absence of one of them in a human Gaucher disease variant. *Biol Chem Hoppe-Seyler*, **367**: 879.
- Christomanou H, Chabás A, Pampols T, Guardiola A.** (1989) Activator protein deficient Gaucher's disease: a second patient with the newly identified lipid storage disorder. *Klin Wochenschr*, **67**: 999-1003.
- Ciana G, Martina C, Leopaldi A, Tamaro G, Katouzian F, Ronfani L, Bembi B.** (2003) Bone marker alterations in patients with type 1 Gaucher disease. *Calcif Tissue Int*, **72**(3):185-189.
- Cleary MA, Wraith JE.** (1993) Management of mucopolysaccharidosis type III. *Arch Dis Child*, **69**: 403-406.
- Cole Strauss A, Yoon K, Xiang Y, Byrne BC, Rice C, Gryn J, Holloman WK, Kmiec EB.,** (1996) Correction of the mutation responsible for sickle cell anemia by an RNA-DNA oligonucleotide. *Science*, **273**: 1386-1389.
- Colombo R.** (2000) Age estimate of the N370S mutation causing Gaucher disease in Ashkenazi Jews and european populations: a reappraisal of haplotype data. *Am J Hum Genet*, **66**: 692-697.
- Cormand B, Vilageliu L, Burguera JM, Balcells S, Gonzalezduarte R, Grinberg D, Chabás A.** (1995) Gaucher disease in Spanish patients: Analysis of eight mutations. *Hum Mutat*, **5**: 303-309.
- Cormand B, Vilageliu L, Balcells S, Gonzalezduarte R, Chabás A, Grinberg D.** (1996) Two novel (1098insA and Y313H) and one rare (R359Q) mutations detected in exon 8 of the beta- glucocerebrosidase gene in Gaucher's disease patients. *Hum Mutat*, **7**: 272-274.
- Cormand B, Montfort M, Chabás A, Vilageliu L, Grinberg DR.** (1997a) Genetic fine localization of the beta glucocerebrosidase (gba) and prosaposin (psap) genes: implications for gaucher disease. *Hum Genet*, **100**: 75-79.
- Cormand B, Grinberg D, Gort L, Fiumara A, Barone R, Vilageliu L, Chabás ARA.** (1997b) Two new mild homozygous mutations in gaucher disease patients: clinical signs and biochemical analyses. *Am J Med Genet*, **70**: 437-443.
- Cormand B, Grinberg D, Gort L, Chabás A, Vilageliu L.** (1998a) Molecular analysis and clinical findings in the Spanish Gaucher disease population: putative haplotype of the N370S ancestral chromosome. *Hum Mutat*, **11**: 295-305.
- Cormand B, Montfort M, Chabás A, Grinberg D, Vilageliu L.** (1998b) Reliable co-segregation analysis for prenatal diagnosis and heterozygote detection in Gaucher disease. *Prenat Diagn*, **18**: 207-212.
- Cormand B, Harboe TL, Gort L, Campoy C, Blanco M, Chamoles N, Chabás A, et al.** (1998c) Mutation analysis of Gaucher disease patients from Argentina: High prevalence of the RecNcil mutation. *Am J Med Genet*, **80**: 343-351.
- Cormand B, Diaz A, Grinberg D, Chabás A, Vilageliu L.** (2000) A new gene-pseudogene fusion allele due to a recombination in intron 2 of the glucocerebrosidase gene causes Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis*, **26**: 409-416.
- Costanzi E, Beccari T, Stinchi S, Bibi L, Hopwood JJ, Orlacchio A** (2000) Gene encoding the mouse sulphamidase: cDNA cloning, structure, and chromosomal mapping. *Mamm Genome*, **11**: 436-439.
- Costanzi E, Beccari T, Aisa MC, Tiribuzi R, Hopwood JJ, Orlacchio A.** (2003) Mouse sulphamidase gene: characterization of the promoter region of the gene and expression in mouse tissues. *Gene*, **310**: 143-149.
- Cox TM, Schofield JP.** (1997) Gaucher's disease: clinical features and natural history. *Baillieres Clinical Haematology*, **10**: 657-689.

Cox, T, Lachmann R, Hollak C, Aerts J, van Weely S, Hrebicek M, Platt F, Butters T, Dwek R, Moyses C, Gow I, Elstein D, and Zimran A. (2000) Novel oral treatment of Gaucher's disease with N-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis. *Lancet*, **355**: 1481-1485.

Cremin BJ, Davey H, Goldblatt J. (1990) Skeletal complications type I Gaucher disease: The magnetic resonance features. *Clin Radiol*, **41**: 244.

Culbertson MR. (1999) RNA surveillance - unforeseen consequences for gene expression, inherited genetic disorders and cancer. *Trends in Genetics*, **15**: 74-80.

Culbertson MR. (2001) Sense versus nonsense in DNA diagnostics. *Nature Biotechnology*, **19**: 413-414.

D

Dahl N, Lagerstrom M, Erikson A, Pettersson U. (1990) Gaucher disease Type III (Norrbotnian type) is caused by a single mutation in exon 10 of the glucocerebrosidase gene. *Am J Hum Genet*, **47**: 275-278.

Dahl N, Hillborg PO, Olofsson A. (1993) Gaucher Disease (Norrbotnian Type-III) - Probable Founders Identified by Genealogical and Molecular Studies. *Hum Genet*, **92**: 513-515.

Danckwardt S, Neu-Yilik G, Thermann R, Frede U, Hentze MW, Kulozik AE. (2002) Abnormally spliced beta-globin mRNAs: a single point mutation generates transcripts sensitive and insensitive to nonsense-mediated mRNA decay. *Blood*, **99**: 1811-1816.

Daniele A, Di Natale P (2001) Heparan N-sulfatase: cysteine 70 plays a role in the enzyme catalysis and processing. *Febs Letters*, **505**: 445-448.

De Duve CH, Pressman BC, Gianbetto R, Wattiaux R, Appelmans F. (1995) Tissue fraction studies. Intracellular distribution pattern of enzymes in rat liver tissue. *Biochem J*, **60**: 604-617.

De Jong JG, Hasselman JJ, Van landeghem AA, Vader HL, Wevers RA. (1991) The spots test is not a reliable screening procedure for mucopolysaccharidoses. *Clin Chem*, **37**: 572

Denecke, J., Kranz, C., Kemming, D., Koch, H. G., and Marquardt, T. (2004) An activated 5' cryptic splice site in the human ALG3 gene generates a premature termination codon insensitive to nonsense-mediated mRNA decay in a new case of congenital disorder of glycosylation type Id (CDG-Id). *Hum Mutat*, **23**(5): 477-486.

Devost NC, Choy FYM. (2000) Mutation analysis of Gaucher disease using dot-blood samples on FTA((R)) filter paper. *Am J Med Genet*, **94**: 417-420.

Di Natale P, Balzano N, Esposito S, Villani G (1998) Identification of molecular defects in Italian Sanfilippo A patients including 13 novel mutations. *Hum Mut*, **11**: 313-320.

Di Natale P, Vanacore B, Daniele A, Esposito S (2001) Heparan N-sulfatase: In vitro mutagenesis of potential N-glycosylation sites. *Biochem Biophys Res Commun*, **280**: 1251-1257.

Di Natale P, Villani GRD, Di Domenico C, Daniele A, Vici CD, Bartuli A. (2003) Analysis of Sanfilippo A gene mutations in a large pedigree. *Clin Genet*, **63**: 314-318.

Díaz A, Montfort M, Cormand B, Zeng BJ, Pastores GM, Chabás A, Vilageliu L, i col. (1999) Gaucher disease: The N370S mutation in Ashkenazi Jewish and Spanish patients has a common origin and arose several thousand years ago. *Am J Hum Genet*, **64**: 1233-1238.

Díaz A, Montfort M, Cormand B, Zeng BJ, Pastores GM, Chabás A, Vilageliu L, i col. (2000) On the age of the most prevalent Gaucher disease-causing mutation, N370S. *Am J Hum Genet*, **66**: 2014-2015.

Díaz-Font A, Cormand B, Blanco M, Chamoles N, Chabás A, Grinberg D, Vilageliu L. (2003a) Gene rearrangements in the glucocerebrosidase-metaxin region giving rise to disease-causing mutations and polymorphisms. Analysis of 25 RecNciI alleles in Gaucher disease patients. *Hum Genet*, **112**: 426-429.

Díaz-Font A, Cormand B, Chabás A, Vilageliu L, Grinberg D. (2003b) Unsuccessful chimera-plast strategy for the correction of a mutation causing Gaucher disease. *Blood Cell Mol Dis*, **31**: 183-186.

Dierks T, Schmidt B, von Figura K. (1997) Conversion of cysteine to formylglycine: a protein modification in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, **94**: 11963-11968.

Dierks T, Schmidt B, Borissenko LV, Peng J, Preusser A, Mariappan M, von Figura K. (2003) Multiple sulfatase deficiency is caused by mutations in de the gene encoding the human Ca-formylglycine generating enzyme. *Cell*, **113**: 435-444.

Doll RF, Bruce A, Smith FI. (1995) Regulation of the human acid beta-glucosidase promoter in multiple cell types. *Bba-Gene Struct Express*, **1261**: 57-67.

Dunbar C, Kohn D, Karlsson S, Barton N, Brady R, et al. (1996) Retroviral Mediated Transfer of the cDNA for Human Glucocerebrosidase into Hematopoietic Stem Cells of Patients with Gaucher Disease. A Phase I Study. *Hum Gene Ther*, **7**: 231-253.

Durand P, Lehn P, Callebaut I, Fabrega S, Henrissat B, Mornon JP. (1997) Active site motifs of lysosomal acid hydrolases: invariant features of clan GH_A glycosyl hydrolases deduced from hydrophobic cluster analysis. *Glycobiology*, **7**: 277-284.

Dvir H, Michal Harel, Andrew A, McCarthy, Lilly Toker, Israel Silman, Futerman AH, Sussman JL. (2003) X-ray structure of human acid- β -glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. *EMBO reports*, **4**: 704-709.

E

Emre S, Terzioglu M, Tokatli A, Coskun T, Ozalp I, Weber B, Hopwood JJ. (2002) Sanfilippo syndrome in Turkey: Identification of novel mutations in subtypes A and B. *Hum Mutat*, **19**: 5.

Erikson A, Bembi B, Schiffmann R. (1997) Neuronopathic forms of Gaucher's disease. *Baillieres Clinical Haematology, Dec* **10**: 711-723.

Esposito S, Balzano N, Daniele A, Villani G, Perkins K, Weber B, Hopwood JJ, et al (2000) Heparan N-sulfatase gene: two novel mutations and transient expression of 15 defects. *Biochim Biophys Acta*, **1501**: 1-11.

F

Fischer A., Carmichael K.P., Munnell J.F., Jhabvala P., Thompson J.N., Matalon R., Jezyk P.F, Wang P., Giger U. (1998) Sulfamidase deficiency in a family of dachshunds: a canine model of mucopolysaccharidosis IIIA (Sanfilippo A) *Pediatr. Res*, **44**: 74-82.

Freeman C and Hopwood J.J. (1986) Human liver sulphamate sulphohydrolase: determination of native protein and subunit Mr values and influence of substrate aglycone structure on catalytic properties. *Biochem J*, **234**: 83-92

Freud E, Cohen IJ, Mor C, Golinsky D, Blumenfeld A, Zer M. (1998) Splenic "regeneration" after partial splenectomy for Gaucher disease: Histological features. *Blood Cells Mol Dis*, **24**: 309-316.

Frischmeyer PA, Dietz HC. (1999) Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum Mol Genet*, **8**: 1893-1900.

Fujimoto A, Tayebi N, Sidransky E. (1995) Congenital ichthyosis preceding neurologic symptoms in two sibs with type 2 Gaucher disease. *Am J Med Genet*, **59**: 356-358.

Fukuda M. (1991) Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J Biol Chem*, **266**: 21327-30.

Furst W, Sandhoff K. (1992) Activator Proteins and Topology of Lysosomal Sphingolipid Catabolism. *Biochim Biophys Acta*, **1126**: 1-16.

G

Gaucher P. (1882) De l'epithelioma primitif de la rate, hypertrophie idiopathique de la rate sans leucemia. Tesi doctoral. Paris.

George R, McMahon J, Lytle B, Clark B, Lichtin A. (2001) Severe valvular and aortic arch calcification in a patient with Gaucher's disease homozygous for the D409H mutation. *Clin Genet*, **59**: 360-363.

Ginns EI, Choudary PV, Tsuji S, Martin B, Stubblefield B, Sawyer J, Hozier J, et al. (1985) Gene mapping and leader polypeptide sequence of human glucocerebrosidase: implications for Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, **82**: 7101-7105.

Giraldo P, Pocovi M, Perez-Calvo JI, Pubio-Felix D, Giralto M. (2000) Report of the Spanish Gaucher's Disease Registry: clinical and genetic characteristics. *Haematologica*, **85**: 792-799.

Goker-Alpan O, Schiffmann R, Park JK, Stubblefield BK, Tayebi N, Sidransky E. (2003) Phenotypic continuum in neuronopathic Gaucher disease: an intermediate phenotype between type 2 and type 3. *J Pediatr*, **143**: 273-276.

Grabowski GA, Gatt S, Kruse J, Desnick RJ. (1984) Human lysosomal beta-glucosidase: kinetic characterization of the catalytic, aglycon, and hydrophobic binding sites. *Arch Biochem Biophys*, **231** (1): 144-57.

Grabowski GA, White WR, Grace ME. (1989) Expression of functional human acid β -glucosidase in COS-1 and *Spodoptera frugiperda* cells. *Enzyme*, **41**: 131-142.

Grabowski GA, Gatt S, Horowitz M. (1990) Acid β -Glucosidase: Enzymology and molecular biology of Gaucher Disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **25**: 385-414.

Grabowski GA. (1993) Gaucher Disease - Enzymology, Genetics, and Treatment In: Harris H, Hirschhorn K (eds) *Advances in Hum Genet*, 21. Vol. 21: *Advances in Hum Genet*. Plenum Press Div Plenum Publishing Corp, 233 Spring St, New York, NY 10013, pp 377-441

Grabowski GA, Horowitz M. (1997) Gaucher's disease: molecular, genetic and enzymological aspects. *Baillieres Clinical Haematology*, **10**: 635-656.

Grace ME, Graves PN, Smith FI, Grabowski GA. (1990) Analyses of catalytic activity and inhibitor binding of human acid β -glucosidase by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, **265**: 6827-6835.

Grace ME, Newman KM, Scheinker V, Berg-Fussman A, Grabowski GA. (1994) Analysis of human acid β -glucosidase by site-directed mutagenesis and heterologous expression. *J Biol Chem*, **269**: 2283-2291.

Grace ME, Ashton PP, Pastores GM, Soni A, Desnick RJ. (1999) Non-pseudogene-derived complex acid beta-glucosidase mutations causing mild type 1 and severe type 2 Gaucher disease. *J Clin Invest*, **103**: 817-823.

Guo Y i col. (1995) Elevated plasma chitotriosidase activity in various lysosomal storage disorders. *J Inher Metab Dis*, **18**: 717-722.

H

Hakomori S. (1981) Glycosphingolipids in cellular interactions, differentiation and oncogenesis. *Annu Rev Biochem*, **50**: 733-764.

Hatton CE, Cooper ARA, Whitehouse C, Wraith JE. (1997) Mutation analysis in 46 british and irish patients with gauchers disease. *Arch Dis Child*, **77**: 17-22.

Havenga M, Fisher R, Hoogerbrugge P, Roberts B, Valerio D, vanEs H. (1997) Development of safe and efficient retroviral vectors for Gaucher disease. *Gene Ther*, **4**: 1393-1400.

Heitner R, Elstein D, Aerts J, van Weely S, Zimran A. (2002) Low-dose N-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) for type I Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis*, **28**: 127-133.

Henrissat B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*, **280**: 309-316.

Henrissat B, Bairoch A. (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*, **293**: 781-788.

Henrissat B, Callebaut I, Fabrega S, Lehn P, Mornon JP, Davies G. (1995) Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hidrolases. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**: 7090-7094.

Henrissat B, Bairoch A. (1996) Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J*, **316**:695-696.

Hentze MW, Kulozik AE. (1999) A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell*, **96**: 307-310.

Hers HG. (1963) Alpha-glucosidase deficiency in generalized glycogen storage disease (Pompe's disease). *Biochem J*, **86**: 11-16.

Hess B, Saftig P, Hartmann D, Coenen R, Lüllmann-Rauch R, Goebel HH, Evers M, von Figura K, D'Hooge R, Nagels G, De Deyn P, Peters C, Gieselmann V. (1996) Phenotype of arylsulfatase A-deficient mice: relationship to human metachromatic leukodystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**: 14821-14828.

Hillman RT, Green RE, Brenner SE. (2004) An unappreciated role for RNA surveillance. *Genome Biol*, **5** (2): R8.

Ho MW, O'Brien JS. (1971) Gaucher's disease: deficiency of acid beta-glucosidase and reconstitution of enzyme activity in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **68**: 2810-2813.

Hodanova K, Melkova Z, Horowitz M, Hrebicek M. (2003) Transient expression of wild-type and mutant glucocerebrosidases in hybrid vaccinia expression system. *Eur J Hum Genet*, **11**: 369-374.

Holleran WM, Ginns EI, Menon GK, Grundmann JU, Fartasch M, Mckinney CE, Elias PM, i col. (1994) Consequences of beta-Glucocerebrosidase Deficiency in Epidermis - Ultrastructure and Permeability Barrier Alterations in Gaucher Disease. *J Clin Invest*, **93**: 1756-1764.

Hoogerbrugge PM, Brouwer OF, Bordigoni P, Ringden O, Kapaun P, Ortega JJ, Omeara A, i col. (1995) Allogeneic bone marrow transplantation for lysosomal storage diseases. *Lancet*, **345**: 1398-1402.

Hopwood JJ, Elliott H. (1981) Sulphamidase activity in leucocytes culture fibroblasts and amniotic cells: diagnosis of the Sanfilippo A syndrome with the use of a radiolabelled disaccharide substrate. *Clin Sci*, **61**: 729-735.

Hopwood JJ. (1989) Enzymes that degrade heparin and heparan sulphate. In *Heparin: Clinical and Biological Properties, Clinical Applications*. D.W. Lane and U. Lindahl, eds. (Edward Arnold, London) pp. 190-229.

Horowitz M, Wilder S, Horowitz Z, Reiner O, Gelbart T, Beutler E. (1989) The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: structure and evolution. *Genomics*, **4**: 87-96.

Horowitz M, Tzuri G, Eyal N, Berebi A, Kolodny EH, Brady RO, Barton NW, i col. (1993) Prevalence of 9 Mutations Among Jewish and Non-Jewish Gaucher Disease Patients. *Am J Hum Genet*, **53**: 921-930.

Hua CT, Hopwood JJ, Carlsson SR, Harris RJ, Meikle PJ. (1998) Evaluation of the lysosome-associated membrane protein LAMP-2 as a marker for lysosomal storage disorders. *Clin Chem*, **44**: 2094-2102.

I

Ida H, Rennert OM, Iwasawa K, Kobayashi M, Eto Y. (1999a) Clinical and genetic studies of Japanese homozygotes for the Gaucher disease L444P mutation. *Hum Genet*, **105**: 120-126.

Ida H, Rennert OM, Kato S, Ueda T, Oishi K, Mackawa K, Eto Y. (1999b) Severe skeletal complications in Japanese patients with type 1 Gaucher disease. *J Inher Metab Dis*, **22**: 63-73.

Inui K, Kao FT, Fujibayashi S, Jones C, Morse HG, Law ML, Wenger DA. (1985) The gene coding for a sphingolipid activator protein, SAP-1, is on human chromosome 10. *Hum Genet*, **69**: 197-200.

J

Jenkins J, Leggio L, Harris G, Pickersgill RW. (1995) β -Glucosidase, β -galactosidase, family A cellulases, family F xylanases and two barley glycanases form a superfamily of enzymes with 8-fold β/α architecture and with two conserved glutamates near the carboxy-terminal ends of two β -strands four and seven. *FEBS Lett*, **362**: 281-285.

Jeyakumar, M, Butters TD, Cortina-Borja M, Hunnam V, Proia RL, Perry VH., Dwek RA., Platt FM. (1999) Delayed symptom onset and increased life expectancy in Sandhoff disease mice treated with N-butyldeoxynojirimycin. *Proc Natl Acad Sci. USA*, **96**: 6388-6393.

Jolly RD. (2000) Mucopolysaccharidosis IIIA (Sanfilippo syndrome) in a New Zealand Huntaway dog with ataxia. *N. Z. Vet.J.*, **48**: 144-148.

K

Kaminsky P, Belmatoug N, Devillemeur TB. (1996) Gaucher disease. *Presse Med*, **25**: 108-112.

Kao F-T, Law ML, Hartz J, Jones C, Zhang X-L, Dewji N, O'Brien JS, i col. (1987) Regional localization of the gene coding for sphingolipid activator protein SAP-1 on human chromosome 10. *Somat Cell Mol Genet*, **13**: 685-688.

Karageorgos, Guo, Blanch, Weber, Anson, Scott, Hopwood (1996) Structure and Sequence of the human Sulphamidase Gene. *DNA Res*, **3**:269-271.

Karpova EA, Voznyi YV, Keulemans JLM, Hoogeveen AT, Winchester B, Tsvetkova IV, Van Diggelen OP. (1996) A fluorometric enzyme assay for the diagnosis of Sanfilippo disease type A (MPS IIIA) *J Inher Metab Dis*, **19**: 278-285.

Kasper D, Dittmer F, Von Figura K, Pohlmann R (1997) Neither type of mannose 6-phosphate receptor is sufficient for targeting of lysosomal enzymes along intracellular routes. *J Cell Biol*, **134**: 615-623

Kim JW, Liou BB, Lai MY, Ponce E, Grabowski GA. (1996) Gaucher disease: Identification of three new mutations in the Korean and Chinese (Taiwanese) populations. *Hum Mutat*, **7**: 214-218.

Kishimoto Y, Hiraiwa M, Obrien JS. (1992) Saposins - Structure, Function, Distribution, and Molecular Genetics. *J Lipid Res*, **33**: 1255-1267.

Kleijer WJ, Karpova EA, Geilen GC, Keulemans J, Huijmans J, Tsvetkova IV, Voznyi YV, et al (1996) Prenatal diagnosis of Sanfilippo a syndrome: Experience in 35 pregnancies at risk and the use of a new fluorogenic substrate for the heparin sulphamidase assay. *Prenat Diagn*, **16**: 829-835.

Knaust A, Schmidt B, Dierks T, von Bulow R, von Figura K. (1998) Residues critical for formylglycine formation and/or catalytic activity of arylsulfatase A. *Biochemistry*, **37**: 13941-13946.

Knudson AG, Kaplan WD. (1962) Genetics of the sphingolipidosis. A: Cerebral sphingolipidosis. A symposium on Tay-Sachs disease. Academic Press, New York, 395-411.

Kolodny EH & Fluharty AL. (1995) In *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases*, eds, Scriver, C.R. Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D. (McGraw-Hill, New York).

Kolter T, Sandhoff K. (1998) Recent advances in the biochemistry of sphingolipidoses. *Brain Pathology*, **8**: 79-100.

Koprivica V, Stone DL, Park JK, Callahan M, Frisch A, Cohen IJ, Tayebi N, i col. (2000) Analysis and Classification of 304 Mutant Alleles in Patients with Type 1 and Type 3 Gaucher Disease. *Am J Hum Genet*, **66**: 1777-1786.

Korkotian E, Schwarz A, Pelled D, Schwarzmann G, Segal M, Futerman AH. (1999) Elevation of intracellular glucosylceramide levels results in an increase in endoplasmic reticulum density and in functional calcium stores in cultured neurons. *J Biol Chem*, **274**: 21673-21678.

Krantz ID, MxCallum J, DeScipio C, Kaur M, Gillis LA, Yaeger D, Jukosky L, Wasserman N, Bottani A, Morris CA, Nowaczyk MJ, Toriello H, Bamshad MJ, Carey JC, Rappaport E, Kawachi S, Lander AD, Calof AL, Li HH, Devoto M, Jackson LG. (2004) Cornelia de Lange syndrome is caused by mutations in NIPBL, the human homologue of *Drosophila melanogaster* Nipper-B. *Nat Genet*, **36**(6): 631-635.

Kroepfl T, Milos I, Paul K, Plecko B, Paschke E. (2001) The frequency of common mutations among patients with mucopolysaccharidosis types I, II and IIIA diagnosed in Austria over the last 17 years. *Clin Genet*, **60**: 393-394.

L

Lachmann RH, Platt FM. (2001) Substrate reduction therapy for glycosphingolipid storage disorders. *Expert Opin Investig Drugs*, **10**: 455-466.

Lau AA, Hemsley KM, Meedeniya A, Hopwood JJ. (2004) In vitro characterization of genetically modified embryonic stem cells as a therapy for murine mucopolysaccharidosis type IIIA. *Mol Genet Metab*, **81**: 86-95.

Lau EK, Tayebi N, Ingraham LJ, Winfield SL, Koprivica V, Stone DL, Zimran A, i col. (1999) Two novel polymorphic sequences in the glucocerebrosidase gene region enhance mutational screening and founder effect studies of patients with Gaucher disease. *Hum Genet*, **104**: 293-300.

Laubscher KH, Glew RH, Lee RE, Okinaka T. (1994) Use of denaturing gradient gel electrophoresis to identify mutant sequences in the β -glucocerebrosidase gene. *Hum Mutat*, **3**: 411-415.

Lee-Chen GL, Lin SP, Ko MH, Chuang CK, Chen CP, Lee HH, Cheng SC, Shen CH, Tseng KL, Li CL. (2002) Identification and characterization of mutations underlying Sanfilippo syndrome type A (mucopolysaccharidosis type IIIA) *Clin Genet*, **61**: 192-197.

Leonova T, Qi XY, Bencosme A, Ponce E, Sun Y, Grabowski GA. (1996) Proteolytic processing patterns of prosaposin in insect and mammalian cells. *J Biol Chem*, **271**: 17312-17320.

Liu CM, Watkins S, Bahnson A, Barranger JA. (1997) Gene therapy for Gaucher disease via genetically engineered primary myoblasts. *Concepts In Gene Therapy*, **283**: 283-295.

Liu YJ, Suzuki K, Reed JD, Grinberg A, Westphal H, Hoffmann A, Doring T, i col. (1998) Mice with type 2 and 3 Gaucher disease point mutations generated by a single insertion mutagenesis procedure (SIMP). *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**: 2503-2508.

Lloyd Evans E, Pelled D, Riebeling C, Bodennec J, de Morgan A, Waller H, Schiffmann R, i col. (2003) Glucosylceramide and glucosylsphingosine modulate calcium mobilization from brain microsomes via different mechanisms. *J Biol Chem*, **278**: 23594-23599.

Lowry RB, Applegarth DA, Toone JR, MacDonald E, Thunem NY (1990) An update on the frequency of mucopolysaccharide syndromes in British Columbia [letter]. *Hum Genet*, **85**: 389-90.

Lutskiy MI, Jones LN, Rosen FS, Remold-O'Donnell E. (2002) An *Alu*-mediated deletion at Xp11.23 leading to Wiskott-Aldrich syndrome. *Hum Genet*, **110**:515-519

M

Maquat LE, Carmichael GG. (2001) Quality control of mRNA function. *Cell*, **104**: 173-176.

Maquat LE. (2002) Nonsense-mediated mRNA decay. *Curr Biol*, **12**: R196-R197.

Martinez Arias R, Calafell F, Mateu E, Comas D, Andres A, Bertranpetit J. (2001) Sequence variability of a human pseudogene. *Genome Res*, **11**: 1071-1085.

Martinez J, Dugaiczuk LJ, Zielinski R, Dugaiczuk A. (2001) Human genetic disorders, a phylogenetic perspective. *J Mol Biol*, **308**:587-596

Masuno M, Tomatsu S, Sukegawa K, Orii T. (1990) Non-existence of a tight association between a ⁴⁴⁴leucine to proline mutation and phenotypes of Gaucher disease: high frequency of a NciI polymorphism in the non-neuronopathic form. *Hum Genet*, **84**: 203-206.

Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. (1999) Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA*, **281**: 249-254.

Mian IS. (1998) Sequence, structural, functional, and phylogenetic analyses of three glycosidase families. *Blood Cells Mol Dis*, **24**: 83-100.

Miao SC, Mccarter JD, Grace ME, Grabowski GA, Aebersold R, Withers SG. (1994) Identification of Glu(340) as the Active-Site Nucleophile in Human Glucocerebrosidase by Use of Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *J Biol Chem*, **269**: 10975-10978.

Millat G, Froissart R, Maire I, Bozon D. (1997) Characterization of iduronate sulphatase mutants affecting N-glycosylation sites and the cysteine-84 residue. *Biochem J*, **327**: 243-247.

Mistry PK, Smith SJ, Ali M, Hatton CSR, McIntyre N, Cox TM. (1992) Genetic diagnosis of Gaucher's disease. *The Lancet* **339**: 889-892.

Mistry PK, Wraight EP, Cox TM. (1996) Therapeutic delivery of proteins to macrophages: Implications for treatment of Gaucher's disease. *Lancet*, **348**: 1555-1559.

Mistry PK, Sirrs S, Chan A, Pritzker MR, Thomas PD, Grace ME, Meeker DP, i col. (2002) Pulmonary hypertension in type I Gaucher's disease: genetic and epigenetic determinants of phenotype and response to therapy. *Mol Genet Metab*, **77**: 91-98.

Miyazaki T, Masuda N, Waragai M, Motoyoshi Y, Kurokawa K, Yuasa T. (2002) An adult Japanese Sanfilippo A patient with novel compound heterozygous S347F and D444G mutations in the sulphamidase gene. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **73**: 777-778.

Mizukami H, Mi YD, Wada R, Kono M, Yamashita T, Liu YJ, Werth N, i col. (2002) Systemic inflammation in glucocerebrosidase-deficient mice with minimal glucosylceramide storage. *J Clin Invest*, **109**: 1215-1221.

Montfort M, Vilageliu L, GarciaGiralt N, Guidi S, Coll MJ, Chabás A, Grinberg D. (1998) Mutation 1091delC is highly prevalent in Spanish Sanfilippo syndrome type A patients. *Hum Mutat*, **12**: 274-279.

Moran D, Galperin E, Horowitz M. (1997) Identification of factors regulating the expression of the human glucocerebrosidase gene. *Gene*, **194**: 201-213.

Muezer J (1986) Mucopolisaccharidosis. *Adv Pediatr*, **33**: 269-302.

Muschol N, Storch S, Ballhausen D, Beesley C, Westermann JC, Gal A, Ullrich K, Hopwood JJ, Winchester B, Braulke T. (2004) Transport, Enzymatic Activity, and Stability of Mutant Sulfamidase (SGSH) Identified in Patients With Mucopolysaccharidosis Type IIIA. *Hum Mutat*, **23**: 559-566.

N

Nagy E, Maquat LE. (1998) A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem Sci*, **23**: 198-199.

Nelson J. (1996) Incidence of the mucopolysaccharidosis in Northern Ireland. *4th MPS Symposium*. Wollongong, Australia.

Nelson J (1997) Incidence of the mucopolysaccharidoses in Northern Ireland. *Hum Genet*, **101**: 355-358.

Neufeld EF, Muenzer J. (1995) The Mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* 7th Ed., New York, pp 2465-2494.

Neufeld EF, Muenzer J. (2001) The Mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* 8th Ed. Vol. III. McGraw-Hill, New York, pp 3421-3452.

Nilson O, Svennerholm L. (1982) Accumulation of glucosylceramide and glucosylsphingosine (psychosine) in cerebrum and cerebellum in infantile and juvenile Gaucher disease. *J Neurochem*, **105**: 709-718.

Nilsson O, Grabowski GA, Ludman MD. (1985) Glycosphingolipid studies of visceral tissues and brain from type I Gaucher variants. *Clin Genet*, **27**: 443-450.

Nimgaonkar MT, Bahnson AB, Boggs SS, Ball ED, Barranger JA. (1994) Transduction of mobilized peripheral blood CD34+ cells with the glucocerebrosidase cDNA. *Gene Ther*, **1**: 201-207.

Noensie EN, Dietz HC. (2001) A strategy for disease gene identification through nonsense-mediated mRNA decay inhibition. *Nat Biotechnol*, **19**: 434-439

O

Ohashi T, Hong CM, Weiler S, Tomich JM, Aerts JMGF, Tager JM, Barranger JA. (1991) Characterization of Human Glucocerebrosidase from Different Mutant Alleles. *J Biol Chem*, **266**: 3661-3667.

Ohashi T, Boggs S, Robbins P, Bahnson A, Patrene K, Wei FS. (1992) Efficient transfer and sustained high expression of the human glucocerebrosidase gene in mice and their functional macrophages following transplantation of bone marrow transduced by a retroviral vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**: 11332-11336.

Ohshima T, Murray GJ, Swaim WD, Longenecker G, Quirk JM, Cardarelli CO, Sugimoto Y, Pastan I, Gottesman MM, Brady RO, Kulkarni AB. (1997) α -galactosidase A deficient mice: a model of Fabry disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**: 2540-2544.

O'Neill RR, Tokoro T, Kozak CA, Brady RO. (1989) Comparison of the chromosomal localization of murine and human glucocerebrosidase genes and of the deduced amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**: 5049-5053.

Orvisky E, Sidransky E, McKinney CE, LaMarca ME, Samimi R, Krasnewich D, Martin BM, et al. (2000) Glucosylsphingosine accumulation in mice and patients with type 2 Gaucher disease begins early in gestation. *Pediatr Res*, **48**: 233-237.

P

Pampols T, Pineda M, Giros ML, Ferrer I, Cusi V, Chabás A, Sanmarti FX, et al. (1999) Neuronopathic juvenile glucosylceramidosis due to sap-C deficiency: clinical course, neuropathology and brain lipid composition in this Gaucher disease variant. *Acta Neuropathol*, **97**: 91-97.

Park JK, Taebi N, Stubblefield BK, LaMarca ME, MacKenzie JJ, Stone DL, Sidransky E. (2002) The E326K mutation and Gaucher disease: mutation or polymorphism? *Clin Genet*, **61**: 32-34.

Pasmanik-Chor M, Elroystein O, Aerts H, Agmon V, Gatt S, Horowitz M. (1996a) Overexpression of human glucocerebrosidase containing different-sized leaders. *Biochem J*, **317**: 81-8.

Pasmanik-Chor M, Laadan S, Elroystein O, Zimran A, Abrahamov A, Gatt S, Horowitz M. (1996b) The glucocerebrosidase D409H mutation in Gaucher disease. *Biochem Mol Med*, **59**: 125-133.

Pasmanik-Chor M, Madarshapiro L, Stein OE, Aerts H, Gatt S, Horowitz M. (1997) Expression of mutated glucocerebrosidase alleles in human cells. *Hum Mol Genet*, **6**: 887-895.

Pastores GM, Einhorn TA. (1995) Skeletal complications of Gaucher disease: pathophysiology, evaluation, and treatment. *Seminars in Hematology* **32** (Suppl. 1): 20-27.

Pastores GM, Barnett NL. (2003) Substrate reduction therapy: miglustat as a remedy for symptomatic patients with Gaucher disease type 1. *Expert Opin Invest Drugs* **12**: 273-281.

Paventi G, Filocamo M, Titomanlio L, Rizzolo G, Silvestro E, Perretti A, Gatti R and Angria G. (1998) A novel mutation of the beta-glucocerebrosidase gene associated with neurologic manifestations in three sibs. *Clin Genet*, **53**: 281-285.

Perkins KJ, Byers S, Yogalingam G, Weber B, Hopwood JJ (1999) Expression and characterization of wild type and mutant recombinant human sulfamidase. Implications for Sanfilippo (Mucopolysaccharidosis IIIA) syndrome. *J Biol Chem*, **274**: 37193-9.

Perkins KJ, Muller V, Weber B, Hopwood JJ (2001) Prediction of Sanfilippo phenotype severity from immunoquantification of heparan-N-sulfamidase in cultured fibroblasts from mucopolysaccharidosis type IIIA patients. *Mol Genet Metab*, **73**: 306-312.

Pines G, Morag A, Elstein D, Abrahamov A, Zimran A. (2001) Viral infections and phenotypic heterogeneity in Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis*, **27**: 358-361.

Piraud M, Boyer S, Mathieu M, Marie I. (1993) Diagnosis of mucopolysaccharidosis in a clinically selected population by urinary glycosaminoglycans analysis. A study of 2000 urinary samples. *Clin Chim Acta*, **221**: 171-181.

Platt FM, Neises GR, Reinkensmeier G, Townsend MJ, Perry VH, Proia RL, Winchester B, et al. (1997) Prevention of lysosomal storage in tay sachs mice treated with N butyldeoxynojirimycin. *Science*, **276**: 428-431.

Prosser J. (1993) Detecting single-base mutations. *TIBTECH*, **11**: 238-246.

Q

Qi XY, Qin W, Sun Y, Kondoh K, Grabowski GA. (1996) Functional organization of saposin C - Definition of the neurotrophic and acid beta-glucosidase activation regions. *J Biol Chem*, **271**: 6874-6880.

Qi XY, Grabowski GA. (2001) Molecular and cell biology of acid beta-glucosidase and prosaposin. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **66**: 203-239.

R

Rady PL, Susendran S, Vu AT, Hawkins JC, Michals-Matalon K, Merren J, Kumar AK, Matalon R. (2002) Founder mutation R254H of Sanfilippo syndrome type A in Cayman islands. *Genet Test*, **6**(3): 211-215.

Rafi MA, Degala G, Zhang XL, Wenger DA. (1993) Mutational Analysis in a Patient with a Variant Form of Gaucher Disease Caused by SAP-2 Deficiency. *Somat Cell Mol Genet*, **19**: 1-7.

Raghavan SS, Topol J, Kolodny EH. (1980) Leukocyte b-glucosidase in homozygotes and heterozygotes for Gaucher disease. *Am. J. Hum. Genet*, **32**: 158-173.

Rampini S. (1969) Das Sanfilippo syndrome (polydystrophie oligophrenie, HS-Mukopolysaccharidose). Bericht über 8 Fällen und Literaturübersicht. *Helv Paediatr Acta*, **24**: 55-91.

Reiner O, Wigderson M, Horowitz M. (1988) Structural analysis of the human glucocerebrosidase gene. *DNA*, **7**: 107-116.

Robertson SP, Klug GL, Rogers JG (1998) Cerebrospinal fluid shunts in the management of behavioral problems in Sanfilippo syndrome (MPS III). *European Journal of Pediatrics*. **157**: 653-655.

Rodriguez Mari A, Diaz Font A, Chabás A, Pastores GM, Grinberg D, Vilageliu L. (2001) New insights into the origin of the Gaucher disease-causing mutation N370S: Extended haplotype analysis using the 5GC3.2, 5470 G/A, and ITG6.2 polymorphisms. *Blood Cells Mol Dis*, **27**: 950-959.

Rorman E, Scheinker V, Grabowski GA. (1992) Structure and evolution of the human Prosaposin chromosomal gene. *Genomics*, **13**: 312-318.

Rudensky B, Paz E, Altarescu G, Raveh D, Elstein D, Zimran A. (2003) Fluorescent flow cytometric assay: a new diagnostic tool for measuring beta-glucocerebrosidase activity in Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis*, **30**: 97-99.

S

Samuel R, Katz K, Papapoulos SE, Yosipovitch Z, Zavivov R, Liberman UA. (1994) Aminohydroxypropylidene-bisphosphonate (APD) treatment improves the clinical skeletal manifestations of Gaucher's disease. *Pediatrics*, **94**: 385-389.

Sandhoff K, Klein A. (1994) Intracellular trafficking of glycosphingolipids: Role of sphingolipid activator proteins in the topology of endocytosis and lysosomal digestion. *FEBS Lett*, **346**: 103-107.

Sanfilippo SJ, Podosin R, Langer L, Good, RA. (1963) Mental retardation associated with acid mucopolysacchariduria (heparitin sulfate type). *J Pediatr*, **63**: 837-8.

Schmid CW, Jelinek WR. (1982) The Alu family of dispersed repetitive sequences. *Science*, **216**: 1065-1070.

Schnabel D, Schröder M, Sandhoff K. (1991) Mutation in the sphingolipid activator protein 2 in a patient with a variant of Gaucher disease. *FEBS Lett*, **284**: 57-59.

Schnabel D, Schroder M, Furst W, Klein A, Hurwitz R, Zenk T, Weber J, i col. (1992) Simultaneous Deficiency of Sphingolipid Activator Proteins-1 and Proteins-2 Is Caused by a Mutation in the Initiation Codon of Their Common Gene. *J Biol Chem*, **267**: 3312-3315.

Schuette CG, Pierstorff B, Huettler S, Sandhoff K. (2001) Sphingolipid activator proteins: proteins with complex functions in lipid degradation and skin biogenesis. *Glycobiol*, **11**: 81-90.

Scott HS, Blanch L, Guo XH, Freeman C, Orsborn A, Baker E, Sutherland GR, i col. (1995) Cloning of the sulphamidase gene and identification of mutations in Sanfilippo A syndrome. *Nat Genet*, **11**: 465-7.

Sibille A, Eng CM, Kim SJ, Pastores G, Grabowski GA. (1993) Phenotype/Genotype Correlations in Gaucher Disease Type-I - Clinical and Therapeutic Implications. *Am J Hum Genet*, **52**: 1094-1101.

Sidransky E, Sherer DM, Ginns EL. (1992) Gaucher Disease in the Neonate - A Distinct Gaucher Phenotype Is Analogous to a Mouse Model Created by Targeted Disruption of the Glucocerebrosidase Gene. *Pediatr Res*, **32**: 494-498.

Sidransky E, Fartasch M, Lee RE, Metlay LA, Abella S, Zimran A, Gao W, Elias PM, Ginns EI, Holleran WM. (1996a) Epidermal abnormalities may distinguish type 2 from type 1 and type 3 of Gaucher disease. *Pediatr Res*, **39**: 134-141.

Sidransky E, Tayebi N, Stubblefield BK, Eliason W, Klineburgess A, Pizzolato GP, Cox JN, et al. (1996b) The clinical, molecular, and pathological characterisation of a family with two cases of lethal perinatal type 2 Gaucher disease. *J Med Genet*, **33**: 132-136.

Singh G, Lykke-Andersen J. (2003) New insights into the formation of active nonsense-mediated decay complexes. *Trends Biochem Sci*, **28**: 464-466.

Sivakumur P, Wraith JE (1999) Bone marrow transplantation in mucopolysaccharidosis type IIIA: A comparison of an early treated patient with his untreated sibling. *J Inher Metab Dis*, **22**: 849-850.

Sorge J, West C, Westwood B, Beutler E. (1985) Molecular cloning and nucleotide sequence of human glucocerebrosidase cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, **82**: 7289-7293.

Sorge JA, West C, Kuhl W, Treger L, Beutler E. (1987) The human glucocerebrosidase gene has two functional ATG initiator codons. *Am J Hum Genet*, **41**: 1016-1024.

Sorge J, Gross E, West C, Beutler E. (1990) High level transcription of the glucocerebrosidase pseudogene in normal subjects and patients with Gaucher disease. *J Clin Invest*, **86**: 1137-1141.

Spranger JW. (1975) Morphological aspects of the mucopolysaccharidoses. In *Inborn Errors Of Skin, Hair and Connective Tissue*. J.B. Holten & J.T. Ireland (ed.). Lancaster, MTP Press, 39-60.

Stone DL, van DO, de KJ, Gaillard J, Niermeijer MF, Willemssen R, Tayebi N, i col. (1999) Is the perinatal lethal form of Gaucher disease more common than classic type 2 Gaucher disease? *Eur J Hum Genet*, **7**: 505-509.

Stone DL, Carey WF, Christodoulou J, Silience D, Nelson P, Callahan M, Tayebi N, i col. (2000) Type 2 Gaucher disease: the collodion baby phenotype revisited. *Arch Dis Child*, **82** (2).

Strasberg PM, Skomorowski MA, Warren IB, Hilson WL, Callahan JW, Clarke JTR. (1994) Homozygous Presence of the Crossover (Fusion Gene) Mutation Identified in a Type-Ii Gaucher Disease Fetus - Is This Analogous to the Gaucher Knock-out Mouse Model. *Biochem Med and Metab Biol*, **53**: 16-21.

Sukegawa K, Nakamura H, Kato Z, Tomatsu S, Montaña AM, Fukao T. (2000) Biochemical and structural analysis of missense mutations in N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase causing mucopolysaccharidosis IVA phenotypes. *Hum Mol Genet*, **9**: 1283-1290.

T

Tayebi N, Callahan M, Madike V, Stubblefield BK, Orvisky E, Krasnewich D, Fillano JJ, i col. (2001) Gaucher disease and parkinsonism: A phenotypic and genotypic characterization. *Mol Genet Metab*, **73**: 313-321.

Tayebi N, Stubblefield BK, Park JK, Orvisky E, Walker JM, LaMarca ME, Sidransky E. (2003) Reciprocal and nonreciprocal recombination at the glucocerebrosidase gene region: Implications for complexity in Gaucher disease. *Am J Hum Genet*, **72**: 519-534.

Tonkin ET, Wang TJ, Lisgo S, Bamshad MJ, Strachan T (2004) NIPBL, encoding a homolog of fungal Sec-2-type sister chromatid cohesion proteins and fly Nipped-B, is mutated in Cornelia de Lange syndrome. *Nat Genet*, **36**(6): 636-341.

Torralba MA, Perez Calvo JI, Pastores GM, Cenarro A, Giraldo P, Pocovi M. (2001) Identification and characterization of a novel mutation c.1090G > T (G325W) and nine common mutant alleles leading to Gaucher disease in Spanish. *Blood Cells Mol Dis*, **27**: 489-495.

Tsuji S, Choudary PV, Martin BM, Stubblefield BK, Mayor JA, Barranger JA, Ginns EI. (1987) A mutation in the human glucocerebrosidase gene in neuropathic Gaucher's disease. *New Engl J Med*, **316**: 570-575.

Tsuji S, Martin BM, Barranger JA, Stubblefield BK, LaMarca ME, Ginns EI. (1988) Genetic heterogeneity in Type I Gaucher disease: Multiple genotypes in Ashkenazic and non-Ashkenazic individuals. *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**: 2349-2352.

Turnbull J, Powell A, Guimond S. (2001) Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator. *Trends Cell Biol*, **11**: 75-82.

Tybulewicz VLJ, Tremblay ML, Lamarca ME, Willemssen R, Stubblefield BK, Winfield S, Zablocka B, i col. (1992) Animal Model of Gaucher's Disease from Targeted Disruption of the Mouse Glucocerebrosidase Gene. *Nature*, **357**: 407-410.

U

Uyama E, Uchino M, Ida H, Eto Y, Owada M. (1997) D409H/D409H genotype in Gaucher-like disease. *J Med Genet*, **34**: 175.

V

Vaccaro AM, Tatti M, Ciaffoni F, Salvioli R, Serafino A, Barca A. (1994) Saposin C induces pH-dependent destabilization and fusion of phosphatidylserine-containing vesicles. *FEBS Lett*, **349**: 181-186.

Vaccaro AM, Salvioli R, Barca A, Tatti M, Ciaffoni F, Maras B, Siciliano R, i col. (1995) Structural analysis of saposin C and B - Complete localization of disulfide bridges. *J Biol Chem*, **270**: 9953-9960.

Vaccaro AM, Salvioli R, Tatti M, Ciaffoni F. (1999) Saposins and their interaction with lipids. *Neurochem Res*, **24**: 307-314.

Van de Kamp JJP. (1979) The Sanfilippo syndrome: a clinical and genetical study of 75 patients in The Netherlands. *PhD thesis*, S-Gravenhage, J. H. Pasmans, Leiden.

Van de Kamp JJP, Niemeijer MF, von Figura K, Giesberts MAH. (1981) Genetic heterogeneity and clinical variability in Sanfilippo Syndrome (Types A, B, and C). *Clin Genet*, **20**: 152-160.

Van Hove JLK, Wevers RA, Van Cleemput J, Moerman P, Sciote R, Matthijs G, Schollen E, et al. (2003) Late-onset visceral presentation with cardiomyopathy and without neurological symptoms of adult Sanfilippo A syndrome. *Am J Med Genet*, **118a**: 382-387.

Vanweely S, Vandenberg M, Barranger JA, Miranda MCS, Tager JM, Aerts JMFG. (1993) Role of pH in Determining the Cell-Type-Specific Residual Activity of Glucocerebrosidase in Type-1 Gaucher Disease. *J Clin Invest*, **91**: 1167-1175.

Von Heijne G. (1986) A new methods for predicting signal sequence cleavage site. *Nucl. Acids Res*, **14**, 4683-4690.

W

Walker JM, Lwin A, Tayebi N, LaMarca ME, Orvisky E, Sidransky E. (2003) Glucocerebrosidase mutation T369M appears to be another polymorphism. *Clin Genet*, **63**: 237-238.

Walkley SU. (1995) Pyramidal neurons with ectopic dendrites in storage diseases exhibit increased GM2 ganglioside immunoreactivity. *Neuroscience*, **68**: 1027-1035.

Walkley SU. (1998) Cellular pathology of lysosomal storage disorders. *Brain Pathol*, **8**: 175-193.

Weber B, Guo XH, Wraith JE, Cooper A, Kleijer WJ, Bunge S, Hopwood JJ. (1997) Novel mutations in Sanfilippo A syndrome: implications for enzyme function. *Hum Mol Genet*, **6**: 1573-1579.

Weber B, vandeKamp J, Kleijer WJ, Guo XH, Blanch L, vanDiggelen OP, Wevers R, et al (1998) Identification of a common mutation (R245H) in Sanfilippo A patients from the Netherlands. *J Inherit Metab Dis*, **21**: 416-422.

Wenger DA, Clark C, Sattler M, Whaton C. (1978) Synthetic substrate b-glucosidase activity in leukocytes: a reproducible method for identification of patients and carriers of Gaucher's disease. *Clin Genet*, **13**: 145-153.

Wilkening G, Linke T, Sandhoff K. (1998) Lysosomal degradation on vesicular membrane surfaces. *J Biol Chem*, **273** (46): 30271-30278.

Wiltink E, Hollak C. (1996) Alglucerase (Ceredase(TM)). *Pharm World Sci*, **18**: 16-19.

Winfield SL, Tayebi N, Martin BM, Ginns EI, Sidransky E. (1997) Identification of three additional genes contiguous to the glucocerebrosidase locus on chromosome 1q21: implications for gaucher disease. *Genome Res*, **7**: 1020-1026.

X

Xu LC, Stahl SK, Dave HPG, Schiffmann R, Correll PH, Kessler S, Karlsson S. (1994) Correction of the Enzyme Deficiency in Hematopoietic Cells of Gaucher Patients Using a Clinically Acceptable Retroviral Supernatant Transduction Protocol. *Exp Hematol*, **22**: 223-230.

Xu YH, Quinn B, Witte D, Grabowski GA. (2003) Viable mouse models of acid beta-glucosidase deficiency - The defect in Gaucher disease. *Am J Pathol*, **163**: 2093-2101.

Y

Yogalingam G, Hopwood JJ (2001) Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type IIIA and IIIB: Diagnostic, clinical, and biological implications. *Hum Mutat*, **18**: 264-281.

Z

Zervas M, Somers KL, Thrall MA, and Walkley SU. (2001) Critical role for glycosphingolipids in Niemann-Pick disease type C. *Curr Biol*, **11**: 1283-1287.

Zhang J, Maquat LE. (1997) Evidence that translation reinitiation abrogates nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells. *EMBO J*, **16**: 826-833.

Zhang J, Sun XL, Qian YM, Maquat LE. (1998) Intron function in the nonsense-mediated decay of beta-globin mRNA: Indications that pre-mRNA splicing in the nucleus can influence mRNA translation in the cytoplasm. *RNA*, **4**: 801-815.

Zhao HQ, Bailey LA, Grabowski GA. (2003) Enzyme therapy of Gaucher disease: clinical and biochemical changes during production of and tolerization for neutralizing antibodies. *Blood Cells Mol Dis*, **30**: 90-96.

Zimmer KP, Le CP, Aerts H, Harzer K, Fukuda M, O' BJ, Naim HY. (1999) Intracellular transport of acid beta-glucosidase and lysosome-associated membrane proteins is affected in Gaucher's disease (G202R mutation). *J Pathol*, **188**: 407-414.

Zimran A, Gross E, West C, Sorge J, Kubitz M, Beutler E. (1989) Prediction of Severity of Gaucher's Disease by Identification of Mutations at DNA Level. *Lancet*, **2**: 349-352.

Zimran A, Gelbart T, Beutler E. (1990a) Linkage of the PvuII polymorphism with the common Jewish mutation for Gaucher disease. *Am J Hum Genet*, **46**: 902-905.

Zimran A, Sorge J, Gross E, Kubitz M, West C, Beutler E. (1990b) A glucocerebrosidase fusion gene in Gaucher disease. Implications for the molecular anatomy, pathogenesis, and diagnosis of this disorder. *J Clin Invest*, **85**: 219-222.

Zimran A, Gelbart T, Westwood B, Grabowski GA, Beutler E. (1991) High frequency of the Gaucher disease mutation at nucleotide 1226 among Ashkenazi Jews. *Am J Hum Genet*, **49**: 855-859.

