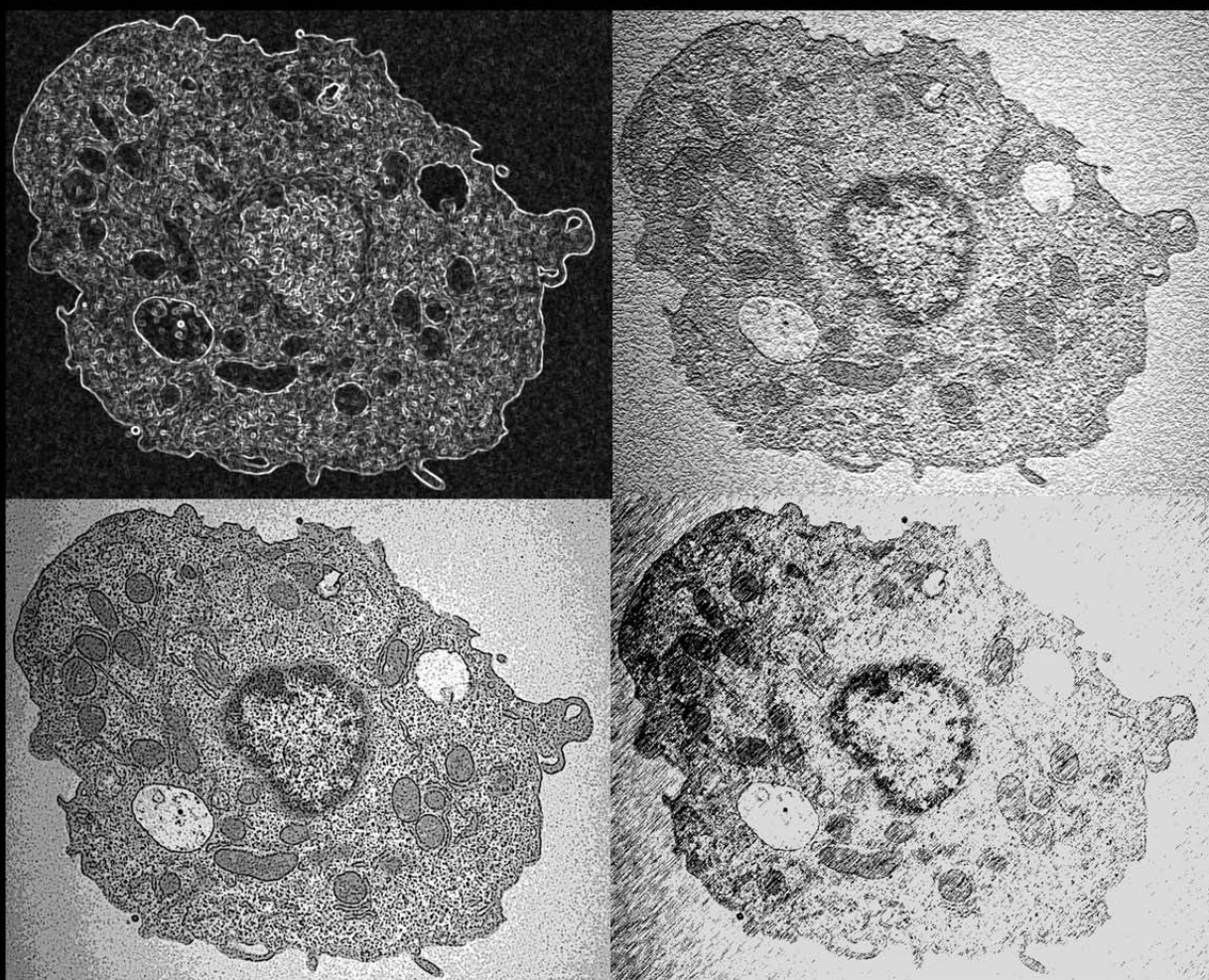


# Caracterització de mutacions causants de la malaltia de Gaucher. Aproximació a una teràpia gènica.



Anna Diaz Font  
2006

*Resultats*

CAPITOL 2

*ANÀLISI DEL GEN PSAP EN PACIENTS DE LA MALALTIA  
DE GAUCHER*



## 2.1. Anàlisi de mutacions en el gen *PSAP* en un pacient de la malaltia de Gaucher

Fins al moment només s'han descrit tres pacients de la malaltia de Gaucher amb mutacions en el gen de la prosaposina (*PSAP*) i no en el gen de la glucocerebrosidasa (*GBA*). En dos casos d'aquests només s'havia identificat una de les dues mutacions responsables de la malaltia (Rafi i col., 1993; Schnabel i col., 1991).

Nosaltres disposàvem de la mostra d'un d'aquests dos pacients. Aquest pacient era portador de la mutació p.C382G, que es troba dins del domini de la saposina C. En aquest treball es presenta com es va identificar la segona mutació d'aquest pacient, la mutació p.Q430X. Aquesta mutació es troba en el domini de la saposina D i molt probablement produeix una deficiència de totes les saposines per NMD. És la primera mutació descrita en el domini de la saposina D.

### Referència del treball publicat:

A mutation within the saposin D domain in a Gaucher disease patient with normal glucocerebrosidase activity. *Human Genetics* (2005) 117: 275-277.

---



Hum Genet (2005) 117: 275–277  
DOI 10.1007/s00439-005-1288-x

## SHORT REPORT

Anna Diaz-Font · Bru Cormand · Raül Santamaria  
Lluïsa Vilageliu · Daniel Grinberg · Amparo Chabás

## A mutation within the saposin D domain in a Gaucher disease patient with normal glucocerebrosidase activity

Received: 23 December 2004 / Accepted: 25 January 2005 / Published online: 23 April 2005  
© Springer-Verlag 2005

**Abstract** Only two Gaucher disease (GD) patients bearing mutations in the prosaposin gene (*PSAP*), and not in the glucocerebrosidase gene (*GBA*), have been reported. In both cases, one mutant allele remained unidentified. We report here the identification of the second mutation in one of these patients, being the first complete genotype described so far in a SAP-C-deficient GD patient. This mutation, p.Q430X, is the first one reported in the saposin D domain and probably produces a null allele by nonsense mediated mRNA decay.

data of this patient, who meets the clinical criteria of GD but has normal acid  $\beta$ -glucosidase activity, were previously described (Christomanou et al. 1989; Pampols et al. 1999).

The patient inherited mutation p.C382G from his father. The maternal mutation was expected to be also in the SAP-C domain to be consistent with a GD phenotype. However, after analysing DNA from the patient's mother (since no sample from the patient was available) no change was identified upon sequencing exons 10 and 11, encoding the SAP-C domain, and the promoter region of the *PSAP* gene (GenBank AF057307). Thus, a complete sequencing of the whole coding region was undertaken. Fifteen PCR fragments, covering all the exons and the intron/exon boundaries were amplified and sequenced. Primers for a three-step PCR reaction (annealing temperatures 59–60°C) are described in Table 1.

This approach allowed the identification of the second mutation, p.Q430X, in the patient (Fig. 1a, b), which was confirmed by mismatch PCR (see primers in Table 1) and *RsaI* restriction analysis (Fig. 1c), and was not found in 100 control chromosomes. It corresponded to a C to T transition at position 1288 of the cDNA (GenBank M32221, with nucleotide 7 of that sequence, the A of the ATG initiation codon, corresponding to +1), giving rise to a premature stop codon in exon 12. This exon corresponds to the SAP-D domain, in which no mutation has previously been reported. A mutation in this domain is not expected to cause GD. However, the presence of that premature stop codon could trigger degradation of the whole mRNA by nonsense-mediated decay (NMD), since it fulfils the requirements for this process (Nagy and Maquat 1998). Although no sample was available for an experimental confirmation, the NMD hypothesis is consistent with the previous observation that *PSAP* RNA levels in the mother's fibroblasts were reduced by 50%, as shown by Northern blot analysis (Rafi et al. 1999).

In the search for mutations, two new polymorphic variants were identified. The first was the change –130T/

Gaucher disease (GD, MIM 230800, 230900, 231000) occurs mainly as a result of mutations in the glucocerebrosidase gene (*GBA*). Only very rarely it is due to a deficiency in the *GBA* activator protein SAP-C. The prosaposin gene (*PSAP*) is translated as a polypeptide of 524 amino acids, which is processed into four saposins, SAP-A, B, C, and D (for a review see Qi and Grabowski 2001)

In the two SAP-C-deficient GD patients reported to date (Christomanou et al. 1986, 1989), only one mutant allele was identified. The first patient bore mutation p.C382F (Schnabel et al. 1991) and the second presented a different change in the same codon, p.C382G (Rafi et al. 1999), within the SAP-C domain. In the present work we describe the identification of the second mutant allele in the last patient. The clinical and pathological

A. Diaz-Font · B. Cormand · R. Santamaria  
L. Vilageliu · D. Grinberg (✉)  
Departament de Genètica, Facultat de Biologia,  
Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645,  
08028 Barcelona, Spain  
E-mail: dgrinberg@ub.edu  
Tel.: + 34-93-4035716  
Fax: + 34-93-4034420

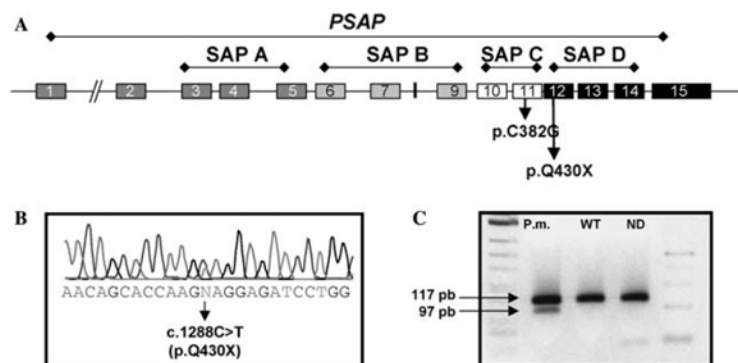
A. Chabás  
Institut de Bioquímica Clínica,  
Hospital Clínic, Corporació Sanitària Clínic,  
Barcelona, Spain

**Table 1** Primers used in the analysis of the *PSAP* gene

	Primer	Sequence (5' → 3')
Promoter region 1	PSAP p1 F	TTTAAGCAATTTCTGGCC
	PSAP p1 R	ACATAGAATAAGTAGTCGTG
Promoter region 1	PSAP p2 F	ACTGAGCCCTGTACCCTGTT
	PSAP p2 R	ATAGTGGGAGGAGTGAGGAA
Exon 1	PSAP exo1 F	GGGCTTTTCTTTTATGACCTT
	PSAP exo1 R	GACGCTGCGAGGGTCAAATCCT
Exon 2	PSAP exo2 F	CTGGGGAAATAAGTCAGGTGCG
	PSAP exo2 R	CTGAGCCTCCATCTCCTCTG
Exon 3	PSAP exo3 F	AGTCACACCTCTTCCCTC
	PSAP exo3 R	TATACGGCTCATATACCCTAA
Exon 4	PSAP exo4 F	GCTGTTTTCCAGGCTTGGTT
	PSAP exo4 R	TTACATTCTTCAGCAGTCCG
Exon 5	PSAP exo5 F	AGGGACTAATTCAGAGGCACT
	PSAP exo5 R	GCCCCAGTTTAAAGAACCAC
Exon 6	PSAP exo6 F	ATTTGAGAGCCTGTAAAGCAT
	PSAP exo6 R	CCTACTCCAGCCTCCACA
Exon 7	PSAP exo7 F	GGCCCAGAGCAGACATT
	PSAP exo7 R	GCCCAATTCAGCACTCTAAG
Exon 8	PSAP exo8 F	AGAGCATTTCCTGAACTT
	PSAP exo8 R	AGCCCTCCCAGCCTAT
Exon 9	PSAP exo9 F	GAGAGGGAGGTAGCCTTGAC
	PSAP exo9 R	GGGAACCGAAAGAAACAAGT
Exon 10	PSAP exo10 F	CAAGACCAAGGGCTGTGAGT
	PSAP exo10 R	CCTGGGACATTCAGGCTCG
Exon 11	PSAP exo11 F	TCCGGCCTCCCGTCTTCTCA
	PSAP exo11 R	ACCATCTCTCCCGCACCAC
Exon 12	PSAP exo12 F	CATGCTGCACCTCTGCTCT
	PSAP exo12 R	CAAAATGTACCCAGCCTTG
Exon 13	PSAP exo13 F	GGAGCTCTCAGGGAACAGTG
	PSAP exo13 R	GCCAAGTCTCAGAGCAACCT
Exon 14	PSAP exo14 F	TGTTCTGAAAAGAGCGTGTTG
	PSAP exo14 R	CTGGGTTCCATTAAAGCAG
Exon 15	PSAP exo15 F	CTGGGTCTCAGCATCTGGT
	PSAP exo15 R	GTGGGGGAGCCCTATTTTA
Mismatch p.Q430X	M-exon12 F	GTTACGTGACTCAGCCAA
	M-exon12 R	AAGAGCAGCCAGGATCTCGT

**Fig. 1 a** Schematic representation of the *PSAP* gene, which encodes four different saposins. Mutations present in the patient, p.C382G and p.Q430X, and the gene regions coding for the whole prosaposin (*PSAP*) protein and for the four saposins are indicated. **b** Sequence analysis of exon 12 PCR product from the mother of the patient, showing the presence of a C to T transition at cDNA position 1288, which leads to a change from a glutamine (amino acid 430) to a stop codon. **c** Detection of the c.1288C>T mutation by *RsaI* restriction analysis of the exon 12 PCR product. *P.m.* mother of the patient, *WT* wild-type control, *ND* non-digested PCR product

C (nt 682, GenBank AF057307) within the promoter region. The allele frequencies in 42 chromosomes from unrelated Spanish individuals were T: 90.5%, C: 9.5%. The second polymorphism was identified at position +5 in intron 12 (c.1350+5G>A). The frequencies in 48 chromosomes were 15 and 85% for the A and G alleles, respectively. The normal splicing was not affected by this change (data not shown).





**Acknowledgements** We thank R. Rycroft for revising the English. This research was supported by CICYT (SAF 2000-0200 and SAF 2003-00386) and FIS (Redes Temáticas, G03/054 REDEMETH).

---

## References

- 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, Pámpols T, Guardiola A (1989) Activator protein deficient Gaucher's disease. A second patient with the new identified lipid storage disorder. *Klin Wochenschr* 67:999-1003
- 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
- Pámpols T, Pineda M, Giros ML, Ferrer I, Cusi V, Chabás A, Sanmarti FX, Vanier MT, Christomanou H (1999) Neurodegenerative juvenile glucosylceramidosis due to sap-C deficiency: clinical course, neuropathology and brain lipid composition in this Gaucher disease variant. *Acta Neuropathol* 97:91-97
- Qi XY, Grabowski GA (2001) Molecular and cell biology of acid beta-glucosidase and prosaposin. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 66:203-239
- Rafi MA, de Gala G, Zhang XL, Wenger DA (1999) Mutational analysis in a patient with a variant form of Gaucher disease caused by SAP-2 deficiency. *Somat Cell Mol Genet* 19:1-7
- 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



## **Dades suplementàries:**

### **2.2. Anàlisi del gen de la prosaposina (PSAP) en pacients candidats a ser deficients en Saposina C.**

Un dels objectius d'aquesta tesi era trobar pacients de la malaltia de Gaucher com a conseqüència d'una deficiència de la saposina-C. Així, a més del pacient que ja s'havia descrit com a portador d'una mutació en el gen de la PSAP (capítol 2.1.), vam analitzar les mostres procedents de dos pacients més que eren candidats a ser portadors de mutacions en el gen de la PSAP. Aquests pacients tenien un fenotip que semblava Gaucher tipus I, però tenien una activitat glucocerebrosidasa normal en l'anàlisi *in vitro*.

Tot i que no es van trobar mutacions en el gen de la PSAP en aquests dos pacients, l'anàlisi complet del gen va permetre identificar dos polimorfismes nous del tipus SNPs en aquest gen, un en la regió promotora i l'altre en l'intró 12.

#### **2.2.1. Individus analitzats**

El pacient 1 es el pacient descrit en el capítol 2.1. Per a l'anàlisi de DNA es va utilitzar la mostra de la mare del pacient (SAP1m). El pacient 2 presentava hepatoesplenomegalia i hemorràgies gastrointestinals, i en l'aspirat de medul·la òssia apareixien un nombre baix de cèl·lules Gaucher. La pacient 3 presentava hepatoesplenomegalia i pancitopènia, i en l'aspirat de medul·la òssia s'observaven cèl·lules d'emmagatzematge lipídic.

La caracterització bioquímica dels pacients es va realitzar a l'Institut de Bioquímica Clínica (Barcelona). Els tres pacients tenien una activitat glucocerebrosidasa *in vitro* normal. A més, en els pacients 2 i 3, les activitats esfingomielinasa,  $\beta$ -galactosidasa, i  $\beta$ -hexosaminidasa eren també normals en els fibroblasts en cultiu. Per al pacient 3 també es va descartar la malaltia de Niemann-Pick tipus C en base a la tinció filipina.

Els DNAs d'individus control es van obtenir a partir de mostres de voluntaris del departament de Genètica de la Universitat de Barcelona i del banc de sang de l'Hospital de la Vall d'Hebron, Barcelona.

#### **2.2.2. Mètodes utilitzats**

Extracció de DNA: el DNA genòmic es va preparar a partir de fibroblasts dels pacients utilitzant el *Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega)*.

Amplificació per PCR i seqüenciació: El gen de la PSAP es va analitzar per amplificació per PCR i posterior seqüenciació de la regió promotora i dels seus 15 exons. Per la reacció de PCR es va fer utilitzant 1 U *Taq DNA Polymerase (Promega)*, 10 pmols de cada primer (descrits en el

capítol 2.1), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTPs, i 100 ng de DNA genòmic en el buffer recomanat. Les condicions de la reacció van ser: desnaturalització inicial a 94°C durant 2 min, 35 cicles de desnaturalització a 94°C durant 40s i 30s d'anellament a 59-60°C, amb una extensió final de 5 min a 72°C.

Els fragments de PCR amplificats van ser purificats amb el *GFX™ PCR DNA and Gel Band purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech)*. Les reaccions de seqüència es van fer amb el *BigDye Terminator Cycle Sequencing v2.0 kit (PE Applied Biosystems, UK)* i es van analitzar amb un *ABI PRISM 3700 DNA analyzer (PE Applied Biosystems, UK)*.

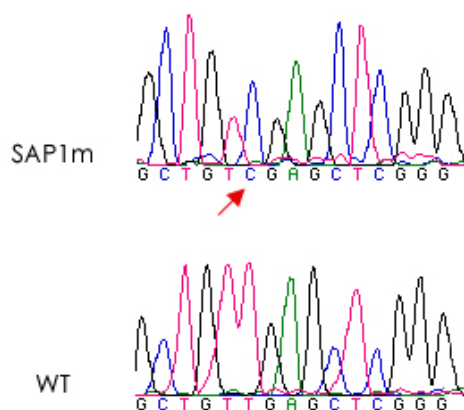
**Anàlisi de restricció:** Els SNPs de l'intró 12 i de la regió promotora es van confirmar per PCR i digestió amb els enzims *AccII* (3h at 60°C) i *TaqI* (2h at 65°C) respectivament. Els productes de digestió es van separar per electroforesi en un gel d'agarosa al 2.5%.

**Extracció d'RNA i RT-PCR.** Per al pacient 3, es va aïllar l'RNA total a partir dels fibroblasts cultivats amb el *QIashredder™ homogenizer (Qiagen)* i el *RNeasy Mini Kit (Qiagen)*. La transcripció reversa es va fer amb 200 U *M-MLV Reverse Transcriptase, Rnase H Minus, Point Mutant (Promega)*, 1 µg d'RNA total, i 1 µg d'oligo-dT (1h a 42°C, 10 min a 70°C).

Es va amplificar un fragment de cDNA que incloïa des de l'exó 8 al 14 (els dominis SAP-C i SAP-D) utilitzant els primers SAPdownF (5'-ACTCTGGTCCCCGCCAAAGT-3') i SAPdownR (5'-CCAATGCTGTGGTTTGGCC-3'). Les condicions de PCR van ser: desnaturalització inicial a 94°C durant 2 min, 35 cicles de desnaturalització a 94°C durant 40s, 1min d'anellament a 55°C, i una extensió a 68°C durant 90s, amb una extensió final de 5 min a 68°C.

### 2.2.3. Resultats

Es va analitzar DNA genòmic procedent dels pacients 2 i 3, i de la mare de l'1, per la falta de mostra d'aquest. Es van seqüenciar 17 fragments de PCR que cobrien la regió codificant, incloent els límits exó/intró, i la regió promotora.



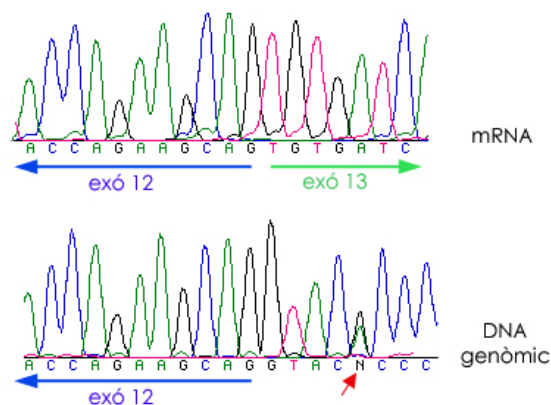
**Figura 1.** Seqüència del polimorfisme de la regió promotora en la mare del pacient 1 (SAP1m) i en un individu control.

En la mare del pacient 1 es va trobar la mutació p.Q430X (descrita en el capítol 2.1), causant de la malaltia de Gaucher juntament amb la p.C382G (descrita per Rafi et al., 1993). En els altres dos pacients no es va poder identificar cap mutació causant de la malaltia.

La seqüenciació del gen de la *PSAP* en els tres pacients va permetre, a més, trobar dos nous SNPs: un en la regió promotora i l'altre en l'intró 12, concretament en la posició +5.

El polimorfisme en el promotor és una transició T→C, 130 nt a 5' del codó d'iniciació ATG (posició 682 de l'entrada del Genbank AF057307). La variant menys freqüent, l'al·lel C, es va trobar en homozigosi en la mare del pacient 1 (Figura 1). Les freqüències al·lèliques calculades a partir de 42 cromosomes d'individus control d'origen espanyol no relacionats era de 90.5% (38 cromosomes) per l'al·lel T i 9.5% (4 cromosomes) per l'al·lel C, sense incloure els cromosomes de la mare del pacient 1. Aquestes dades indicaven que era una variant rara no patogènica.

La segona variant en la seqüència, identificada en el pacient 3, es va trobar a la posició +5 de l'intró 12 (IVS12+5G>A). El pacient era heterozigot per aquesta variant. Per analitzar si aquesta variant intrònica era una mutació patogènica, vam estudiar els seus possibles efectes en l'*splicing* del gen de la *PSAP*. Es va aïllar l'RNA total del pacient 3 i es va realitzar una RT-PCR amplificant un fragment que incloïa els dominis de la SAP-C i la SAP-D, que posteriorment va ser seqüenciat. Es va obtenir una banda de la mida esperada (787 nt) que corresponia a la seqüència normal, i no es va trobar cap producte adicional (Figura 2). Es van genotipar per aquest canvi nucleotídic 48 cromosomes d'individus control no relacionats, i es van trobar 7 cromosomes amb l'al·lel A i 41 amb l'al·lel G, donant unes freqüències al·lèliques del 15% i del 85% per la A i la G respectivament.



**Figura 2.** Seqüència del mRNA i DNA genòmic del pacient 3, on es veu que la mutació no afecta al *splicing*.

Vam aplicar el mètode descrit per Shapiro and Senapathy (1987) de predicció d'*splicing* per avaluar la probabilitat de que es donés l'*splicing* aberrant, calculant el valor consens (CV, '*consensus values*'). El CV reflecteix la similitat entre un possible lloc d'*splicing* i la seqüència consens. El valor obtingut per la seqüència mutada era més baix (68.25) que el de la seqüència normal (82.66).

Tot i el valor del CV, les dades experimentals suggerien que no es donava un *splicing* anormal en aquest pacient.