

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E  
BIOLOGIA MOLECULAR**

## **Gangliosidose GM1:**

**Aspectos clínicos e moleculares da população brasileira e a busca  
de novas terapias para o tratamento da doença.**

**Fernanda Sperb Ludwig**

**Orientador: Prof. Roberto Giugliani  
Co-orientadora: Profa. Ursula Matte**

**Porto Alegre, abril de 2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E  
BIOLOGIA MOLECULAR**

## **Gangliosidose GM1:**

**Aspectos clínicos e moleculares da população brasileira e a busca  
de novas terapias para o tratamento da doença.**

**Fernanda Sperb Ludwig**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Ciências (Genética e Biologia Molecular)**

**Orientador: Prof. Roberto Giugliani  
Co-orientadora: Profa. Ursula Matte**

**Porto Alegre, abril de 2012**

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Ursula Matte pela confiança e oportunidade, que me recebeu no CTG mesmo sem me conhecer, oportunizando o meu crescimento e aprendizado, sendo um grande exemplo de profissional que levarei por toda a minha vida;

Ao professor Roberto Giugliani que me proporcionou a oportunidade de desenvolver este trabalho, sempre dando apoio e incentivo;

Aos queridos amigos do CTG, que estiveram ao meu lado nos momentos bons e ruins, que sempre me ajudaram, sejam com dicas de trabalho ou com um ombro amigo, vocês foram sensacionais;

Ao Elmo por toda a paciência e pela ajuda incansável em todas as etapas do curso;

Aos professores do PPGBM, pelos conhecimentos repassados;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo financiamento dos projetos;

A todos os amigos, aos quais cito a Andréia, o Renato, a Vera e o Eduardo, com os quais sempre sei o significado da amizade verdadeira.

Aos grandes amores da minha vida, minha mãe e meu marido Alexandre, vocês são a luz da minha vida, meus melhores amigos, meus maiores exemplos.

A minha família pelo incentivo, em especial ao meu pai que sempre se orgulhou muito pelas minhas conquistas, eu queria muito que tu estivesses aqui para ver mais esta...

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	5
LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
1.0 INTRODUÇÃO.....	9
1.1 GANGLIOSIDOSE GM1.....	9
1.2 ASPECTOS CLINICOS.....	9
1.3 ASPECTOS BIOQUÍMICOS E MOLECULARES.....	11
1.4 PRINCIPAIS ACHADOS MOLECULARES.....	13
1.5 ANÁLISES POPULACIONAIS.....	15
1.2 BIOINFORMÁTICA.....	16
1.2.1 MODELAGEM DE PROTEÍNAS.....	17
1.2.2 MODELAGEM DA $\beta$ -GALACTOSIDASE HUMANA.....	18
1.3 TRATAMENTOS.....	19
1.3.1 TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS E TERAPIA DE REPOSIÇÃO ENZIMÁTICA.....	20
1.3.2 REDUÇÃO DA SÍNTESE DE SUBSTRATO.....	21
1.3.3 CHAPERONAS.....	22
1.3.4 TRADUÇÃO ALTERNATIVA.....	23
1.3.5 TERAPIA GÊNICA.....	25
2.0 OBJETIVOS.....	26
2.1 OBJETIVO GERAL.....	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3.0 ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	28
4.0 DISCUSSÃO .....	80
5.0 CONCLUSÕES.....	87
5.1 CONCLUSÃO GERAL.....	87
5.2 CONCLUSÕES.....	87
6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema do defeito bioquímico em Gangliosidose GM1.

Figura 2: Principais mutações identificadas no gene *GLB1*.

## LISTA DE ABREVIATURAS

3D- tridimensional

2D- bidimensional

DNA- ácido desoxirribonucleico

EBP- elastin binding protein

EXO-SAP – exonuclease – fosfatase alcalina de camarão (do inglês *shrimp alkaline phosphatase*)

GAG - Glicosaminoglicano

GSL - glicosilceramida

HSCT - células-tronco hematopoiéticas

Kb- kilobases

kDa - kilodaltons

LMC- *lysosomal multienzyme complex*

MPS - mucopolissacaridose

MPSI - mucopolissacaridose tipo I

MPSII – mucopolissacaridose tipo II

MPSVI – mucopolissacaridose tipo VI

NB-DGJ- N-butyl-deoxygalactonojirimycin

NB-DNJ - N-butyldeoxynojirimicina

NOEV - N-octyl-4-epi-bvalienamine

PAGE - polyacrilamide-agarose gel electrophoresis

PPCA- proteína protetora/catepsina A

RNA – ácido ribonucleico

SSCP - Single Strand Conformational Polymorphism

SNC – Sistema nervoso central

## RESUMO

A deficiência hereditária da enzima lisossômica  $\beta$ -galactosidase, codificada pelo gene *GLB1*, causa duas doenças humanas clinicamente distintas, a Gangliosidose GM1 e Morquio B. Clinicamente, pacientes com Gangliosidose GM1 mostram graus variados de neurodegeneração e anormalidades esqueléticas, enquanto que os com Mórquio B apresentam displasia esquelética e opacidade de córnea, sem envolvimento do sistema nervoso central. Neste trabalho foi realizada a análise da frequência populacional das mutações mais comuns no Brasil para Gangliosidose GM1, e a tentativa de comprovação da hipótese de efeito fundador destas mutações. Também foi realizada a pesquisa clínica e molecular de pacientes com Gangliosidose GM1 na tentativa de caracterizar os pacientes brasileiros, identificando novas mutações e traçando um panorama clínico e genético dessa população. Com a intenção de compreender os efeitos das novas mutações encontradas entre os pacientes brasileiros sobre a estrutura da proteína codificada por *GLB1*, modelos tridimensionais foram gerados através de ferramentas de bioinformática. Neste estudo foi possível prever as conseqüências biológicas destas mutações, correlacionando às mesmas com os achados fenotípicos dos pacientes. Um esforço na busca de novas terapias para a doença também foi realizado, visto que não existe tratamento eficaz contra a Gangliosidose GM1. Para tanto, três terapias foram testadas em fibroblastos de paciente com a mutação mais comum encontrada na população brasileira: a terapia de tradução alternativa com o uso de geneticina e cloranfenicol, e a terapia de chaperonas farmacológicas, através do uso de galactose. Nenhuma das terapias foi eficaz no aumento da atividade enzimática da  $\beta$ -galactosidase, mas um aumento da expressão gênica pode ser observado para o gene *GLB1*.

## ABSTRACT

The inherited deficiency of the lysosomal enzyme  $\beta$ -galactosidase, encoded by the gene *GLB1*, causes two clinically distinct human diseases: GM1Gangliosidosis and Morquio B. Clinically, patients with GM1 Gangliosidosis show varying degrees of neurodegeneration and skeletal abnormalities, while Morquio B shows skeletal dysplasia and corneal opacity, without involving the central nervous system. This work was performed to analyze the population frequency of the most common mutations in Brazil for Gangliosidosis GM1, and the attempt to prove the hypothesis of a founder effect for these mutations. A clinical and molecular research in patients with Gangliosidosis GM1 was also performed, in an attempt to characterize Brazilian patients, identifying new mutations and drawing a picture of the clinical and genetic aspects of this population. Trying to understand the effects of new mutations found among Brazilian patients on the structure of the protein encoded by *GLB1*, three-dimensional models were generated using bioinformatics tools. In this study it was possible to predict the biological consequences of these mutations, correlating them with the phenotypic findings of the patients. An effort in finding new therapies for the disease was also performed, since there is no effective treatment for GM1 Gangliosidosis. Therefore, three treatments were tested in fibroblasts from patients with the most common mutation found in Brazil: the alternative translation therapy using geneticin and chloramphenicol, and the pharmacological chaperone therapy, using galactose. None of these therapies was effective in increasing the enzyme activity of  $\beta$ -galactosidase, but an increase in gene expression could be observed in the *GLB1* gene.



## INTRODUÇÃO

### 1. Gangliosidose GM1

A Gangliosidose GM1 (MIM#230500) é uma doença lisossômica caracterizada pela deficiência da enzima  $\beta$ -galactosidase (E.C.3.2.1.23), que acarreta no acúmulo de gangliosídeo GM1 nos lisossomos (Suzuki et al., 1991). A deficiência hereditária da enzima lisossômica  $\beta$ -galactosidase causa duas doenças humanas clinicamente distintas, a Gangliosidose GM1 e a Mucopolissacaridose IV B (MIM#253010), também conhecida como Morquio B.

A  $\beta$ -galactosidase é uma hidrolase lisossômica que cliva resíduos galactosil terminais ligados a extremidade  $\beta$  de gangliosídeos, glicoproteínas e glicosaminoglicanos. Mutações no gene da  $\beta$ -galactosidase causam a deficiência ou a redução da atividade da enzima e o acúmulo patológico de metabólitos não digeríveis no lisossomo (Morreau et al., 1989).

A heterogeneidade clínica é comum em doenças lisossômicas, e a Gangliosidose GM1 e Morquio B representam os extremos em um espectro de fenótipos clínicos decorrentes de mutações no gene  $\beta$ -galactosidase (Callahan, 1999). Ambas as doenças são desordens raras que ocorrem devido a mutações no gene *GLB1*. A enzima  $\beta$ -galactosidase tem um efeito catalítico sobre gangliosídeo GM1, queratan sulfato e glicopeptídeos, sendo que o gangliosídeo GM1 é principalmente armazenado no tecido neuronal, enquanto que o queratan sulfato é acumulado nas cartilagens (Santamaria et al., 2006).

#### 1.1.1 Aspectos Clínicos:

A Gangliosidose GM1 é uma doença caracterizada pelo acúmulo do substrato gangliosídeo nos lisossomos. Clinicamente, pacientes mostram graus variados de neurodegeneração e anormalidades esqueléticas. Os sintomas

clínicos resultam do depósito de gangliosídeo GM1 e glicoconjugados relacionados em diferentes tecidos, principalmente no sistema nervoso central (Brunetti-Pierri & Scaglia, 2008). São três as principais variantes clínicas categorizadas pela gravidade e atividade residual da  $\beta$ -galactosidase.

O tipo I, ou forma infantil, mostra rápida deterioração psicomotora que inicia seis meses após o nascimento, com envolvimento generalizado do sistema nervoso central, hepatoesplenomegalia, dismorfismo facial, manchas maculares vermelhas, displasia esquelética e morte precoce. Em um primeiro momento, observa-se, além do dismorfismo, apatia, perda de apetite, sucção fraca e ganho de peso sub-normal para o período neonatal. Ascite e edema das extremidades são às vezes observados (Lyon, 1996). O retardo acentuado do desenvolvimento neuropsicomotor e a deterioração do SNC levam ao quadro de hipotonia muscular generalizada, que evolui gradualmente para um estado de espasticidade associado a crises convulsivas (O'Brien, 1983). O acúmulo de gangliosídeo GM1 se dá preferencialmente no cérebro. Órgãos como o fígado e o baço são afetados, porém em menor extensão. O acúmulo de oligossacarídeos contendo galactose terminal e proteoglicanos em menor proporção é provavelmente o responsável pelo comprometimento visceral e pelas mudanças ósseas observadas nestes pacientes (Suzuki et al., 2001). Alterações cardíacas, como coração hipertrófico e cardiomiopatia (Morrone et al., 2000), assim como extensas manchas mongólicas e pele espessa (Severini et al., 1997) são alguns dos achados clínicos observados com menor frequência. Dificuldades respiratórias e broncopneumonias repetitivas são a causa do óbito, que ocorre usualmente antes dos dois anos de idade (Suzuki et al., 2001).

O tipo II, ou forma infantil/juvenil, tem início entre sete meses e três anos de idade e curso mais lento. Apresenta envolvimento generalizado do sistema nervoso central com deterioração psicomotora, convulsões, envolvimento esquelético localizado e sobrevivência durante a infância. A hepatoesplenomegalia e as manchas maculares vermelhas normalmente não estão presentes. Quadros convulsivos, infecções recorrentes, especialmente broncopneumonias, são as causas de óbito entre essas crianças (O'Brien, 1983; Suzuki et al., 2001).

O tipo III, ou forma adulta, apresenta início dos três aos 30 anos de idade e é caracterizada pelo envolvimento localizado do sistema nervoso central, assim como distonia, distúrbios na marcha e fala (Callaham, 1999; Okumiya et al., 2003; Caciotti et al., 2011). Uma grande variabilidade fenotípica pode ser observada nestes pacientes. O primeiro sintoma apresentado geralmente é a disartria cerebelar progressiva, levando a espasticidade e ataxia. A distonia representa a manifestação clínica mais comum. A patologia em adultos é localizada no gânglio basal, com proeminente envolvimento do núcleo caudado, putamen e, em menor grau, a amígdala e o paleoestriado (Muthane et al., 2004). A progressão dos sintomas é lenta, mas a perda de função intelectual é evidente. A atividade enzimática residual de  $\beta$ -galactosidase nestes pacientes é maior que nas demais formas, chegando a 10% da observada em controles (Suzuki et al., 2001).

Entre os sintomas neurodegenerativos encontrados em pacientes com Gangliosidose GM1, a morte celular neuronal e a desmielinização acompanhada por astrogliose e microgliose são usualmente observadas em áreas de severa vacuolação neuronal. A apoptose neuronal, a resposta ao stress do retículo endoplasmático e o transporte axoplasmático anormal resultam em deficiência na mielina e distúrbios nas interações neuronais-oligodendrogliais (Voorn et al., 2004). Estes processos podem estar diretamente relacionados aos mecanismos patogênicos da doença (Kaye et al., 1992). Também contribuem para patogênese e progressão da doença as respostas inflamatórias, assim como a observação da ativação de processos autofágicos (Jeyakumar et al., 2003).

### **1.1.2 Aspectos bioquímicos e moleculares:**

O gene humano codificador da  $\beta$ -galactosidase, *GLB1*, está localizado no cromossomo 3 em 3p21.33 (Takano & Yamanouchi, 1993) e contém 16 éxons com aproximadamente 62.5 kb (Morreau et al., 1989; Oshima et al., 1990). A biossíntese e processamento da  $\beta$ -galactosidase têm sido estudados em fibroblastos normais e mutantes. A enzima é sintetizada como um precursor de 88 kDa, o qual é processado pós-transcricionalmente em uma forma lisossômica madura de 64 kDa (Hoogeveen et al., 1984).

Duas proteínas relacionadas surgem por *splicing* alternativo do transcrito primário do gene *GLB1*. O produto mais abundante é a  $\beta$ -galactosidase lisossômica. A segunda proteína, originalmente chamada  $\beta$ -galactosidase-*like*, não exibe atividade de hidrolase e se caracteriza como uma proteína de ligação à elastina (EBP). Ela surge por *splicing* alternativo, no qual a seqüência codificada pelos éxons 3, 4 e 6 é perdida, ocorre uma troca de fase no éxon 5 (que codifica uma seqüência de 32 aminoácidos) e a fase aberta de leitura é restaurada no início do éxon 7. Exceto por essa troca de fase, a estrutura principal da EBP é idêntica à da  $\beta$ -galactosidase (Morreau et al., 1989).

A proteína  $\beta$ -galactosidase forma o complexo lisossomal multienzima (LMC, do inglês *lysosomal multienzyme complex*) no compartimento endossomal-lisossomal, onde a enzima se associa à PPCA (proteína protetora/catepsina A) e a neuraminidase. Este complexo também inclui a enzima N-acetilglicosamina-6-sulfato sulfatase. A correta interação destas proteínas no complexo é essencial para sua perfeita atividade. Com o complexo LMC, a PPCA não tem somente uma função protetora, mas também desempenha um importante papel na maturação da forma de 64 kDa da  $\beta$ -galactosidase (Pshezhetsky et al., 2001).

A  $\beta$ -galactosidase cliva substratos por formação de um aminoácido intermediário galactosilado (o catalisador nucleófilo), com subsequente liberação da galactose e retenção da configuração  $\beta$ . Esse mecanismo prevê que, pelo menos, dois resíduos ácidos estejam envolvidos no mecanismo catalítico. Neste processo são clivados esfingolípídeos (gangliosídeos), oligossacarídeos contendo galactose terminal e proteoglicanos (glicosaminoglicanos como o ketaran sulfato) (Suzuki et al., 2001).

Os gangliosídeos são glicoesfingolípídeos que contêm ácido siálico em sua estrutura. Esses compostos estão presentes em grandes quantidades nas células ganglionares do sistema nervoso central, particularmente nas terminações nervosas e, em menor quantidade, na superfície da membrana das células dos tecidos extraneurais.

A falta da enzima  $\beta$ -galactosidase leva ao acúmulo de gangliosídeo GM1 (Figura 1). Nos tipos infantil e juvenil de Gangliosidose GM1, o conteúdo total de gangliosídeo na substância cinzenta aumenta de 10 a 20 vezes em relação

aos indivíduos normais e o gangliosídeo GM1 representa 80% deste total (O'Brien, 1989; Suzuki et al., 2001).

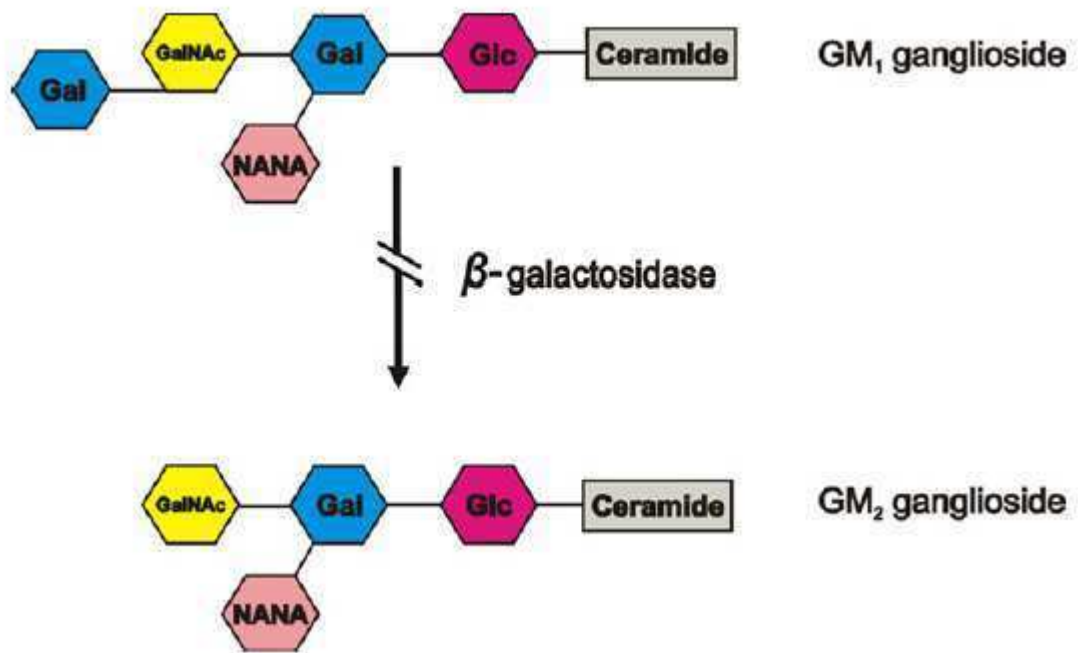


Figura 1: Defeito bioquímico em Gangliosidose GM1. A enzima  $\beta$ -galactose hidroliza resíduos galactosil terminais de gangliosídeo GM1. A falta da enzima  $\beta$ -galactosidase leva ao acúmulo de gangliosídeo GM1; NANA: ácido N-acetilneuramínico (Brunetti-Pierre & Scaglia, 2008).

### 1.1.3. Principais achados moleculares:

Mais de 100 mutações em *GLB1* já foram descritas em pacientes com Gangliosidose GM1 e Morquio B (Santamaria et al., 2007; Brunetti-Pierre & Scaglia, 2008), mas poucas têm sido caracterizadas. Menos de 30 pacientes de Morquio B foram analisados quanto às suas mutações no DNA (Paschke et al., 2001; Bagshaw et al., 2002; Santamaria et al., 2007).

As mutações estão espalhadas por todo o gene (Figura 2): 70% delas ocorrem simultaneamente tanto na  $\beta$ -galactosidase quanto na EBP. As mutações correspondentes a Gangliosidose GM1 abrangem toda a seqüência do gene, enquanto que as mutações correspondentes a Morquio B parecem ocorrer com maior freqüência nas regiões que envolvem os aminoácidos de 270-280 e 440-500, sugerindo que estas áreas estão diretamente ligadas a

atividade de degradação do queratan sulfato (Callaham, 1999, Paschke et al., 2001).

A maioria dos pacientes com Gangliosidose GM1 são heteroalélicos, com diferentes mutações em cada cromossomo e não existe uma mutação comum para esta doença presente em diferentes populações. Em contrapartida, uma mutação comum, p.W273L, foi encontrada em grande parte dos pacientes com Morquio B de diversas regiões da Europa que foram analisados por Paschke et al. (2001). É digno de nota que nenhum paciente com a mutação do p.W273L apresentou Gangliosidose GM1 e todos eles tinham o fenótipo clínico e bioquímico da doença Morquio B.

Em um amplo estudo molecular realizado por Silva et al. (1999) em 19 pacientes brasileiros e um uruguaio com a forma infantil de Gangliosidose GM1, seis novas mutações e duas já descritas foram identificadas. Duas mutações, c.1622-1627insG e p.R59H, estavam presentes em 18 dos 20 pacientes analisados, respondendo por 62,5% dos alelos mutados encontrados entre os pacientes. A figura 2 representa a posição das diferentes mutações descritas no gene *GLB1*.

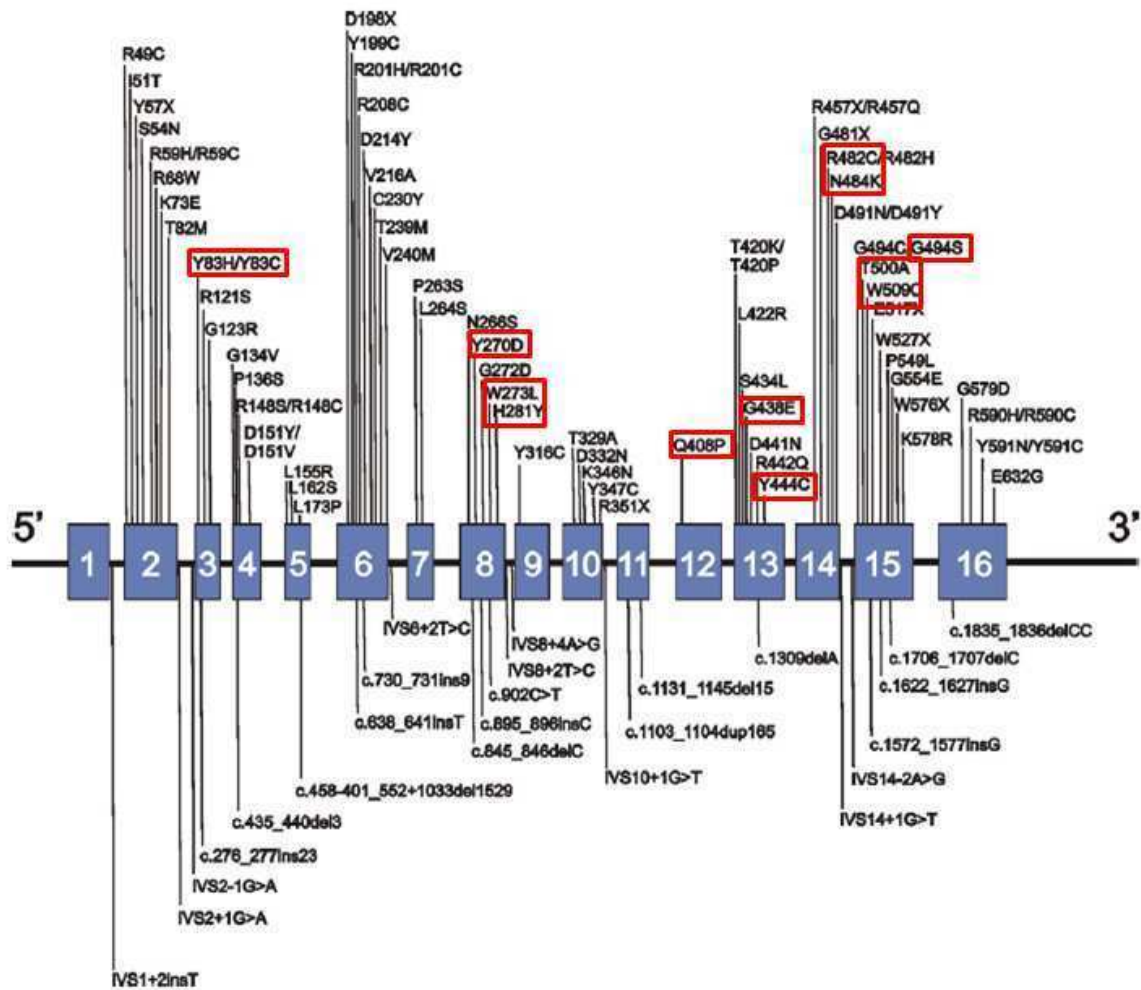


Figura 2: Principais mutações identificadas no gene *GLB1*. São 102 mutações identificadas. As caixas vermelhas destacam as mutações de Morquio B. As caixas azuis representam os éxons do gene *GLB1*. Adaptado de Brunetti-Pierre & Scaglia (2008).

#### 1.1.4. Análises populacionais:

Apesar de a Gangliosidose GM1 ser uma doença pan-etnica, poucos trabalhos analisam as taxas populacionais dessa doença. É estimado que a sua incidência seja de 1:100.000-200.000 nascidos-vivos, mas áreas de altas prevalências são encontradas ao redor do mundo.

No Brasil, dois trabalhos relatam a incidência como sendo de 1: 17.000 nascidos vivos (Coelho et al., 1997; Severini et al., 1999). Estes últimos autores apresentaram uma série histórica de diagnósticos nos anos de 1982 a 1996, no

Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Serviço de Genética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. De todos os 493 pacientes diagnosticados com erro inato do metabolismo, 14,8% dos pacientes apresentavam Gangliosidose GM1 (Severini et al., 1999).

Em Roma, a estimativa é de 1:10.000 (Sinigerska et al., 2006; Santamaria et al., 2006). Sinigerska et al. (2006) analisou 12 famílias afetadas de origem cigana. Neste trabalho foi comprovado um efeito fundador, onde 2% da população geral apresentam a mutação p.R59H, assim como 10% da população Rudari. Lenicker et al. (1997) avaliou crianças que deram entrada no Hospital St. Luke`s, em Malta, no período de 1970 a 1993 e observou a incidência de 1:3.700, com uma freqüência de portadores do alelo de 1:30. Georgiou et al. (1995) estimou a freqüência da doença na população de Chipre ao avaliar 102 habitantes da ilha, e em 104 habitantes específicos da vila de Pelegrine, região um pouco mais isolada de Chipre, onde 8,3% das pessoas eram portadoras do alelo p.R482H. A freqüência de portadores do alelo foi estimada como sendo de 1:12.

## **1.2. Bioinformática:**

Durante os últimos anos, a bioinformática, definida como tratamento computacional e processamento de informação biológica, tornou-se uma ferramenta de extrema importância para pesquisa em genética e biologia molecular. A pesquisa em bioinformática inclui o desenvolvimento de métodos para recuperação, armazenamento e análise dos dados. Nos últimos anos têm-se testemunhado um aumento exponencial na quantidade de dados biológicos, principalmente devido ao desenvolvimento e aplicação de tecnologias de alta capacidade, incluindo o seqüenciamento de nova geração, os microarranjos e as análises proteômicas (Yang et al., 2011).

A relação entre a ciência da computação e a biologia se torna cada vez mais estreita, uma vez que a taxa de dados biológicos produzidos fornece amplos desafios: quantidades massivas de dados têm de ser armazenados, analisados e devem estar disponíveis de forma acessível. A natureza dos dados é tal que muitas vezes um método estatístico e, portanto computacional, é necessário. Isto se aplica, em particular, as informações sobre os planos de



construção das proteínas e da organização de expressão gênica (Berman et al., 2000).

Os avanços na tecnologia de softwares têm permitido a criação de plataformas adequadas para o armazenamento, análise e representação de informações biológicas complexas de tal forma a permitir a realização de abordagens mais amplas e integradas dos dados (Navarro et al., 2003). Bancos de dados biológicos ainda estão longe de serem plataformas de fácil acesso e interpretação, devido à forma como são construídos, exigindo um esforço verdadeiramente coordenado entre biólogos e profissionais da informática (Peri et al., 2003).

### **1.2.1 Modelagem de proteínas**

O advento das tecnologias computacionais, integrado aos conhecimentos em biologia molecular, permitiu a projeção e simulação de estruturas protéicas em terceira dimensão. A compreensão da estrutura 3D de proteínas se mostra de grande impacto no entendimento de interações entre proteínas, DNA ou mesmo na ação de medicamentos, e das conseqüências de modificações na estrutura de proteínas. As novas tecnologias de projeções de estruturas terciárias de proteínas podem ser observadas com muito sucesso nos estudos de ligações de proteínas ao DNA, vias de sinalização, interações com compostos químicos e simulações do efeito de mutações (Bansal, 2005).

Uma proteína pode estar sob influência de um nível mais alto ou mais baixo de energia livre, o que influenciará no seu estado conformacional dependendo de sua interação com outras proteínas. Sob um estado de estabilidade conformacional, certas regiões da proteína são expostas para interações proteína-proteína ou DNA-proteína. Como a função da proteína depende de sítios ativos expostos, a função da proteína pode ser prevista pela correspondência da estrutura 3D de uma proteína desconhecida com estruturas já conhecidas (Baker & Sali, 2001; Whisstock & Lesk, 2003).

No entanto, as estruturas 3D a partir de cristalografia e espectroscopia são de difícil obtenção. Assim, há uma necessidade de mecanismo alternativo para análise das proteínas. Neste tipo de análise, geralmente há uma estreita correspondência entre a seqüência do gene e a estrutura 3D. Em tais casos, a

combinação de seqüências é suficiente para anotação de função. No entanto, múltiplas seqüências para a mesma estrutura 3D e a falta de concordância entre as seqüências de aminoácidos não influencia a estrutura 3D. Em tais casos, comparar a estrutura 2D, padrões de alfa-hélice e folhas beta, com as estruturas 3D é necessário para a correta verificação da função da proteína analisada (Whisstock & Lesk, 2003).

Existem duas abordagens principais para a projeção da estrutura 3D de uma proteína: a predição baseada na homologia de seqüência, e o método *ab initio*. A abordagem por homologia de seqüência utiliza alinhamento de seqüências para identificar a melhor montagem da estrutura 3D por diferentes componentes: porções conservadas, porções em loop, e cadeias laterais, importantes para prever a estrutura geral 3D. O método *ab initio* baseia-se no princípio da minimização de energia, e prevê a estrutura a partir de uma única seqüência (Baker & Sali, 2001). Recentes avanços nos métodos *ab initio* procuram integrar as propriedades bioquímicas e biofísicas como o dobramento de folhas beta e as informações de regiões hidrofóbicas para obter melhor precisão na estrutura final.

### **1.2.2 Modelagem da $\beta$ -galactosidase humana**

A  $\beta$ -galactosidase humana é classificada como pertencente a família 35 das hidrolases glicosídicas. A predição de sua estrutura descreve um domínio em barril TIM, que é típico de membros da família das hidrolases glicosídicas. A  $\beta$ -galactosidase humana é uma glicosidase retida, na qual o produto retém a mesma estereoquímica do substrato inicial devido a um mecanismo de reação de duplo deslocamento, no qual dois ataques nucleofílicos consecutivos em um carbono anomérico levam a uma retenção geral da configuração anomérica. Um par de ácidos carboxílicos é necessário para esta reação. Um deles age como nucleófilo catalítico e o outro age como um catalisador em ácido/base. Na  $\beta$ -GAL humana, Glu268 foi identificada como nucleófilo catalítico e Glu188 é um candidato a catalisador ácido/base. Estes resíduos são localizados na quarta e sétima folha  $\beta$  do domínio em barril TIM respectivamente. Por esta razão, a  $\beta$ -GAL humana pertence a superfamília 4/7 (Ohto et al., 2011).

Anteriormente à publicação de Usui et al. (2011) que cristalografou a  $\beta$ -galactosidase humana, e da publicação de Ohto et al. (2011), que se baseou na estrutura cristalografada para realizar a análise das conseqüências de diversas mutações na estrutura da proteína, outros autores realizaram a modelagem desta proteína utilizando como base seqüências de *Bacteroides* e *Penicillium* (PDB 3D3A e 1XC6, respectivamente). Morita et al. (2009), além da modelagem da proteína, acreditou ter estabelecido uma boa correlação entre as mudanças estruturais e os fenótipos clínicos e bioquímicos das mutações p.G123R, p.R201C, p.I51T e p.Y83H. Caciotti et al. (2011), descreveu a estrutura da  $\beta$ -GAL e estabeleceu a estrutura virtual das mutações p.I51N, p.L69P, p.R148H, p.W161G, p.S191N, p.R68W e p.R109W. Entretanto, Ohto et al. (2011) mostrou que a organização dos domínios da proteína cristalografada são diferentes dos domínios descritos nos artigos que se basearam em um modelo virtual e em seqüências homólogas a  $\beta$ -GAL humana.

Com a proteína recentemente cristalografada e caracterizada (Usui et al., 2011), muitos conhecimentos a cerca da estrutura e organização, ação enzimática, interações no interior das células e interações com compostos farmacológicos poderão ser desvendados, abrindo portas para o desenvolvimento de novas pesquisas e abordagens no tratamento de Gangliosidose GM1.

### **1.3. Tratamentos**

Nenhuma terapia efetiva existe, até o momento, para o tratamento de Gangliosidose GM1. Portanto, as intervenções adotadas são essencialmente sintomáticas e paliativas, baseadas no atendimento global ao paciente e no aconselhamento genético (Vellodi, 2005). Terapias experimentais estão sendo desenvolvidas e testadas. Entre elas podemos citar o transplante de células tronco hematopoiéticas, a redução da síntese de substrato, o uso de chaperonas e de fármacos para indução de tradução alternativa e a terapia gênica.

### **1.3.1. Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas e Terapia de Reposição Enzimática**

O princípio do transplante de células-tronco hematopoiéticas (HSCT) para doenças lisossômicas consiste no fato de que as células do doador são capazes de produzir quantidade suficiente de enzima para corrigir a deficiência do receptor, de forma clinicamente eficiente (Krivit, 2004). Desde o primeiro transplante de medula óssea há 30 anos, para Mucopolissacaridose (MPS) I (Hobbs et al., 1981) várias centenas de pacientes com doenças lisossômicas receberam HSCT.

O enxerto após transplante apresenta resultados de forma rápida, auxiliando na diminuição da excreção de substrato, na redução do volume visceral e na melhora dos sintomas de vias aéreas obstrutivas. Os ossos, no entanto, não respondem tão bem e os pacientes muitas vezes precisam de cirurgia e intervenção para correção de deformidades ósseas. Quando tratados, os pacientes freqüentemente mostram um ganho significativo na função cognitiva (Peters & Steward 2003). O HSCT apresenta resultados promissores em pacientes com diversas doenças lisossômicas, como manosidose, leucodistrofia metacromática e doença de Krabbe, desde que o transplante seja realizado antes que os sinais de envolvimento do sistema nervoso central e periférico estejam presentes (Cartier & Aubourg, 2008). Entretanto, ainda não há evidências de que este tipo de terapia funcione efetivamente para Gangliosidose GM1. Uma das dificuldades é a necessidade de se encontrar um doador compatível em um período muito curto de tempo, já que pacientes com forma infantil da doença vão a óbito em torno dos dois anos de idade (Winn, 2011).

A terapia de reposição enzimática (TRE) é um tratamento que consiste na administração periódica, por via venosa, da enzima específica deficiente no paciente. Este tipo de terapia já está disponível para diversas doenças lisossômicas, como doença de Gaucher, doenças de Fabry, MPS I, MPS II e MPS VI (Desnick & Schushman, 2002; Giugliani et al., 2010).

A Terapia de Reposição Enzimática é uma alternativa terapêutica disponível para várias doenças lisossômicas, no entanto, é incapaz de atravessar a barreira hemato-encefálica e não melhora a doença no sistema

nervoso central no caso das deficiências enzimáticas graves, além de apresentar custos bastante elevados (Giugliani et al., 2010).

### **1.3.2. Redução da síntese de substrato**

A terapia de redução da síntese de substrato representa uma nova abordagem no tratamento de doenças lisossômicas. O conceito deste princípio terapêutico é reduzir a quantidade de material armazenado em vez de aumentar a atividade das enzimas degradantes, melhorando o desbalanço entre a taxa de biossíntese e a taxa de catabolismo (Beck, 2010).

Um exemplo do uso bem sucedido de terapia de redução de substrato foi realizado para doença de Gaucher. A N-butyldeoxynojirimycina (NB-DNJ), assim como compostos relacionados, possuem a capacidade de inibir ceramidaglicosiltransferase (GlcCerS), enzima que sintetiza glicosilceramida (GSL), composto de armazenamento na doença de Gaucher. Para demonstrar a segurança e eficácia desta substância, foi iniciado um ensaio clínico com 28 pacientes com a doença de Gaucher (Cox et al., 2000). E, com base neste ensaio, o fármaco Miglustate, Zaveska® (Actelion Pharmaceuticals), ganhou a aprovação de comercialização na Europa e nos EUA para pacientes sintomáticos com manifestação clínica leve a moderada. Vários ensaios clínicos têm demonstrado que Miglustate não só melhora os parâmetros sanguíneos, como hemoglobina e contagem de plaquetas, mas também tem um efeito positivo sobre manifestações ósseas (Ficicioglu, 2008). Estas drogas, portanto, têm o potencial de serem usadas para tratar todas as doenças resultantes do armazenamento de GSL. Estes imino açúcares podem atravessar a barreira hemato-encefálica e, portanto, têm o potencial de serem usadas para tratar doenças de depósito de GSL com envolvimento do SNC (Elliot-Smith et al., 2008).

Kasperzyk et al. (2005), ao tratar ratos pós-natais com N-butyldeoxygalactonojirimycin (NB-DGJ), reduziu significativamente a quantidade de gangliosídeo GM1 total, no tronco cerebral e no cerebelo de ratos normais e deficientes em  $\beta$ -galactosidase. Estes dados sugerem que o NB-DGJ pode ser uma terapia eficaz de intervenção precoce para Gangliosidose GM1 e outras

doenças decorrentes do acúmulo de gangliosídeos. O mesmo resultado pode ser observado em ratos neonatais (Kasperzyk et al., 2004).

Tratamentos que visam à redução de substratos celulares acumulados em doenças de depósito lisossômico sejam bloqueando um passo anterior no catabolismo do substrato, ou desviando a via metabólica afetada por alteração da sinalização ou silenciamento de genes são de extrema importância, principalmente porque outras enzimas lisossomais são muitas vezes superexpressas para compensar a deficiência. Supondo que uma droga pode atravessar a barreira hemato-encefálica, existe um potencial para atingir todas as células do corpo e, portanto, têm mais oportunidades para corrigir o aspecto neuronal dos distúrbios. Esta abordagem têm sido utilizada com sucesso nas doenças onde há o acúmulo de glicosfingolípido para reduzir gangliosídeos GM1 e 2 nas doenças de Sandhoff, Tay-Sachs e doença de Gaucher (Jeyakumar et al 2005).

Porém, a utilização deste tipo de terapia ainda deve ser cautelosa uma vez que glicosfingolípido são importantes em muitos processos biológicos e qualquer inibição ou redução na sua síntese pode ter conseqüências em muitos sistemas (Fan, 2003).

### **1.3.3 Chaperonas**

Enzimas lisossomais são sintetizadas nos ribossomos e secretadas no retículo endoplasmático em uma forma não dobrada. Existe um sistema eficiente nas células que controla que apenas as proteínas dobradas adequadamente sejam transportadas para o complexo de Golgi para o processamento e maturação. Enzimas mal dobradas são degradadas pelo proteossoma. Moléculas específicas, chamadas chaperonas farmacológicas, são inibidores que em baixas concentrações se ligam as proteínas e as ajudam a serem dobradas de forma apropriada. Mutações que afetam o dobramento de proteínas impedem as enzimas lisossomais de alcançar seu destino final, o lisossomo, de modo que elas não podem cumprir com sua função. No entanto, algumas enzimas mutantes poderiam manter a capacidade total ou parcial do sítio catalítico se adquirissem sua conformação correta e, conseqüentemente, ser submetida à maturação (Fan et al., 1999; Beck, 2010)

Uma das vantagens das chaperonas farmacológicas é a sua melhor biodistribuição em comparação com enzimas recombinantes. Certos compostos exógenos que inibem a atividade enzimática *in vitro* se ligam à enzima intracelular, resultando na formação de um complexo que estabiliza e transporta a enzima cataliticamente ativa ao lisossomo. Sob o pH ácido dos lisossomos, o complexo se dissocia, e a enzima mutante permanece estabilizada e funcional (Matsuda et al., 2003).

Diversos trabalhos têm demonstrado o efeito positivo da galactose e seus derivados na correção da atividade enzimática da  $\beta$ -galactosidase. Um dos compostos mais utilizados é a N-octyl-4-epi-bvalienamine (NOEV), que apresenta resultados específicos para cada tipo de mutação, sendo efetiva para 20% a 40% dos pacientes, com aumentos de 0,5 a 10 vezes (Iwasaki et al., 2006). Caciotti et al. (2009), ao testar galactose em cultura de fibroblastos de pacientes, obteve um aumento de 2,5 vezes na atividade da  $\beta$ -galactosidase. Com a pesquisa do efeito em mutações específicas e com o aprimoramento dos compostos químicos, o uso de chaperonas poderá ser uma terapia bastante promissora para o tratamento de Gangliosidose GM1.

#### **1.3.4. Tradução alternativa**

Aproximadamente 1/3 dos alelos causadores de doenças genéticas ocorrem devido a códons de terminação prematuros. Estas mutações levam a proteínas truncadas, não-funcionais ou deletérias, que acarretam em efeitos como a dominância negativa ou o ganho de função. O uso de fármacos que conseguem alterar este mecanismo celular tem sido estudado para diversas doenças decorrentes de códons de parada prematuros (Linde & Kerem, 2008).

A tradução alternativa se baseia na capacidade de alguns antibióticos reduzirem a fidelidade da maquinaria de tradução. Antibióticos aminoglicosídicos, como a gentamicina, agem através da inibição do mecanismo ribossomal de correção, o qual faz com que um amino-acilRNA mal pareado não seja incorporado à cadeia polipeptídica. Este método permite que proteínas com mutações que geram códons de parada prematuros sejam traduzidas até o término normal do transcrito por incorporação de um aminoácido aleatório no lugar da mutação sem sentido (Clancy et al., 2001;

Bhuvanagiri et al., 2010). Vale lembrar que aminoglicosídeos têm efeitos mínimos sobre a terminação de tradução normal, porque os códons de parada corretos de genes eucariotos são cercados por seqüências à montante e à jusante, que melhoram a eficiência da parada da tradução, enquanto mutações sem sentido geralmente não possuem essas seqüências (Linde & Kerem, 2008).

Uma década atrás, este potencial dos aminoglicosídeos foi investigado no tratamento de fibrose cística e mais tarde foi testado para outras doenças. Depois do sucesso em ensaios com modelos animais, os ensaios clínicos em pacientes com fibrose cística ou distrofia muscular de Duchenne foram realizados com gentamicina. Estes ensaios mostraram que os aminoglicosídeos podem promover *in vivo* a leitura de mutações sem sentido levando à expressão completa das proteínas e/ou a correção da função da proteína. No entanto, é interessante notar que, apesar de uma série de estudos apontarem para a significância clínica de aminoglicosídeos, a variabilidade na resposta ao tratamento mostrou-se muito variável em muitos desses estudos (Bhuvanagiri et al., 2010).

O cloranfenicol também tem se mostrado como uma possível nova terapia para mutações que geram códons de parada prematuros. Este fármaco pertence a uma classe de antibióticos que, em seu mecanismo de ação normal, inibe a ação da enzima peptidil transferase por se ligar diretamente ao sítio catalítico, impedindo o reconhecimento da mesma sobre o seu substrato acceptor (Schlünzen et al., 2001). Thompson et al., (2002) observaram a alta eficiência deste fármaco na restauração da atividade enzimática em uma seqüência mutada do gene da  $\beta$ -galactosidase bacteriana. Foi demonstrado que este tipo de antibiótico interage com a peptidil-transferase da região da subunidade 50S do ribossomo, podendo afetar os mecanismos de mudança de fase de leitura ou a leitura dos códons de parada na subunidade 30S. Os resultados apresentados mostraram um aumento duas vezes maior na atividade da  $\beta$ -galactosidase em bactérias tratadas com cloranfenicol em relação às tratadas com gentamicina, levantando a possibilidade de uma nova aplicabilidade para este fármaco, no tratamento de doenças genéticas com mutações sem sentido.



### 1.3.5. Terapia gênica

A terapia gênica envolve a inserção de um gene funcional em células com objetivo de corrigir ou atribuir uma nova função a célula (Culver, 1994). Esta técnica permite constante entrega de uma proteína terapêutica para os órgãos alvo. Ela se mostra promissora no tratamento de doenças lisossômicas por acessar órgãos que a terapia de reposição enzimática não consegue atingir como, por exemplo, os ossos ou o cérebro. As doenças lisossômicas são excelentes candidatas para esta terapia, uma vez que em sua grande maioria são doenças bem caracterizadas, monogênicas e, além disso, não estão sujeitas a mecanismos de regulação complexa. Uma atividade enzimática de apenas 15-20% do nível normal é suficiente para eficácia clínica da terapia (Sands e Davidson, 2006).

O material genético pode ser transferido diretamente para as células do paciente (terapia gênica *in vivo*) ou as células são removidas do paciente, modificadas por inserção do material genético e transplantadas de volta para o paciente (terapia gênica *ex vivo*) (Nardi et al., 2002).

O uso de terapia gênica mediada por vírus adeno-associado em camundongos neonatais obteve como resultado a terapia mais eficaz até então apresentada para Gangliosidose GM1 (Takaura et al., 2003; Broekman et al., 2007). A distribuição do produto gênico ocorre de forma ampla, incluindo tecidos de difícil acesso como o cérebro. Aos três meses, camundongos nocautes tratados apresentaram a atividade de  $\beta$ -galactosidase de 7 a 65 vezes maior do que em camundongos selvagens, e pelo menos 1000 vezes maior do que em não-tratados (Broekman et al., 2007).

A terapia gênica é uma modalidade de tratamento promissora para doenças lisossômicas, no entanto, as preocupações permanecem. A grande questão gira em torno da segurança de vetores virais. A possibilidade de carcinogênese devido a transferência de genes mediada por retrovirus ou adenovirus é um grande obstáculo para a aplicação clínica. Para doenças neurogenéticas fatais, muitas vezes o risco pode ser compensado pelo benefício. Uma segunda consideração importante é que os vetores geralmente expressam níveis suprafisiológicos de enzima. Se isso seria seguro em seres humanos ainda é uma questão desconhecida (Sands & Davidson, 2006).

## **2.0 OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Caracterizar os aspectos clínicos e moleculares da Gangliosidose GM1 no Brasil compreender os efeitos de novas mutações descritas e buscar novas estratégias terapêuticas para o tratamento da doença.

### **2.2. Objetivos específicos**

#### Estudo 1

- Identificar as mutações p.R59H e c.1622-1627insG em pacientes com Gangliosidose GM1 e nos seus familiares.
- Analisar a frequência dos polimorfismos R521C e S532G em pacientes e nos controles.
- Utilizar as mutações e polimorfismos para identificação de haplótipos em pacientes com Gangliosidose GM1 e em seus parentes para inferir sobre a origem única ou múltipla das mutações.

#### Estudo 2

- Identificar as mutações causadoras de Gangliosidose GM1 através da análise do gene *GLB1* em uma série histórica de pacientes atendidos no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM/HCPA).
- Avaliar a frequência das mutações causadoras de Gangliosidose GM1 nos pacientes atendidos no SGM/HCPA.

- Fazer o levantamento das informações clínicas dos pacientes com Gangliosidose GM1 atendidos no SGM/HCPA através da revisão de prontuários.
- Estabelecer a correlação genótipo-fenótipo através das informações clínicas e das análises moleculares dos pacientes.

### Estudo 3

- Analisar o efeito de novas mutações encontradas em pacientes com Gangliosidose GM1 através de ferramentas de bioinformática, pela análise da estrutura tridimensional da proteína, usando como molde a estrutura cristalografada da  $\beta$ -galactosidase humana.
- Analisar o efeito de novas mutações encontradas em pacientes com Gangliosidose GM1 através do programa PolyPhen2.

### Estudo 4

- Tratar fibroblastos de paciente com a mutação mais comum encontrada em pacientes brasileiros com geneticina, cloranfenicol e galactose, e avaliar a atividade enzimática da  $\beta$ -galactosidase antes e após o tratamento.
- Avaliar a expressão gênica de *GLB1* antes e após o tratamento com geneticina e cloranfenicol.
- Avaliar o *Nonsense Mediated RNA Decay* antes e após o tratamento com geneticina e cloranfenicol.

### **3.1. Artigo I – publicado na revista Genetics and Molecular Biology**



## Population analysis of the *GLB1* gene in South Brazil

Cléia Baiotto<sup>1,3#</sup>, Fernanda Sperb<sup>1,2#</sup>, Ursula Matte<sup>2</sup>, Cláudia Dornelles da Silva<sup>3</sup>, Renata Sano<sup>3</sup>, Janice Carneiro Coelho<sup>3</sup> and Roberto Giugliani<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>2</sup>Centro de Terapia Gênica/Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>3</sup>Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

### Abstract

Infantile GM1 gangliosidosis is caused by the absence or reduction of lysosomal beta-galactosidase activity. Studies conducted in Brazil have indicated that it is one of the most frequent lysosomal storage disorders in the southern part of the country. To assess the incidence of this disorder, 390 blood donors were tested for the presence of two common mutations (1622-1627insG and R59H) in the *GLB1* gene. Another group, consisting of 26 GM1 patients, and the blood donors were tested for the presence of two polymorphisms (R521C and S532G), in an attempt to elucidate whether there is a founder effect. The frequencies of the R59H and 1622-1627insG mutations among the GM1 patients studied were 19.2% and 38.5%, respectively. The frequency of polymorphism S532G was 16.7%, whereas R521C was not found in the patients. The overall frequency of either R59H or 1622-1627insG was 57.7% of the disease-causing alleles. This epidemiological study suggested a carrier frequency of 1:58. Seven different haplotypes were found. The 1622-1627insG mutation was not found to be linked to any polymorphism, whereas linkage disequilibrium was found for haplotype 2 (R59H, S532G) ( $p < 0.001$ ). These data confirm the high incidence of GM1 gangliosidosis and the high frequency of two common mutations in southern Brazil.

**Key words:** GM1 gangliosidosis, beta-galactosidase, *GLB1* gene, founder effect, linkage disequilibrium.

Received: April 28, 2010; Accepted: October 29, 2010.

GM1 gangliosidosis and mucopolisaccharidosis IV-B (Morquio B) are lysosomal storage disorders caused by a  $\beta$ -galactosidase (*GLB1*; EC 3.2.1.23) deficiency. This deficiency occurs due to mutations in the *GLB1* gene, but the differences that lead either to GM1 gangliosidosis or to Morquio B are not known so far. *GLB1* is located on chromosome 3 at 3p21.33 (Takano and Yamanouchi, 1993) and is composed of 62.5 kb divided into 16 exons (Morreau *et al.*, 1989). Hypotheses have been raised proposing that more than 100 different mutations could be responsible for the Morquio or GM1 gangliosidosis phenotypes (Callahan, 1999; Brunetti-Pierri and Scaglia, 2008). However, patients with intermediate phenotypes have also been described (Giugliani *et al.*, 1987; Mayer *et al.*, 2009).

The incidence of type 1 GM1 gangliosidosis is considered to be between 1:100,000 and 1:200,000 live births (Sinigerska *et al.*, 2006). However, higher frequencies have been described for specific regions, such as Malta (1:3,700

(Lenicker *et al.*, 1997). The incidence in Brazil has been estimated at 1:17,000 live births, and the carrier frequency was found to be 1:67 (Severini *et al.*, 1999). Mutation analysis performed in 19 Brazilian patients detected the presence of mutations 1622-1627insG (Silva *et al.*, 1999) and/or R59H (Morrone *et al.*, 1997) in about 60% of the alleles. These results stand out when compared to mutation frequencies found by other groups in different parts of the world.

Here, we report a screen to detect and confirm the incidence of type 1 GM1 gangliosidosis in southern Brazil by analyzing 390 anonymous blood donor samples for the presence of the two common mutations. In addition, these control samples and a group of 26 GM1 patients were tested for the presence of two polymorphisms located within the *GLB1* gene, in an attempt to elucidate whether there is a founder effect, which could explain the high frequency of this disorder in the studied region.

Mutation analysis was performed on samples from 26 unrelated patients with GM1 gangliosidosis and their relatives (whenever possible) to determine the linkage phase of the alleles.

Send correspondence to Ursula Mattes. Rua Ramiro Barcelos 2.350, Bairro Santa Cecília, 90035-903 Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: umatte@hcpa.ufrgs.br.

# These authors contributed equally to this work.

Patients were diagnosed at the Laboratory of Inborn Errors of Metabolism of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (LREIM/HCPA), Brazil. The diagnosis was confirmed by low levels of  $\beta$ -galactosidase enzyme activity in leukocytes. Anonymous control samples were collected from blood donors of the HCPA Blood Bank, for a total of 390 samples.

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes, using the salting-out procedure (Miller *et al.*, 1988). Molecular analysis was performed using PCR for exons 2 and 15, in order to detect the R59H, 1622-1627insG, R521C and S532G mutations. Primers and conditions were as described by Silva *et al.* (1999). The PCR fragments of exon 2 were digested with *Nla*III (New England Biolabs) and visualized on a 3% agarose gel, to assess for the presence of the R59H mutation. Gels for SSCP (single-strand conformation polymorphism) analysis of exon 15 contained 25% MDE (Mutation Detection Enhancement – FMC) and 5% glycerol, and were run for 14-15 h at 250V/4W at room temperature. The gels were silver-stained as described by Orita *et al.* (1989). Alterations were identified by comparison with known sequenced samples. Nucleotide sequences were aligned using the Alignment Explorer/ClustalW Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 (Tamura *et al.*, 2007). Linkage disequilibrium was calculated using the DNA Sequence Polymorphism 5 (DNASP) program (Rozas and Rozas, 2000) and the haplotype construction.

We investigated 26 patients with GM1 gangliosidosis for mutations R59H and 1622-1627 and for polymorphisms R521C and S532G. Twenty-two patients had one or both mutations. The frequencies of R59H and 1622-1627insG were 19.2% and 38.5%, respectively (Table 1). The frequency of the S532G polymorphism was 15.4%, while that of the R521C polymorphism was 0 (zero); the latter polymorphism was however present in one of the parents of four patients. Four patients presented none of the aforementioned mutations.

The frequencies of these two disease-causing mutations and of the two polymorphisms in 390 control subjects

**Table 1** - Allele frequencies in patients and controls.

Alleles	Patients		Controls	
R59H	10/52 =	0.192	1/780 =	0.001
1622-1627insG	20/52 =	0.385	3/780 =	0.004
S532G	8/52 =	0.154	58/780 =	0.074
R521C	0/52 =	0.0	21/780 =	0.027

are also shown in Table 1. The R59H mutation was in heterozygosis in one subject, and the 1622-1627insG was in heterozygosis in another three. The estimated overall frequency of these two mutations is 0.5% in the normal population of Porto Alegre. The higher frequency of polymorphism S532G in patients (0.154) than in controls (0.074) was marginally significant ( $p = 0.046$ , Fisher's Exact Test), whereas R521C showed no difference between the two groups.

Because R59H and 1622-1627insG correspond to 57.7% of the disease-causing alleles, it was possible to estimate the frequency of mutant alleles in the population of Porto Alegre at 0.0007509 and the carrier proportion at 1:58. These figures would lead to a disease incidence of 1:13,317 live births.

Polymorphisms R521C and S532G were used in haplotype analysis to identify a founder effect in the Brazilian population. Seven different haplotypes were found. Table 2 shows the haplotype frequencies in patients and in controls. In about 10% of the patients and 2% of the controls it was not possible to determine the haplotypes.

In the patient group, haplotype 2 was the most frequent (36.5%), but close to haplotype 1 (34.6%). Haplotypes 3 and 7 were found only in the control group, in which haplotype 1 was the most frequent (89.1%). The 1622-1627insG mutation was not found to be in linkage disequilibrium with any polymorphism, whereas R59H was found to be in linkage disequilibrium with S532G (haplotype 5) in the patient group ( $p < 0.001$ ).

Severini *et al.* (1999) reviewed 63 GM1 type I cases diagnosed at the LREIM/HCPA and found that 68% were

**Table 2** - Haplotype frequencies (as to the presence of R59H and 1622-1627insG mutations and R521C and S532G polymorphisms) in patients and controls.

Haplotype	R59H;1622-1627insG; R521C;S532G*	Patients (n = 52)	Controls (n = 780)
1	1-1-1-1	0.346	0.891
2	1-2-1-1	0.365	0.003
3	1-2-1-2	0.0	0.001
4	2-1-1-1	0.058	0.001
5	2-1-1-2	0.097	0.0
6	1-1-1-2	0.019	0.068
7	1-1-2-1	0.0	0.019
8	ND	0.115	0.016

\* 1 = wild-type allele; 2 = mutant allele; ND = not determined.

from the State of Rio Grande do Sul. The epidemiological study suggested a carrier frequency of 1:67. This observation was confirmed by the molecular analysis of the 390 control subjects of the present work. The presence of four heterozygous individuals led to the determination of a carrier frequency of 1:58 in Porto Alegre. This number is similar to the phenylketonuria carrier frequency in the same area (1:56) (Santana da Silva *et al.*, 2003) and similar to that of Gaucher and Tay-Sachs disease carriers among Ashkenazi Jews (Risch *et al.*, 2003).

Using these figures, we were able to estimate the incidence of GM1 type 1 in Porto Alegre at 1:13,317 live births, slightly higher than that of 1:17,000 live births reported by Severini *et al.* (1999). These frequencies are extremely high when compared to those found in other studies, reported to be 1:100,000-1:200,000 (Beattie and Harvey, 1992; Sinigerska *et al.*, 2006) and 1:320,000 (Meikle *et al.*, 1999). The small proportion of consanguineous couples in our sample (a single case out of 26) is also consistent with the high incidence of this disorder in Brazil, especially considering that 27% of the patients were found to be homozygous for one of the two analyzed mutations.

The two mutations (R59H and 1622-1627insG) were detected in 57.7% of the alleles. This number is quite high for a heterogeneous genetic disorder like GM1 gangliosidosis, for which about 100 mutations were described (Brunetti-Pierri and Scaglia, 2008). The R59H mutation was first described by Morrone *et al.* (1997) in an Italian patient. Silva *et al.* (1999) found this mutation in 23.8% of the alleles of 20 Brazilian patients. These patients presented cardiac involvement similar to that described by Morrone *et al.* (2000). Santamaria *et al.* (2006) and Sinigerska *et al.* (2006) suggested that the R59H mutation is of Gypsy origin and that the presence of this mutation in South America is a reflection of their diaspora.

The 1622-1627insG mutation has only been reported in Brazilian patients so far, except for one patient from Uruguay described by Santamaria *et al.* (2007a). Silva *et al.* (1999) found a frequency of 42.8% for this mutation. Taken together, these two mutations showed a frequency of 62.5% in the patients studied by Silva *et al.* (1999), which is similar to the one found in the present work (57.7%).

Polymorphism S532G was significantly more frequent in patients than in controls. It is not clear if this alteration has an effect on protein activity, because expression data showed contradictory results, with values ranging from 41% (Hilson *et al.*, 1995) to 86% (Zhang *et al.*, 2000) of normal enzyme activity.

The R521C polymorphism was found only in controls and in four parents of patients, but not in any of our patients. This polymorphism was first described by Silva *et al.* (1999) and was present in 10% of patients' alleles. However, in that sample, this polymorphism was found in patients bearing other mutations than the ones studied in this work. Caciotti *et al.* (2005) described a patient who was ho-

mozygous for R521C and assumed that it was likely to be the disease-causing mutation. In the work of Santamaria *et al.* (2007b), the R521C polymorphism resulted in 33.2% enzyme activity. This observation could explain the apparent paradox of 4% of the general population of Porto Alegre carrying the R521C mutation, since it could have a low penetrance rate (Santamaria *et al.*, 2007b).

The lower frequency of haplotypes 6 (S532G only) and 4 (R59H only) in relation to haplotype 5 (R59H and S532G) suggests that each of these DNA changes took place independently and that recombination events were responsible for their grouping in haplotype 5. Moreover, the statistical analysis indicated the occurrence of at least one recombination event.

It was not possible to precisely define the existence of a founder effect, despite the high frequency of 1622-1677insG among patients, because this mutation was not linked to any of the polymorphisms studied. As this mutation is an insertion of one G into a string of six Gs, multiple origins cannot be ruled out. However, if this were the case, this mutation would be expected to have also been found in other populations. The fact that this mutation was never reported in any other region is strongly suggestive of a founder effect in the southern part of Brazil and in Uruguay. Supporting this hypothesis, there is the high proportion of homozygous patients with a low consanguinity rate found in this work and by Silva *et al.* (1999) in the same population.

The data obtained in this study confirm the high incidence of Type 1 GM1 gangliosidosis and the high frequency of two common mutations (R59H and 1622-1727insG) in southern Brazil. It was, however, not possible to prove that the high frequency of the latter mutation is due to a founder effect.

## References

- Beattie RM and Harvey D (1992) Extensive and unusual Mongolian blue spots in a child with GM1 gangliosidosis type one. *J Royal Soc Med* 85:574-575.
- Brunetti-Pierri N and Scaglia F (2008) GM gangliosidosis: Review of clinical, molecular, and therapeutic aspects. *Mol Genet Metab* 94:391-396.
- Caciotti A, Donati MA, Boneh A, d'Azzo A, Federico A, Parini R, Antuzzi D, Bardelli T, Nosi D, Kimonis V, *et al.* (2005) Role of beta-galactosidase and elastin binding protein in lysosomal and nonlysosomal complexes of patients with GM1-gangliosidosis. *Hum Mutat* 25:285-292.
- Callahan JW (1999) Molecular basis of GM1 Gangliosidosis and Morquio disease type B. Structure-function studies of  $\beta$ -galactosidase and the nonlysosomal  $\beta$ -galactosidase-like protein. *Biochim Biophys Acta* 1445:85-103.
- Giugliani R, Jackson M, Skinner SJR, Vimal CM, Fensom AH, Fahmy N, Sjövall A and Benson PF (1987) Progressive mental regression in siblings with Morquio's disease type B (MPS IV B). *Clin Genet* 32:313-325.

- Hilson WL, Okamura-Oho Y, Zhang S, Clarke JTR, Whelan DJ and Callahan JW (1995) Expression studies of two mutations in  $\beta$ -galactosidase that result in GM1 gangliosidosis. *Am J Hum Genet* 57:A180.
- Lenicker HM, Agius PV, Young EP and Montalto SPA (1997) Infantile generalized GM1 gangliosidosis: High incidence in the Maltese Islands. *J Inher Metab Dis* 20:723-724.
- Mayer FQ, Pereira FS, Fensom AH, Slade C, Matte U and Giugliani R (2009) New GLB1 mutation in siblings with Morquio type B disease presenting with mental regression. *Mol Genet Metab* 96:148.
- Meikle P, Hopwood JJ, Clague AE and Carey WF (1999) Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* 281:249-254.
- Miller SA, Dykes DD and Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215.
- Morreau H, Galjart NJ, Gillemans N, Willemsen R, van der Horst GT and d'Azzo A (1989) Alternative splicing of beta-galactosidase mRNA generates the classic lysosomal enzyme and a beta-galactosidase-related protein. *J Biol Chem* 264:20655-20663.
- Morrone A, Bardelli T, Donati MA, Giorgi M, Di Rocco R, Gatti R, Taddeucci G, Ricci R, d'Azzo A and Zammarchi E (1997) Identification of new mutations in six Italian patients affected by a variant form of infantile GM1 gangliosidosis with severe cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* 61:A528.
- Morrone A, Bardelli T, Donati MA, Giorgi M, Di Rocco M, Gatti R, Parini R, Ricci R, Taddeucci G, D'Azzo A, *et al.* (2000)  $\beta$ -galactosidase gene mutation affecting the lysosomal enzyme and the elastin-binding protein in GM1 gangliosidosis patients with cardiac involvement. *Hum Mutat* 15:354-366.
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K and Sekiya T (1989) Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2766-2770.
- Rozas J and Rozas R (2000) DnaSP v. 3.0: An integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* 15:174-175.
- Risch N, Tang H, Katzenstein H and Ekstein J (2003) Geographic distribution of disease mutations in the Ashkenazi Jewish population supports genetic drift over selection. *Am J Hum Genet* 72:812-822.
- Santamaria R, Chabas A, Coll MJ, Miranda CS, Vilageliu L and Grinberg D (2006) Twenty-one novel mutations in the GLB1 gene identified in a large group of GM1-gangliosidosis. *Hum Mutat* 27:1060.
- Santamaria R, Blanco M, Chabas A, Grinberg D and Vilageliu L (2007a) Identification of 14 novel GLB1 mutations, including five deletions, in 19 patients with GM1 gangliosidosis from South America. *Clin Genet* 71: 273-279.
- Santamaria R, Chabas A, Callahan JW, Grinberg D and Vilageliu L (2007b) Expression and characterization of 14 GLB1 mutant alleles found in GM1-gangliosidosis and Morquio B patients. *J Lipid Res* 48: 2275-2282.
- Santana da Silva LC, Carvalho TS, da Silva FB, Morari L, Fachel AA, Pires R, Refosco LF, Desnick RJ, Giugliani R and Saraiva Pereira ML (2003) Molecular characterization of phenylketonuria in South Brazil. *Mol Genet Metab* 79:17-24.
- Severini MH, Silva CMD, Sopelsa A, Coelho J and Giugliani R (1999) High frequency of type 1 GM1 gangliosidosis in southern Brazil. *Clin Genet* 56:168-169.
- Silva CMD, Severini MH, Sopelsa A, Coelho JC, Zaha A, d'Azzo A and Giugliani R (1999) Six novel  $\beta$ -galactosidase gene mutations in Brazilian patients with GM1-gangliosidosis. *Hum Mutat* 13:401-409.
- Sinigerska I, Chandler D, Vaghjiani V, Hassanova I, Gooding R, Morrone A, Kremensky I and Kalaydjieva L (2006) Founder mutation causing infantile GM1-gangliosidosis in the Gypsy population. *Mol Genet Metab* 88:93-95.
- Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software v. 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596-1599.
- Takano T and Yamanouchi Y (1993) Assignment of human beta-galactosidase-A gene to 3p21.33 by fluorescence *in situ* hybridization. *Hum Genet* 92:403-404.
- Zhang S, Bagshaw R, Hilson W, Oho Y, Hinek A, Clarke JTR, Hinek A and Callahan JW (2000) Characterization of  $\beta$ -galactosidase mutations Asp332  $\rightarrow$  Asn and Arg148  $\rightarrow$  Ser, and a polymorphism, Ser532  $\rightarrow$  Gly, in a case of GM1 gangliosidosis. *Biochem J* 348:621-632.

*Associate Editor: Paulo A. Otto*

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



**3.2. Artigo II – a ser submetido para a revista Journal of Inherited Metabolic Disease .**

**Review of genotypic and phenotypic observations in Brazilian patients with GM1 Gangliosidosis**

Fernanda Sperb<sup>1,2</sup>, Filippo Vairo<sup>2</sup>, Maira Burin<sup>3</sup>, Mateus Vieira<sup>4</sup>, Mariana Pereira de Souza Goldim<sup>4</sup>, Ursula Matte<sup>1,2</sup>, Roberto Giugliani<sup>1,2,3,4</sup>

1 Gene Therapy Center, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

2 Post-Graduation Program on Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

3 Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

4 Post-Graduation Program in Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

**Corresponding Author:**

Ursula Matte

Gene Therapy Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

Porto Alegre, RS

90035-903

Fone: 55 51 3359 8841 / 8838

Fax: 55 51 3359 8010

e-mail: [umatte@hcpa.ufrgs.br](mailto:umatte@hcpa.ufrgs.br)

## ABSTRACT

GM1 Gangliosidosis is a lysosomal disorder caused by  $\beta$ -galactosidase deficiency due to mutations in the *GLB1* gene. GM1 Gangliosidosis is a rare neurodegenerative disorder with an incidence of about 1:100,000–1:200,000 live births worldwide. Here we report the *GLB1* mutations and clinical features from 65 and 39 unrelated GM1 Gangliosidosis patients respectively. Molecular analysis showed 18 different mutations, 7 of which are new. The c.1622-1627insG is the most frequent mutation, accounting for 50% of the alleles found. These results stand out when compared to mutation frequencies found by other groups in different parts of the world. The cognitive delay is the main clinical sign, observed in 82% of patients, followed by hepatosplenomegaly observed in 56% of the patients analyzed. It was possible to establish a significant correlation between age at onset of symptoms preceding the first year of life of patients and the presence of the mutation c.1622-1627insG ( $p= 0.03$ ). These findings differ from literature data because represents the exclusive genotypic profile found in the Brazilian population. This work presents further data on genotype–phenotype relations in the most common mutation in Brazilian patients with GM1 Gangliosidosis, and discusses clinical, biochemical and molecular data from patients, in addition to presenting new mutations of the *GLB1* gene.

Keywords: GM1-gangliosidosis, *GLB1* gene, mutation analysis.

## INTRODUCTION

Hereditary deficiency of lysosomal acid  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -galactosidase) is expressed clinically as two different diseases: GM1 Gangliosidosis and Mucopolisaccharidosis IV B (Morquio B) (Suzuki et al 2001). This deficiency occurs due to mutations in the *GLB1* gene (EC 3.2.1.23), although the differences that lead to GM1 Gangliosidosis or Morquio B are not completely understood. The gene is located on chromosome 3 at 3p21.33 (Takano & Yamanouchi 1993) and is composed of 62.5 kb divided into 16 exons (Morreau et al 1989). It has been proposed that more than 130 different mutations are responsible for the Morquio or GM1 Gangliosidosis phenotypes (Callahan 1999; Brunetti-Pierri & Scaglia, 2009; Hofer et al, 2009). However, patients with intermediate phenotypes have also been described (Giugliani et al 1987; Mayer et al 2009).

GM1 gangliosidosis is a neurodegenerative condition for which three main clinical forms have been identified: type I (infantile), type II (late infantile/juvenile), and type III (adult) (Brunetti-Pierri & Scaglia 2009). The severe infantile phenotype (type I) is characterized by psychomotor regression by the age of 6 months, visceromegaly, cherry red spot, and facial and skeletal abnormalities. Type II usually starts between 7 months and 3 years of age with slowly progressive neurological signs including early locomotor problems, strabismus, muscle weakness, seizures, lethargy, and terminal bronchopneumonia. Dysmorphisms and skeletal changes are less severe than seen in type I. The adult form (type III), the mildest phenotype of the disease,

with onset between 3 and 30 years, is characterized by cerebellar dysfunction, dystonia, slurred speech, short stature and mild vertebral deformities (Callahan 1999; Suzuki et al 2001). The incidence of GM1 Gangliosidosis is considered to be between 1:100,000 and 1:200,000 live births (Sinigerska et al., 2006). Higher frequencies have been described for specific regions, such as Malta (1:3,700) (Lenicker et al 1997). The estimated incidence in Brazil has been calculated to be 1:13,317 live births, and the carrier frequency was found to be 1:58 (Baiotto et al 2011).

Here, we report the results of mutation screening of the *GLB1* gene in 65 patients and phenotypes in 39 of these patients with GM1 gangliosidosis. Eighteen different pathogenic mutations were identified, including seven novel mutations.

## **PATIENTS AND METHODS**

Patients were referred from different regions from Brazil and were diagnosed at Laboratory of Inborn Errors of Metabolism from Hospital de Clínicas de Porto Alegre (LREIM/HCPA), Brazil. Diagnosis was confirmed by the low enzyme activity of  $\beta$ -galactosidase in leukocytes or fibroblasts. Residual  $\beta$ -galactosidase activity from patients was measured using the artificial 4-methylumbelliferyl  $\beta$ -galactopyranoside substrate (Sigma).

Genomic DNA was prepared from peripheral blood leukocytes using the Easy-DNA Kit (Invitrogen). Molecular analysis was performed by PCR using primers

and conditions described by Silva et al (1999). All samples were screened by Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP) analysis followed by automated DNA sequencing to establish the specific mutation in each patient. The different conditions used for SSCP were: 8% and 12% polyacrilamide-agarose gel electrophoresis (PAGE) at room temperature. Amplicons with mobility shift were purified with Exo-SAP (GE Healthcare) and submitted to automated sequencing on ABI 3100 Genetic Analyzer using BigDye v3.0 (Life Technologies).

Clinical information was obtained from patient's records. Correlation between age at onset of symptoms and the presence of the mutation c.1622-1627insG was analyzed using chi-square test with Fisher's Exact Test.

The present work has been approved by the Ethics Research Committee of Hospital de Clinicas de Porto Alegre, and followed the Declaration of Helsinki and the standards established by the author's Institutional Review Board and granting agency.

## **RESULTS**

### *Molecular analysis*

From 1982 to 2012, 65 patients were diagnosed with GM1 Gangliosidosis at LREIM/HCPA and had their DNA analyzed. The molecular and clinical characteristics of some of these patients have been previously reported (Silva et al 1999; Baiotto et al 2009). For the 34 previously unreported patients,

sequencing of exons with mobility shift detected by SSCP, revealed seven novel mutations. All new mutations are missense (p.Y36S, p.R38G, p.F63Y, p.Y64F, p.Q580R, p.R590S and p.C626R), and located in exons 2, 15 and 16. Taken together, the 65 patients possess 18 different mutations: 13 missense mutations, 4 frameshift mutations and one splice mutation. Major deletions were not detected among our patients (Table 1 and Suppl. Table 1).

The c.1622-1627insG was the most frequent mutation, accounting for 50% of the alleles found, followed by p.R59H, which showed a frequency of 19%. The other mutations were found in only one or two alleles (Table 1). In 17 alleles it was not possible to determine the mutation due to lack of biological material.

### *Clinical features*

This is a retrospective study in which clinical information was obtained from patients' records, thus, we only had access to clinical information of 39 of the 65 patients genotyped. For 34 of these patients, biochemical reports were available to obtain the levels of enzyme activity for  $\beta$ -galactosidase.

Cognitive delay is the main disease manifestation, observed in 82% of patients; followed by hepatosplenomegaly, observed in 56% of the patients analyzed (Table 2). Other frequent clinical signs were multiple dysostosis (35%), coarse facies (33%), hypotonia (30%), macular cherry-red spots (20%), ataxia (15%), seizures (15%), and dystonia (10%).

Ophthalmologic findings observed included nystagmus, squint, hypertelorism and amaurosis. Other involvements of the central nervous system were characterized by macrocephaly, hydrocephalus, cerebellar atrophy, dysarthria, speech delay, and leukodystrophy. Finally, other clinical findings involving the bone structure were kyphosis, espondilo-epiphyseal dysplasia, kyphoscoliosis, skull thickness and generalized skeletal deformities.

Residual  $\beta$ -galactosidase activity in leucocytes or fibroblasts from patients, measured using the artificial 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -galactopyranoside substrate, varied from 1.74–18 nmol/h/mg protein on leukocytes and 5–33 on fibroblasts. The average enzyme activity of beta-galactosidase was 7.4 nmol/h/mg protein on leukocytes (reference value: 78-280 nmol/h/mg protein); and 19 nmol/h/mg protein on fibroblasts (reference value: 394-1440 nmol/h/mg protein).

#### *Genotype-phenotype correlations*

No clear genotype-phenotype relationship could be established. The most frequent mutation, c.1622-1627insG, was associated with cognitive delay and hypertonia in homozygous patients and ophthalmic findings in heterozygous patients (Table 2). The age at onset of symptoms ranged from 2 months to 15 years. According to the Fisher's Exact Test there is a significant correlation between age of onset of symptoms preceding the first year of life of patients and the presence of the mutation c.1622-1627insG ( $p = 0.03$ ) (Figure 1).

## DISCUSSION

Analysis of 65 GM1 Gangliosidosis patients revealed the presence of 18 different alleles and seven novel mutations in the *GLB1* gene were identified. The most frequent mutation was c.1622-1627insG, present in 50% of the alleles. This mutation has only been reported in Brazilian patients so far, except for one patient from Uruguay described by Santamaria et al (2007). Silva et al (1999) found a frequency of 42.8% for this mutation. The second most frequent mutation was p.R59H, present in 19% of the alleles. Combined, these two mutations showed a frequency of 62.5% in the patients studied by Silva et al (1999), similar to the one found by Baiotto et al (2011), which was 57.7%. In this work the two mutations account for 69% of the alleles. This number is quite high for a heterogeneous genetic disorder like GM1 gangliosidosis, for which about 100 mutations have been described (Brunetti-Pierri and Scaglia 2008).

Genotype-phenotype correlation is difficult to be drawn (Caciotti et al 2011). GM1 gangliosidosis shows phenotypes varying on onset and severity, caused by an accumulation of GM1 ganglioside in nervous tissue and by a highly variable storage of glycosaminoglycans and glycopeptides in visceral and skeletal tissues (Hofer et al 2009). As most of the patients are compound heterozygous, a correlation between mutations in the *GLB1* gene and the resulting phenotypes cannot be drawn easily except for the homozygous for c.1622-1627insG. Most diagnosed patients in our series have the infantile form of the disease, as a result of the c.1622-1627insG, the most frequent mutation, associated to an early onset of the disease, usually before 1 year of age and



thus related to a severe phenotype. As expected, we found that signs and symptoms of central nervous system involvement were present in most cases.

In GM1 Gangliosidosis, the classic features seen in other storage disorders such as coarse facial features (33%), cherry-red macula (20%), hepatosplenomegaly (56%), dysostosis (35%), were not constantly present, at least at the time of the diagnosis. Our results were different from those found in a review of the literature by Brunetti-Pierre & Scaglia (2009), which found the following percentages: facial features (84%), cherry-red macula (42%), hepatosplenomegaly (66%), skeletal abnormalities (83%), seizure (0,8%) and hypotonia (88%). This difference may be due to the exclusive genotypic profile found in the Brazilian population.

In summary, this work presents further data on genotype–phenotype relations in the most common mutation in Brazilian patients with GM1 Gangliosidosis, and discusses clinical, biochemical and molecular data from patients, in addition to presenting new mutations of the *GLB1* gene.

## **ACKNOWLEDGEMENT**

This work was supported by FINE/HCPA, CNPq and CAPES.

## REFERENCES

Baiotto C, Sperb F, Matte U, Silva CD, Sano R, Coelho JC, Giugliani R (2011) Population analysis of the *GLB1* gene in South Brazil. *Genet. Mol. Biol.* 34(1):45-48.

Brunetti-pierri N and Scaglia F (2008) Molecular Genetics and Metabolism. *Mol Genet Metab* 94: 391-396.

Caciotti A, Garman SC, Rivera-Colón Y et al (2011) GM1 gangliosidosis and Morquio B disease: An update on genetic alterations and clinical findings. *Biochimica et Biophysica Acta* 1812: 782–790.

Callahan JW (1999) Molecular basis of GM1 Gangliosidosis and Morquio disease type B. Structure-function studies of  $\beta$ -galactosidase and the nonlysosomal  $\beta$ -galactosidase-like protein. *Biochim Biophys Acta* 1445: 85-103.

Giugliani R, Jackson M, Skinner SJ et al (1987) Progressive mental regression in siblings with Morquio's disease type B (MPS IV B). *Clin Genet* 32: 313-325.

Hofer D, Paul K, Fantur K et al. 2009 GM1 gangliosidosis and Morquio B disease: expression analysis of missense mutations affecting the catalytic site of acid beta-galactosidase. *Hum Mutat.* 30(8):1214-21.

Lenicker HM, Agius PV, Young EP, Montalto SPA (1997) Infantile generalized GM1 gangliosidosis: High incidence in the Maltese Islands. *J Inher Metab Dis* 20: 723-724.

Mayer FQ, Pereira FS, Fensom AH, Slade C, Matte U, Giugliani R (2009) New *GLB1* mutation in siblings with Morquio type B disease presenting with mental regression. Letter to the Editor. *Mol Genet Metab* 96: 148.

Morreau H, Galjart NJ, Gillemans N, Willemsen R, van der Horst GT, d'Azzo A (1989) Alternative splicing of beta-galactosidase mRNA generates the classic

lysosomal enzyme and a beta-galactosidase-related protein. *J Biol Chem* 264: 20655-20663.

Santamaria R, Blanco M, Chabas A, Grinberg D, Vilageliu L (2007) Identification of 14 novel GLB1 mutations, including five deletions, in 19 patients with GM1 gangliosidosis from South America. *Clin Genet* 71: 273-279.

Silva CMD, Severini MH, Sopelsa A et al (1999) Six novel  $\beta$ -galactosidase gene mutations in Brazilian patients with GM1-gangliosidosis. *Hum Mut* 13: 401-409.

Sinigierska I, Chandler D, Vaghjiani V et al (2006) Founder mutation causing infantile GM1-gangliosidosis in the Gypsy population. *Mol Genet Metab* 88: 93-95.

Suzuki Y, Oshima A, Namba E. (2001)  $\beta$ -Galactosidase deficiency ( $\beta$ -galactosidosis). GM1 gangliosidosis and Morquio B disease. 8th ed. Scriver CR Beaudet AL Sly WS Valle D Childs B Kinzler KW Vogelstein B eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 3:3775-3809.

Takano T, Yamanouchi Y (1993) Assignment of human beta-galactosidase-A gene to. 3p21.33 by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 92: 403-404.

Table 1: Allele frequencies in 65 Brazilian GM1 Gangliosidosis patients.

Allele frequencies in patients		
Alleles	Frequency	
c.1622-1627insG	66/130=	0.50
p.R59H	25/130 =	0.19
p.Y36S	2/130 =	0.01
p.R201H	2/130 =	0.01
p.R208C	2/130 =	0.01
c.638-641insT	2/130 =	0.01
p.V240M	2 /130 =	0.01
p.Q580R	2 /130 =	0.01
p.R38G	1 /130 =	0.007
p.F63Y	1 /130 =	0.007
p.Y64F	1 /130 =	0.007
p.R121S	1 /130 =	0.007
c.592-593insT	1 /130 =	0.007
c.895-896insC	1 /130 =	0.007
c.2(+1)G>A	1 /130 =	0.007
p.D491N	1 /130 =	0.007
p.R590S	1 /130 =	0.007
p.C626R	1 /130=	0.007
ND	17/132=	0.13

ND = not determined

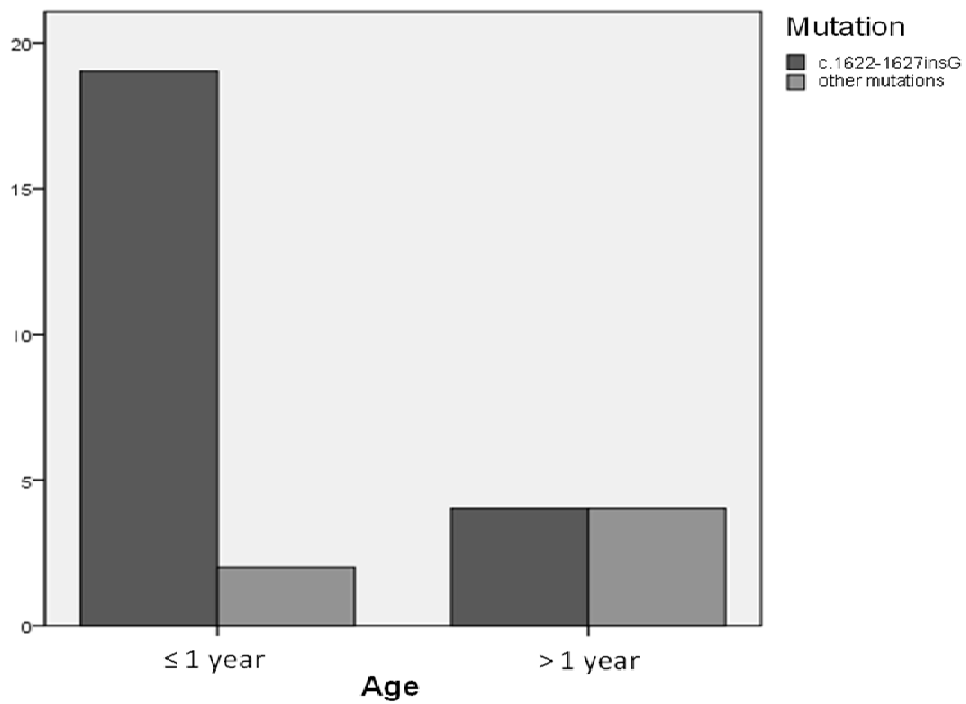


Figure 1: Statistical analysis of age at onset before or after the first year of age of the patient regarding the presence of the mutation c.1622-1627insG.

Table 2: Genotypes and main clinical features of GM1 gangliosidosis patients here reported.

PATIENT	GENOTYPE	b-gal activity	Onset	CD	HY	Seizures	Ataxia	Dystonia	Facial features	HS	DY	CRS	Other
1	p.R208C / c.1622-1627insG	4,0 <sup>a</sup>	5 m	+	+	+	-	-	+	+	-	-	kyphosis
2	c.1622-1627insG / c.1622-1627insG	13,0 <sup>a</sup>	9 m	+	-	-	-	-	+	+	-	-	
3	c.1622-1627insG / c.1622-1627insG	9,3 <sup>a</sup>	1 y	+	+	-	-	-	-	-	-	+	amaurosis
4	c.638-641insT / c.1622-1627insG	4,8 <sup>a</sup>	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	macrosomia
5	c.638-641insT / c.1622-1627insG	6,0 <sup>a</sup>	7 m	+	+	-	-	-	+	+	-	+	leukodystrophy
6	p.R59H / ND	33,0 <sup>b</sup>	13 y	+	-	-	-	-	-	-	+	-	Morquio B phenotype
7	p.R59H / c.1622-1627insG	13 <sup>a</sup>	2 m	+	+	+	-	-	-	+	-	-	MS, hernia
8	p.R59H / c.1622-1627insG	3,0 <sup>a</sup>	9 m	+	-	-	-	-	-	+	-	-	
9	p.Q580R / p.Q580R	14,0 <sup>a</sup>	9 m	+	-	-	-	-	+	+	+	+	
10	ND	n.a.	12 y	+	+	-	+	-	-	-	-	-	speech delay
11	p. F63Y / c.1622-1627insG	4,0 <sup>a</sup>	15 y	-	-	-	+	-	-	-	-	-	dysarthria
12	ND	2,4 <sup>a</sup>	11 m	+	-	-	-	-	+	+	+	-	
13	p.R59H / ND	n.a.	4 y	-	-	+	+	-	+	+	-	-	MC, hypertriglyceridemia, CA
14	c.1622-1627insG / c.1622-1627insG	5,0 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	infant
15	p. R38G / c.1622-1627insG	5,0 <sup>a</sup>	4 m	+	-	+	-	-	-	-	-	+	ST , MS, hypertonia, hydrocele
16	p. Y36S / c.1622-1627insG	5,0 <sup>a</sup>	9 m	+	-	-	-	-	+	+	+	+	
17	c.1622-1627insG / c.1622-1627insG	7,1 <sup>a</sup>	10 m	-	+	-	-	-	-	+	+	+	
18	p. Y64F / ND	n.a.	8 y	+	-	-	-	-	-	-	+	-	
19	ND	5,0 <sup>a</sup>	3 m	+	-	-	-	-	+	-	+	+	
20	ND	n.a.	3 m	+	-	-	+	-	-	-	+	-	
21	2(+1)G>A/ c.1622-1627insG	3,6 <sup>a</sup>	1 y	+	-	-	-	-	-	+	-	-	
22	c.1622-1627insG / c.1622-1627insG	n.a.	7 y	+	-	-	-	-	-	+	-	-	Hydrocephalus
23	c. 1622-1627insG / ND	7,0 <sup>a</sup>	3 y	-	+	-	+	+	-	-	+	-	espondilo-epiphyseal dysplasia ST, MC, kyphoscoliosis, hypertelorism
24	c. 1622-1627insG / ND	4,0 <sup>a</sup>	1 y	+	+	-	+	+	+	+	+	-	
25	c.1622-1627insG / c.1622-1627insG	1,74 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
26	p.R59H / c.1622-1627insG	3,0 <sup>a</sup>	9 m	+	+	+	-	-	+	-	-	-	Nystagmus

27	c. 1622-1627insG / ND	11,0 <sup>a</sup>	8 y	+	-	-	-	+	-	-	+	-	SA, squint
28	c. 1622-1627insG / ND	9,0 <sup>a</sup>	11 y	+	-	-	-	+	-	-	+	-	SA, speech delay
29	c.1622-1627insG / c.1622-1627insG	n.a.	11 m	+	-	-	-	-	+	+		-	MS
30	c.1622-1627insG / c.1622-1627insG	6,3 <sup>a</sup>	1 y	+	+	-	-	-	+	+	+	-	hernia, SA
31	c.insT592-593/ c.1622-1627insG	n.a.	1 y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
32	p.R59H / ND	4,15 <sup>a</sup>	7 m	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
33	p.R59H / ND	n.a.	15 y	+	-	-	-	-	-	-	+	-	
34	ND	n.a.	20 y	+	-	-	-	-	-	-	-	-	CA
35	ND	3,2 <sup>a</sup>	11 m	+	-	-	-	-	+	+	-	-	MS
36	c. 1622-1627insG / ND	5,9 <sup>a</sup>	6 m	+	-	-	-	-	-	+	-	+	
37	c.1622-1627insG / c.1622-1627insG	n.a.	1 y	+	+	-	-	-	-	+	-	-	
38	c.1622-1627insG / c.1622-1627insG	7,8 <sup>a</sup>	2 m	+	+	+	-	-	-	+	-	-	
39	ND	3,0 <sup>a</sup>	1 y 5 m	+	-	-	-	-	-	+	-	-	

Legend: beta-gal activity in nmol/h/mg protein; a- on leukocytes (78-280); b- on fibroblasts (394-1440); m, month; y, year; CD, cognitive delay; CRS, cherry-red spots; HS, hepatosplenomegaly; ST, skull thickness ; SA, skeletal abnormalities; MS, Mongolian spots; MC, macrocephaly, CA, cerebellar atrophy, DY, Dysostosis; HY, Hypotonia; +, presence; -, absence; ND, not determined.

Supplementary Material 1: Mutations in the *GLB1* gene of all 65 GM1 Gangliosidosis Brazilian patients analyzed.

PATIENT	GENOTYPE	PATIENT	GENOTYPE
1	p.R59H / ND <sup>1</sup>	35	p. Y36S / c.1622-1627insG
2	p. D491 N / c.1622-1627insG	35	p.R59H / p.R59H
3	p.R59H / ND	36	p. R38G / c.1622-1627insG
4	p. R208C / c.1622-1627insG	37	p. Y36S / c.1622-1627insG
5	p.R59H / ND	38	c. 1622-1627insG / ND
6	c.1622-1627insG / c.1622-1627insG	39	c.1622-1627insG / ND
7	c.1622-1627insG / c.1622-1627insG	40	c.1622-1627insG / ND
8	c.1622-1627insG / c.1622-1627insG	41	c.1622-1627insG / c. 1622-1627insG
9	c.1622-1627insG / c.1622-1627insG	42	p.R59H / c. 1622-1627insG
10	c.1622-1627insG / c.1622-1627insG	43	c.1622-1627insG / c. 1622-1627insG
11	c.895-896insC/ c.1622-1627insG	44	p. V240M / p.V240M
12	c.1622-1627insG / c.1622-1627insG	45	c.1622-1627insG / c.1622-1627insG
13	p.R59H / p.R59H	46	c.1622-1627insG / c.1622-1627insG
14	638-641insT / c.1622-1627insG	47	p. Y64F / ND
15	p.R59H / c.1622-1627insG	48	c.1622-1627insG / intron2 (+1)G-A
16	p.R59H / c.1622-1627insG	49	c.1622-1627insG / ND
17	p. R121S / p.R208C	50	c.1622-1627insG / c.1622-1627insG
18	638-641insT / c.1622-1627insG	51	p.R59H / c.1622-1627insG
19	p.R59H / c.1622-1627insG	52	c.1622-1627insG / ND
20	p.R59H / p.R59H	53	c.1622-1627insG / ND
21	p.R59H / c.1622-1627insG	54	c.1622-1627insG / c. 1622-1627insG
22	p.R59H / c.1622-1627insG	55	p.R59H / c.1622-1627insG
23	p. Q580R / p.Q580R	56	c.1622-1627insG / ND
24	c.1622-1627insG / c.1622-1627insG	57	c.1622-1627insG / c.1622-1627insG
25	p. F63Y / p.1622-1627insG	58	p.R59H / p.R201H
26	p.R59H / p.R59H	59	c.1622-1627insG / c.592-593insT
27	p.R59H / p.R59H	60	p. R201H / c.1622-1627insG
28	p.R59H / ND	61	p.R590S / p.C626R
29	c.1622-1627insG / ND	62	p.R59H / c.1622-1627insG
30	c.1622-1627insG / ND	63	c.1622-1627insG / ND
31	c.1622-1627insG / c.1622-1627insG	64	c.1622-1627insG / c.1622-1627insG
32	c.1622-1627insG / ND	65	c.1622-1627insG / c.1622-1627insG
33	p.R59H / c.1622-1627insG		

1. ND = not determined



**3.3. Artigo III – a ser submetido para a revista Journal of Human Genetics.**

**Structural changes of beta galactosidase caused by new mutations in**

**GM1 Gangliosidosis**

Fernanda Sperb<sup>1,2</sup>

Karina S. Machado<sup>3</sup>

Adriano V. Werhli<sup>3</sup>

Roberto Giugliani<sup>1,2</sup>

Ursula Matte<sup>1,2</sup>

1 Gene Therapy Center, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

2 Post-Graduation Program on Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

3 Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Centro de Ciências Computacionais (C3), Rio Grande, RS, Brazil

**Corresponding Author:**

Ursula Matte

Gene Therapy Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

Porto Alegre, RS

90035-903

Fone: 55 51 3359 8841 / 8838

Fax: 55 51 3359 8010

e-mail: [umatte@hcpa.ufrgs.br](mailto:umatte@hcpa.ufrgs.br)

## ABSTRACT

Primary deficiency of  $\beta$ -galactosidase, due to mutations in *GLB1*, results in GM1 gangliosidosis and Morquio B disease. The tertiary structure of human  $\beta$ -galactosidase has been recently resolved. Here we report the *in silico* and structural characterization of seven new amino acid variants identified in Brazilian patients with GM1 Gangliosidosis. All mutations are distant from the binding site of the protein and do not affect any glycosylation site. Four mutations affect the TIM barrel domain (Y36S, R38G, F63Y and Y64F) and three affect the  $\beta$ -domain 2 (Q580R, R590S and C626R). In the analysis of Polyphen, three mutations are classified as benign and four as possibly damaging, which is not always corroborated by structural analysis data. The determination of the mutant protein structure is of great importance for the inference of biological consequences for new mutations found in patients with GM1 Gangliosidosis.

## INTRODUCTION

The deficiency of lysosomal  $\beta$ -galactosidase caused by mutations in the *GLB1* gene is the cause of the rare lysosomal storage disorders GM1 gangliosidosis (OMIM 230500) and Morquio B disease (OMIM 253010). *GLB1* is located on chromosome 3 at 3p21.33<sup>1</sup>, spans 62.5kb, and is divided in 16 exons. This sequence encodes a 677 amino acid prepolypeptide, in which the N-terminal signal sequence containing 23 aminoacids is cleaved on entry into the ER to generate a polypeptide of 654 residues. The precursor protein of approximately 70kDa is then processed in the lysosomes into a 64kDa mature enzyme<sup>2</sup>.

GM1 Gangliosidosis is a neurodegenerative disorder occurring in infantile (type I), juvenile (type II) and adult (type III) phenotypes of varying onset and severity, caused by the accumulation of GM1 ganglioside in nervous tissue and by a highly variable storage of glycosaminoglycans and glycopeptides in visceral and skeletal tissues<sup>3</sup>. To date more than 130 genetic alterations have been described in *GLB1* and associated to disease. To elucidate the bases of GM1 gangliosidosis and Morquio B disease, structural information on defective  $\beta$ -galactosidases is very important. However, only few reports on this issue have been published<sup>4</sup>, and the tertiary structure of human  $\beta$ -galactosidase has only recently been resolved<sup>5,6</sup>.

Here we report the *in silico* and structural characterization of new amino acid variants identified in Brazilian patients with GM1 Gangliosidosis. Our purpose for undertaking this study was to clarify the role of the mutated alleles in

determining patients' phenotypes and improve the molecular diagnostic yield in differentiating GM1 forms.

## **MATERIALS AND METHODS**

In this study, seven amino-acid substitutions described in Brazilian patients with GM1 Gangliosidosis were analyzed: p.Y36S, p.R38G, p.F63Y, p.Y64F, p.Q580R, p.R590S and p.C626R. To generate the mutants tridimensional (3D) structures we considered the Crystal Structure of Human  $\beta$ -galactosidase (PDB Code: 3THC)<sup>7</sup> and used the software Molden (<http://www.cmbi.ru.nl/molden/>). Molden is a software package interfacing to *ab initio* programs with emphasis on computation and visualization of electronic and molecular properties<sup>8</sup>. We applied this software for performing the substitution of the mutant residues in the crystal human  $\beta$ -galactosidase protein structure generating the p.Y36S, p.R38G, p.F63Y, p.Y64F, p.Q580R, p.R590S and p.C626R tridimensional structures. To view, analyze and generate the figures of human  $\beta$ -galactosidase mutants the software VMD (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>) was used<sup>9</sup>. VMD is a molecular visualization program for displaying, animating, and analyzing large biomolecular systems using 3-D graphics and built-in scripting.

For protein-ligand contact analysis the LigPlot (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LIGPLOT/>) was used<sup>10</sup>. LigPlot was applied to determine the contact between the receptor and its substrate, automatically generating schematic diagrams of protein-ligand interactions for a given PDB file. The interactions shown are those mediated by hydrogen bonds and by hydrophobic contacts. Hydrogen bonds are indicated by dashed lines between the atoms

involved, while hydrophobic contacts are represented by an arc with spokes radiating towards the ligand atoms they contact. The contacted atoms are shown with spokes radiating back.

To predict possible impact of an amino acid substitution on the structure and function of a human protein using straightforward physical and comparative considerations PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping-v2, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml>) was used<sup>11</sup>.

## RESULTS

### **Comparative study of crystal structure of wild type human $\beta$ -Galactosidase and different mutants**

The overall structure of the  $\beta$ -galactosidase monomer was flat, with dimensions of approximately 75 × 50 × 30 Å.  $\beta$ -galactosidase was folded into three domains: the TIM barrel domain, also called ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> (residues 1–359);  $\beta$ -domain 1 (residues 397–514); and  $\beta$ -domain 2 (residues 545–647). Based on the crystal structure of the protein (PDB Code:3THC),<sup>6</sup> the final  $\beta$ -galactosidase/galactose complex structural model contains four ligand molecules, four chloride ions, eight sulfate ions, eight ethylene glycol molecules, 16 *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) residues, and 2244 water molecules (Figure 1). Human  $\beta$ -galactosidase possessed seven potential *N*-glycosylation sites (Asn26, Asn247, Asn464, Asn498, Asn542, Asn545, and Asn555). The  $\beta$ -domain 1 and  $\beta$ -domain 2 are composed of four- and six-stranded  $\beta$  sheets, respectively. The TIM barrel domain and  $\beta$ -domain 1 are connected with a loop region of approximately 50 Å (residues 360–396, the TIM- $\beta$ 1 loop). This loop crosses  $\beta$ -

domain 2, and residues 372–384 in the loop region formed an additional  $\beta$ -strand with  $\beta$ -domain 2 (Figure 3).

To understand the galactose-binding domain-like active site, we analyzed the residues of receptor at a distance of 4Å of the substrate galactose (GAL) that comprised: Glu268, Tyr270, Trp273, Leu274, Tyr333, Tyr331, Tyr306, Ala128, Glu129, Tyr83, Asn187, Glu188, Cys127, Ile126 (Figure 2). The configuration of the active site residues around the galactose was suitable for the nucleophilic attack of the Glu268 carboxylate to the C1 position of galactose (Figure 4).

### **Structural changes caused by representative amino-acid substitutions**

All mutations analyzed are distant from the active site of the protein. The mutations described do not affect any binding site or glycosylation sites of protein. Four mutations affect the TIM barrel domain (p.Y36S, p.R38G, p.F63Y and p.Y64F) and three affect the  $\beta$ -domain 2 (p.Q580R, p.R590S and p.C626R). The mutations p.Y36S (Figure 5A) and p.R38G (Figure 5B) are located in TIM barrel domain, in the surface of the protein, whereas mutations p.F63Y (Figure 5C) and p.Y64F (Figure 5D) are located near to TIM barrel domain, in an interdomain region. The p.Q580R (Figure 5E), p.R590S (Figure 5F) and p.C626R (Figure 5G) mutations are located near to  $\beta$ -domain 2, p.Q580R and p.R590S in protein core residues in the interdomain, and p.C626R in the surface of protein, in  $\beta$ -domain 2.

## PolyPhen analysis

Besides structural analysis of  $\beta$ -galactosidase mutants, we assessed the possible impact of amino acid substitutions on the structure and function of the protein using PolyPhen 2. Some changes were suggested to be benign, whereas others were considered possibly damaging (Table 1).

Table 1: Results of PolyPhen analysis of seven novel mutations in *GLB1*.

Mutation	Consequence (PSIC Score)
p.Y36S	possibly damaging(0.842)
p.R38G	benign (0.000)
p.F63Y	benign (0.005)
p.Y64F	possibly damaging (0.554)
p.Q580R	benign (0.304)
p.R590S	possibly damaging(1.000)
p.C626R	possibly damaging(0.975)

## DISCUSSION

A previous homology model of human GLB1 was derived from the structure of the *Bacteroides thetaiotaomicron* GLB1 protein<sup>4</sup>. Caciotti et al<sup>7</sup> design a three-dimensional structure of GLB1 based upon two crystal structures, one of *Penicillium* and one from *Bacteroides* (PDB codes 1XC6 and 3D3A, respectively), but the crystal structure of the human  $\beta$ -galactosidase protein was only recently published<sup>6</sup>.

According to Ohto et al<sup>5</sup> and Usui et al<sup>6</sup>, the structure of human  $\beta$ -galactosidase can be divided into three domains: The TIM barrel domain, also called  $(\alpha/\beta)_8$  (residues 1–359), which contains the active site; the  $\beta$ -domain 1 (residues 397–514); and the  $\beta$ -domain 2 (residues 545–647) (Figure 4). Human  $\beta$ -

galactosidase possesses seven potential *N*-glycosylation sites<sup>6</sup>, that presumably mediate the secretion and protection of  $\beta$ -galactosidase, rather than its ligand binding<sup>5</sup>.

The new mutations described here do not affect any binding site or glycosylation sites of protein. To date, only mutations p.Y270D, p.Y83C, p.Y83H, p.W273L and p.Y333H directly affect the ligand recognition<sup>5</sup>. The location of p.Q580R, p.R590S and p.C626R mutations in the interdomain of the protein core leads to a severe phenotype corroborating the findings of PolyPhen 2. When interdomain residues are mutated, the appropriate domain organization is disrupted. That destabilizes the mutant proteins and causes the loss of the surface with the neuraminidase/cathepsin to form multiprotein complex to transport properly to the lysosomes<sup>5</sup>.

The mutations p.Y36S and the p.R38G are located in TIM barrel domain, but in the surface of the protein. The situation of these mutations is controversial because most of the mutations located in the protein core would cause drastic effects on the overall protein structure and stability, especially for the TIM barrel domain that is responsible for catalysis. However, mutations located in the protein surface had milder effects on the protein and the effect of such mutations could be balanced by local rearrangement of the nearby residues<sup>5</sup>. On the other hand, mutation p.F63Y was found in a patient with the adult form of the disease, which supports the idea that this mutation would have a mild effect on the phenotype, predicted by PolyPhen 2 as a benign mutation.



As a future work we are going to perform molecular dynamics simulation<sup>12</sup> of the Y36S, R38G, F63Y, Y64F, Q580R, R590S and C626R mutants using the software GROMACS<sup>13</sup>. The generated trajectories will permit us to better understand the conformational changes caused by mutations in these residues.

#### **ACKNOWLEDGEMENT**

This work was supported by FIPE/HCPA, CNPq and CAPES.

## REFERENCES

- 1 Yamamoto Y, Hake CA, Martin BM, Kretz KA, Ahernrindell AJ, Naylor SL, Mudd M, O'Brien JS (1990) Isolation, characterization and mapping of human acid beta-galactosidase cDNA. *DNA Cell Bioll.* **9**:119-127.
- 2 Callahan JW. Molecular basis of GM1 Gangliosidosis and Morquio disease type B. Structure-function studies of  $\beta$ -galactosidase and the nonlysosomal  $\beta$ -galactosidase-like protein. *Biochim Biophys Acta* **1445**: 85-103 (1999)
- 3 Hofer D, Paul K, Fantur K et al. GM1 gangliosidosis and Morquio B disease: expression analysis of missense mutations affecting the catalytic site of acid beta-galactosidase. *Hum Mutat.* **30**(8):1214-21 (2009)
- 4 Morita M, Saito S, Ikeda K, Ohno K, Sugawara K, Suzuki T, Togawa T, Sakuraba H. Structural bases of GM1 gangliosidosis and Morquio B disease. *Journal of Human Genetics* **54**: 510–515 (2009)
- 5 Ohto U, Usui K, Ochi T, Yuki K, Satow Y and Shimizu T. Crystal Structure of Human  $\beta$ -Galactosidase: Structural basis of GM<sub>1</sub>Gangliosidosis and Morquio B disease *J. Biol. Chem.* **287**:1801-1812. (2012)
- 6 Usui K, Ohto U, Ochi T, Shimizu T and Satow Y Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of human  $\beta$ -galactosidase. *Acta Cryst.* **F68**: 73–77(2012)
- 7 Caciotti A, Garman SC, Rivera-Colón Y et al. GM1 gangliosidosis and Morquio B disease: An update on genetic alterations and clinical findings. *Biochimica et Biophysica Acta* **1812**: 782–790 (2011)
- 8 Schaftenaar G. and Noordik JH. "Molden: a pre- and post-processing program for molecular and electronic structures". *J. Comput.-Aided Mol. Design.* **14**: 123-134 (2000)

9 Humphrey W, Dalke A. and Schulten K. "VMD - Visual Molecular Dynamics", *J. Molec. Graphics.* **14**: 33-38. (2006)

10 Wallace A C, Laskowski R A, Thornton J M (1996) LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng.* **8**: 127-134.

11 Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. *Nat Methods* **7**(4),248-249 (2010)

12 van Gunsteren WE and Berendsen H. J. C (1990) Computer Simulation of Molecular Dynamics: Methodology, Applications, and Perspectives in Chemistry. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* **29**: 992-1023.

13 Hess B, Kutzner C, van der Spoel D, Lindahl E. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *Journal of Chemical Theory and Computation* **4**(3): 435-447 (2008)

## FIGURES

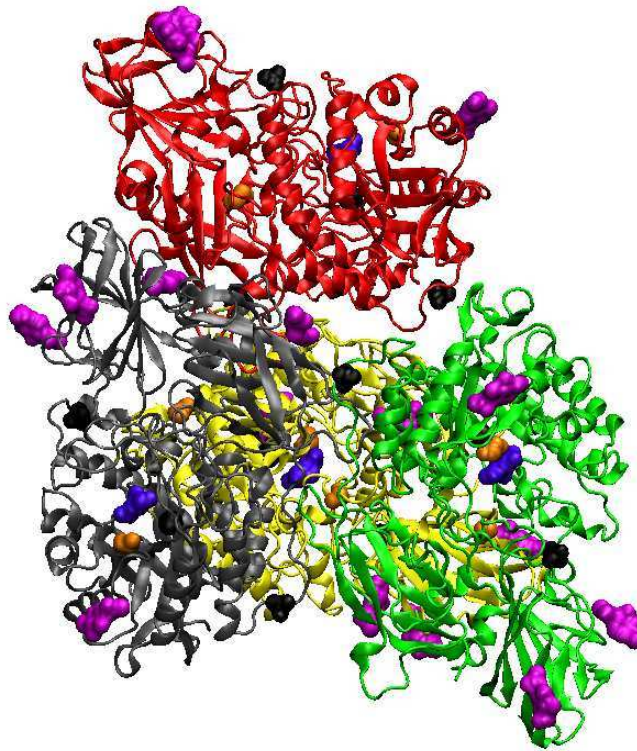


Figure 1: Three-dimensional structure of human  $\beta$ -galactosidase (PDB code: 3THC) complexed with the substrate  $\beta$ -D-galactose (GAL, in blue). The four chains of the structure are: Chain A in gray, Chain B in yellow, Chain C in red and Chain D in green. Black: molecules of chlorine ( $\text{Cl}^-$ ) and sulfate ions ( $\text{SO}_4$ ). Orange: 1,2-Ethandiol molecules (EDO). Magenta: N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc). Figure made in VMD software.

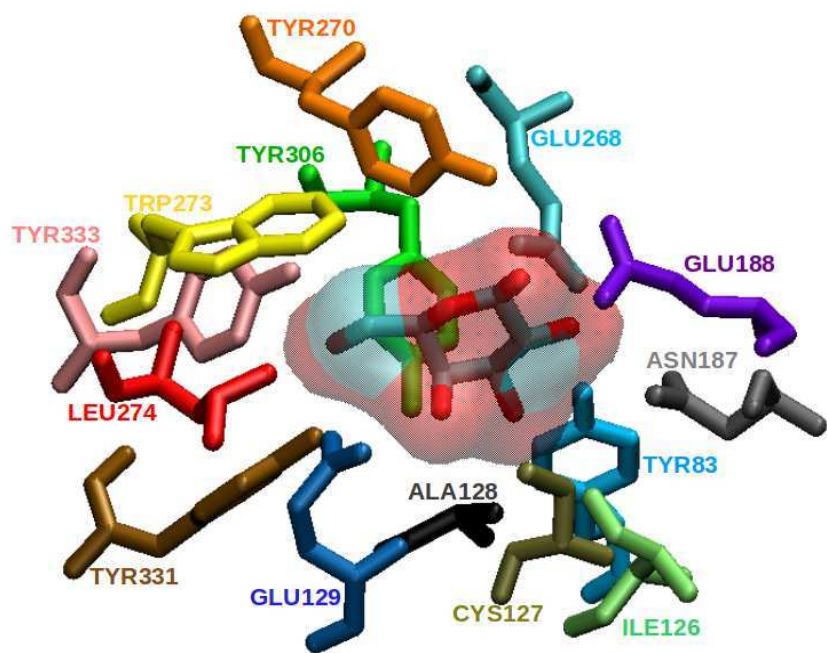


Figure 2: Characterization of the binding site with the substrate GAL. Description of receptor residues at a distance of 4 angstroms from the substrate GAL.

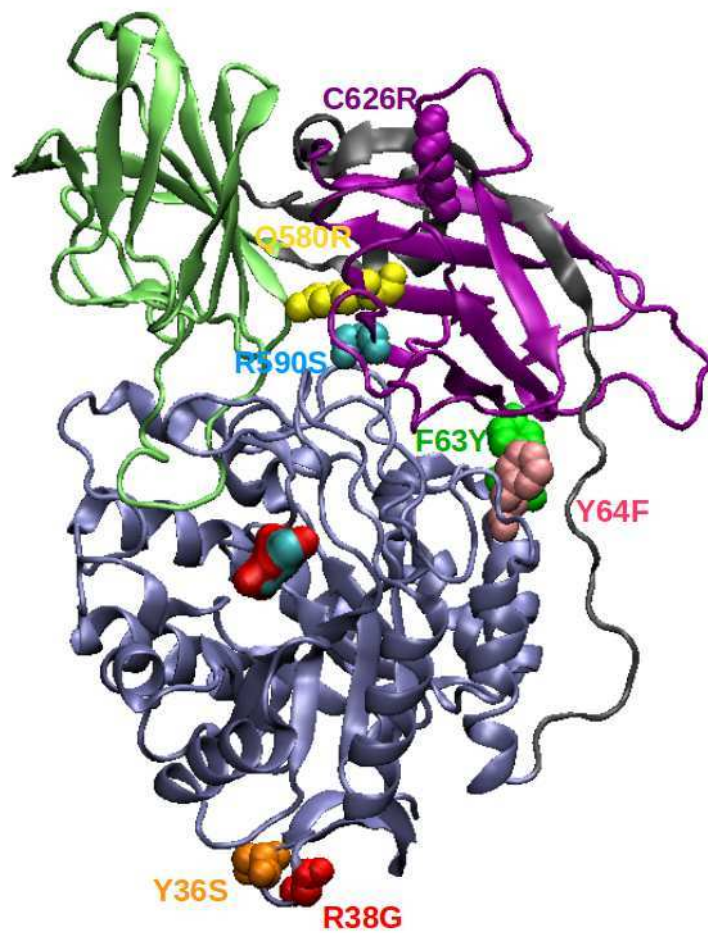


Figure 3: The three different domains of the human protein  $\beta$ -galactosidase and position of mutations analyzed.  $\beta$ -galactosidase was folded into three domains: the TIM barrel domain, also called  $(\alpha/\beta)_8$  (blue);  $\beta$ -domain 1 (green); and  $\beta$ -domain 2 (purple).

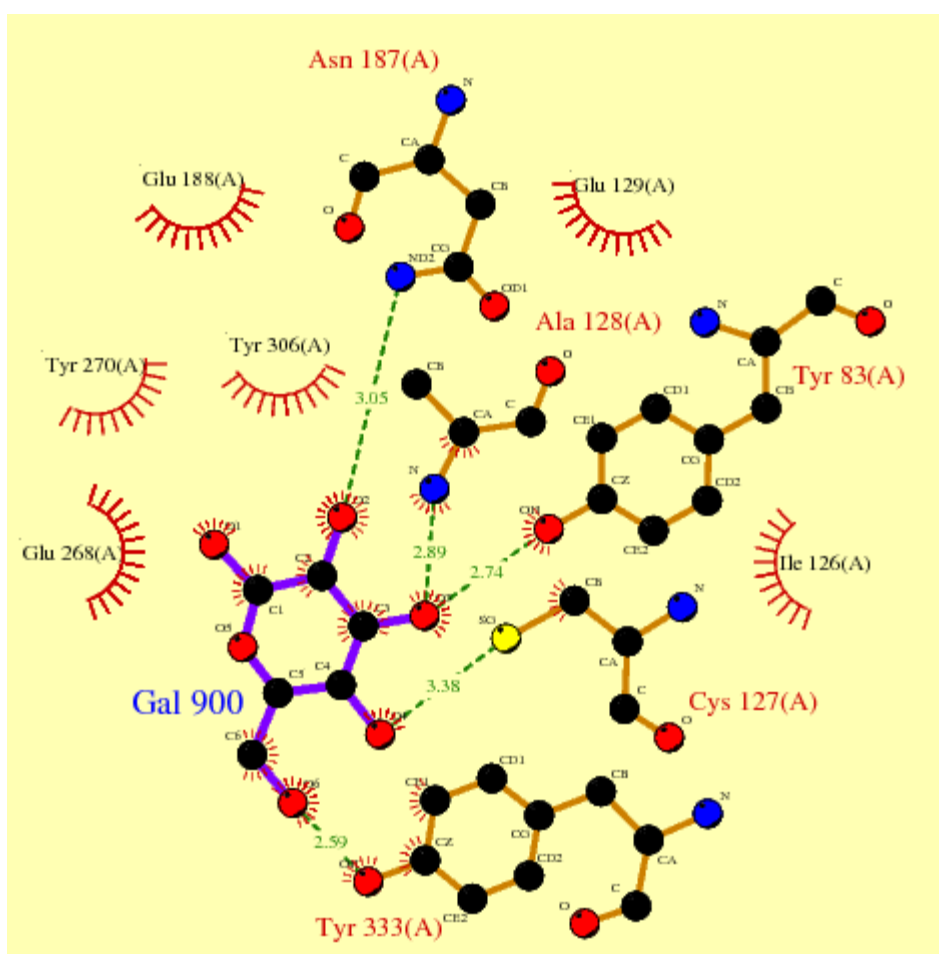


Figure 4: Protein-ligand contact analysis of human  $\beta$ -galactosidase. The interactions shown are those mediated by hydrogen bonds and by hydrophobic contacts. Hydrogen bonds are indicated by dashed lines between the atoms involved, while hydrophobic contacts are represented by an arc with spokes radiating towards the ligand atoms they contact. The contacted atoms are shown with spokes radiating back.

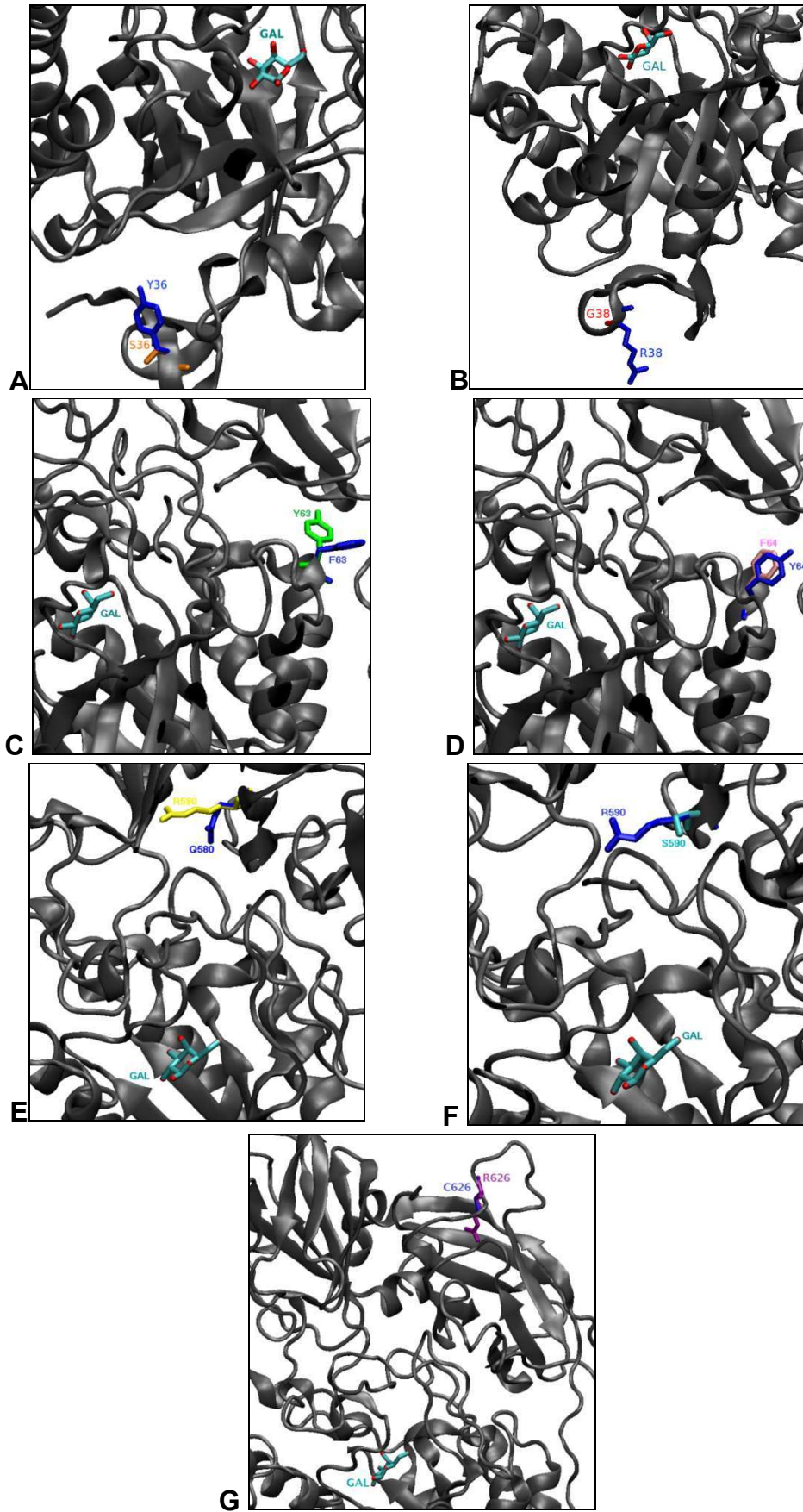




Figure 5: Structure of  $\beta$ -galactosidase linked to galactose (GAL) bearing different mutations. A) p.Y36S. B) p.R38G. C) p.F63Y. D) p.Y64F. E) p.Q580R. F) p.R590S. G) p.C626R.

**3.4. Artigo IV – a ser submetido para a revista Molecular Genetics and Metabolism**

**Effect of geneticin and chloramphenicol and galactose on fibroblasts from a patient with GM1 gangliosidosis**

Fernanda Sperb<sup>1,2</sup>

UrsulaMatte<sup>1,2</sup>

Roberto Giugliani<sup>1,2</sup>

1Gene Therapy Center, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

2Post-Graduation Program on Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

**Corresponding Author:**

Ursula Matte

Gene Therapy Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

Porto Alegre, RS

90035-903

Fone: 55 51 3359 8841 / 8838

Fax: 55 51 3359 8010

e-mail: [umatte@hcpa.ufrgs.br](mailto:umatte@hcpa.ufrgs.br)

## ABSTRACT

GM1 Gangliosidosis is a lysosomal disease caused by absence or reduction of  $\beta$ -galactosidase enzyme, due to mutations in the gene *GLB1*. The most common mutation in Brazilian patients is c.1622-1627insG, present in 50% of alleles studied. This mutation is an insertion of G which results in changing the reading phase of the gene, causing a premature stop codon four amino acids downstream of the mutation. Geneticin and chloramphenicol have been reported to suppress the effect of mutations that cause premature stop codons by a mechanism called stop codon read through (SCRT). In this study we tested the effects of these drugs and of galactose, a known chaperone for  $\alpha$ -galactosidase, in fibroblasts from a patient homozygous for the mutation c.1622-1627insG and in normal fibroblasts. Enzyme activity and quantitative real time PCR were compared before and after treatment. Geneticin and chloramphenicol showed a trend for increasing mRNA levels although no difference in enzyme activity was observed with any treatment. Through the use of different primers we could rule out nonsense mediated RNA decay as the cause for SCRT failure. Interestingly, galactose was shown to increase enzyme activity in normal fibroblasts, suggesting that it may have an effect upon certain point mutations in *GLB1*.

Keywords: geneticin, chloramphenicol, galactose, stop codon read through, GM1 Gangliosidosis

## INTRODUCTION

GM1 gangliosidosis is a lysosomal storage disorder caused by the absence or reduction of lysosomal  $\beta$ -galactosidase activity because of mutations in the *GLB1* gene. This lysosomal enzyme cleaves  $\beta$ -galactoses from different substrates such as ganglioside GM1, keratansulfate or glycopeptides. Mutations in this gene can cause two different diseases: GM1 gangliosidosis (MIM# 230500) and Morquio B disease (MIM# 253010) [1]. The most frequent mutation in Brazilian patients is c.1622-1627insG [2,3] and it has only been reported in Brazilian patients so far, except for one patient from Uruguay described by Santamaria et al. [4]. The c.1622–1627insG generates a frameshift after codon 524 in a cluster of six Gs that leads to premature chain termination after incorporation of four different amino acids [2].

Aminoglycoside antibiotics as gentamicin and geneticin have been shown to interact with the small ribosomal RNA subunit (18S) in eukaryotic cells, altering normal ribosomal proofreading during protein translation. Occasionally, this interaction leads to the binding of a near cognate amino-acyl tRNA at the premature stop codon, inserting an erroneous amino acid and allowing normal translation to progress to the end of the mRNA transcript. By this mechanism, known as stop codon read through (SCRT), suppression of premature stop mutations can lead to the production of full-length and functional protein [5]. Since GM1 Gangliosidosis main involvement is neurological, SCRT could be an appealing approach as antibiotics can cross the blood brain barrier. Although chloramphenicol belongs to another class of antibiotics that act through the inhibition of peptidyl transferase and formation of the peptide bond, it has been

used to induce SCRT and showed high efficiency in restoring the activity of mutant  $\beta$ -galactosidase [6].

Various factors may influence SCRT efficiency, including nonsense-mediated decay (NMD), a well known RNA surveillance mechanism that ensures the speedy degradation of mRNAs containing premature stop codons. NMD is part of diverse regulation mechanisms evolved to ensure the accuracy of gene expression at multiple levels, also known as mRNA surveillance [7,8].

Chemical chaperone therapy could stabilize misfolded proteins, leading to the correct delivery and increased activity of the affected enzymes into the lysosomes. Recently it has been shown that synthetic molecules of galactose derivative are potential chemical agents useful for stabilizing  $\beta$ -galactosidase [9].

The aim of this study was to evaluate the effect of treatment with geneticin, chloramphenicol or galactose upon enzyme activity and gene expression in fibroblasts from patients with GM1 Gangliosidosis with the most common genotype in Brazil (c.1622-1627insG/c.1622-1627insG).

## **Materials and methods**

### *Experimental design and cell culture*

Fibroblasts from one Gangliosidose GM1 patient (c.1622-1627insG / c.1622-1627insG) and one normal control were maintained in culture with Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (LGC Biotecnologia, Brazil) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, USA), 1% penicillin/streptomycin

(P/S) (Gibco, USA) and 2 mM L-glutamine (Gibco, USA). Cells ( $2 \times 10^5$ ) were plated in a 6-well-plate (TPP, Switzerland) and kept in culture for 24 h with medium supplemented either with 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of geneticin (Sigma, USA); 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of chloramphenicol (Acros Organics, USA), or without treatment (n=4 wells for enzyme activity and n=3 wells for qPCR analysis). Cells incubated with 200mM of Galactose were kept for 48 h. The cells were obtained from patients under informed consent and the project was approved by the local ethics committee.

### *Enzyme assay*

Enzyme assay was performed in cell lysates either without or after 24 h of treatment with geneticin and chloramphenicol or 48 h for galactose.  $\beta$ -galactosidase activity was measured using the fluorimetric substrate 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactoside (Glycosynth, UK). Results were expressed as nmol/h/mg protein [10].

### *Quantitative real time PCR*

RNA extraction was performed with RNeasy mini kit (QIAGEN, Germany) and the conversion to cDNA was made using Superscript II (Invitrogen, USA). For quantification of *GLB1* mRNA, primers were designed to anneal at exon 2 (5'-TCCCGTGTGCCCCGCTTCTA-3' and 5'-CTGGATGGCGTTCAGCCCAG-3') and exon 16 (5'-CGTGCTGGAAGTGGAGTGGGC3' and 5'GGGGGTGGGGGCATGAGTCT3'), with amplicon sizes of 72 bp and 147 bp respectively. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as endogenous control (primer sequences 5'CCCATCACCATCTTCCAGG3'

and 5'CATATTTGGCAGCTTTCTCC3'). Quantitative PCR reactions were performed on the MXPro Program (Stratagene – GEHealthcare Life Sciences, USA) using SYBR green master mix (Invitrogen, USA) at 60°C annealing temperature for all genes.

#### *Statistical analysis*

Statistical analysis was performed by the Predictive Analytics SoftWare (PASW, version 18.0) using Kruskal-Wallis test. The comparisons were made between untreated, geneticin, chloramphenicol and galactose groups for the patient and control. Statistical differences among groups were considered when  $p < 0.05$ .

## **RESULTS**

Fibroblasts from a female patient, diagnosed at 11 months of age, as homozygous for c.1622-1627insG/c.1622-1627insG by direct sequencing were submitted to treatment with three pharmacological chaperones: geneticin, chloramphenicol and galactose. Neither of them had an effect upon intracellular  $\beta$ -galactosidase activity measured by fluorimetric enzyme assay. Figure 1 shows the enzyme activity in fibroblasts and supernatant of treated and untreated cells compared to normal fibroblasts. Interestingly, galactose showed a significant increase in enzyme activity in normal fibroblasts.

To access the effect of drug treatments upon mRNA expression, *GLB1* mRNA was quantified by qRT-PCR. Although mRNA levels increased in cells treated with geneticin (Figure 2), this difference did not reach statistical significance ( $p=0.08$ ), probably due to the sample size. It is worth noticing that mRNA

increase was observed both when using primers for exon 2 as for exon 16, indicating that nonsense-mediated mRNA decay (NMD) was not occurring. Chloramphenicol, on the other hand, showed an apparent increase only when primers for exon 16 were used (Figure 2B).

## **DISCUSSION**

Several therapeutic approaches have been investigated for LSD patients, but most of these diseases remain without an effective treatment option, especially for neurological manifestations. No effective therapy exists for the treatment of GM1Gangliosidosis so far. Experimental therapies are being developed and tested, such as hematopoietic stem cell transplantation, reduction of substrate synthesis, the use of chaperones and agents for induction of gene therapy and the alternate translation.

Aminoglycoside antibiotics have been shown to suppress nonsense mutations *in vitro* by promoting readthrough of termination codons [11,12,13], but these results are genotype-dependent [14]. In our study, no increase on enzyme activity was observed after geneticin treatment, despite an increase in mRNA levels. It is known that readthrough efficiency is inversely correlated with translation-termination efficiency. The highest readthrough efficiency is for the UGA stop codon [15], exactly the one created by c.1622-1627insG mutation, thus the lack of effect was probably due to other causes.

In cases of efficient NMD, the level of nonsense transcripts is markedly reduced, being insufficient to generate enough functional proteins even when



gentamicin is provided. Thus SCRT is only effective in patients with markedly high levels of transcripts. In our case, mRNA levels detected by primers located before and after mutation suggest that NMD was not significant in our patient. It is worth noticing that the position of the premature termination codon is only one among the factors that determine NMD efficiency, as patients with the same genotypes and different NMD levels have been described [16].

Chloramphenicol also failed to increase enzyme activity or mRNA levels. This is surprising, since Thompson et al. (2002) have shown that it could be used to induce SCRT and was efficient in restoring the activity of mutant  $\beta$ -galactosidase. It is worth noticing that Thompson et al. [6] used *Escherichia coli* carrying a plasmid-encoded lacZ gene mutated as a model, whereas we used fibroblasts from patients.

The use of small molecules that could function like chaperones would be beneficial for GM1 Gangliosidosis, as these molecules cross the blood brain barrier [9]. The development of a therapeutic protocol that uses galactose in treating of Gangliosidosis GM1 patients may be facilitated by the fact that this molecule has already been successfully used in a Fabry patient [17]. However, galactose was not effective as a pharmacological chaperone in the patient under examination. Interestingly, control fibroblasts showed a significant increase in enzyme activity after galactose treatment. Asano et al. [18] also observed  $\alpha$ -galactosidase A activity elevation in normal lymphoblasts after incubation with 1-deoxy-galactonojirimycin, a chaperone that corrects the activity in a variant associated with Fabry disease. Similarly, Sawkar et al. [19]

also noted the increased in  $\beta$ -glucosidase activity in control cells treated with chaperones for Gaucher disease. These observations suggest that galactose may be a chaperone for other variants of  $\beta$ -galactosidase.

Therapies that enhance residual enzyme activity could be beneficial for certain LSDs, as it is known that even a small increase (1.5- to 2-fold) in enzyme activity can be sufficient to induce clinical improvement [19]. However, at present this patient is not an appropriate candidate for read through or chaperone therapy under the current experimental therapeutic conditions. Unlike previously reported patients, this patient's enzyme in cultured skin fibroblasts did not respond to treatment with geneticin and chloramphenicol. This is a preliminary study that must be repeated with patients bearing other genotypes and even with other c.1622-1627insG homozygous to determine to what extent this was an exclusive response of this particular individual.

#### **ACKNOWLEDGEMENT**

This work was supported by FIPE/HCPA, CNPq and CAPES.

## REFERENCES

- [1] N. Brunetti-pierri and F. Scaglia. Molecular Genetics and Metabolism. Mol Genet Metab 94 (2008) 391-396.
- [2] C.M.D. Silva, M.H. Severini, A. Sopelsa et al. Six novel  $\beta$ -galactosidase gene mutations in Brazilian patients with GM1-gangliosidosis. Hum Mut 13 (1999) 401-409.
- [3] C. Baiotto, F. Sperb, U. Matte, C.D. Silva, R. Sano, J.C. Coelho, R. Giugliani Population analysis of the *GLB1* gene in South Brazil. Genet.Mol. Biol. 34 (2011) 45-48.
- [4] R. Santamaria, M. Blanco, A. Chabas, D. Grinberg, L. Vilageliu. Identification of 14 novel *GLB1* mutations, including five deletions, in 19 patients with GM1 gangliosidosis from South America. Clin Genet. 71(2007) 273-279.
- [5] J.P. Clancy, S.M. Rowe, Z. Bebok, M. Aitken, R. Gibson, P. Zeitlin, P. Berclaz, R. Moss, M.R. Knowles, R.A. Oster, N. Mayer-Hamblett, and B. Ramsey. No Detectable Improvements in Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator by Nasal Aminoglycosides in Patients with Cystic Fibrosis with Stop Mutations Am J Respir Cell Mol Biol. 37 (2007) 57–66.
- [6] J. Thompson, M. O'Connor, J.A. Mills, A.E. Dahlberg. The protein synthesis inhibitors, oxazolidinones and chloramphenicol, cause extensive translational inaccuracy in vivo. J Mol Biol. 322 (2002) 273-9.
- [7] P. Nicholson, H. Yepiskoposyan, S. Metze, R.Z. Orozco, N. Kleinschmidt, O. Muhlemann Nonsense-mediated mRNA decay in human cells: mechanistic insights, functions beyond quality control and the double-life of NMD factors. Cell. Mol. Life Sci. 67 (2010) 677–700.

- [8] M. Bhuvanagiri, A.M. Schlitter, M.W. Hentze and A.E. Kulozik. NMD: RNA biology meets human genetic medicine. *Biochem. J.* 430 (2010) 365–377.
- [9] A. Caciotti, M.A. Donati, A. d’Azzo, R. Salvioli, R. Guerrini, E. Zammarchi, A. Morrone. The potential action of galactose as a “chemical chaperone”: Increase of beta galactosidase activity in fibroblasts from an adult GM1-gangliosidosis patient. *European journal of paediatric neurology* 13 (2009) 160 – 164.
- [10] K. Suzuki. Globoid cell Leukodystrophy (Krabbe disease) and GM1 gangliosidosis in: Glew RH and Peters SP. *Practical enzymology of the sphingolipidoses*. New York. Alan R. Liss (1977).
- [11] M. Wilschanski, C. Famini, H. Blau, J. Rivlin, A. Augarten, A. Avital, B. Kerem, E. Kerem. A pilot study of the effect of gentamicin on nasal potential difference measurements in cystic NMD in human cells 695 fibrosis patients carrying stop mutations. *Am J Respir Crit Care Med* 161 (2000) 860–865.
- [12] J.P. Clancy, Z. Bebok, F. Ruiz, C. King, J. Jones, L. Walker, H. Greer, J. Hong, L. Wing, M. Macaluso, R. Lyrene, E.J. Sorscher, D.M. Bedwell. Evidence that systemic gentamicin suppresses premature stop mutations in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 163 (2001) 1683–1692.
- [13] M. Pinotti, L. Rizzotto, P. Pinton, P. Ferraresi, A. Chuansumrit, P. Charoenkwan, G. Marchetti, R. Rizzuto, G. Mariani, F. Bernardi. Intracellular readthrough of nonsense mutations by aminoglycosides in coagulation factor VII. *J Thromb Haemost.* 4 (2006) 1308–14.
- [14] I. Sermet-Gaudelus, M. Renouil, A. Fajac, L. Bidou, B. Parbaille, S. Pierrot, N. Davy, E. Bismuth, P. Reinert, G. Lenoir, J.F. Lesure, J.P. Rousset, A. Edelman. In vitro prediction of stop-codon suppression by intravenous gentamicin in patients with cystic fibrosis: a pilot study. *BMC Med.* 5 (2007) 5.

- [15] M. Manuvakhova, K. Keeling, D.M. Bedwell. Aminoglycoside antibiotics mediate context-dependent suppression of termination codons in a mammalian translation system. *RNA*.6 (2000) 1044–1055.
- [16] L. Linde, S. Boelz, M. Nissim-Rafinia, Y.S. Oren, M. Wilschanski, Y. Yaacov, D. Virgilis, G. Neu-Yilik, A.E. Kulozik, E. Kerem, B. Kerem. Nonsense-mediated mRNA decay affects nonsense transcript levels and governs response of cystic fibrosis patients to gentamicin. *J Clin Invest*.117 (2007) 683-92.
- [17] A. Frustaci, C. Chimenti, R. Ricci, L. Natale, M.A. Russo, M. Pieroni, et al. Improvement in cardiac function in the cardiac variant of Fabry's disease with galactose-infusion therapy. *N Engl J Med* 345: (2001) 25–32.
- [18] N. Asano, S. Ishii, H. Kizu, K. Ikeda, K. Yasuda, A. Kato, OR. Martin and J. Fan. In vitro inhibition and intracellular enhancement of lysosomal  $\alpha$ -galactosidase A activity in Fabry lymphoblasts by 1-deoxygalactonojirimycin and its derivatives *Eur. J. Biochem*. 267 (2000)4179-4186 [19] A.R. Sawkar, W.C. Cheng, E. Beutler, C.H. Wong, W.E. Balch, J.W. Kelly. Chemical chaperones increase the cellular activity of N370S  $\beta$ -glucosidase: a therapeutic strategy for Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99 (2002) 15428–33.

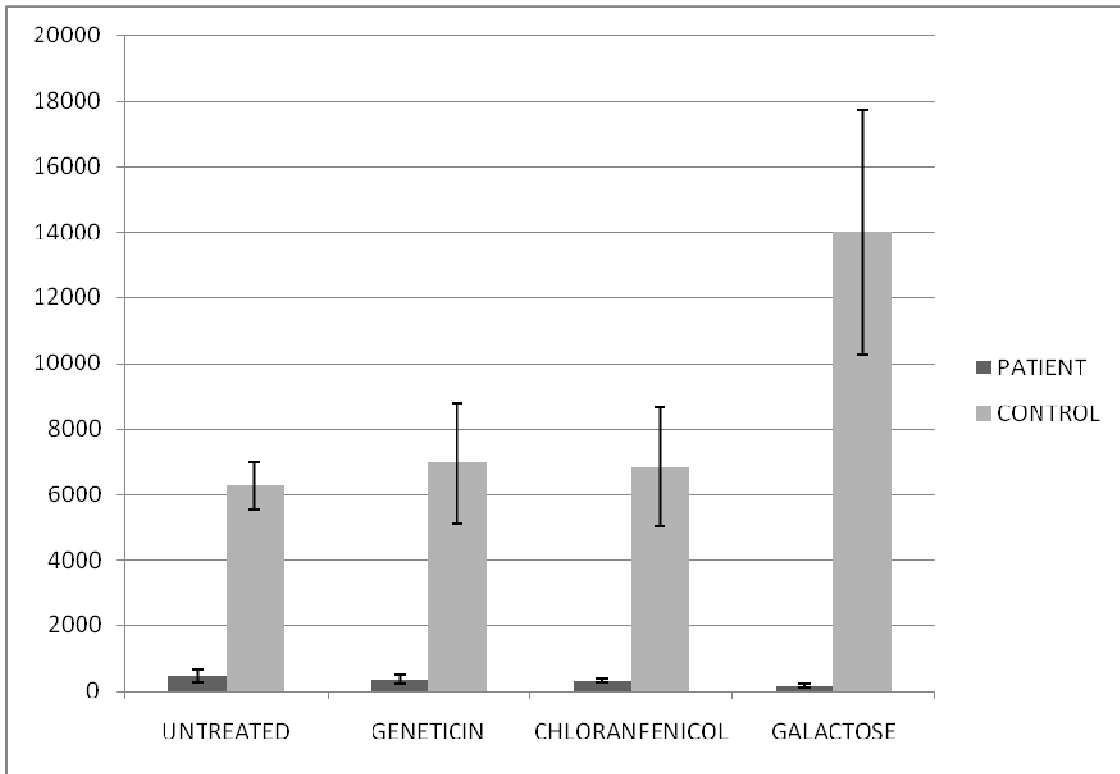
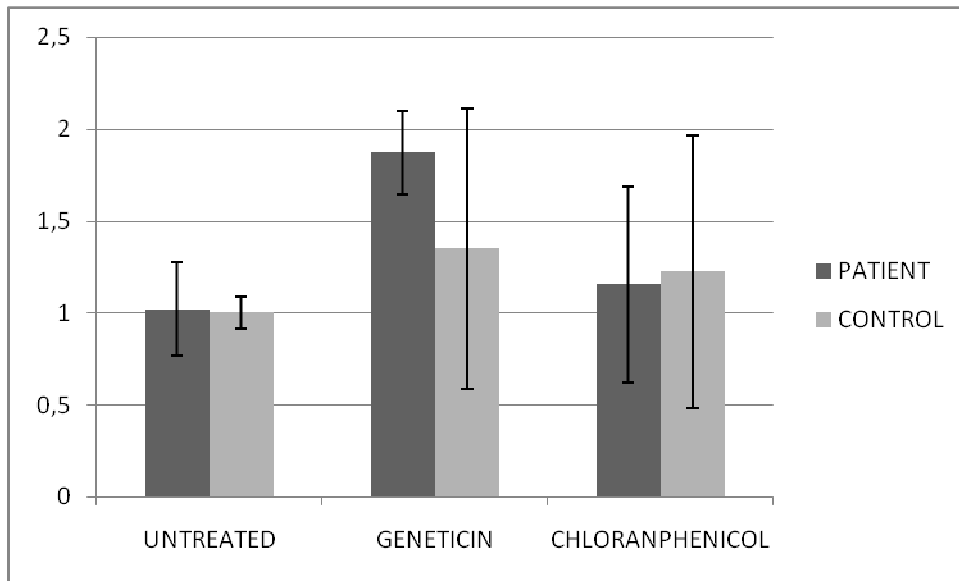


Figure 1:  $\beta$ -galactosidase activity after treatment with geneticin, chloranphenicol or galactose in fibroblasts.

A



B

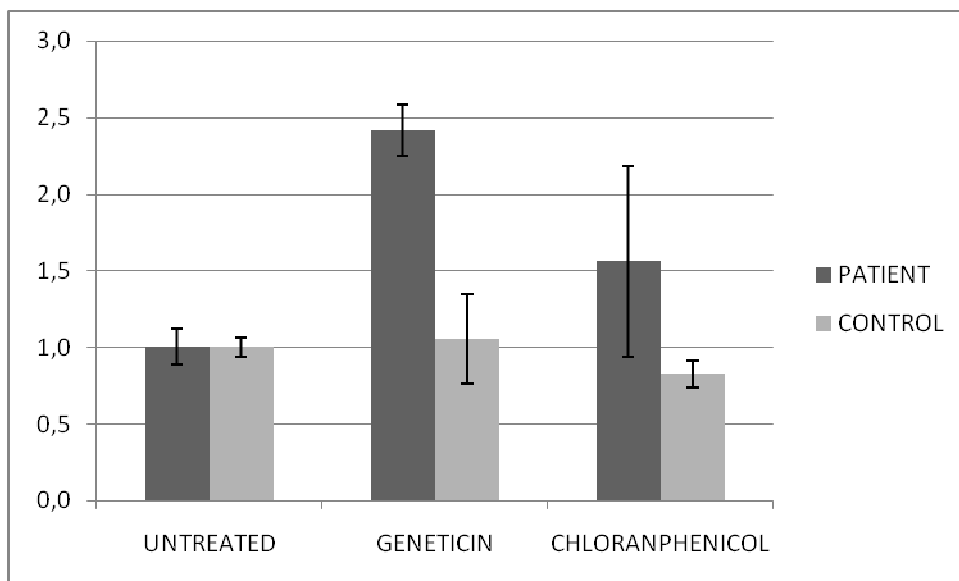


Figure 2:  $\beta$ -galactosidase mRNA levels after treatment with geneticin or chloranphenicol in fibroblasts. A- primers for exon 2; B- primers for exon 16.

#### 4.0 DISCUSSÃO

A Gangliosidose GM1 é uma doença rara, multissistêmica, herdada de forma autossômica recessiva causada pela deficiência da enzima  $\beta$ -galactosidase. Mais de 100 mutações já foram descritas para Gangliosidose GM1, demonstrando a grande heterogeneidade genética da doença (Brunetti-Pierrri and Scaglia, 2008). A pesquisa de mutações comuns possibilita elucidar aspectos relacionados à origem e à prevalência das mesmas em diferentes regiões e grupos étnicos, e estabelecer correlações genótipo-fenótipo, indicando um prognóstico mais seguro da doença.

Neste trabalho foi possível confirmar a alta freqüência de portadores de Gangliosidose GM1 na cidade de Porto Alegre como 1:58 e a incidência de 1:13.317 nascidos vivos. A freqüência dessa doença é relatada na literatura como sendo de 1:100,000-1:200,000 (Beattie and Harvey, 1992; Sinigerska et al, 2006) e 1:320,000 (Meikle et al., 1999). Os altos valores encontrados neste trabalho chamam a atenção, sendo comparados a doenças como Tay-Sachs e Gaucher em populações como os judeus Ashkenazi (Risch et al., 2003). Situação semelhante é encontrada apenas na vila de Pelendri, no Chipre, onde a mutação p.R482H no gene *GLB1*, primeiramente descrita em pacientes italianos (Oshima et al., 1991), apresenta freqüência de portadores de (1:12). A alta freqüência neste caso é explicada pelo efeito fundador seguido por deriva genética e/ou endogamia, considerado o pequeno tamanho da população em questão, com 1.500 habitantes. Malta também apresenta uma alta freqüência de portadores de Gangliosidose GM1 (1:30), justificada pelas ligações históricas entre estas duas ilhas (Georgiou et al., 2005).

Em nosso estudo, duas mutações, p.R59H e c.1622-1627insG, foram encontradas em cerca de 60% dos pacientes. A mutação p.R59H, descrita primeiramente por Morrone et al. (2000), foi observada em 20% dos alelos (Silva et al., 1999) e 19,2% neste estudo (Baiotto et al., 2009). Esta mutação já foi encontrada em diferentes populações de origem cigana, sendo sugerido que a diáspora cigana pode ter contribuído para propagação desta mutação para a América do Sul (Santamaria et al., 2006; Sinigerska et al., 2006; Santamaria et al., 2007). A mutação c.1622-1627insG é reportada somente em pacientes brasileiros (Silva et al., 1999) em uma freqüência de 42% dos alelos. A única



exceção é de um paciente uruguaio (Santamaria et al., 2007), mas devemos lembrar que o Uruguai é geograficamente próximo ao Brasil, fazendo fronteira com a região sul do país.

Na tentativa de estabelecer o efeito fundador da mutação na população brasileira, dois polimorfismos foram pesquisados (p.S532G e p.R521C). O polimorfismo p.S532G foi mais freqüente em pacientes do que em controles, enquanto que o polimorfismo p.R531C foi encontrado somente nos controles apesar de estar presente em 10% dos alelos de pacientes analisados por Silva et al. (1999). Através da análise de haplótipos não foi possível estabelecer o efeito fundador de c.insG1622-1627, que não estava em desequilíbrio de ligação com nenhum dos polimorfismos analisados. O fato de esta mutação ser praticamente exclusiva da população brasileira sugere fortemente que há um efeito fundador, mas o mesmo só poderá ser comprovado com a pesquisa de novos polimorfismos. A menor freqüência dos haplótipos contendo apenas p.S532G ou p.R59H em relação ao haplótipo contendo as duas alterações juntas sugere que cada uma destas alterações no DNA ocorreu de forma independente e que eventos de recombinação formaram o haplótipo combinado. Além disso, a análise estatística indicou a ocorrência de pelo menos um evento de recombinação.

No segundo estudo foi realizada uma abordagem mais ampla, com diagnóstico clínico e molecular em uma série histórica de pacientes diagnosticados com Gangliosidose GM1 no Serviço de Genética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Foram reunidas todas as informações clínicas disponíveis nos prontuários de pacientes na tentativa de estabelecer correlações genótipo-fenótipo, além de avaliar a freqüência das mutações e descrição de novas mutações.

Através da análise molecular de 65 pacientes foi possível detectar a presença de 13 mutações com troca de sentido, quatro inserções e uma mutação em sítio de *splicing* no gene *GLB1*. A mutação mais freqüente foi c.1622-1627insG, que estava presente em 50% dos alelos. Já a mutação p.R59H estava presente em 19% dos alelos, enquanto que as demais mutações estavam presentes em apenas um ou dois alelos. Sete novas mutações foram identificadas: p.Y36S, p.R38G, p.F63Y, p.Y64F, p.Q580R,

p.R590S e p.C626R. Essas mutações estão localizadas nos éxons 2, 15 e 16, afetando tanto a  $\beta$ -galactosidase quanto a proteína EBP.

Os fenótipos presentes na Gangliosidose GM1 variam quanto à idade de início e gravidade da doença, em decorrência do acúmulo de gangliosídeo GM1 no sistema nervoso e glicosaminoglicanos e glicopeptídeos nos tecidos viscerais e esquelético (Hofer et al., 2009). Foram revisados 39 prontuários de pacientes atendidos ao longo da história do Serviço de Genética Médica. A maioria dos casos relatados mostrava envolvimento do sistema nervoso central. O atraso cognitivo foi o sintoma mais freqüente, presente em 84% dos pacientes. Entre os sintomas mais comuns, foram observados: face infiltrada (33%), mancha macular vermelho-cereja (20%), hepatoesplenomegalia (56%) e disostose (35%), hipotonia (30%), anormalidades esqueléticas (12%), convulsões (15%), ataxia (15%) e distonia (10%).

O estabelecimento de uma forte correlação genótipo-fenótipo se tornou bastante difícil vista a ampla presença de heterozigotos compostos, além de também ser dificultada pela coleta de dados heterogênea. No entanto, foi possível observar que a mutação c.1622-1627insG causa a forma infantil da doença, com apresentação dos sintomas antes do primeiro ano de vida. Foi possível estabelecer uma correlação estatisticamente significativa entre a idade de início da doença e a presença da mutação c.1622-1627insG para a população brasileira. Este resultado sugere que pacientes brasileiros com idade de início dos sintomas  $\leq 1$  ano devem começar o diagnóstico molecular pelo éxon 15, no qual se localiza a mutação em questão. O único paciente com essa mutação diagnosticado fora do Brasil, de origem uruguaia, apresenta atraso no desenvolvimento, hepatoesplenomegalia, dismorfismo e nistagmo (Santamaria et al., 2007), também observado nos pacientes brasileiros.

O terceiro estudo realizado para compor este trabalho foi a análise comparativa de mutações novas com a estrutura em cristal da  $\beta$ -Galactosidase humana através de ferramentas de bioinformática. Em decorrência da estrutura cristalografada da  $\beta$ -Galactosidase humana não ter sido publicada até o final de 2011, os poucos trabalhos baseados na estrutura tridimensional da  $\beta$ -Galactosidase publicados usavam como molde estruturas homólogas, que geravam dúvidas quanto à fidelidade de sua estrutura. Morita et al. (2009) utilizou como base a sequência de *Bacteroides thetaiotaomicron*, já Caciotti et

al. (2011) se baseou nas sequências de *Penicillium* e *Bacteroides* para simular a estrutura tridimensional da  $\beta$ -Galactosidase.

Apenas no final de 2011 Usui et al. (2011) cristalografou a  $\beta$ -galactosidase humana, comprovando que haviam diferenças entre os modelos simulados por outros autores. Ohto et al. (2011) foi o responsável pelo importante trabalho que caracterizou o cristal e correlacionou os dados com os achados moleculares de Gangliosidose GM1 e Morquio B. De acordo com esses autores, a  $\beta$ -galactosidase humana é dividida em três domínios: o domínio barril-TIM ou  $(\alpha/\beta)_8$  (resíduos 1–359), o domínio  $\beta_1$  (resíduos 397–514) e o o domínio  $\beta_2$  (resíduos 545–647). Também foi possível determinar que a  $\beta$ -Galactosidase humana possui sete sítios de glicosilação, prováveis responsáveis pela secreção e proteção da enzima (Usui et al., 2011; Ohto et al., 2011).

Neste trabalho foram analisadas as estruturas das mutações p.Y36S, p.R38G, p.F63Y, p.Y64F, p.Q580R p.R590S e p.C626R, todas mutações novas identificadas em pacientes brasileiros com Gangliosidose GM1. Nenhuma das mutações analisadas afeta o sítio de ligação ou qualquer dos sítios de glicosilação da proteína. Foi possível observar que as mutações p.Y36S e p.R38G, presentes em pacientes com a forma infantil da doença, estão localizadas no domínio barril-TIM, mas na superfície da proteína. Mutações localizadas no domínio barril-TIM costumam ter efeitos bastante drásticos no fenótipo da doença por alterarem o sítio catalítico da enzima, em contrapartida, mutações na superfície da proteína apresentam efeito mais leve em decorrência de rearranjos de resíduos próximos (Ohto et al., 2011). Outro fator que pode contribuir para o fenótipo dos pacientes portadores destas mutações é o fato de eles serem heterozigotos compostos com a mutação c.1622-1627insG, que causa a forma infantil da doença.

As mutações p.F63Y e p.Y64F causaram a forma adulta da doença. Pela análise pelo programa PolyPhen 2, p.F63Y não causaria impacto sobre a estrutura da proteína, o que justifica o fato desta mutação estar em heterozigose com c.1622-1627insG, que causa a forma infantil da doença, entretanto o paciente apresenta a forma adulta da doença. Já p.Y64F se trata de uma mutação possivelmente danosa, mas não foi possível determinar o outro alelo causador da doença. As mutações p.Q580R, p.R590S estão

localizadas no interdomínio da proteína, o que normalmente acarreta em um fenótipo grave da doença. Isto ocorre pela desestabilização dos domínios, que leva a problemas na superfície de interação da  $\beta$ -galactosidase no complexo multienzima neuraminidase/catepsina (Ohto et al., 2011). Já p.C626R encontra-se no domínio  $\beta$ 2, na superfície da proteína.

Para confirmação destes dados estudos de expressão seriam necessários, mas por hora a determinação da estrutura da proteína mutante é de grande valia para compreensão dos efeitos biológicos causadores dos fenótipos encontrados em pacientes com Gangliosidose GM1.

O quarto estudo que compõe este trabalho trata do uso de novas terapias para o tratamento da Gangliosidose GM1. Apesar dos inúmeros esforços e avanços feitos no tratamento de doenças lisossômicas, a Gangliosidose GM1 não possui tratamento eficaz. Neste trabalho foram estudadas três alternativas terapêuticas de tratamento com o objetivo de superar as limitações dos tratamentos atuais.

O uso de antibióticos aminoglicosídicos têm se mostrado uma alternativa bastante interessante para mutações que geram códons de parada prematuros. A geneticina interage com a subunidade ribossomal 18S, alterando a tradução de forma que no lugar de códons de parada prematuros, seja incorporado outro aminoácido, permitindo que o mRNA seja transcrito até seu final (Clancy et al., 2007). Através deste processo, também denominado *stop codon read through*, é possível que uma proteína funcional seja formada. Diversos exemplos comprovam a eficiência deste tipo de terapia. Estudos *in vitro*, *in vivo* e ensaios clínicos mostram que a correta síntese de proteínas e a atividade de enzimas podem ser restauradas, mas os resultados são genótipo-dependentes (Wilschanski et al., 2000; Clancy et al., 2001; Pinotti et al., 2006; Sermet-Gaudelus et al., 2007). O cloranfenicol pertence à outra classe de antibióticos, que age sobre a enzima peptidil transferase prevenindo a formação de ligações peptídicas, e mostrou-se eficiente na restauração do fenótipo em mutantes com códons de parada prematuros para  $\beta$ -galactosidase (Thompson et al., 2002). Para Gangliosidose GM1, nenhum estudo utilizando antibióticos para *stop codon read through* foi realizado até o momento.

Outro tipo de terapia que vem ganhando destaque pelos bons resultados obtidos é o uso de chaperonas farmacológicas. As chaperonas farmacológicas

são capazes de estabilizar proteínas mal dobradas, permitindo que as mesmas sejam endereçadas corretamente e sejam ativas no interior dos lisossomos (Beck, 2010; Valenzano et al., 2011). Estudos recentes mostram que moléculas como a galactose e seus derivados possuem a capacidade de estabilizar a enzima  $\beta$ -galactosidase (Caciotti et al 2009).

Para a realização deste trabalho usamos como modelo de estudo os fibroblastos de um paciente homocigoto para c.1622-1627insG, que por se tratar da mutação mais comum para população brasileira, é de grande relevância. Foram avaliadas as respostas dos fibroblastos *in vitro* aos tratamentos com geneticina, cloranfenicol e galactose. Os tratamentos não mostraram resultados significativos na atividade enzimática do paciente analisado. Apesar da atividade enzimática não ter sido influenciada pelo tratamento, os níveis de mRNA do gene *GLB1* mostraram um claro aumento, apesar de não significativo. A falta de significância estatística provavelmente se deve ao fato de estarmos analisando a resposta em apenas um paciente.

Diversos fatores influenciam na resposta a terapia de tradução alternativa. Estudos mostram respostas variadas associadas com a identidade do códon de terminação e com o contexto da sequência, onde o *read through* seria inversamente proporcional a eficiência da terminação da tradução. O códon de terminação com maior eficiência de *read through* é UGA (Manuvakhov et al., 2000), casualmente o códon encontrado no paciente analisado neste trabalho. Outro fator limitante ao tratamento seria a influência dos nucleotídeos posteriores ao stop códon prematuro, com respostas que variam individualmente entre os pacientes (Linde et al., 2007; Linde & Kerem 2008).

Outro fator que deve ser levado em consideração é o decaimento do mRNA em decorrência de códons de parada prematuros (NMD). Este mecanismo é responsável pela acurácia da regulação da expressão gênica (Nicholson et al., 2010; Bhuvanagiri et al., 2010). A análise de mRNAs antes e depois do tratamento é um bom indicativo do potencial de cada paciente responder ao tratamento (Linde & Kerem 2008). Nos casos de NMD eficiente, os níveis de mRNA são reduzidos, entretanto, em nosso estudo podemos afirmar que o NMD do paciente é favorável para o uso das terapias testadas, visto que os níveis de mRNA aumentaram após os tratamentos mesmo que

não de forma significativa, destacando que pacientes com o mesmo genótipo podem responder de diferentes formas ao tratamento (Linde et al., 2007).

Esforços devem ser continuamente realizados na busca de novas terapias para doenças genéticas, pois apesar da grande heterogeneidade genética que muitas vezes representa uma barreira para os tratamentos, diversos compostos vêm sendo desenvolvidos como podemos observar no uso das chaperonas farmacológicas. Elas são hábeis a restaurar a atividade biológica de diversas proteínas causadoras de doenças humanas (Sawkar et al., 2005; Valenzano et al., 2011). Estes compostos possuem grande potencial por atravessar a barreira hemato-encefálica e mesmo pequenos aumentos (1,5 a 2 vezes) podem induzir a melhora clínica do paciente (Sawkar et al., 2002).

Até o momento, as terapias disponíveis para pacientes de Gangliosidose GM1, assim como para diversas outras doenças lisossômicas, restringem-se a terapias de suporte e tratamento das complicações, representando soluções paliativas de manutenção da vida dos pacientes. O avanço na habilidade de tratar doenças lisossômicas tem sido um grande passo nas últimas décadas, devido ao desenvolvimento de novas terapias, baseadas em novas moléculas e fármacos, em técnicas inovadoras e no advento do conhecimento das doenças genéticas.

Estudos de caracterização de doenças, assim como análises populacionais sempre contribuirão para a elucidação dos mecanismos causadores da doença, além de gerar maior entendimento sobre prognósticos. É de grande importância que esforços e recursos sejam destinados a descobertas a cerca de doenças genéticas que, além de atribuir qualidade de vida aos pacientes, possam representar um caminho para compreensão das doenças até então sem um completo entendimento e uma terapia eficaz.

## 5. CONCLUSÕES

### 5.1. Conclusão geral

A conclusão geral do primeiro estudo é que existe uma alta frequência de duas mutações comuns na população do sul do Brasil e não foi possível comprovar o efeito fundador através dos polimorfismos analisados. A conclusão do segundo estudo foi que 50% dos alelos analisados apresentam a mutação c.1622-1627insG, e a principal característica clínica observada entre os pacientes foi o atraso cognitivo. Através do terceiro estudo foi possível concluir que é possível estimar os efeitos biológicos de mutações através da bioinformática, e de diferentes formas, as mutações novas afetam a  $\beta$ -galactosidase, onde os dados clínicos por vezes corroboram com a modelagem tridimensional, e por vezes com o PolyPhen 2. O quarto estudo teve como conclusão geral que a geneticina, o cloranfenicol e a galactose não são capazes de aumentar a atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase.

### 5.2. Conclusões

#### Estudo 1

- As frequências de p.R59H e c.1622-1627insG entre os pacientes estudados foram de 19,2% e 38,5% respectivamente, com uma frequência combinada de 57,7% dos alelos causadores da doença.
- O polimorfismo p.R521C não foi encontrado entre os pacientes.
- Sete diferentes haplótipos foram identificados.
- c.1622-1627insG não estava em desequilíbrio de ligação com os polimorfismos analisados.
- A presença do haplótipo contendo p.R59H e p.S532G foi significativa ( $p < 0.001$ ).

- Foi confirmada a alta frequência das duas mutações comuns na população do sul do Brasil.

## Estudo 2

- Foi realizado diagnóstico molecular em 65 pacientes, dos quais 39 foram caracterizados clinicamente.

- Dezoito mutações foram identificadas entre os pacientes analisados, sete das quais são mutações novas.

- A mutação c.1622-1627insG foi encontrada em 50% dos alelos analisados.

-Os sintomas mais comuns observados entre os pacientes foram o atraso cognitivo, presente em 82% dos pacientes, e a hepatoesplenomegalia, presente em 56% dos pacientes.

- Foi possível estabelecer a correlação entre a idade de início dos sintomas anterior ao primeiro ano de vida e a presença da mutação c.1622-1627insG ( $p = 0.03$ ).

## Estudo 3

- Nenhuma das mutações novas analisadas afeta o sítio de ligação, nem os sítios de glicosilação da proteína. No entanto, os domínios barril-TIM e  $\beta 2$  são afetados.

- Quatro mutações analisadas estavam na região interdomínio da proteína, podendo desestabilizar a estrutura como um todo e sua interação com o complexo multienzima neuraminidase/catepsina.



- Três mutações estavam na superfície da proteína, o que provavelmente acarreta em um efeito mais leve da doença.

- Os achados através da análise tridimensional da proteína se correlacionaram com a análise *in silico*.

#### Estudo 4

- Fibroblastos de paciente com Gangliosidose GM1 foram tratados com geneticina, cloranfenicol ou galactose, porém a atividade enzimática da  $\beta$ -galactosidase não aumentou após os tratamentos.

- Apesar de se observar um aumento, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com geneticina ou cloranfenicol em relação à expressão gênica de *GLB1*.

- Através deste aumento, mesmo que não significativo da expressão gênica de *GLB1* após os tratamentos com geneticina e cloranfenicol, foi possível inferir que o mRNA não é alvo de NMD neste paciente.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bagshaw RD, Zhang S, Hinek A, Skomorowski MA, Whelan D, Clarke JT and Callahan JW (2002) Novel mutations (Asn 484 Lys, Thr 500 Ala, Gly 438 Glu) in Morquio B disease. *Biochim Biophys Acta* 1588:247-53.

Baker D & Sali A (2001) Protein structure prediction and structural genomics. *Science* 294:93-96.

Bansal AK (2005) Bioinformatics in microbial biotechnology – a mini review. *Microbial Cell Factories*. 4:19.

Beattie RM, Harvey D (1992) Extensive and unusual Mongolian blue spots in a child with GM1 gangliosidosis type one. *J Royal Soc Med* 85: 574-575.

Beck M (2010) Therapy for lysosomal storage disorders. *IUBMB Life*. 62:33-40.

Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*. 28:235–42.

Bhuvanagiri M, Schlitter AM, Hentze MW and Kulozik AE (2010) NMD: RNA biology meets human genetic medicine. *Biochem. J*. 430, 365–377.

Broekman MLD, Baek RC, Comer LA, Fernandez JL, Seyfried TN and Sena-Esteves M (2007) Complete Correction of Enzymatic Deficiency and Neurochemistry in the GM1-gangliosidosis Mouse Brain by Neonatal Adeno-associated Virus-mediated Gene Delivery. *Molecular Therapy* 15(1):30-37.

Brunetti-pierri N and Scaglia F (2008) *Molecular Genetics and Metabolism*. *Mol Genet Metab* 94: 391-396.

Caciotti A, Donati MA, d’Azzo A, Salvioli R, Guerrini R, Zammarchi E, Morrone A (2009) The potential action of galactose as a “chemical chaperone”: Increase of

beta galactosidase activity in fibroblasts from an adult GM1-gangliosidosis patient. *European journal of paediatric neurology* 13:160 – 164.

Caciotti A, Garman SC, Rivera-Colón Y et al (2011) GM1 gangliosidosis and Morquio B disease: An update on genetic alterations and clinical findings. *Biochimica et Biophysica Acta* 1812: 782–790.

Callahan JW (1999) Molecular basis of GM1 Gangliosidosis and Morquio disease type B. Structure-function studies of  $\beta$ -galactosidase and the nonlysosomal  $\beta$ -galactosidase-like protein. *Biochim Biophys Acta* 1445: 85-103.

Cartier, N. and Aubourg, P. (2008) Hematopoietic stem cell gene therapy in Hurler syndrome, globoid cell leukodystrophy, metachromatic leukodystrophy and X-adrenoleukodystrophy. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 10: 471–478.

Clancy JP, Bebok Z, Ruiz F, King C, Jones J, Walker L, Greer H, Hong J, Wing L, Macaluso M, Lyrene R, Sorscher EJ, Bedwell DM (2001) Evidence that systemic gentamicin suppresses premature stop mutations in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 163:1683–1692.

Clancy JP, Rowe SM, Bebok Z, et al (2007) No Detectable Improvements in Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator by Nasal Aminoglycosides in Patients with Cystic Fibrosis with Stop Mutations. *Am J Respir Cell Mol Biol* Vol 37: 57–66.

Coelho JC, Wajner M, Burin MG, Varga CR, Giugliani R (1997) Selective screening of 10,000 high-risk Brazilian patients for the detection errors of metabolism. *Eur J Pediatr* 156: 650–654.

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.

Desnick RJ, Schuchman EH (2002) Enzyme replacement and enhancement therapies: lessons from lysosomal disorders. *Rev Genet.* 3:954-66.

Culver K V & Blaese RM (1994) Gene therapy for cancer. *Trends Genet.* 10 : 174-178.

Elliot-Smith E., Speak AO, Lloyd-Evans E, Smith DA, van der Spoel AC, Jeyakumar M, Butters TD, Dwek RA, d'Azzo A, Platt FM (2008) Beneficial effects of substrate reduction therapy in a mouse model of GM1 gangliosidosis *Molecular Genetics and Metabolism* 94 204–211.

Fan JQ, Ishii S, Asano N, Suzuki Y (1999) Accelerated transport and maturation of lysosomal alpha-galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor. *Nat Med.* 5:112-5.

Fan JQ (2003) A contradictory treatment for lysosomal storage disorders: inhibitors enhance mutant enzyme activity. *Trends Pharmacol Sci.* 24:355-60.

Ficiocioglu C. (2008) Review of miglustat for clinical management in Gaucher disease type 1. *Ther. Clin. Risk Manag.* 4: 425–431.

Georgiou T, Stylianidou G, Anastasiadou V, Caciotti A, Campos Y, Zammarchi E, Morrone A, D'azzo A, Drousiotou A (2005) The Arg482His Mutation in the  $\alpha$ -Galactosidase Gene Is Responsible for a High Frequency of GM1 Gangliosidosis Carriers in a Cypriot Village. *Genetic Testing.* 9(2):126-132.

Giugliani R, Federhen A, Muñoz Rojas MV, Vieira TA, Artigalás O, Pinto LL, Azevedo AC, Acosta AX, Bomfim C, Lourenço CM, Kim CA, Horovitz D, Souza DB, Norato D, Marinho D, Palhares D, Santos ES, Ribeiro E, Valadares ER, Guarany F, De Lucca GR, Pimentel H, Souza IN, Corrêa Neto J, Fraga JC, Góes JE, Cabral JM, Simeonato J, Llerena JC Jr, Jardim LB, Giuliani Lde R, Silva LC, Santos M, Moreira MA, Kerstenetzky M, Ribeiro M, Ruas N, Barrios P, Aranda P, Honjo R, Boy R, Costa R, Souza CF, Alcântara FF, Avilla SG, Fagundes S, Martins AM (2010) Enzyme replacement therapy for

mucopolysaccharidoses I, II and VI: recommendations from a group of Brazilian F experts. *Rev Assoc Med Bras.* 56:271-7.

Hobbs JR, Hugh-Jones K, Barrett AJ et al (1981) Reversal of clinical features of Hurler's disease and biochemical improvement after treatment by bone-marrow transplantation. *Lancet.* 2: 709-12.

Hofer D, Paul K, Fantur K et al. 2009 GM1 gangliosidosis and Morquio B disease: expression analysis of missense mutations affecting the catalytic site of acid beta-galactosidase. *Hum Mutat.* 30(8):1214-21.

Hoogeveen AT, Graham-Kawashima H, d'Azzo A, Galjaard H (1984) Processing of human  $\beta$ -galactosidase in Gm1-gangliosidosis and Morquio B syndrome. *J Biol Chem* 259: 1974-1977.

Iwasaki H, Watanabe H, Iida M, Ogawa S, Tabe M, Higaki K, Nanba E, Suzuki Y (2006) Fibroblast screening for chaperone therapy in  $\beta$ -galactosidosis. *Brain & Development* 28: 482–486.

Jeyakumar M, Thomas R, Elliot-Smith E, Smith DA, van der Spoel AC, d'Azzo A, Hugh Perry V, Butters TD, Dwek RA, Platt FM (2003) Central nervous system inflammation is a hallmark of pathogenesis in mouse models of GM1 and GM2 gangliosidosis *Brain*, 126: 974–987.

Jeyakumar M, Dwek R A, Butters T D and Platt FM (2005) Storage solutions: treating lysosomal disorders of the brain. *Nature reviews.* 6:1-12.

Kasperzyk JL, d'Azzo A, Platt F M, Alroy J, and Seyfried TN (2005) Substrate reduction reduces gangliosides in postnatal cerebrum-brainstem and cerebellum in GM1gangliosidosis mice. *Journal of Lipid Research.* 46: 744-751.

Kaye EM, Ullman MD, Kolodny EH, Krivit W, Rischert JC (1992) Possible use of CSF glycosphingolipids for the diagnosis and therapeutic monitoring of lysosomal storage diseases. *Neurology.* 42: 2290–2294.

Krivit W (2004) Allogeneic stem cell transplantation for the treatment of lysosomal and peroxisomal metabolic diseases *Semin Immun* 26:119–132.

Lenicker HM, Agius PV, Young EP, Montalto SPA (1997) Infantile generalized GM1 gangliosidosis: High incidence in the Maltese Islands. *J Inher Metab Dis* 20: 723-724.

Linde L, Boelz S, Nissim-Rafinia M, et al (2007) Nonsense-mediated mRNA decay affects nonsense transcript levels and governs response of cystic fibrosis patients to gentamicin. *The Journal of Clinical Investigation*. 117:683–692.

Linde L and Kerem B (2008) Introducing sense into nonsense in treatments of human genetic diseases. *Trends in Genetics* 24(11): 552-563.

Lyon G, Adams RD, Kolodny EH. Early infantile progressive metabolic encephalopathies: clinical problems and diagnostic considerations. In Lyon G, *Neurology of hereditary metabolic diseases of children*. 2.Ed. New York, Mc Graw-Hill, 1996:44-123.

Manuvakhova M, Keeling K and Bedwell D M (2000) Aminoglycoside antibiotics mediate context-dependent suppression of termination codons in a mammalian translation system. *RNA*. 6: 1044-1055.

Matsuda J, Suzuki O, Oshima A, Yamamoto Y, Noguchi A, Takimoto K, Itoh M, Matsuzaki Y., Yasuda Y, Ogawa S, Sakata Y, Nanba E, Higaki K, Ogawa Y, Tominaga L, Ohno K, Iwasaki H, Watanabe H, Brady RO, and Suzuki Y (2003). Chemical chaperone therapy for brain pathology in GM1- gangliosidosis. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA*. 100: 15912–15917.

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

Morita M, Saito S, Ikeda K, Ohno K, Sugawara K, Suzuki T, Togawa T, Sakuraba H (2009) Structural bases of GM1 gangliosidosis and Morquio B disease. *Journal of Human Genetics* 54: 510–515.

Morreau H, Galjart NJ, Gillemans N, Willemsen R, van der Horst GT, d'Azzo A (1989) Alternative splicing of beta-galactosidase mRNA generates the classic lysosomal enzyme and a beta-galactosidase-related protein. *J Biol Chem* 264: 20655-20663.

Morrone A, Bardelli T, Donati MA, Giorgi M, Di Rocco M, Gatti R, Parini R, Ricci R, Taddeucci G, D'Azzo A, et al. (2000)  $\beta$ -galactosidase gene mutation affecting the lysosomal enzyme and the elastin-binding protein in GM1 Gangliosidosis patients with cardiac involvement. *Hum Mut* 15: 354-366.

Muthane U, Chickabasaviah Y, Kaneski C, Shankar SK, Narayanappa G, Christopher R, Govindappa SS (2004) Clinical features of adult GM1 gangliosidosis: report of three Indian patients and review of 40 cases, *Mov. Disord.* 19: 1334–1341.

Nardi NB, Teixeira LAK, Silva EFA (2002) Terapia Gênica. *Ciência & Saúde coletiva.* 7:109-116.

Navarro, JD, Niranjana V, Peri S, Jonnalagadda CK and Pandey A (2003) From biological databases to platforms for biomedical discovery. *Trends Biotechnol.* 21: 263–268.

Nicholson P, Yepiskoposyan H, Metzger S, Orozco RZ, Kleinschmidt N, Mühlemann O (2010) Nonsense-mediated mRNA decay in human cells: mechanistic insights, functions beyond quality control and the double-life of NMD factors. *Cell. Mol. Life Sci.* 67:677–700.

O'Brien JS, Gugler E, Giedion A, Weismann R, Herschkowitz N, Meier C and Leroy JG (1976) Spondyloepiphyseal dysplasia, corneal clouding, normal intelligence and acid beta-galactosidase deficiency. *Clin Genet* 9: 495-504.

Ohto U, Usui K, Ochi T, Yuki K, Satow Y and Shimizu T (2012) Crystal Structure of Human  $\beta$ -Galactosidase: Structural basis of  $G_{M1}$  Gangliosidosis and Morquio B disease *J. Biol. Chem.* 287:1801-1812.

Oshima A, Itoh K, Nagao Y, Sakuraba H and Suzuki Y (1990). Beta-galactosidase-deficient human fibroblasts: uptake and processing of the exogenous precursor enzyme expressed by stable transformant COS cells. *Hum Genet* 85:505-8.

Okumiya T, Sakuraba H, Kase R and Sugiura T (2003) Imbalanced substrate specificity of mutant  $\beta$ -galactosidase in patients with Morquio B disease. *Molecular Genetics and Metabolism.* 78: 51–58.

Paschke E, Milos I, Kreimer-Erlacher H, Hoefler G, Beck M, Hoeltzenbein M, Kleijer W, Levade T, Michelakakis H and Radeva B (2001) Mutation analyses in 17 patients with deficiency in acid  $\beta$ -galactosidase: three novel point mutations and high correlation of mutation W273L with Morquio disease type B. *Hum Genet* 109: 159-166.

Peri S, Navarro D, Amanchy R et al. (2003) Development of Human Protein Reference Database as an Initial Platform for Approaching Systems Biology in Humans Genome Research. 13:2363–2371.

Peters C & Steward C G (2003) Hematopoietic cell transplantation for inherited metabolic diseases: an overview of outcomes and practice guidelines. *Bone Marrow Transplant.* 31:229–239.

Pinotti M, Rizzotto L, Pinto P, et al (2006) Intracellular readthrough of nonsense mutations by aminoglycosides in coagulation factor VII *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4: 1308–1314.



Pshezhetsky A V and M Ashmarina (2001) Lysosomal multienzyme complex: biochemistry, genetics, and molecular pathophysiology. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 69: 81–114.

Risch N, Tang H, Katzenstein H, Ekstein J (2003) Geographic Distribution of Disease Mutations in the Ashkenazi Jewish Population Supports Genetic Drift over Selection. *Am J Hum Genet* 72: 812–822.

Sands MS & Davidson BL (2006) Gene therapy for lysosomal storage diseases. *Mol. Ther.* 13, 839–849.

Santamaria RA, Chaba's A, Coll MJ, Miranda CS, Vilageliu L and Grinberg D (2006) Twenty-one novel mutations in the GLB1 gene identified in a large group of GM1-gangliosidosis and Morquio B patients: possible common origin for the prevalent p.R59H mutation among gypsies. *Hum Mutat* 27: 1060.

Santamaria R, Blanco M, Chabas A, Grinberg D, Vilageliu L (2007) Identification of 14 novel GLB1 mutations, including five deletions, in 19 patients with GM1 gangliosidosis from *South America*. *Clin Genet* 71: 273-279.

Sawkar AR, Adamski-Werner SL, Cheng WC, Wong CH, Beutler E, Zimmer KP, Kelly JW (2005) Gaucher disease-associated glucocerebrosidases show mutation-dependent chemical chaperoning profiles. *Chem Biol.* 12:1235-44.

Schlünzen F, Zarivach R, Harms J, Bashan A, Tocilj A, Albrecht R, Yonath A, Franceschi F. (2001) Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature.* 413:814-21.

Sermet-Gaudelus I, Renouil M, Fajac A (2007) *In vitro* prediction of stop-codon suppression by intravenous gentamicin in patients with cystic fibrosis: a pilot study. *BMC Medicine.* 5:5.

Severini MH, Silva CMD, Sopelsa A, Coelho J, Giugliani R (1999) High frequency of type 1 GM1 Gangliosidosis in Southern Brazil. *Clin Genet* 56: 168-169.

Silva CMD, Severini MH, Sopelsa A et al (1999) Six novel  $\beta$ -galactosidase gene mutations in Brazilian patients with GM1-gangliosidosis. *Hum Mut* 13: 401-409.

Sinigerska I, Chandler D, Vaghjiani V et al (2006) Founder mutation causing infantile GM1-gangliosidosis in the Gypsy population. *Mol Genet Metab* 88: 93-95.

Suzuki Y, Oshima A, Namba E.  $\beta$ -Galactosidase deficiency ( $\beta$ -galactosidosis). GM1 gangliosidosis and Morquio B disease. 8th ed. Scriver CR Beaudet AL Sly WS Valle D Childs B Kinzler KW Vogelstein B eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease* 2001;Vol 3:3775-3809 McGraw-Hill New York.

Takano T, Yamanouchi Y (1993) Assignment of human beta-galactosidase-A gene to. 3p21.33 by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 92: 403–404.

Takaura N, Yagi T, Maeda M, Nanba E, Oshima A, Suzuki Y, Yamano T and Tanaka A (2003) Attenuation of ganglioside GM1 accumulation in the brain of GM1 Gangliosidosis mice by neonatal intravenous gene transfer *Gene Therapy*10, 1487–1493.

Thompson J, O'Connor M, Mills JA, Dahlberg AE (2002) The protein synthesis inhibitors, oxazolidinones and chloramphenicol, cause extensive translational inaccuracy in vivo. *J Mol Biol*322:273-9.

Usui K, Ohto U, Ochi T, Shimizu T and Satow Y (2012) Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of human  $\beta$ -galactosidase. *Acta Cryst. F*68: 73–77

Valenzano KJ, Khanna R, Powe AC, Boyd Jr, Lee G, Flanagan JJ and Benjamin ER (2011) Identification and Characterization of Pharmacological Chaperones to Correct Enzyme Deficiencies in Lysosomal Storage Disorders. *Assay and Drug Development Technologies*. 9:213-235.

Vellodi A (2005) Lysosomal storage disorders. *Br J Haematol.* 128 (4): 413–431.

Voorn JP, Kamphorst W, van der Knaap MS, Powers JM (2004) The leukoencephalopathy of infantile GM1 gangliosidosis: oligodendrocytic loss and axonal dysfunction *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 107: 539–545.

Wilschanski M, Yahav Y, Yaacov Y, Blau H, Bentur L, Rivlin J, Aviram M, Bdolah-Abram T, Bebok Z, Shushi L, Kerem B, Kerem E (2003) Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations. *N Engl J Med.* 349:1433-41.

Whisstock JC & Lesk AM (2003) Prediction of protein function from protein sequence and structure. *Q Rev Biophysics.* 36(3):307-340.

Wynn R (2011) Stem Cell Transplantation in Inherited Metabolic Disorders. *Hematology.* 1: 285-291.

Yang X, Jiao R, Yang L, Wu LP, Li YR, Wang J (2011) New-generation high-throughput technologies based 'omics' research strategy in human disease. *Yi Chuan.* 33(8):829-46.